

## ***AGRADECIMENTOS***

Quero agradecer e destacar a excelente orientação do Professor Doutor Jorge Canhoto. Foi um trabalho de investigação realmente estimulante e gratificante, em muito se devendo a si. Um muito obrigado.

Ao Dr. João Pratas pela oportunidade que me deu e por ser Co-orientador deste trabalho.

Um obrigado muito especial á Dra Ludovina, sem dúvida a alma do laboratório de Botânica. Fico muito feliz por ter tido o prazer de trabalhar consigo. Aproveito e desejo-lhe as maiores felicidades.

Um obrigado á Dona Eulália, foi sempre de uma grande generosidade e simpatia.

Á Dra Ana Paula Mesquita pela disponibilidade demonstrada para a realização de análises em SEM-EDS.

À Dra Filomena Gomes pelas tardes de estatística passadas a aturar-me.

Ao Dr.Dias, pela ajuda na Microscopia.

A toda a minha Família, aos meus amigos, que sempre estiveram para me apoiar.

Ao Bruno pela preciosa ajuda.

À Cláudia pelo interesse, motivação, acompanhamento e ajuda em todo o trabalho realizado.

A todos quantos me ajudaram e não referi, um muito obrigado.

## **RESUMO**

*Fontinalis antipyretica* e *F. squamosa* são dois musgos aquáticos que crescem submersos em pequenos cursos de água. Foram recolhidos exemplares de ambas as espécies num ribeiro na região centro de Portugal e levadas para o laboratório, onde foram realizados ensaios para obtenção de culturas assépticas. Os resultados mostraram que um tratamento de hipoclorito de cálcio 5% por 3 min. obteve a melhor taxa de esterilização sem efeitos nocivos. Melhores resultados para o estabelecimento de plantas foram obtidos numa solução de Knop modificada, contendo os micronutrientes do meio MS e o Fe do meio MS reduzido a meia força. Uma vez obtido o material vegetal suficiente, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de benziladenina (0,5-4,0 mg.L<sup>-1</sup>) no crescimento das plantas. Os resultados mostraram que a BA tem um efeito inibitório sobre o crescimento da planta já que em todas as concentrações testadas o comprimento dos explantes foi menor do que o observado no controle (meio sem reguladores de crescimento). Após essas experiências testou-se a capacidade de crescimento de ambas as espécies na presença de ouro, adicionado ao meio de cultura como tetracloroaurato de sódio (III) hidratado (NaAuCl<sub>4</sub>), em concentrações que variam de 0,5 a 20 µM. Os resultados indicaram que *Fontinalis antipyretica* mostrou uma taxa de crescimento similar ao controle no meio contendo até 3,75 µM. Concentrações mais elevadas prejudicaram o crescimento das plantas. *Fontinalis squamosa* apresentou melhor adaptação às concentrações mais elevadas. Também fizemos estudos semelhantes com antimónio, arsénio e prata, elementos frequentemente associados ao ouro com os mesmos intervalos de concentrações. Experiências feitas em aquário durante 30 dias, testaram o comportamento de acumulação das plantas na presença de iodeto de ouro (AuI), cianeto de ouro (AuCN), tetracloroaurato de sódio hidratado (III) (NaAuCl<sub>4</sub>), tartarato de antimónio (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>7</sub>Sb.Na), trióxido de arsénio (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) em três concentrações diferentes. Os resultados obtidos pela técnica de Espectrometria de Absorção Atómica em Câmara de Grafite (GF-AAS), parecem indicar que ambas as plantas são bioabsorventes adequados para ouro, prata e antimónio. Melhores resultados foram obtidos com solução de iodeto. Análises de microscopia não foram conclusivas para entender como os tecidos interagem com o metal.

**Palavras-Chave:** *Fontinalis antipyretica* Hedw; *Fontinalis squamosa* Hedw; Au; bioacumulação; culturas *in vitro*.

## ***ABSTRACT***

*Fontinalis antipyretica* and *F. squamosa* are two water mosses growing underwater in small water courses. Stems of both species were collected in a brook in the centre region of Portugal and brought to the laboratory where attempts to obtain aseptic cultures were performed. The results showed that a 5% calcium hypochlorite treatment for 3 min. gave the best rate of sterilization without harmful effects. Best results for plant establishment were achieved in a Knop modified solution containing the minor salts of the MS medium and the Fe of the MS medium reduced at half strength. Once enough plant material was obtained the effect of different concentrations of the benzyladenine ( $0.5 - 4.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ) on plant growth was evaluated. The results showed that BA has an inhibitory effect on plant growth since in all the concentrations tested shoot length was lower than that observed in the control (medium without plant growth regulators). Following these experiments we have tested the ability of both species to growth in the presence of gold added to the growth medium as sodium tetrachloroaurate (III) hydrate ( $\text{NaAuCl}_4$ ) in concentrations ranging from 0,5 to 20  $\mu\text{M}$ . The results indicated that *Fontinalis antipyretica* showed a growth rate similar to the control on media containing until 3.75  $\mu\text{M}$ . Higher concentrations impaired plant growth. *Fontinalis squamosa* showed better adaptation to higher concentrations. We also made similar studies with elements often associated with gold, arsenic, antimony and silver with the same concentrations range. Experiments made in aquarium over 30 days tested the accumulation behavior of the plants in the presence of gold iodide ( $\text{AuI}$ ), gold cyanide ( $\text{AuCN}$ ), sodium tetrachloroaurate (III) hydrate ( $\text{NaAuCl}_4$ ), antimonium tartaricum ( $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_7\text{Sb.Na}$ ), arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) and silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) in three different concentrations. The results obtained with GF-AAS (Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry) technique seem to indicate that both plants are suitable biosorbents for gold, silver and antimony. Better results were obtained with iodide solution. Microscopy analyses were not conclusive to understand how the tissues cope with the metal.

**Key-Words:** *Fontinalis antipyretica* Hedw; *Fontinalis squamosa* Hedw ; Au ; bio accumulation ; in vitro cultures

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	6
1.1 MACRÓFITAS .....	7
1.2 FONTINALIS .....	8
1.3 CULTURA <i>IN VITRO</i> .....	12
1.4 CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS.....	13
1.4.1 OURO .....	13
1.4.2 ARSÊNIO.....	17
1.4.3 ANTIMÓNIO.....	18
1.4.4 PRATA.....	20
1.5 HIPERACUMULAÇÃO FITORREMEDIAÇÃO FITOMINERAÇÃO.....	21
1.6 TESTES TOXICOLÓGICOS .....	24
1.7 USO DE MACRÓFITAS EM FITORREMEDIAÇÃO E TESTES TOXICOLÓGICOS	25
1.8 OBJECTIVOS.....	27
<b>2 Materiais e Métodos</b> .....	28
2.1 Material Vegetal:.....	28
2.1.1 Localização.....	28
2.1.2 Esterilização .....	28
2.1.3 Meios usados.....	29
2.1.4 Biomassa .....	30
2.2 Efeito da benziladenina no crescimento de <i>Fontinalis</i> .....	30
2.3 Testes de Toxicidade.....	30
2.3.1 As ; Sb e Ag .....	32
2.3.2 pH.....	32
2.3.3 Manutenção do material vegetal.....	32
2.3.4 Apresentação dos resultados .....	33
2.4 Testes em aquário.....	34
2.5 Quantificação Química.....	36
2.5.1 Quantificação de Ouro .....	36
2.5.2 Quantificação de As, Sb e Ag .....	37
2.5.3 Apresentação dos resultados .....	37
2.6 Microscopia:.....	38
2.7 Análise Estatística .....	39

3	Resultados .....	40
3.1	Esterilização do material vegetal.....	40
3.2	Efeito dos meios no estabelecimento das culturas .....	41
3.3	Biomassa .....	41
3.4	Efeito da benziladenina no crescimento de <i>Fontinalis</i> .....	42
3.4.1	Fontinalis antipyretica.....	42
3.5	Testes de Toxicidade.....	43
3.5.1	Ouro.....	43
3.5.2	Arsénio .....	50
3.5.3	Antimónio (Sb).....	54
3.5.4	Prata (Ag).....	56
3.5.5	pH.....	60
3.6	Acumulação de Metais .....	60
3.6.1	Ouro.....	60
3.6.2	Arsénio .....	63
3.6.3	Antimónio.....	64
3.6.4	Prata.....	66
3.7	Estudos Estruturais.....	68
3.7.1	Microscopia óptica .....	68
3.7.2	SEM-EDS.....	71
4	Discussão.....	73
4.1	Esterilização e meios de cultura usados: .....	73
4.1.1	BA .....	74
4.2	Testes de Toxicidade.....	75
4.3	Estudos de microscopia.....	76
4.4	Acumulação de metais .....	77
5	Conclusão e Trabalhos Futuros .....	78
6	Anexos.....	84

## Índice de figuras

Figura 1 – Fotografia da contaminação por escorrência de águas provenientes de drenagem ácida de galerias mineiras na região de Jales (à esquerda) e de Valongo (à direita).....	6
Figura 2 – Fotografias de <i>F.antipyretica</i> no ambiente natural (à esquerda) e crescida em laboratório (à direita).....	8
Figura 3 – Fotografias de <i>F.squamosa</i> no ambiente natural .....	8
Figura 4 - Diagrama Eh– pH para o sistema químico Au–CN–H <sub>2</sub> O a 25°C (Trindade e Filho, 2002). .....	15
Figura 5 – Diagrama Eh – pH para o sistema químico Au–Cl–H <sub>2</sub> O a 25°C (Trindade e Filho, 2002). .....	16
Figura 6 – Diagrama Eh – pH para o sistema químico Au–I–H <sub>2</sub> O a 25°C (Trindade e Filho, 2002).	16
Figura 7 – Evolução do peso fresco <i>F. antipyretica</i> cultivada durante 60 dias em solução de Knop. .....	41
Figura 8 – Efeito da benziladenina (BA) na cultura in vitro de <i>F. Antipyretica</i> . A) crescimento total (figura da esquerda) e respectivo índice de crescimento (ICRE, figura da direita); B) n° gemas formadas e respectivo ICRE. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. [BA] em mg.L <sup>-1</sup> .....	42
Figura 9 – Formação de estruturas nodosas em culturas de <i>F. antipyretica</i> em meio com 5,0 µM de Au. Ampliação: 2,8x. ....	44
Figura 10 – A) crescimento de <i>F. antipyretica</i> em função do tempo e de diferentes concentrações de Au. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativa (p < 0,005); B) índices de crescimento, em que valores inferiores a 0,5 indicam inibição crescimento em relação ao controlo acima dos 50%. [Au] em µM.....	44
Figura 11 – Resultados do 2º teste com Au. A) crescimento do explante principal; B) n° de novas gemas; C) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( p < 0,05). [Au] em µM. ....	45
Figura 12 – <i>F. antipyretica</i> após 30 dias de cultura no segundo ensaio com Au. Do lado esquerdo com [Au]=3,75 µM e do lado direito dois explantes nas condições controlo. Escala em cm. .	46
Figura 13 – Resultados do 2º teste com Au. A) crescimento explante principal; B) crescimento total; C) n° novas gemas e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas (p < 0,05). [Au] em µM. ....	47
Figura 14 – Resultados do 3º teste com Au. A) n° novas gemas; B) crescimento total e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (p < 0,05). [Au] em µM. ....	49
Figura 15 – Aspecto de explantes de <i>F. squamosa</i> após 30 dias de cultura. Do lado esquerdo, controlo, ao centro com [Au]=3,75 µM de Au e, do lado direito, um explante em meio com 20µM de Au. Escala em cm. ....	49
Figura 16 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> na presença de uma solução de As. A) crescimento explante principal; B) n° de novas gemas; C) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (p < 0,05). [As] em µM. ....	51
Figura 17 – <i>F. antipyretica</i> exposta a 20µM de As durante 30 dias. À esquerda um grande número de ramificações não desenvolvidas e, á direita, são visíveis alterações morfológicas do crescimento lateral. Escala em cm. ....	52
Figura 18 – <i>F. squamosa</i> exposta a concentrações de As durante 30 dias: A) crescimento total; B) n° gemas novas; C) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( p < 0,05). [As] em µM.....	53
Figura 19 – Explantes de <i>F. squamosa</i> exposta a soluções de As durante 90 dias. À esquerda para concentrações de As de 0,5 µM e à direita de 5,0 µM. Escala em cm. ....	53
Figura 20 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> na presença de uma solução de Sb: A) crescimento explante principal; B) n° de novas gemas; C) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (p < 0,05). [Sb] em µM.....	55

Figura 21 – <i>F. squamosa</i> exposta a concentrações de antimónio durante 60 dias. A) nº gemas novas; B) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas para ( $p < 0,05$ ). [Sb] em $\mu\text{M}$ . .....	56
Figura 22 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> na presença de uma solução de Ag. A) crescimento explante principal; B) número de gemas novas; C) crescimento lateral; D) crescimento total e os índices de crescimento ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). [Ag] em $\mu\text{M}$ . .....	57
Figura 23 – À esquerda <i>F. antipyretica</i> com 20 $\mu\text{M}$ Ag. À direita <i>F. squamosa</i> com 20 $\mu\text{M}$ de Ag. Escala em cm.....	58
Figura 24 – <i>F. squamosa</i> exposta a concentrações de Ag durante 60 dias. A) crescimento explante principal; B) nº gemas novas; C) crescimento lateral; D) crescimento total e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). [Ag] em $\mu\text{M}$ . .....	59
Figura 25 – A) explantes de <i>F. antipyretica</i> ; B) explantes de <i>F. squamosa</i> e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).....	60
Figura 26 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> (a verde) e <i>F. squamosa</i> (a vermelho) expostas a diferentes soluções auríferas. A) AuI [Au] <sub>i</sub> = 0,05mg.kg <sup>-1</sup> ; B) AuCl [Au] <sub>i</sub> = 0,03 mg.kg <sup>-1</sup> ; C) AuCN [Au] <sub>i</sub> = 0,05 mg.kg <sup>-1</sup> . .....	61
Figura 27 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> (a verde) e <i>F. squamosa</i> (a vermelho) expostas a diferentes soluções auríferas. A) AuI [Au] <sub>i</sub> = 0,75mg.L <sup>-1</sup> ; B) AuCl [Au] <sub>i</sub> = 0,55 mg.L <sup>-1</sup> ; C) AuCN [Au] <sub>i</sub> = 0,75 mg.L <sup>-1</sup> . .....	62
Figura 28 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> (a verde) e <i>F. squamosa</i> (a vermelho) expostas a diferentes soluções auríferas. A) AuI [Au] <sub>i</sub> = 4,0mg.L <sup>-1</sup> ; B) AuCl [Au] <sub>i</sub> = 2,9 mg.L <sup>-1</sup> ; C) AuCN [Au] <sub>i</sub> = 4,0 mg.L <sup>-1</sup> . .....	63
Figura 29 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> (a verde) e <i>F. squamosa</i> (a vermelho) expostas a soluções As com diferentes concentrações iniciais. A) [As] <sub>i</sub> = 0,025mg.L <sup>-1</sup> ; B) [As] <sub>i</sub> = 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ; C) [As] <sub>i</sub> = 2,5 mg.L <sup>-1</sup> . .....	64
Figura 30 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> (verde) e <i>F. squamosa</i> (vermelha) expostas a soluções de antimónio com diferentes concentrações iniciais. A) [Sb] <sub>i</sub> = 0,025 mg.L <sup>-1</sup> ; B) [Sb] <sub>i</sub> = 1,0 mg.L <sup>-1</sup> ; C) [Sb] <sub>i</sub> = 2,5 mg.L <sup>-1</sup> . .....	65
Figura 31 – Ensaio com <i>F. antipyretica</i> (a verde) e <i>F. squamosa</i> (a vermelho) expostas a soluções de Ag com diferentes concentrações iniciais. A) [Ag] <sub>i</sub> = 0,005 mg.L <sup>-1</sup> ; B) [Ag] <sub>i</sub> = 0,5 mg.L <sup>-1</sup> ; C) [Ag] <sub>i</sub> = 1,5 mg.L <sup>-1</sup> . .....	67
Figura 32 – Secções transversais de caulóides de <i>F. antipyretica</i> expostos a diferentes concentrações de Au coradas com azul toluidina, observadas ao microscópio óptico com ampliação de 40x: A) controlo; B) caulóide exposto a uma concentração de 0,5 $\mu\text{M}$ de Au. ..	69
Figura 33 – Secções transversais de filóides de <i>F. antipyretica</i> expostos a diferentes concentrações de Au coradas com azul toluidina, observadas ao microscópio óptico com ampliação de 40x: A) filóide exposto a uma concentração de 0,5 $\mu\text{M}$ de Au; B) controlo. ....	69
Figura 34 – Células de filóide de <i>F. antipyretica</i> na presença de 5 $\mu\text{M}$ de Au observadas em microscopia electrónica, com ampliação de 5000x: 1) partículas electronodensas na parede celular. ....	70
Figura 35 – Células de um filóide de <i>F. antipyretica</i> expostas a uma concentração de 5 $\mu\text{M}$ de Au observadas por TEM com ampliação de 8000x: 1) núcleo; 2) vacúolo; 3) parede celular; 4) cloroplasto; 5) mitocôndrias. ....	70
Figura 36 – Fotografias obtidas em microscopia electrónica de varrimento de <i>F. squamosa</i> : A) filóides; B) superfície de um filóide; C) caulóides; D) corte de caulóide. ....	71
Figura 37 – Análise da composição química de uma amostra de <i>F. squamosa</i> , destacando-se a presença de ósmio: A) caulóides; B) filóides; 1) carbono; 2) oxigénio; 3) ósmio. ....	72

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Meios usados em tentativas de crescimento do material vegetal .....	29
Tabela 2 - Resumo dos ensaios efectuados com $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	31
Tabela 3 - Ensaios efectuados com As, Sb e Ag para ambas as espécies e só para <i>F. antipyretica</i> (Fa) .....	32
Tabela 4 - Elementos químicos presentes nos 19 aquários da experiência com <i>Fontinalis antipyretica</i> e <i>Fontinalis squamosa</i> , durante 30 dias .....	35
Tabela 5 - Condições experimentais de pH e Eh no início e no final da experiência. ....	35
Tabela 6 - Efeito da esterilização na sobrevivência de explantes de <i>F.s antipyretica</i> inoculados <i>in vitro</i> (n=não; s=sim) .....	40
Tabela 7- Valores das médias com erro padrão obtidas aos 60 dias do ensaio com <i>Fontinalis antypiretica</i> . ....	46
Tabela 8 - Cálculo estimativo da % recuperação de Au na análise das águas dos aquários. ....	68



## 1. INTRODUÇÃO

Actualmente, a contaminação do meio ambiente por metais pesados é um assunto que tem vindo a preocupar cada vez mais a comunidade científica e as diferentes sociedades.

A evolução da Humanidade, com o conseqüente aumento de exigências e necessidades, levou a uma sobreexploração de recursos naturais bem como a um processo de industrialização extremamente intensivo um pouco por toda a parte. Este fenómeno acarreta problemas ao nível da contaminação dos ecossistemas, fenómeno agravado pela perda contínua da capacidade de resposta destes às alterações provocadas pelo Homem.

No caso concreto dos ecossistemas aquáticos surge como premente a necessidade de se desenvolverem estratégias de remediação e monitorização da contaminação, provocada por fontes antropogénicas, tais como: actividade mineira e conseqüente drenagem ácida das minas, actividade industrial e deposição de resíduos (Figura 1).

Neste sentido, cada vez mais organismos estão a ser aplicados no domínio da monitorização e da biorremediação, sendo de destacar o incremento da utilização de plantas macrófitas aquáticas com essa finalidade.



Figura 1 – Fotografia da contaminação por escorrência de águas provenientes de drenagem ácida de galerias mineiras na região de Jales (à esquerda) e de Valongo (à direita).

## 1.1 MACRÓFITAS

A designação "macrófita aquática" engloba todas as formas de vegetação macroscópica aquática e inclui as macroalgas, musgos e fetos adaptados ao ambiente aquático, bem como as angiospérmicas (Wetzel, 1983). No entanto, Horne e Goldman (1994) apresentaram uma definição mais abrangente, considerando que macrófita aquática refere toda a vegetação que cresce nos cursos de água ou junto das suas margens, englobando as briófitas, macroalgas, pteridófitas e angiospérmicas. Quanto ao seu sistema de fixação, as macrófitas aquáticas podem ser flutuantes ou fixas ao sedimento, subdividindo-se estas últimas em emergentes, flutuantes e submergentes.

Na estrutura do ecossistema as macrófitas aquáticas ocupam um lugar de destaque pois desempenham funções vitais importantes na base do ecossistema. Além de serem as principais responsáveis pela produção primária de alimento nos ecossistemas (base da cadeia alimentar), são também habitat por excelência para vários organismos aquáticos, tais como micróbios, invertebrados e peixes, e substrato necessário à instalação de novas comunidades de plantas ou algas, facto importante para a manutenção e equilíbrio do ecossistema. As macrófitas aquáticas são os principais mobilizadores de nutrientes do sedimento para a coluna de água e responsáveis pela renovação e manutenção dos níveis de gases, tanto na coluna de água como nos próprios sedimentos.

Embora as macrófitas aquáticas tenham sido durante muito tempo ignoradas no que diz respeito à sua capacidade de fornecer indicações precisas sobre parâmetros importantes de avaliação da qualidade ambiental do ecossistema em que se encontram, actualmente têm sido muito utilizadas em testes toxicológicos e experiências de monitorização de poluentes; em especial metais pesados e compostos químicos de elevada toxicidade, provenientes de processos de drenagem ácida de minas e escombreliras em regiões que estão a ser ou foram exploradas para a obtenção de minérios, lixiviação de solos onde foram utilizados pesticidas, descargas de efluentes industriais, e que atingem cada vez mais os cursos de água.

## 1.2 FONTINALIS

Nas macrófitas aquáticas estão incluídas as plantas pertencentes ao filo das Briófitas, que engloba, entre outras, a classe dos musgos, na qual se insere a família Fontinalaceae. A esta família de plantas pertencem as espécies *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw (Figura 2) e *Fontinalis squamosa* Hedw (Figura 3).



Figura 2 – Fotografias de *F.antipyretica* no ambiente natural (à esquerda) e crescida em laboratório (à direita).



Figura 3 – Fotografias de *F.squamosa* no ambiente natural

Fontinalaceae é uma pequena família de musgos aquáticos típicos de cursos de água doce oligotrófica, subdivide-se em 3 géneros e engloba cerca de 20 espécies diferentes de musgos, geograficamente distribuídos por todo o Hemisfério Norte e com especial incidência na Europa (Mouvet, 1984; Siebert *et al.*, 1996, Cenci, 2000). Em Portugal, em

especial na zona centro, fazem parte das espécies mais representativas das macrófitas aquáticas (Pratas *et al.*, 2010).

Típicos de ambientes húmidos e sombrios, os exemplares de *Fontinalis* são frequentemente encontrados nos cursos de água doce pouco profundos, crescendo agarrados pelos seus rizóides ao substrato rochoso do leito ou nas margens, onde as oscilações do nível da água os deixa submersos durante parte do ano. São extremamente dependentes das condições do meio para viverem e resistentes a adversidades como as oscilações na velocidade das correntes nos cursos de água e períodos de ausência de água. Glime and Knoop (1986) verificaram, por exemplo, que em culturas de *F. squamosa* que haviam previamente secado, a adição de água provocou um “inchaço” no protenema e a reactivação deste.

As espécies de *fontinalis* caracterizam-se pela sua morfologia endostómica (peristoma) pouco comum. O endostoma nesta espécie de musgos é composto por um conjunto de 16 filóides verticais dispostos radialmente, ligados entre si por filamentos horizontais, formando uma estrutura em rede, exclusiva desta espécie. Apresentam-se como plantas de pequeno porte e com estrutura simples, cujo gametófito é constituído por caulóides e filóides e não possuem sistema vascular, facto que restringe o seu crescimento somente a locais húmidos.

A sua reprodução/ciclo de vida alterna entre duas gerações bem distintas: a geração gametófito (haplóide, sexuada) dominante, mas que não é capaz de originar uma planta independente, e a geração esporófito (diplóide). A alternância de gerações ocorre consoante as condições do meio em que a planta se encontra.

A fase gametófito caracteriza-se pelo desenvolvimento dos órgãos responsáveis pela reprodução sexuada. Os órgãos masculinos, anterídios, originam anterozóides móveis que necessitam de uma camada de água para atingirem os gâmetas femininos, oosferas, que permanecem no arquegónio. Quando ocorre a fertilização inicia-se uma nova fase, correspondente à geração esporófito, com o desenvolvimento do esporófito que amadurece e é constituído por uma cápsula e uma seda que permanece ligada à planta-mãe. Na cápsula, dá-se a formação dos esporos, por divisão meiótica, ocorrendo a sua dispersão por acção do vento e da água. A libertação dos esporos dá-se por ruptura da cápsula ou através de uma estrutura especializada que funciona como uma tampa, o opérculo. Após a germinação, cada esporo está apto a originar um novo gametófito a partir de uma fase

efémera, o protonema.

O gametófito liga-se ao substrato por meio de rizóides que servem apenas de suporte, uma vez que a absorção de água e nutrientes ocorre directamente pelo gametófito. Este é folhoso, composto por um eixo central – o caulóide – à volta do qual estão os filóides, semelhantes a pequenas folhas e com disposição em espiral. O esporófito, estruturalmente muito diferente do gametófito, vive sobre este. É constituído por uma seda que suporta a cápsula, uma estrutura globosa onde tem lugar a produção de esporos. Durante o seu crescimento, os esporófitos rompem a zona basal da parede arquegonial no interior da qual se formam. A parte superior fica sobre a cápsula formando uma estrutura designada por coifa.

Outro processo de reprodução, o mais comum no meio natural, tem lugar através da fragmentação de filóides ou de outras partes da planta, permitindo a formação de uma nova planta por multiplicação vegetativa (Glime, 2007). Este processo de propagação ocorre preferencialmente em zonas dos cursos de água com corrente forte, em que pedaços da planta são arrancados e vão dar origem a novos indivíduos, contribuindo para a dispersão da planta e para a colonização de novas áreas (Siebert, 1996).

O corpo vegetativo das fontinalis é geralmente frágil, podendo porém, atingir dimensões que podem variar desde tamanhos microscópicos até mais de um metro de comprimento. Por serem altamente dependentes do grau de humidade do ambiente, estas plantas adoptaram ciclos de vida fugazes e estratégias eficazes de redução da perda de água por evaporação, o que lhes permite sobreviver especialmente em habitats de extrema e prolongada secura.

Em geral, as várias espécies de fontinalis são facilmente distinguidas umas das outras através de características morfológicas visíveis a olho nu, tais como a forma das folhas, que podem ser alongadas, côncavas ou planas (Welch, 1960). Por vezes, esta identificação não é fácil, pois alguns exemplares podem apresentar mais do que um tipo de folhas.

A distinção entre as duas espécies de *Fontinalis* utilizadas neste trabalho, *Fontinalis antypyretica* e *Fontinalis Squamosa*, faz-se com base em algumas características estruturais que diferem entre estas espécies, tais como:

- a forma dos filóides, que está relacionada com a velocidade da corrente no curso de água em que a planta se encontra. Assim, a espécie *F. antypyretica* apresenta filóides alongados e com nervura central, sendo típica de cursos de água com fraca corrente, enquanto a *F. squamosa* apresenta-se em tufos densos e bastante ramificados de cor verde-negro, possuindo filóides côncavos e sem nervura central, e é típica de zonas com corrente forte.

- a morfologia das gemas apicais, as quais na *F. antypyretica* apresentam uma forma triangular, enquanto na *F. squamosa* têm gemas apicais cilíndricas.

No caso da espécie *F. squamosa*, Glime e Knoop (1986) verificaram que é difícil o desenvolvimento de gametóforos em indivíduos de cultura, porém o seu crescimento continua, e curiosamente os exemplares em que se formaram gametóforos apresentavam um protonema desenvolvido a partir de mais de um esporo e a cultura estava contaminada com fungos. Este facto indica que o habitat pode, eventualmente, ser responsável pelo fornecimento de alguma condição ou substância determinante para a formação de gametóforos (Glime e Knoop, 1986).

### 1.3 CULTURA *IN VITRO*

O conceito de micropropagação baseia-se na multiplicação de material vegetal com vista à obtenção de um grande número de indivíduos, mantendo-se idêntico em todos eles o genótipo da planta-mãe, com recurso a técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro*. Este tipo de processo é bastante útil para a produção de um elevado número de exemplares de plantas num curto espaço de tempo.

As plantas-mãe devem encontrar-se em perfeitas condições de assepsia para que, no final do processo se obtenham plantas saudáveis, sendo também importante a esterilização dos explantes com recurso a lixívias, álcoois e lavagens com água esterilizada.

Inicialmente é necessário seleccionar o material vegetal que vai ser utilizado no processo de propagação, podendo ser utilizadas folhas, caules, raízes e ainda órgãos florais. Estes explantes, depois de cuidadosamente lavados, são colocados no meio de cultura apropriado, o qual contém os elementos necessários ao desenvolvimento e suporte da nova planta. É necessário que antes da introdução da planta no meio de cultura, este seja esterilizado por processos de autoclavagem ou filtração, para prevenir contaminações com bactérias e fungos que vão impedir o correcto desenvolvimento da planta. A textura do meio deve simular o mais próximo possível o ambiente natural da planta, podendo ser gelificado (através da adição de ágar) ou permanecer líquido.

A micropropagação é aplicada hoje em dia a uma vasta gama de ensaios, uma vez que através desta técnica, é possível conservar plantas em sistemas completamente controlados e conhecidos, sem interferência de agentes externos que poderiam pôr em causa a validade dos ensaios. Por outras palavras, no meio natural as plantas estão sujeitas a um conjunto de variáveis e factores externos que estão inevitavelmente presentes e são difíceis de controlar, tais como as interações biológicas, condições físico-químicas do ecossistema (nomeadamente ao nível do solo e da água) e variações climáticas. É também importante realçar que a existência da possibilidade de modificar e ajustar as condições do meio (em especial a composição e os nutrientes presentes), bem como de regular factores físicos, tais como luz e temperatura, permite uma taxa de multiplicação das plantas elevada, isto é, obtém-se um maior número de indivíduos num menor espaço de tempo.

## 1.4 CONTAMINAÇÃO POR METAIS PESADOS

Os metais pesados estão frequentemente presentes nas águas superficiais e subterrâneas em quantidades extremamente reduzidas não constituindo perigo para os ecossistemas. Porém, se presentes em elevadas concentrações, e uma vez que não são biodegradáveis, persistindo no meio ambiente durante longos períodos de tempo, revelam ser tóxicos para os organismos vivos.

Diversas fontes naturais e antropogénicas são responsáveis pela presença de metais pesados nos ambientes aquáticos, sendo esta presença influenciada pelos parâmetros físico-químicos temperatura, pH, Eh, luminosidade, especiação dos metais pesados em solução, presença de compostos orgânicos e agentes quelantes, entre outros. A presença de diversos organismos vivos vai também exercer alguma influência nas especiações dos metais pesados no meio.

### 1.4.1 OURO

O ouro (símbolo químico Au) é um elemento químico de muito baixa abundância na crosta terrestre, sendo a sua concentração média nas rochas da ordem dos  $4 \text{ ng.kg}^{-1}$  e nos solos  $1,0 \text{ ng.kg}^{-1}$ . No caso das águas, foram medidas concentrações de  $0,05 \text{ ng.mL}^{-1}$  nas águas de rio e de  $0,2 \text{ ng.mL}^{-1}$  em águas marinhas (Medved *et al.*, 2004).

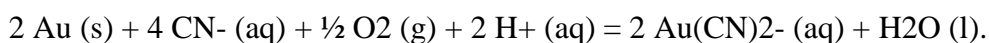
Em condições naturais, o Au ocorre geralmente no estado elementar pois trata-se de um metal nobre, logo inerte em contacto com a água pura. É então necessário que ocorra um processo de solubilização deste elemento antes da sua entrada nas plantas. A combinação do Au com agentes complexantes como as espécies iónicas de cianeto, cloro ou iodo, transforma-o em espécies iónicas complexas passíveis de serem incorporadas pelas plantas, mas também mais tóxicas para os organismos vivos. Segundo Gardea-Torresdey *et al.* (2002), o Au pode ser incorporado pelas plantas sob as formas Au(0) e Au(III), sendo que este último pode ser reduzido para a forma Au(0) no interior da planta (forma menos tóxica para elas). De um modo geral, as plantas são capazes de absorver Au se este se encontrar sob forma solúvel. Em meios redutores, a precipitação de Au tem lugar na superfície das células inibindo a permeabilidade da membrana celular (Kabata-Pendias *et al.*, 2001)



Desde o início do século XX que há referência a numerosos casos de acumulação de Au por plantas. Assim, Warren and Delavault (1950) verificaram uma acumulação de Au acima dos  $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$  (peso seco) em coníferas comuns. Williams *et al.* (1995) referem a existência de concentrações de Au entre 224 e  $7450 \text{mg.kg}^{-1}$  (peso seco) em líquenes que cresceram na vizinhança de uma mina de Au na Nova Zelândia.

Neste trabalho foram utilizados dois agentes complexantes, KCN, KI para a dissolução do Au em solução. Uma terceira solução foi preparada recorrendo ao composto  $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , em que o Cl funciona como espécie complexante.

O processo de cianetação tem como base o facto de o cianeto apresentar a capacidade de complexar o Au. Este processo é traduzido pela seguinte reacção química (Trindade e Filho, 2002):



O cianeto utilizado no processo de cianetação está sob a forma de sais de CN. O ião cianeto é então libertado a partir do sal por um processo de hidrólise deste e há a formação de ácido cianídrico. No caso concreto deste trabalho, o sal utilizado foi o KCN.

Através da análise do diagrama Eh-pH para o sistema Au-CN-H<sub>2</sub>O (Figura 4), retirado de Trindade e Filho (2002), é possível observar que o cianocomplexo de ouro é estável ao longo de toda a gama de variação do pH. Para  $\text{pH} < 9,2$  ocorre a formação de  $\text{Au(CN)}_2^-$  (dicianoaurato), como resultado da reacção de Au com HCN (ácido cianídrico), sendo esta reacção dependente do pH e do Eh. Para  $\text{pH} > 9,1$ , o Au pode reagir com a espécie iónica  $\text{CN}^-$  (cianeto), formando também o complexo  $\text{Au(CN)}_2^-$ , mas desta vez dependendo do pH do meio.

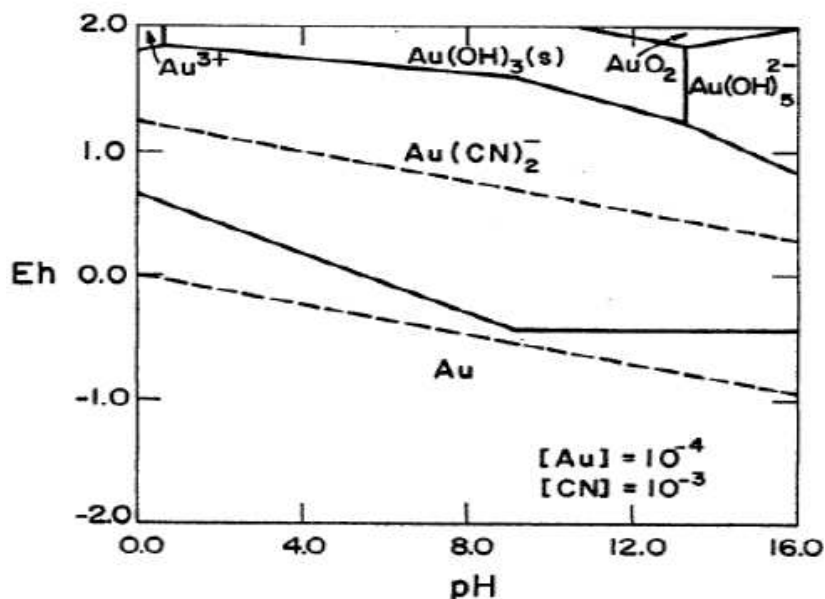


Figura 4 - Diagrama Eh- pH para o sistema químico Au-CN-H<sub>2</sub>O a 25°C (Trindade e Filho, 2002).

De acordo com Trindade e Filho (2002), o cloro (Cl) na presença de íons cloreto (Cl<sup>-</sup>) dissolve rapidamente o Au, ocorrendo a formação do complexo AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup>, para valores de pH inferiores a 2,5. Esta espécie de Au formada é a única encontrada em sistemas regidos por processos de lixiviação, típicos por exemplos de ambientes aquáticos afectados por fenómenos de drenagem ácida de minas.

Observando o diagrama Eh-pH para o sistema Au-Cl-H<sub>2</sub>O a 25°C (Figura 5), nota-se a existência de um campo de estabilidade para o AuCl<sub>4</sub><sup>-</sup> em solução aquosa, indicando que a lixiviação ocorre tipicamente em condições de pH < 2,2 e Eh > 1,1, funcionando o Cl<sub>2</sub> como oxidante (zona a sombreado no diagrama).

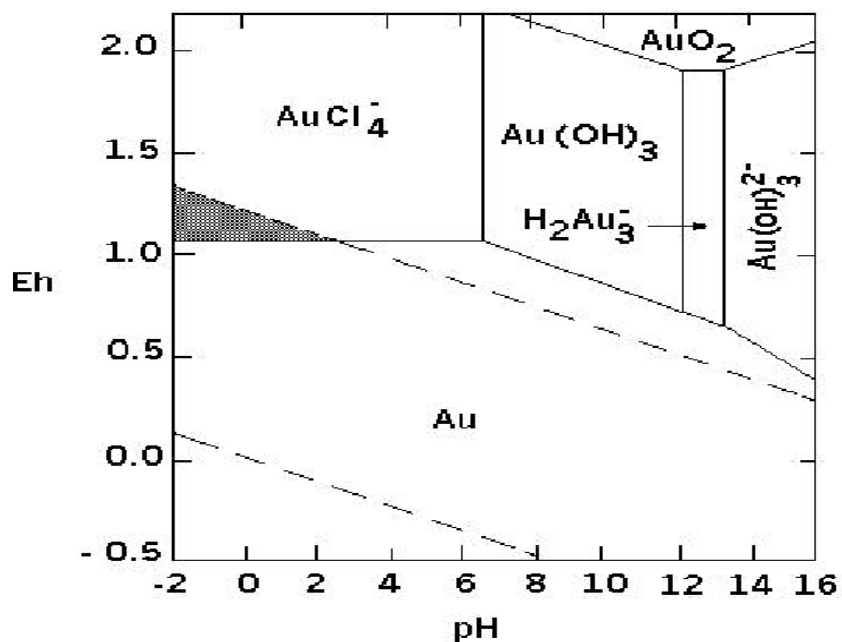


Figura 5 – Diagrama Eh – pH para o sistema químico Au-Cl-H<sub>2</sub>O a 25°C (Trindade e Filho, 2002).

O diagrama da figura 6 ilustra as condições de estabilidade Eh – pH para o sistema Au-I-H<sub>2</sub>O a 25°C, onde se verifica que o complexo AuI<sub>2</sub> é estável no campo de condições de pH e Eh assinalado a cinza no diagrama. Acima destas condições, a espécie dominante e estável passa a ser o AuI<sub>4</sub><sup>-</sup>.

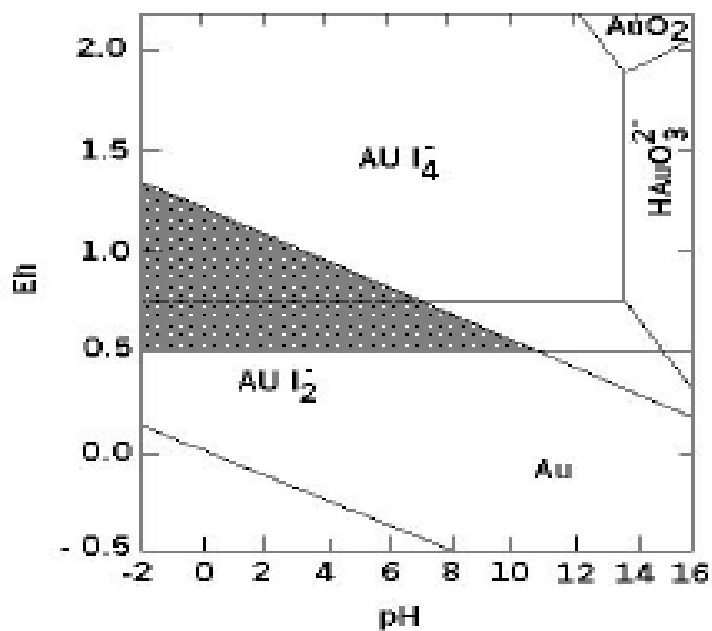


Figura 6 – Diagrama Eh – pH para o sistema químico Au-I-H<sub>2</sub>O a 25°C (Trindade e Filho, 2002).

### 1.4.2 ARSÉNIO

A contaminação com arsénio (símbolo químico As), elemento com elevada toxicidade, é actualmente um problema ambiental à escala mundial que acarreta sérios problemas para a saúde humana.

O As é um metalóide pertencente ao grupo 15 da Tabela Periódica dos Elementos. É o 52º elemento mais abundante na crosta terrestre, com um teor médio entre 1,5 e 2,0 mg.kg<sup>-1</sup>. Integra a estrutura química de mais de 245 minerais (O'Neill, 1995), sendo os mais importantes a arsenopirite, pirite, realgar e ouropigmento.

As principais fontes naturais responsáveis pelos teores de As no solo e, posteriormente nas águas, nos sedimentos e na atmosfera, são a alteração/erosão de rochas com minerais de As na sua constituição e *inputs* provenientes das emissões vulcânicas. As fontes antropogénicas mais comuns de As para o ambiente são a extracção mineira, a fundição de metais, a queima de combustíveis fósseis, a deposição de lixos industriais e domésticos e a utilização de pesticidas e herbicidas. O As é ainda usado na indústria de semicondutores, de pigmentos e de vidro, também estas fontes antropogénicas de As.

Nos ambientes aquáticos em particular, o As encontra-se em solução ou adsorvido na superfície dos sedimentos de linha de água, e resulta principalmente da dissolução e lixiviação de rochas sedimentares de origem marinha, ricas em As, de rochas vulcânicas, da circulação de fluídos de origem hidrotermal e águas provenientes da drenagem ácida de minas. O teor típico de As em águas naturais não contaminadas está geralmente abaixo dos 0,001 µg.L<sup>-1</sup>. Gaillardet et al. (2003), indica um teor médio de As nas águas dos rios de 0,62 µg.L<sup>-1</sup>. Actualmente, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1981) recomenda um teor máximo de As nas águas de consumo de 10,0 µg.L<sup>-1</sup>, valor também aceite na legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 243/2001, de 5 de Setembro).

Em águas de escorrências de minas de Au foram determinados teores de As de 104 a 264 mg.kg<sup>-1</sup> em *Fontinalis antipyretica* (Grosboisa, 2009).

Um outro exemplo a referir é o caso da mina *Giant Mine* no noroeste do Canadá onde, desde 1948, foram extraídos milhares de toneladas de ouro e ao mesmo tempo enormes quantidades de arsénio. Actualmente, o ouro está esgotado, mas ali permanecem mais de 237000 toneladas de arsénio, constituindo o seu maior depósito mundial de origem antropogénica. Este depósito é responsável pela contaminação das águas subterrâneas daquela região, que chegam a apresentar teores de arsénio de 5000 mg.L<sup>-1</sup> (Clark e Raven, 2004).

Uma vez presente no solo e nas águas, o As em solução pode ser fácil e rapidamente incorporado pelas plantas e animais, atingindo toda a cadeia alimentar e pondo em risco o Homem.

Em sistemas aquáticos, em condições redutoras verifica-se que a espécie inorgânica predominante é o arsenato pentavalente ( $H_nAsO_4^{n-3}$ ), enquanto que em condições oxidantes, há predomínio do arsenito trivalente ( $H_nAsO_3^{n-3}$ ), a forma mais tóxica para os organismos vivos (Pokrovski et al., 1996). Nas águas superficiais ocorre frequentemente a reacção do As(V) com o fitoplâncton e fosfatos em solução, havendo formação de As(III), com toxicidade, mobilidade e biodisponibilidade para as plantas, muito superiores às da espécie inicial. De seguida, podem ocorrer reacções de metilação do As(III), pela acção de microorganismos, algas e espécies de briófitas presentes nas águas, havendo formação das espécies orgânicas monometilarsenato (MMA) e dimetilarsenato (DMA).

### **1.4.3 ANTIMÓNIO**

O Antimónio (símbolo químico Sb) é um elemento de ocorrência rara na crosta terrestre, apresentando um teor médio que varia entre 0,2 e 0,3  $mg.kg^{-1}$  (Rish, 2004). As fontes naturais de Sb mais comuns são a alteração e/ou lixiviação de depósitos minerais de origem vulcânica e de mineralizações de Au e Sb em xistos e materiais libertados durante episódios vulcânicos. Associado a elementos como S, Pb e As, o Sb integra a estrutura de mais de 100 minerais. Quantidades traço de Sb podem também ser encontradas em minerais de Ag e Cu.

O principal mineral de Sb é a Estibina ( $Sb_2S_3$ ), um sulfureto de Sb muito comum em Portugal. Outro mineral de Sb comum é a Pirargirite ( $Ag_3SbS_3$ ). O Sb é utilizado nas indústrias de semicondutores, baterias e equipamentos eléctricos, constituindo estas, juntamente com a actividade mineira e drenagem ácida de minas, queima de combustíveis fósseis e inceneração de lixos industriais e domésticos, as principais fontes antropogénicas de Sb para o meio ambiente.

O limite máximo admitido para águas de consumo para o Sb é de  $5,0 \mu g.L^{-1}$  (WHO, 1996), sendo que as concentrações típicas de Sb verificadas em águas naturais não

contaminadas são inferiores a  $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Gaillardet et al. (2003), referem que o nível médio de Sb nas águas dos rios é de  $0,07 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

O Sb pertence ao grupo 15 da Tabela Periódica dos Elementos apresentando um comportamento e propriedades químicas idênticas às dos elementos Arsénio e Fósforo. Ocorre em ambientes naturais em 4 estados de oxidação: +5, +3, 0 e -3. Os estados de oxidação mais comuns em ambientes com baixas temperaturas são +3 e +5. Em condições redutoras, a espécie mais comum é a antimonite, Sb(III), sob a forma de  $\text{Sb(OH)}_3$ ; pelo contrário, em ambientes oxidantes, a forma mais comum é o antimonato, Sb(V), sob a forma aniónica  $\text{Sb(OH)}_6^-$ . As formas inorgânicas de Sb (antimonite e antimonato) são mais tóxicas do que os compostos orgânicos. De realçar que a espécie química Sb(III) apresenta uma toxicidade superior à espécie Sb(V), tal como acontece com as espécies químicas de As.

O Sb não é um elemento essencial para as plantas e animais, podendo, em elevadas quantidades, desencadear um efeito de toxicidade significativa. No ser humano, uma exposição continuada pode desencadear dermatites e a exposição a alguns compostos de Sb pode provocar efeitos cancerígenos.

Em Portugal, Pratas *et al.* (2005) verificaram a existência de teores de Sb entre 0,04 a  $139,9 \text{ mg.kg}^{-1}$  (peso seco) em caules de plantas recolhidas em solos de zonas mineiras.

Permanecem ainda por explicar com exatidão os mecanismos de entrada de Sb nas plantas e a respectiva toxicidade. No entanto, o facto de o Sb apresentar características químicas idênticas ao As e ao P sugere que a entrada de Sb nas plantas ocorre por mecanismos semelhantes ao de entrada destes elementos (Tschan et al., 2008).

#### 1.4.4 PRATA

A prata (símbolo químico Ag) é um metal nobre pertencente ao grupo 1 da Tabela Periódica dos Elementos. A sua abundância média na crosta terrestre oscila entre 0,01 mg.kg<sup>-1</sup> e 5,0 mg.kg<sup>-1</sup>, sendo a maioria dos valores referidos inferiores a 0,1 mg.kg<sup>-1</sup> (Boyle, 1969; Purcell e Peters, 1998; Kramer et al., 2002; Adriano, 2001). Andren and Bober (2002) referem uma concentração de AgS na água superficial que varia entre 0,2 e 0,5 ng.L<sup>-1</sup>.

As principais fontes antropogénicas responsáveis pelos conteúdos de Ag presente no meio ambiente são: a indústria, a fundição, a deposição de detritos fotográficos e eléctricos e a queima de combustíveis fósseis. Concentrações elevadas são verificadas nos sistemas aquáticos devido a fenómenos de erosão de fontes naturais (rochas), como resultado de resíduos da actividade mineira ou de descargas industriais feitas directamente nos cursos de água (Purcell e Peters, 1998).

A Ag é um metal de ocorrência rara, tipicamente encontrado em compostos com enxofre (S), selénio (Se) e telúrio (Te) e com os seus vizinhos na tabela periódica, o As, Sb e Bismuto (Bi) (Renner, 1998; Kramer et al., 1999). Os minerais de Ag mais comuns são a Prata nativa (Ag) e a Argentite (Ag<sub>2</sub>S), Pirargirite (Ag<sub>3</sub>SbS<sub>3</sub>) e Proustite (Ag<sub>3</sub>AsS).

No meio natural, a Ag pode aparecer em quatro estados de oxidação: 0, 1, 2 e 3, sendo o 0 e o 1 as formas oxidadas mais facilmente encontradas. Ag(I) pode formar precipitados com as espécies iónicas de Cl e S eventualmente presentes em solução, ficando a sua mobilidade no meio ambiente drasticamente reduzida. No meio aquático são frequentes reacções de hidrólise, resultando espécies como AgOH<sub>0</sub>, AgOH<sub>2</sub><sup>-</sup> e AgCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. A especiação que predomina em toda a gama de pH típica dos sistemas aquáticos naturais é Ag(I). Na presença de iões sulfureto ocorre a precipitação de Ag<sub>2</sub>S, especialmente em meios com pH ácido ou ligeiramente ácido.

Não sendo um elemento essencial para as plantas nem animais, a Ag, mesmo em concentrações relativamente pequenas, pode ser bastante tóxico em especial para os organismos aquáticos. A acumulação nas plantas é geralmente baixa; Smith e Carson (1977) indicaram concentrações de Ag nas plantas que oscilavam entre 0,03 e 0,5 mg.kg<sup>-1</sup> (peso seco). Aparentemente, a Ag em solução no solo e que é incorporada pelas plantas, deposita-se maioritariamente sob a forma de Ag<sub>2</sub>S. O composto AgNO<sub>3</sub> pode também ser facilmente captado pelas plantas, sendo tóxico mesmo em quantidades reduzidas

## 1.5 HIPERACUMULAÇÃO FITORREMEDIAÇÃO FITOMINERAÇÃO

Após alguns estudos, na década de 70, o cientista neozelandês Robert Brooks referiu pela primeira vez a capacidade de algumas plantas para acumularem elevadas concentrações de alguns metais presentes no meio ambiente em que se encontram. De acordo com Brooks *et al.* (1977), a hiperacumulação é um processo natural através do qual algumas plantas são capazes de acumular metais em quantidades superiores a  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  (peso seco). Este conceito foi considerado por este autor no caso de acumulação de níquel. Porém, actualmente sabemos que existem plantas capazes de acumular igualmente elevadas concentrações de outros metais. Assim, foi necessário reformular este conceito e, hoje em dia, considera-se que uma planta é hiperacumuladora se tem a capacidade de acumular um determinado metal em quantidades 100 a 1000 vezes superiores à concentração desse mesmo metal encontrada nas outras plantas não hiperacumuladoras que crescem no mesmo ambiente. Para o caso específico do Ouro, Anderson (1998) definiu que uma planta é considerada como sendo hiperacumuladora de Au quando o teor nela medido for superior a  $1,0 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Além da capacidade de acumular metais não essenciais ao seu metabolismo em elevadas doses, as plantas hiperacumuladoras caracterizam-se pela sua resistência elevada à toxicidade que estas concentrações anormais de metais acarretam e que, na maioria das vezes, se expressa por alterações no normal decurso dos processos fisiológicos típicos de qualquer planta. Assim, estas plantas são capazes de sobreviver, desenvolverem-se e reproduzirem-se em meios onde as concentrações de metais pesados são bastante elevadas como resultado de fenómenos naturais ou de contaminações antropogénicas.

As plantas aquáticas têm a capacidade de acumular metais pesados quer estejam vivas ou mortas, se bem que, quando vivas, a sua capacidade de acumulação seja obviamente superior, pois ocorre regeneração celular, permitindo o aumento da capacidade acumulativa (Axtell *et al.*, 2003). A biorremocção de metais pesados está associada a dois processos: a bioadsorção e a bioacumulação.

A bioadsorção consiste na capacidade que algumas plantas apresentam de retenção extracelular, baseada num processo metabólico rápido, reversível e independente de reacções que ocorram à superfície, podendo levar à fixação de metais nos tecidos de uma planta (Keskinan *et al.*, 2003). É um processo dependente de parâmetros externos como o



tipo e forma iónica em que o metal se encontra em solução no meio, bem como o tipo de ligações que o metal pode estabelecer.

A bioadsorção de espécies metálicas pode ocorrer mesmo se as células da planta já não se encontrarem metabolicamente activas. Os iões metálicos apresentam afinidades ou preferência em estabelecer ligações químicas com espécies como o oxigénio, o azoto e o enxofre, que estão presentes nas paredes das células das plantas sob a forma de grupos químicos com carga electrónica negativa que vão atrair os metais pesados. Assim, estes ficam adsorvidos, permanecendo retidos nas paredes das células.

A bioacumulação, ao contrário da bioadsorção, um processo lento, intracelular, irreversível e dependente do nível de acumulação e metabolismo celular, pode ser considerado como um processo de transferência de massa desde a parede celular exterior até ao interior da célula.

O fenómeno de bioacumulação pode ocorrer por difusão passiva (como resposta às diferenças de potencial osmótico e eléctrico) ou por transporte activo (Mouvet *et al.*, 1989). Assim, os elementos presentes no interior da célula podem permanecer em solução no citoplasma ou complexar com alguns componentes intra-celulares.

Além da sua importância ecológica, as plantas com capacidade hiperacumuladora têm vindo a ser alvo de bastante interesse na área da Biorremediação, na medida em que estas plantas podem constituir uma forma ecológica de remediação da contaminação de solos e águas por metais pesados em áreas afectadas pela escorrência de águas provenientes de drenagem ácida de minas, assim como podem ser uma ferramenta de prospecção ao fornecerem informações sobre a localização de jazigos minerais a explorar. As estratégias de Biorremediação incluem processos como a Fitorremediação e Fitomineração.

A Fitorremediação é um processo de biorremediação que consiste no uso de espécies hiperacumuladoras com o principal objectivo de extrair os metais pesados de águas e solos contaminados, sendo estes translocados até aos diversos órgãos das plantas, onde pode ocorrer a sua retenção e/ou degradação. Esta técnica é vantajosa em relação a outras técnicas de remediação e extracção de contaminantes, na medida em que acarreta custos reduzidos e é uma tecnologia amiga do ambiente, pois permite que as plantas e produtos resultantes sejam utilizados, por exemplo, para adubar terrenos de cultivo. Porém, é uma técnica muito demorada até que se atinja o nível de descontaminação pretendido e está fortemente limitada a áreas onde seja viável a plantação e crescimento adequado das

espécies acumuladoras. No caso específico da absorção de contaminantes, neste caso metais pesados, directamente dos cursos de água pelas raízes de uma planta aquática, este processo é chamado rizofiltração (Salt *et al.*, 1998).

Uma outra área que tem vindo a merecer cada vez mais especial atenção é a Fitominação, em que o principal objectivo é a obtenção de quantidades comercializáveis de metais através da recuperação destes a partir da biomassa de plantas hiperacumuladoras (bio-metais) provenientes de solos com mineralizações consideráveis ou com elevados índices de contaminação por metais pesados (Brooks *et al.*, 1998). Esta técnica é também aplicável no caso de ecossistemas aquáticos contaminados com metais pesados com resultado da incorporação de águas provenientes da drenagem ácida de zonas mineiras.

Diversos estudos foram realizados com sucesso no âmbito da fitominação para o caso do níquel em áreas fortemente mineralizadas, com recurso a diversas espécies de plantas (Robinson *et al.*, 1997; Brooks *et al.*, 1998; Nicks, L.J., 1998). A fitominação pode também ser usada em casos de áreas mineiras em que o material das escombrelas contém concentrações elevadas de metais mas estes não são economicamente exploráveis pelas técnicas tradicionais.

## 1.6 TESTES TOXICOLÓGICOS

Os níveis de toxicidade em sistemas aquáticos são usualmente quantificados com base em parâmetros físico-químicos de fácil medição, mas que, porém, só dão indicações pontuais das condições vigentes no meio no momento da amostragem.

A quantificação da toxicidade recorrendo a organismos vivos tem a vantagem de proporcionar informações contínuas das características do meio, bem como dos efeitos nocivos dos contaminantes para a comunidade biótica do ecossistema.

Segundo Powell *et al.* (1996), a escolha de espécimes com vista ao seu uso em testes de toxicidade e monitorização ambiental deve ter em conta determinadas características do organismo: relativa facilidade de propagação; taxa de crescimento significativa, ciclo de vida reduzido; dimensão reduzida; ecológica e economicamente relevantes; sensibilidade a um extenso conjunto de compostos ou factores externos, permitindo respostas significativas quando sujeitos a diferentes testes. Devem também estar ecologicamente relacionados com outras espécies presentes no ecossistema em que são inseridos, ocupando uma posição relevante na cadeia alimentar e afetando os vários níveis tróficos da cadeia.

## 1.7 USO DE MACRÓFITAS EM FITORREMEDIAÇÃO E TESTES TOXICOLÓGICOS

As zonas contaminadas com metais pesados são de um modo geral, áreas com condições adversas para a grande maioria dos organismos vivos. Porém, existem seres vivos capazes de se adaptar e colonizar ambientes com estas condições, tais como as macrófitas aquáticas. O facto de estas terem uma vasta distribuição geográfica deixa desde logo perceber que elas são capazes de se adaptar a uma enorme variedade de meios diferentes com condições também diferentes.

As macrófitas apresentam algumas das características que um organismo deve prefigurar para que seja aplicado em testes de toxicidade e monitorização ambiental, características que as destacam das restantes plantas nesse âmbito. Para começar, devido à sua posição basal na cadeia alimentar do ecossistema elas estão mais expostas aos contaminantes que possam estar a circular no meio. O facto de a absorção de nutrientes essenciais ocorrer através, quer das raízes quer das folhas, traduz-se numa maior e mais eficaz área de exposição e absorção, quer dos nutrientes como também dos contaminantes. Embora sejam plantas com crescimento demorado, apresentam facilidade em serem submetidas a um processo de clonagem (reprodução vegetativa) e plantação com sucesso, obtendo-se um grande número de réplicas em que se mantém um determinado genótipo. Isto é bastante vantajoso no caso de experiências de monitorização em que é constante a necessidade de um elevado número de exemplares. Em ambos os casos de testes considerados (em laboratório e no campo) é fácil e simples avaliar indicadores toxicológicos tais como o crescimento da planta (desenvolvimento radicular e caulinar), diferenças na biomassa, aspecto visível (cor e forma) e a taxa de sobrevivência dos exemplares expostos a determinada toxicidade, permitindo uma constante avaliação do sucesso da experiência.

Dentro das macrófitas aquáticas, é importante destacar que as briófitas são um dos grupos de plantas mais utilizados em estudos de monitorização ambiental (Nimis, 1990), apresentando, de acordo com Mouvet (1985), uma série de vantagens, entre as quais: elevados factores de acumulação em relação aos teores presentes nos outros elementos da biota; tolerância a elevados níveis de substâncias tóxicas; elevada correlação entre o teor

por elas acumulado e a concentração de contaminante verificada no ambiente em que estão expostas; sésseis e necessidade de se fixarem a um substrato permanecendo assim no mesmo local. Então, através da sua análise é possível inferir acerca dos efeitos tóxicos de determinado elemento presente no meio ao qual estão expostas. O facto de não possuírem cutículas impermeáveis à água no seu revestimento (ausência de lignina), possibilita um contacto mais estreito com o meio em que se encontram, obtendo os nutrientes e os metais através de absorção na superfície da folha (Bates, 2000), sendo estes incorporados pelas células passando através das suas paredes e distribuídos ao longo dos vários compartimentos celulares, nomeadamente no citoplasma celular, onde complexam com os polímeros ou nos vacúolos, onde vão incorporar os precipitados de fosfato (Bruns *et al.*, 2001). É por estas razões que as briófitas são largamente indicadas em situações de fitorremediação e fitomineração.

A acumulação de metais por parte da Fontinalis, bem como das restantes macrófitas, está fortemente condicionada por factores externos, tais como: a biodisponibilidade dos metais em solução e a competição destes com outros elementos não-metálicos (Ca, Mg, K) existentes no meio, o tempo de exposição da planta, o pH do meio, bem como de factores internos que têm a ver com a estrutura morfológica bastante simples desta espécie de plantas (em que os rizóides desempenham unicamente a função de fixação da planta ao substrato, não permitindo a absorção radicular de substâncias a partir do meio) e a ausência de sistema vascular (ocorrendo a incorporação de elementos e nutrientes através da superfície das folhas directamente para o citoplasma).

Em ensaios toxicológicos, espécies geralmente utilizadas como algumas algas (*Serenastrum capricornutum*, *Scenedesmus quadricauda*) e plantas (*Ceratophyllum*, *Elodea*, *Myriophyllum* e, por vezes, *Callitriche*).

É de realçar o uso de várias espécies de briófitas como biomonitores em diversos estudos de avaliação e quantificação da contaminação de cursos de água por metais pesados (Whitton *et al.*, 1982; Mouvet, 1984, 1985; Gonçalves *et al.*, 1992; Bruns *et al.*, 1997; Samecka-Cymerman *et al.*, 2002).

## 1.8 OBJECTIVOS

O estudo laboratorial que conduziu à elaboração desta dissertação teve como principal objectivo a avaliação da capacidade de resposta de plantas da espécie *Fontinalis antipyretica* e *Fontinalis squamosa* em testes de toxicidade, bem como o potencial destas plantas para a acumulação de metais pesados em meio aquático.

Assim, para este efeito foram estabelecidas culturas *in vitro* destas espécies e determinadas as condições mais favoráveis para o seu cultivo. Posteriormente, foram testadas a sensibilidade e a capacidade das espécies na captação e acumulação dos metais pesados Au, As, Sb e Ag em solução aquosa, bem como os efeitos tóxicos provocados por estes metais, realizando-se para isso ensaios *in vitro* e em aquário de exposição das plantas a soluções com diferentes concentrações dos referidos metais.

Este estudo insere-se num projecto mais alargado, financiado pela FCT e que visa, de uma maneira geral, determinar a capacidade de várias espécies em sobreviverem em ambientes contaminados com metais pesados.

## 2 Materiais e Métodos

### 2.1 Material Vegetal:

#### 2.1.1 Localização

##### 2.1.1.1 *Fontinalis antipyretica*

Exemplares de *Fontinalis antipyretica* foram recolhidos na Ribeira de Ançã, perto da vila de Cantanhede, no Distrito de Coimbra, em águas não poluídas, em finais de Fevereiro de 2010. As plantas foram transportadas para o laboratório onde ficaram em repouso num aquário com água corrente e oxigenação durante 48 horas.

##### 2.1.1.2 *Fontinalis squamosa*

*Fontinalis squamosa* foi recolhida em Junho do mesmo ano, na Ribeira de Bordeiro, perto da Vila de Góis, no Distrito de Coimbra, em águas não poluídas. As amostras foram tratadas de igual forma.

#### 2.1.2 Esterilização

No laboratório, a planta foi lavada várias vezes em água bidestilada tendo sido assim mantida durante uma semana. Para iniciar o cultivo *in vitro* da planta, foi necessário esterilizar o material vegetal. Este foi colocado num *erlenmeyer* com água e umas gotas de *tween* com agitação durante alguns momentos. O procedimento de esterilização a partir daqui é efectuado em câmara de fluxo laminar. Usou-se hipoclorito de cálcio ( $\text{CaClO}_2$ ), testando variações no tempo de exposição à planta, em períodos de 1 a 5 minutos, e também com variações na concentração do desinfectante, entre 1% e 5% ( $\frac{m}{V}$ ). Depois disso, o material foi prontamente lavado, para retirar rapidamente o ( $\text{CaClO}_2$ ) tendo sido colocado em meio nutritivo para promover o seu crescimento.

### 2.1.3 Meios usados

Colocaram-se explantes de material vegetal em meio MS, com e sem sacarose. Ao mesmo tempo testou-se a inoculação de material vegetal somente em água destilada e também numa solução de Knop modificada (Gautheret, 1959), sem esterilização nenhuma até se optar por um meio de Knop modificado com sacarose a 1,5 % (meio K). O resumo dos meios usados está descrito na tabela 1.

Utilizaram-se explantes da zona apical da planta com cerca de 3 cm contendo o meristema apical. Os explantes foram inoculados em *erlenmeyers* de 50 mL com cerca de 20 mL de meio, rolhados com algodão cardado e gaze. Os recipientes foram colocados em estufa a 24 °C com luz ( $96 \mu\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) em ciclos de 16-8 horas.

A experiência com *F antipyretica* permitiu que o estabelecimento da *Fontinalis squamosa* fosse efectuado da mesma forma.

Tabela 1- Meios usados em tentativas de crescimento do material vegetal

	Elementos	Andrews Mod.	MS	C (MS/2)	K
<b>Macronutrientes (mmol)</b>	<b>N</b>	2,6	60,2	30,1	6,7
	<b>K</b>	1	16	8	4,31
	<b>Mg</b>	3	9,1	4,55	1
	<b>P</b>	0,2	2,5	1,25	1,84
	<b>Ca</b>	0,8	3,4	1,7	2,12
	<b>S</b>	5	25	12,5	1,1
<b>Micronutrientes (μmol)</b>	<b>Na</b>	0	0	0	77,1
	<b>Cl</b>	10	300	300	0,21
	<b>I</b>	0	0	0	5
	<b>B</b>	25	100	100	100
	<b>Mn</b>	1	100	100	100
	<b>Zn</b>	0,4	29,9	29,9	29,9
	<b>Mo</b>	0,02	1	1	1
	<b>Cu</b>	0,05	0,1	0,1	0,1
	<b>Co</b>	0	0,09	0,09	0,1
	<b>Fe</b>	10	100	100	50
<b>Carbono (mmol)</b>	<b>C</b>	1057	1061	701	526



### 2.1.4 Biomassa

Para determinar o crescimento da *F. antipyretica*, foram inoculados explantes iniciais com cerca de 1,5 cm de comprimento, em meio de crescimento Knop modificado (k) (Tabela 1). Decorridos 15, 30, 45 e 60 dias após o início da experiência, efectuaram-se recolhas e pesagens (peso fresco) de 6 amostras em cada um dos referidos momentos. As plantas foram secas em papel absorvente e pesadas em balança de precisão.

## 2.2 Efeito da benziladenina no crescimento de *Fontinalis*

O efeito da hormona BA (benziladenina) foi testado num ensaio, com duração de 35 dias, usando 4 concentrações diferentes (0,5; 1,0; 2,0 e 4,0 mg.L<sup>-1</sup>) e 10 réplicas para cada concentração.

## 2.3 Testes de Toxicidade

Os testes de toxicidade consistiram em ensaios efectuados no departamento de botânica entre Setembro de 2010 e Maio de 2011. Usaram-se explantes de *F. antipyretica* e *F. squamosa* crescidas em laboratório em culturas assépticas previamente estabelecidas para o efeito. Nos estudos de stresse fisiológico usou-se o Au como elemento de estudo preferencial, bem como os metalóides As e Sb e ainda o metal Ag, os quais fazem parte da paragénese do Au.

O material vegetal (1,5 cm) foi colocado em *erlenmeyers*, contendo 20 mL da solução de estudo desejada, previamente autoclavada. O meio de Knop modificado foi usado para todos os ensaios, controlo e meio de diluição. Os balões foram colocados em estufa a 24 °C com luz (96  $\mu\text{m m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) em ciclos de 16-8 horas. Durante as experiências e no final das mesmas, registou-se o crescimento do explante principal (em cm), o número de novas formações (nº de gemas), o crescimento lateral (em cm) e o crescimento total (em cm). As medições foram efectuadas com recurso a uma régua, considerando um erro experimental de  $\pm 0,1$  cm. As condições dos ensaios estão resumidas na tabela 2. Os explantes recolhidos no final de cada teste foram levados para o Departamento de Ciências

da Terra da Universidade de Coimbra, onde foi efectuada a sua análise química por Espectrometria de absorção atómica por câmara de grafite (GF-AAS).

Uma nova experiência com duração de 30 dias foi realizada para ambas as espécies de fontinalis, considerando 18 réplicas de cada espécie que funcionaram como controlo e outras 18 réplicas de cada espécie que foram submetidas a uma concentração de Au de 0,75 mg.L<sup>-1</sup> (3,75 µM). Posteriormente foram realizadas análises por microscopia electrónica de varrimento (SEM) no departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra.

Tabela 2 - Resumo dos ensaios efectuados com NaAuCl<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O

<i>F.antipyretica</i>	<b>Teste Au I</b>	Concentrações	µmol.L <sup>-1</sup>	0	0,05	0,5	5	
			mg.L <sup>-1</sup>	0	0,01	0,1	1	
		Duração (dias)			37			
		Réplicas (nº)			12			
	<b>Teste Au II</b>	Concentrações	µmol.L <sup>-1</sup>	0	1,25	2,5	3,75	
			mg.L <sup>-1</sup>	0	0,25	0,5	0,75	
Duração (dias)			60	30	60			
Réplicas (nº)			18					
<i>F.squamosa</i>	<b>Teste Au II</b>	Concentrações	µmol.L <sup>-1</sup>	0	0,5	1,25	2,5	3,75
			mg.L <sup>-1</sup>	0	0,01	0,25	0,5	0,75
		Duração (dias)			30			
		Réplicas (nº)			18			
	<b>Teste Au III</b>	Concentrações	µmol.L <sup>-1</sup>	0	3,75	5	20	
			mg.L <sup>-1</sup>	0	0,75	1	4	
Duração (dias)			60					
Réplicas (nº)			18					

### Ensaio de determinação da presença de ouro:

Um ensaio com ambas as espécies de fontinalis foi realizado com vista à quantificação da presença de Au. Para isso, as plantas foram colocadas num meio com NaAuCl<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O com [Au] = 3,75 µM. Decorridos 15 e 30 dias, procedeu-se à recolha de 6 exemplares (n=6) em cada momento. Os explantes iniciais eram maiores do que os utilizados nos outros ensaios, medindo cerca de 4,5 cm, tendo sido colocados 4 em cada *erlenmeyer* de 250 mL.

### 2.3.1 As ; Sb e Ag

Os ensaios realizados com *Fontinalis antipyretica* e *Fontinalis squamosa*, com os metalóides As e Sb e com o metal Ag estão resumidos na tabela 3

Tabela 3 - Ensaios efectuados com As, Sb e Ag para ambas as espécies e só para *F. antipyretica* (Fa).

<b>Teste As</b>		Ambas espécies					Fa
Concentrações	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	0,5	1,25	3,75	5,0	20
	$\text{mg.L}^{-1}$	0	0,038	0,094	0,281	0,375	1,5
Duração (dias)		30					
Réplicas (n°)		18					

<b>Teste Sb</b>		Ambas espécies				
Concentrações	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	0,5	1,25	3,75	5,0
	$\text{mg.L}^{-1}$	0	0,06	0,15	0,46	0,61
Duração (dias)		60				
Réplicas (n°)		18				

<b>Teste Ag</b>		Ambas as espécies					Fa
Concentrações	$\mu\text{mol.L}^{-1}$	0	0,5	1,25	3,75	5,0	20
	$\text{mg.L}^{-1}$	0	0,05	0,13	0,4	0,54	2,0
Duração (dias)		60					
Réplicas (n°)		12					

### 2.3.2 pH

Foi usado um n=12 para realizar um ensaio com pH de 4,5 em comparação com o normal 5,8 a 6.

### 2.3.3 Manutenção do material vegetal

O material vegetal foi continuamente repicado, mantendo-se a linha celular de ambas as espécies sempre em perfeitas condições para novos ensaios. À medida que o crescimento foi aumentando, o material foi direccionado para experiências em ambientes menos controlados.

#### ***2.3.4 Apresentação dos resultados***

Os dados de crescimento do explante principal (em cm), número de novas formações (nº de gemas), crescimento lateral (em cm) e crescimento total (em cm) foram apresentados sob a forma de gráficos em Excel. Foram também descritas alterações morfológicas observadas macroscopicamente.

## 2.4 Testes em aquário

Em aquários foram realizados ensaios com os 4 elementos químicos (Au, As, Sb e Ag), considerando 3 concentrações diferentes por elemento e um controlo, nos quais foi utilizada água corrente num volume total de 5 litros. Os aquários continham uma bomba que promovia a oxigenação e luz artificial durante 8 horas por dia. O ambiente oxirredutor do aquário foi medido, assim como o pH. O material vegetal usado cresceu em cultura *in vitro* e foi transferido para aquários com água da torneira durante um período de adaptação às novas condições, antes de se iniciar a experiência. Usaram-se as duas espécies de *Fontinalis* para a elaboração da experiência, tendo em conta a quantidade de material disponível.

Esta experiência teve como objectivo perceber a capacidade de acumulação dos metais de interesse pelas plantas e relacionar esta capacidade com as três concentrações utilizadas (Tabela 4). As soluções de Au foram preparadas, fazendo-se o cálculo exacto de ouro necessário no sentido de ocorrer o mínimo desperdício possível, ou seja, por exemplo para a solução de AuI (iodeto de ouro) calculou-se que, a partir de uma solução com 40 mg AuI /100mL e para um volume final de 5 litros, seriam necessários 82.2 mL de AuI para se obter uma concentração final de Au de 4 mg.L<sup>-1</sup>, 15,4 mL para uma concentração final de Au de 0,75 mg.L<sup>-1</sup> e 1,05 mL para uma concentração final de Au de 0,05 mg.L<sup>-1</sup>. Assim, apenas houve um desperdício de solução inicial inferior a 2 mL.

Nas experiências mediram-se os potenciais de oxirredução e o pH para verificar se os valores se enquadravam nos diagramas de Eh-pH, de forma a garantir a solubilização do Au (Tabela 5).

Fizeram-se 6 recolhas de material vegetal de ambas as espécies às 24 horas, 48 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas e 1 mês. A quantificação dos elementos químicos por GF-AAS foi efectuada no departamento de Geociências da Universidade de Coimbra em Julho de 2011.

Tabela 4 - Elementos químicos presentes nos 19 aquários da experiência com *Fontinalis antipyretica* e *Fontinalis squamosa*, durante 30 dias.

Composto	AuI + KI(sat)			
[Au]	μmol/L	0,25	3,75	20
	mg/L	0,05	0,75	4,0
Composto	AuCN + KCN(sat)			
[Au]	μmol/L	0,25	3,75	20
	mg/L	0,05	0,75	4,0
Composto	NaAuCl <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O			
[Au]	μmol/L	0,185	2,75	14,5
	mg/L	0,037	0,55	2,9
Composto	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>			
[As]	μmol/L	0,33	13,2	32,9
	mg/L	0,025	1,0	2,5
Composto	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>7</sub> Sb			
[Sb]	μmol/L	0,2	8,3	20,8
	mg/L	0,025	1,0	2,5
Composto	AgNO <sub>3</sub>			
[Ag]	μmol/L	0,05	5,0	15
	mg/L	0,005	0,5	1,5
Controlo	H <sub>2</sub> O			
T	dias	30		

Tabela 5 - Condições experimentais de pH e Eh no início e no final da experiência.

Composto químico	Concentração do elemento	pH <sub>i</sub>	pH <sub>f</sub>	Eh <sub>i</sub>	Eh <sub>f</sub>
AuCN	0,05	10,5	7,74	250	206,2
	0,75	8,40	7,73	263	206,9
	4,00	10,08	7,68	285	197,7
AuI	0,05	7,85	7,86	260	204,9
	0,75	7,91	7,81	297	207,3
	4,00	7,98	7,80	340	205,2
NaAuCl <sub>4</sub>	0,03	7,70	7,85	253	204
	0,55	7,66	7,77	260	210,1
	2,90	7,63	7,74	274	219,7

## 2.5 Quantificação Química

### 2.5.1 Quantificação de Ouro

As amostras recolhidas nos ensaios efectuados foram secas em estufa à temperatura de 60°C, durante 4 horas. Pesaram-se em balança digital de precisão, sendo em seguida colocadas numa mufla à temperatura de 450°C, durante 14 horas, com o intuito de eliminar elementos químicos voláteis não desejados. Reduzidas a cinzas, as amostras foram colocadas em tubos *falcon* de 25 mL e sujeitas a uma digestão ácida com 5 mL de água régia. Inicialmente colocou-se 1,25 mL de HNO<sub>3</sub>, para eliminar a matéria orgânica presente e depois 3,75 mL de HCl, mantendo o Au solúvel (a água régia perde o efeito rapidamente, não devendo ser preparada com antecedência). Os tubos foram colocados em banho-maria para reduzir o volume da amostra, e em seguida distribuído o seu conteúdo por *ependorfs* de 15mL aferidos com HCl 2M, obtendo-se um volume final de 10 mL. Introduziu-se 1 mL de MiBK (metil isobutyl cetona), seguido de agitação vigorosa e repouso para a completa separação de fases. Da fase orgânica de cada amostra foram pipetados 0,5 mL para serem analisados por GF-AAS com vista à quantificação de Au.

A determinação de Au em águas foi efectuada de modo direto. Assim, no final da experiência foram recolhidas amostras de água de cada aquário para análise em GF-AAS.

Todas as diluições necessárias foram efectuadas por adição de MiBK.

A partir de uma solução de tetracloroaurato de sódio hidratado(III) (NaAuCl<sub>4</sub>) 1000 ppm, em HCl 2M, foram preparados os padrões de leitura com concentrações de Au de 100 e 200 µg.L<sup>-1</sup>, cuja matriz é igual à das amostras, apenas não contendo material vegetal. A sensibilidade do aparelho determinou a escolha destas soluções-padrão. O método de análise teve como referência o trabalho comparativo de vários métodos analíticos realizado por Anderson *et al.* (2005) e Van Loon e Barefoot (1988).

O método usado, quantifica o Au na planta segundo a seguinte equação:

$$[\text{Au}] \mu\text{g L}^{-1} = \text{Leitura no MiBK} \times \frac{\text{Volume Total}}{\text{Volume Usado}} \times \frac{\text{Vol MiBK}}{\text{massa planta}}$$

### **2.5.2 Quantificação de As, Sb e Ag**

O método de quantificação para estes 3 elementos químicos foi igual ao utilizado para o Au. As amostras recolhidas nos ensaios foram secas em estufa durante 4 horas a 60 °C. Posteriormente, foram pesadas numa balança de precisão e efectuado um ataque químico com 8 mL de HNO<sub>3</sub> e 2mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em tubos de teflon. Os tubos foram colocados num microondas, onde, sob condições de pressão e temperatura adequadas, se obteve uma solução com os metais disponíveis para quantificação. O conteúdo dos tubos foi transferido para balões de 25 mL, e estes aferidos com água destilada. Estas soluções foram submetidas a análise por GF-AAS e quantificadas as concentrações de As, Sb e Ag presentes nas amostras.

### **2.5.3 Apresentação dos resultados**

Foram efectuados gráficos em Excel, com o propósito de avaliar a variação da concentração dos elementos testados, nas *Fontinalis spp.* durante os 30 dias do ensaio. Também se determinou a presença de Au na água no final do ensaio, tendo-se calculado a sua % de recuperação.



## 2.6 Microscopia:

Estudos estruturais de material fresco foram realizados por microscopia óptica.

Material vegetal em resina foi também analisado por microscopia óptica. Para isso, usaram-se amostras de *F. antipyretica* após exposição a soluções com diferentes concentrações Au. Fizeram-se dois tipos de lavagem: uma, com H<sub>2</sub>O bidestilada, três vezes por períodos de 10 minutos, outra com EDTA, 10 mM, também três vezes em períodos de 10-15 minutos. EDTA (Vázquez, 1999).

A colocação das amostras em resina é precedida da fixação do material numa solução de gluteraldeído tampão fosfato 2,5%, durante uma hora. Segue-se 1 hora de fixação com tetróxido de ósmio (1% m/v). Lava-se três vezes com tampão fosfato por períodos de 10 minutos. Desidrata-se o material com sucessivas passagens com álcool por períodos de 10 minutos num gradiente de concentração de etanol crescente de 40% até 95%. O material permanece durante 24 horas em etanol 100%.

O material foi impregnado em resina, polimerizando a 60 °C durante 24 horas. Para efectuar os diferentes cortes com lâmina de vidro é usado um micrótomo. Os cortes semi-finos (1 a 2 µm) foram corados com azul de toluidina e observadas as estruturas no microscópio óptico. Os cortes ultra-finos (0,5 a 0,7µm) foram colocados em grelhas de Au, para seguidamente serem contrastados com uma solução de acetato de uranilo e com uma solução de citrato de chumbo, a fim de serem observados em microscopia electrónica de transmissão (TEM).

Efectuaram-se novos estudos estruturais, após novo ensaio de *Fontinalis antipyretica* e *Fontinalis squamosa*, em presença de uma solução de NaAuCl<sub>4</sub>, com concentração de Au de 3,75 µM, e com controlo, para usar a técnica de SEM - EDS (*Scanning Electronic Microscopy – Energy Dispersive Spectroscopy*), existente no Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Coimbra. A associação de uma microssonda à técnica de SEM – EDS permitiu a visualização tridimensional da superfície do material vegetal e a determinação da sua composição química. As amostras foram fixadas com ósmio pelo mesmo método, colocadas em grelhas e revestidas a carbono na Universidade de Aveiro.

## 2.7 Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados recolhidos nos ensaios de toxicidade foi realizado, com vista à análise do crescimento do explante principal, número de novos rebentos, crescimento lateral e crescimento total. Efectuaram-se gráficos em Excel, com médias e erros padrão obtidos pelo teste Factorial Anova, considerando a variável dependente como factor de estudo em função da concentração e do número de dias. Ilustra-se também o teste de *Duncan* para a obtenção da comparação de médias entre as várias amostras dos ensaios.

Foi calculado um índice de crescimento (ICRE) (Carpio, 2004) para cada um dos indicadores (crescimento, crescimento lateral, número de gemas e crescimento total), da seguinte forma:

$$ICRE = \frac{\text{Valor final na concentração X} - \text{valor inicial na concentração X}}{\text{Valor final no controlo} - \text{valor inicial no controlo}}$$

Nos gráficos do índice de crescimento os valores relacionam-se com o crescimento do controlo, sendo que valores de ICRE > 1 indicam que os exemplares cresceram mais que o controlo, e valores de ICRE < 1 indicam que os exemplares cresceram menos. Valores de ICRE inferiores a 0,5 demonstram uma inibição de factor estudado acima dos 50 %.

Os cálculos foram feitos no programa Statistica 7.0

### 3 Resultados

#### 3.1 Esterilização do material vegetal

Como referência foram considerados estudos anteriores, Sequeira (2009) e Carpio (2004), de tentativas de esterilização de macrófitas. Após o período em que a planta foi lavada e mantida em água destilada, efectuaram-se os ensaios de esterilização. Em todos os ensaios houve contaminações de algas, fungos ou bactérias. No primeiro ensaio inocularam-se as plantas num meio de Knop com fonte de ferro do meio Murashige Skoog (MS) sem sacarose. No segundo ensaio o meio usado foi MS sem sacarose. A falta de sacarose mascara por algum tempo a contaminação, por isso e também pela sua necessidade metabólica passou a estar sempre presente com uma concentração de 1,5 % a 2% ( $\frac{m}{v}$ ). Em todos os outros ensaios o material, após ter estado em lixívia foi inoculado em meio MS com sacarose. O tempo e concentração do hipoclorito de cálcio utilizada resultou da análise mais vantajosa da taxa de sobreviventes, optando-se sempre pelo tratamento menos agressivo para a planta. Este método foi aplicado em *F. antipyretica* (Tabela 8) e depois reproduzido de igual forma em *F. squamosa* com a concentração de hipoclorito de cálcio de 5% ( $\frac{m}{v}$ ) durante 3 minutos. Os melhores resultados para a taxa de sobrevivência foram verificados na presença de hipoclorito a 5% e com um tempo de exposição de 3 minutos. Quanto menor o tempo, menores foram também os efeitos nocivos sobre a planta.

Tabela 6 – Efeito da esterilização na sobrevivência de explantes de *F.s antipyretica* inoculados *in vitro* (n=não; s=sim).

Data	H <sub>2</sub> O (dias)	Agitação	Tempo (min)	Agente	Tempo (min)	[m/m] (%)	Nº Amostras	Explantes viáveis (%)
26-02-2010	2	n	-	0	0,0	0,0	4	0,0
03-03-2010	7	n	-	0	0,0	0,0	16	0,0
03-03-2010	7	n	-	CaClO <sub>2</sub>	2,5	2,5	21	9,5
03-03-2010	7	n	-	CaClO <sub>2</sub>	2,0	5,0	10	30,0
05-03-2010	9	n	-	CaClO <sub>2</sub>	3,0	1,0	24	12,5
12-03-2010	16	n	-	CaClO <sub>2</sub>	2,5	1,0	22	0,0
12-03-2010	16	-	-	0	-	-	12	0,0
22-03-2010	26	-	-	CaClO <sub>2</sub>	2,0	5,0	23	4,3
30-03-2010	34	s	10	CaClO <sub>2</sub>	3,5	5,0	20	50,0
30-03-2010	34	s	10	CaClO <sub>2</sub>	5,0	5,0	23	52,2
26-04-2010	2	s	10	CaClO <sub>2</sub>	5,0	5,0	20	40,0
26-04-2010	2	s	10	CaClO <sub>2</sub>	5,0	5,0	23	13,0

### 3.2 Efeito dos meios no estabelecimento das culturas

Após esterilização, os explantes foram colocados em diversos meios de crescimento. Testou-se o meio MS e o meio de Andrews. O aparecimento de uma coloração acastanhada nos explantes, sem que houvesse crescimento, levou à tentativa de uso de outros meios para revitalizar os explantes que sobreviveram à esterilização e que não contaminaram. Nas repicagens efectuadas, testou-se a diluição do meio MS, contudo a planta não desenvolvia, apresentando a mesma coloração castanha. Houve um longo período de senescência da planta sem reagir aos meios utilizados. A repicagem para um meio de Knop modificado com micronutrientes do meio MS e com  $\frac{1}{2}$  da concentração de ferro do mesmo meio, resultou na mudança de coloração dos explantes e na activação do crescimento. O efeito deste meio em *F. squamosa* foi imediato pois esta espécie foi inoculada directamente neste meio sem testes prévios nos meios acima referidos.

### 3.3 Biomassa

A experiência de aumento da biomassa mostra que ao longo do período de cultura há um aumento contínuo da biomassa até ao final dos ensaios (60 dias, Figura 7).

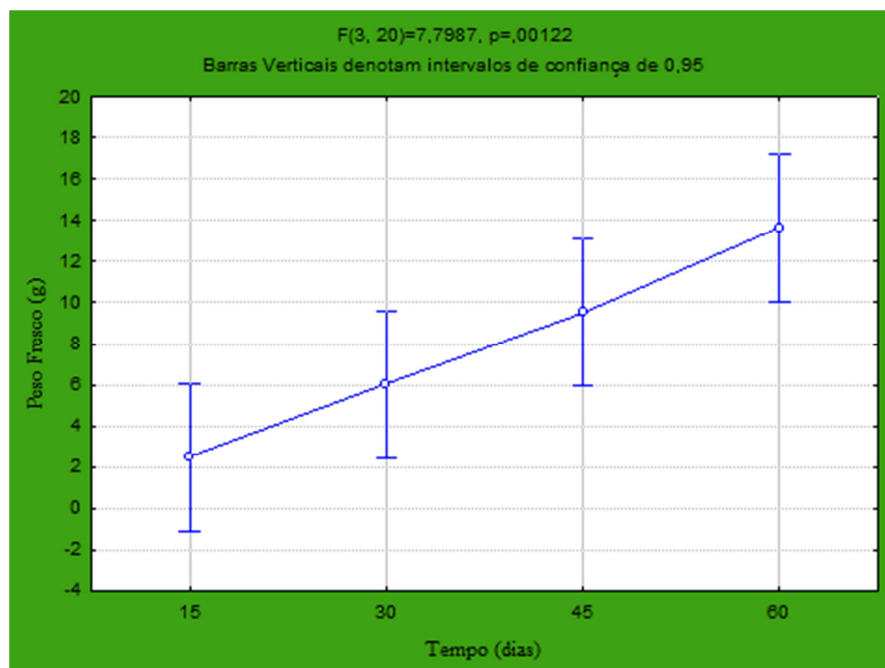


Figura 7 – Evolução do peso fresco *F. antipyretica* cultivada durante 60 dias em solução de Knop.

### 3.4 Efeito da benziladenina no crescimento de *Fontinalis*

#### 3.4.1 *Fontinalis antipyretica*

A presença de benziladenina (BA) no meio de cultura mostrou ter um efeito inibidor do crescimento da *F. antipyretica*, acentuando-se esse efeito com o prolongar do ensaio. Inicialmente, as plantas tiveram um crescimento mínimo, apresentando aos 15 dias algumas formações laterais em desenvolvimento visíveis (Figura 8). No entanto, as plantas entraram em senescência, o crescimento e a formação de gemas cessou, efeitos associados, em alguns explantes, à necrose dos tecidos.

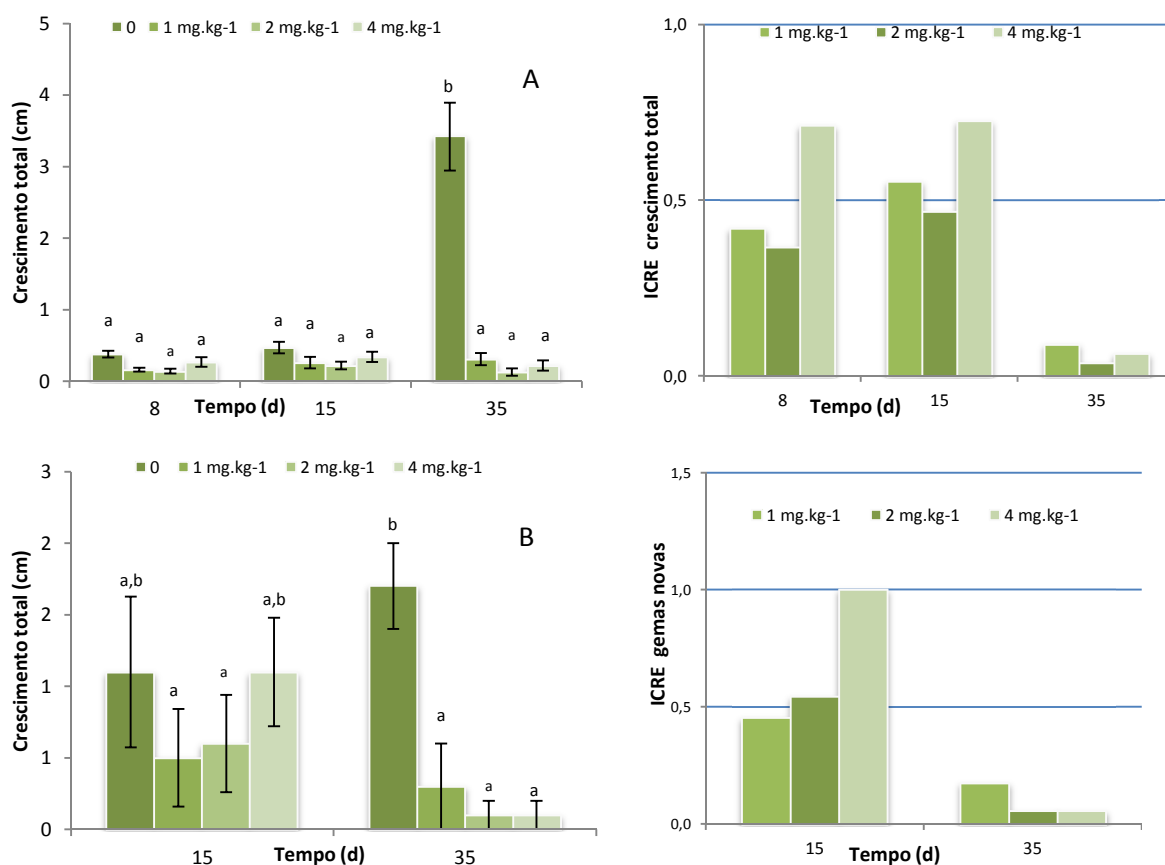


Figura 8 – Efeito da benziladenina (BA) na cultura in vitro de *F. Antipyretica*. A) crescimento total (figura da esquerda) e respectivo índice de crescimento (ICRE, figura da direita); B) n° gemas formadas e respectivo ICRE. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa. [BA] em mg.L<sup>-1</sup>.

## 3.5 Testes de Toxicidade

### 3.5.1 Ouro

#### 3.5.1.1 *Fontinalis antipyretica*:

Os resultados do efeito de uma solução salina de ouro ( $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) no crescimento *in vitro*, não foram conclusivos no primeiro ensaio, em que se utilizou uma gama de concentrações de Au entre  $0,05\mu\text{M}$  e  $5,0\mu\text{M}$ . Na concentração  $0,05\mu\text{M}$  de Au, a planta apresentou um comportamento semelhante ao controlo nos primeiros 15 dias. A partir deste momento, ocorreu uma progressiva inibição de crescimento, sendo o seu ICRE, no final do ensaio, bem inferior a 1. Na concentração mais elevada testada ( $5,0\mu\text{M}$ ), a planta mostrou um ICRE muito inferior, sendo no final do ensaio 80 % inferior ao controlo. Nesta concentração, os explantes alteraram o seu aspecto morfológico formando estruturas nodosas no local de crescimento das novas gemas (Figura 9), assemelhando-se a um processo organogénico. Pelo contrário, alguns explantes apresentavam sinais de senescência observáveis pelo aparecimento de uma tonalidade acastanhada. Na concentração de  $0,5\mu\text{M}$  os explantes cresceram acima do controlo em todos os períodos de cultura (Figura 10).

Tendo em conta estes resultados preliminares, um segundo teste com Au foi efectuado, no qual se procedeu à redução do intervalo de concentrações para aferir qual a relação óptima entre o crescimento da planta e a quantidade de Au introduzida no sistema, assim como os seus limites de crescimento (Figura 11).

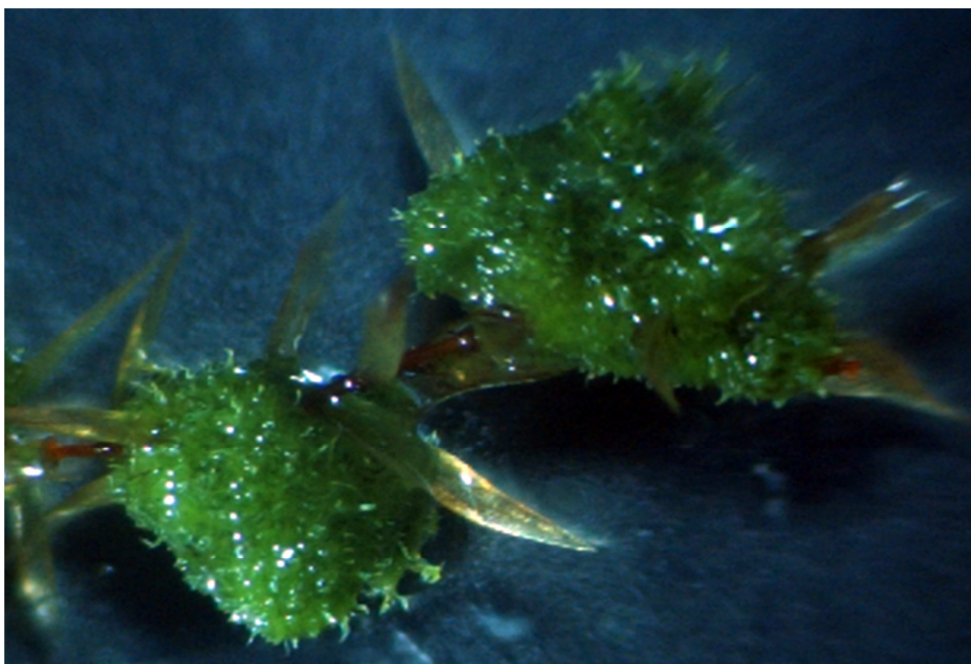


Figura 9 – Formação de estruturas nodosas em culturas de *F. antipyretica* em meio com 5,0  $\mu\text{M}$  de Au. Ampliação: 2,8x.

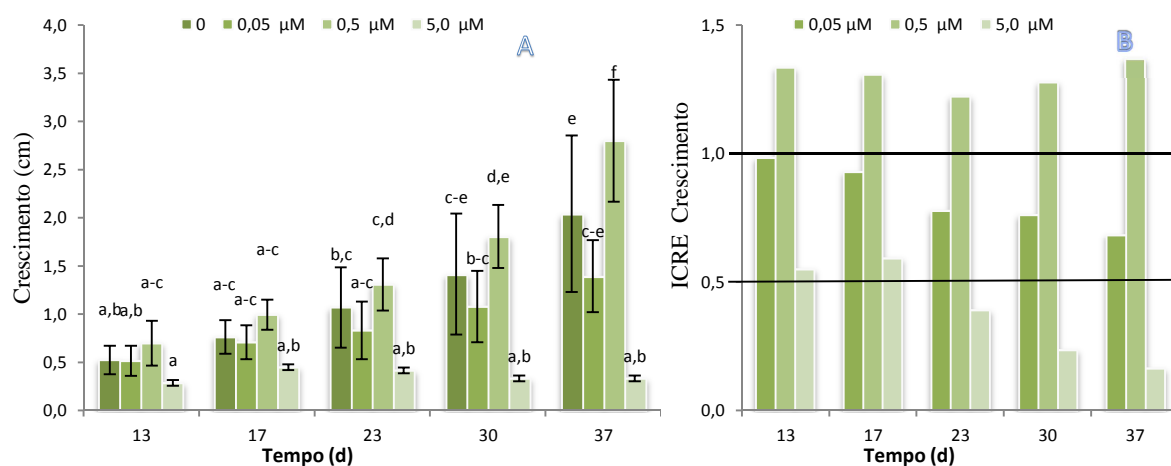


Figura 10 – A) crescimento de *F. antipyretica* em função do tempo e de diferentes concentrações de Au. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativa ( $p < 0,005$ ); B) índices de crescimento, em que valores inferiores a 0,5 indicam inibição crescimento em relação ao controle acima dos 50%. [Au] em  $\mu\text{M}$ .

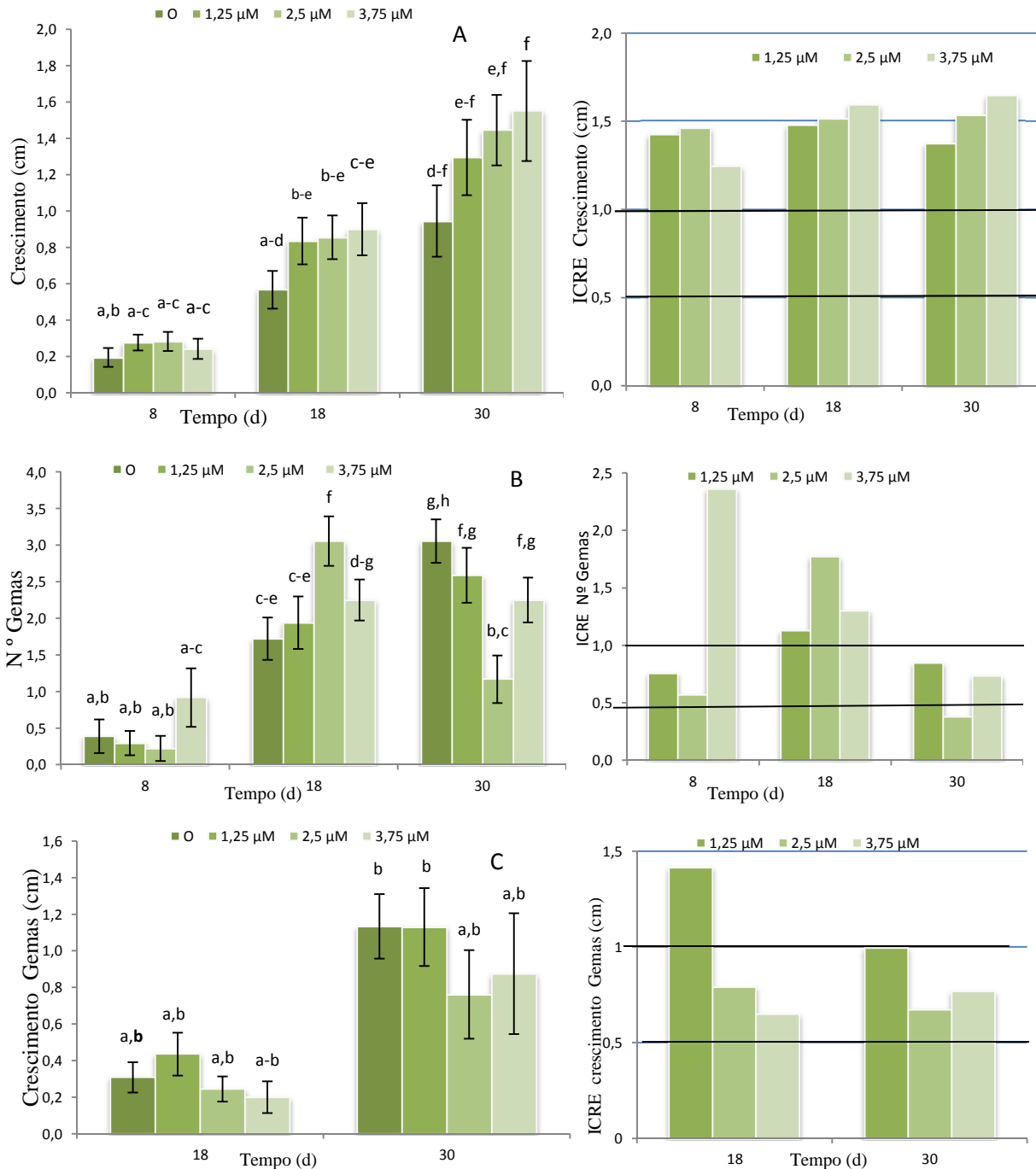


Figura 11 – Resultados do 2º teste com Au. A) crescimento do explante principal; B) nº de novas gemas; C) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). [Au] em  $\mu\text{M}$ .

No segundo teste com Au verificou-se um crescimento linear durante os primeiros 30 dias do ensaio para todas as concentrações do metal testadas, tendo-se sempre observado um crescimento do eixo principal da planta superior ao controlo. O número de rebentos axilares foi maior na presença de metal até aos 15 dias de ensaio, tendo o controlo no final do ensaio tido o maior número de gemas formadas e também o maior crescimento lateral,



apesar de não apresentar diferenças estatísticas significativas relativamente às concentrações testadas. Nestas concentrações não se verificaram outros tipos de alterações morfológicas nos explantes (Figura 12). A experiência prolongou-se até 60 dias, para o controlo e para a concentração de 3,75  $\mu\text{M}$ . Neste intervalo, os explantes, na presença de metal, voltaram a ter índices de crescimento superiores a 1 em todos os parâmetros analisados (Tabela 9). Verificou-se ainda que o crescimento do explante principal mais que duplicou de tamanho e o crescimento das novas ramificações aumentou 4-5 vezes.



Figura 12 – *F. antipyretica* após 30 dias de cultura no segundo ensaio com Au. Do lado esquerdo com  $[\text{Au}] = 3,75 \mu\text{M}$  e do lado direito dois explantes nas condições controlo. Escala em cm.

Tabela 7- Valores das médias com erro padrão obtidas aos 60 dias do ensaio com *Fontinalis antipyretica*.

[Au] $\mu\text{M}$	Tipo(cm)	(média $\pm$ EP)	Tipo(n $^\circ$ )	(média $\pm$ EP)	Tipo(cm)	(média $\pm$ EP)
0	Cresc	3,62 $\pm$ 0,48	Gemas	5,33 $\pm$ 0,63	Cresc Gem	4,59 $\pm$ 0,52
3,75	Cresc	4,73 $\pm$ 0,50	Gemas	7,25 $\pm$ 0,90	Cresc Gem	5,32 $\pm$ 1,32
ICRE	Cresc	1,31	Gemas	1,36	Cresc Gem	1,16

### 3.5.1.2 *F.squamosa*

Nos ensaios efectuados com a espécie *F. squamosa*, verificaram-se diferenças no desenvolvimento entre as plantas. A planta apresentou uma grande propensão para a formação de gemas, responsável por um crescimento lateral muito acentuado. Deste modo, o crescimento do eixo principal não é preponderante, sendo aos 30 dias um quinto do crescimento total (Figura 13) e aos 60 dias um décimo do crescimento total (dados não apresentados).

Nos primeiros 8 dias, pela menor expressão dos valores, pequenas alterações têm mais impacto. No crescimento total verificou-se uma alteração grande da primeira para a segunda semana, onde o ICRE altera de valores próximos do controlo, para inibições de 50

%. Até aos 30 dias, a presença de Au não acentua a tendência de inibição. O número de gemas novas foi semelhante em todas as concentrações durante todo o ensaio. Aos 30 dias, os efeitos mais visíveis da presença de Au verificaram-se na inibição do crescimento total em relação ao controlo, desde 20% com 2,5  $\mu\text{M}$  até 35% com 1,25  $\mu\text{M}$ , e com a presença de zonas necróticas mais acentuadas nos locais de formação de gemas novas para o caso das concentrações mais altas.

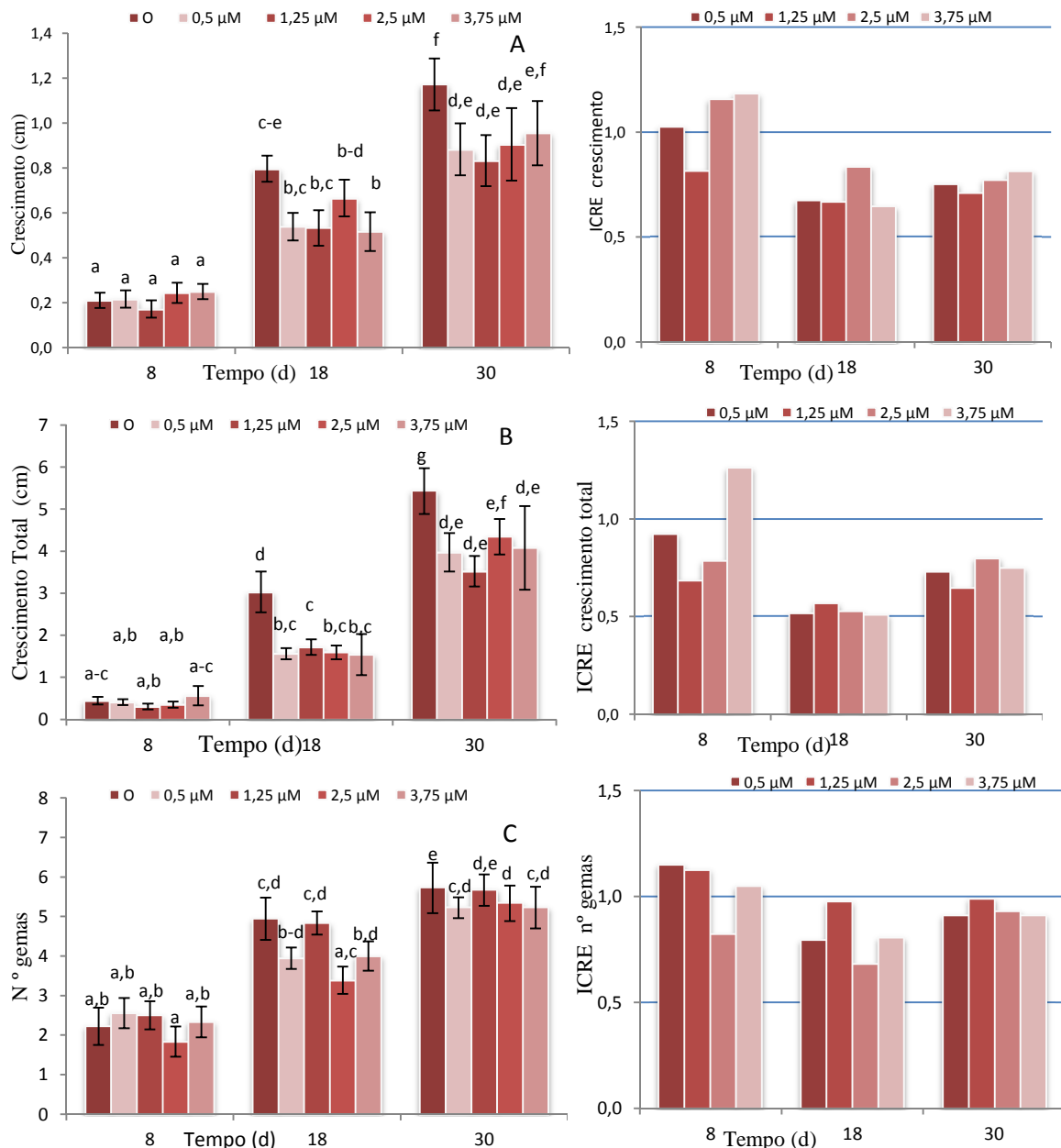


Figura 13 – Resultados do 2º teste com Au. A) crescimento explante principal; B) crescimento total; C) nº novas gemas e ICRES. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ). [Au] em  $\mu\text{M}$ .

Um terceiro ensaio com Au foi realizado com o objectivo de testar o comportamento dos explantes quando submetidos a concentrações de Au mais elevadas e por períodos de tempo mais alargados (Figura 14).

Os resultados mostram que o número de gemas e o crescimento total triplicaram no segundo mês da experiência. A forte inibição verificada aos 15 dias foi-se atenuando com o decorrer do tempo e, aos 60 dias, o número de novas gemas e o crescimento total para as concentrações de 5,0  $\mu\text{M}$  e 20,0  $\mu\text{M}$  mostrou ser equivalente ao controlo. No entanto, na concentração mais elevada (20,0  $\mu\text{M}$ ) observou-se a presença de folhas mais escurecidas. Na concentração mais baixa de Au usada (0,5 $\mu\text{M}$ ) verificou-se uma inibição do crescimento total: ICRE aos 60 d é cerca de 30% inferior ao controlo e o n° de gemas inferior em 40%.

Nesta espécie, nenhuma concentração de Au usada foi suficientemente tóxica para alterar em definitivo qualquer parâmetro do seu desenvolvimento. No entanto, em nenhuma concentração os valores dos parâmetros estudados são iguais ao do controlo, existindo sempre por parte da planta uma fase de adaptação onde os parâmetros em estudo diferem do controlo, ainda que de forma reversível.

Na Figura 15, observam-se estruturas mais negras na zona de ramificação lateral na exposição da planta a concentrações mais altas de ouro, mostrando as dificuldades iniciais de adaptação ao meio.

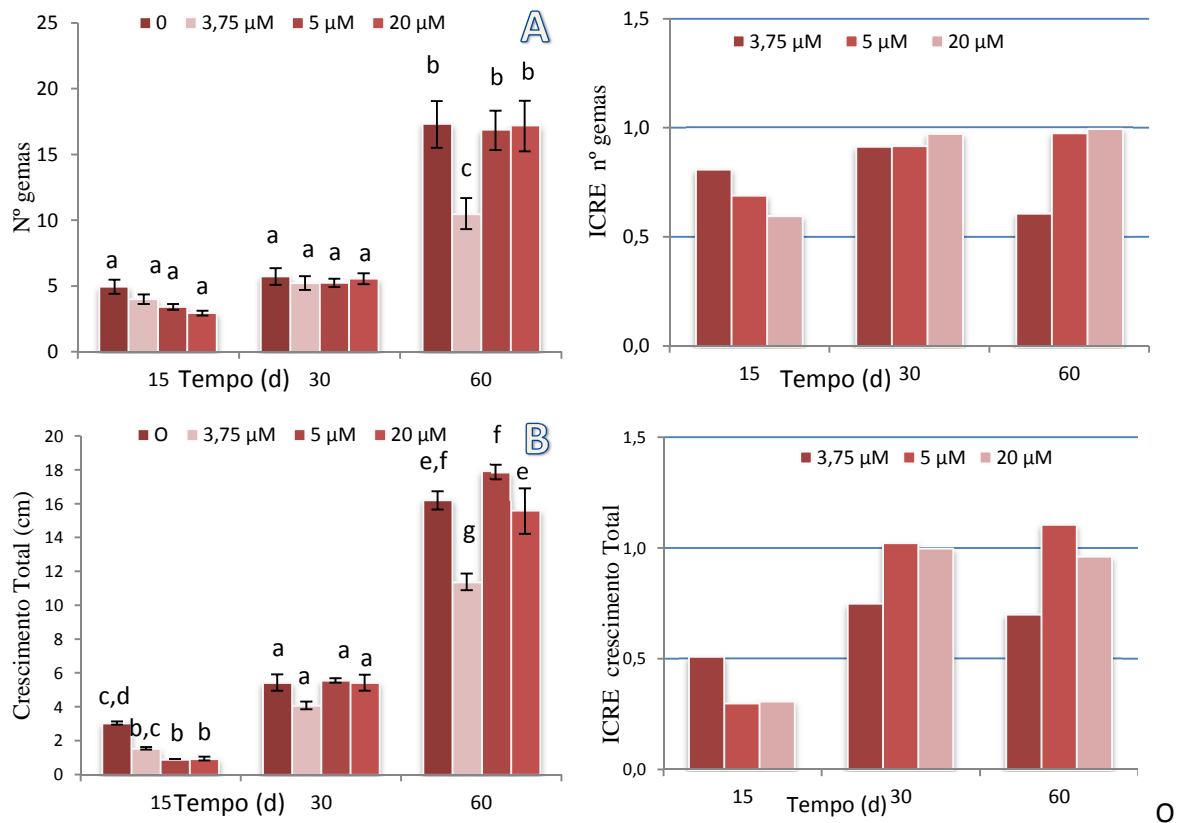


Figura 14 – Resultados do 3º teste com Au: A) nº de novas gemmas; B) crescimento total e ICRES. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). [Au] em  $\mu\text{M}$ .



Figura 15 – Aspecto de explantes de *F. squamosa* após 30 dias de cultura. Do lado esquerdo, controle, ao centro com [Au]=3,75  $\mu\text{M}$  de Au e, do lado direito, um explante em meio com 20 $\mu\text{M}$  de Au. Escala em cm.

### 3.5.2 Arsénio

#### 3.5.2.1 *Fontinalis antipyretica*

No crescimento do explante principal, o arsénio teve um efeito inibidor forte e mais acentuado com o prolongar do tempo de exposição. Aos 8 dias, a inibição na presença de 5  $\mu\text{M}$  de As, era já acima de 50 % e cada vez maior até ao final do ensaio. Na presença de 20  $\mu\text{M}$  de As, apenas ocorreu crescimento a partir dos 8 dias, sendo este 80% inferior ao controlo no final do ensaio. A concentração 0,5  $\mu\text{M}$  de As foi a única que não provocou efeitos observáveis no crescimento ao longo de todo o período de cultura (Figura 16).

A formação de novas gemas pela planta mostrou ser proporcional à presença de As no meio. Aos 15 dias, a formação de gemas era muito superior ao controlo em todas as concentrações testadas e, no final do ensaio, na concentração mais elevada (20  $\mu\text{M}$ ), a sua presença era superior à do controlo em mais de 100%. Apesar disso, o crescimento lateral final também foi inibido pela presença de As no meio.

No final do ensaio, as muitas ramificações formadas tiveram um índice de crescimento bastante inferior ao do controlo. Na concentração de 20  $\mu\text{M}$  de As podem ser observadas alterações morfológicas no crescimento lateral da planta, com as folhas a encaracolarem e a diminuírem de tamanho (Figura 17).

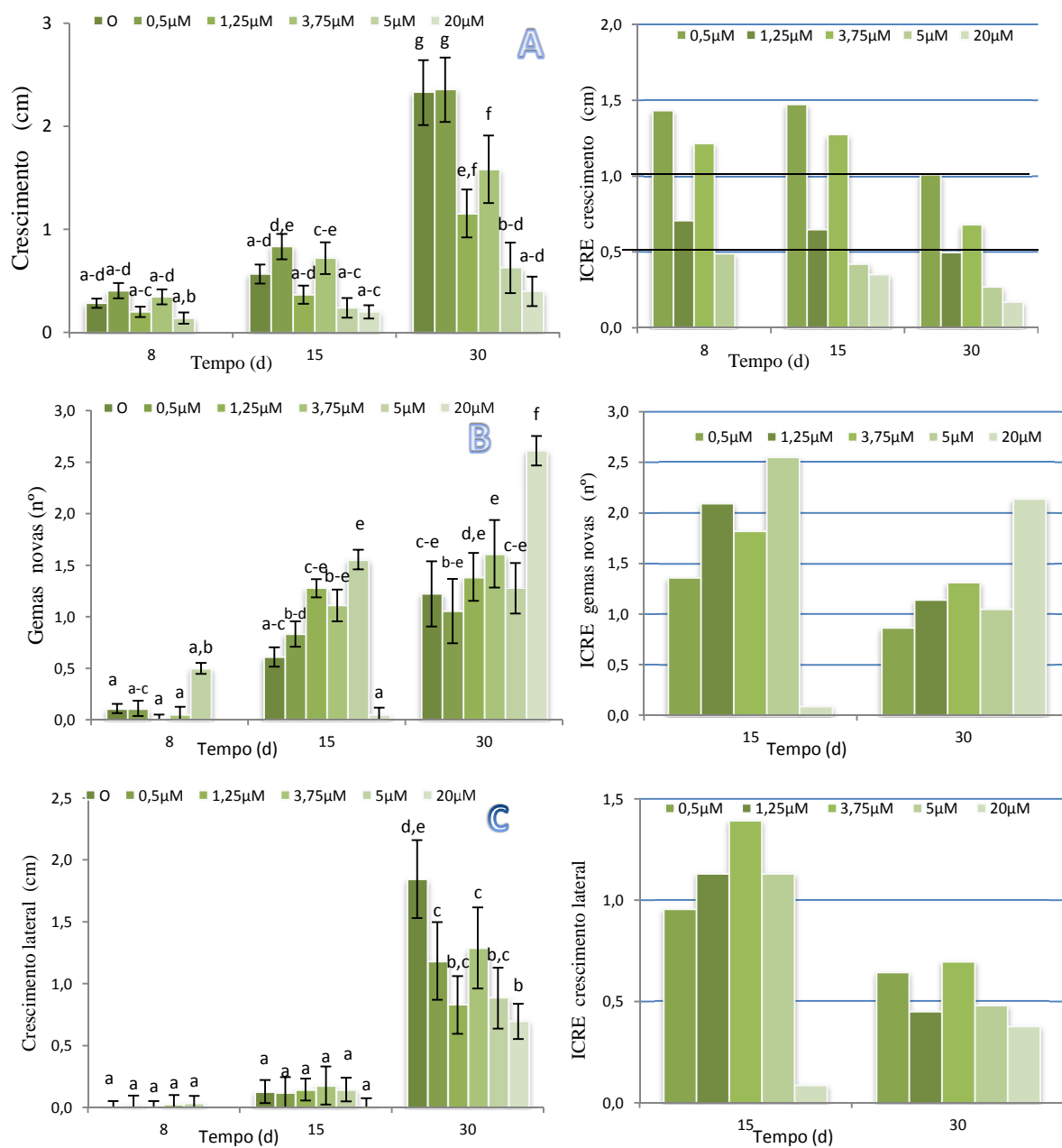


Figura 16 – Ensaio com *F. antipyretica* na presença de uma solução de As. A) crescimento explante principal; B) n° de novas gemas; C) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (p < 0,05). [As] em μM.



Figura 17 – *F. antipyretica* exposta a 20µM de As durante 30 dias. À esquerda um grande número de ramificações não desenvolvidas e, á direita, são visíveis alterações morfológicas do crescimento lateral. Escala em cm.

### 3.5.2.2 *Fontinalis squamosa*

Nesta espécie os ensaios de controlo mostraram uma linearidade no crescimento ao longo dos 30 dias da experiência. Decorridos 8 dias, não se verificam diferenças significativas no crescimento. Após 15 dias, o crescimento do controlo e o número de formações laterais novas eram muito superiores a todas as outras concentrações testadas. Aos 30 dias, verificou-se que as duas concentrações mais altas não acompanhavam o crescimento lateral verificado pelas concentrações mais baixas, havendo dois padrões de inibição diferentes. Neste ensaio, verifica-se a inibição provocada pela presença de As em todos os períodos analisados e em todas as concentrações, sendo a inibição proporcional à presença do metalóide (Figura 18).

Verificaram-se ainda diferenças de cor e de crescimento entre os dois padrões de inibição, observando-se uma coloração verde mais escura e um menor crescimento lateral na concentração mais elevada, em amostras com 90 dias de cultura (Figura 19).

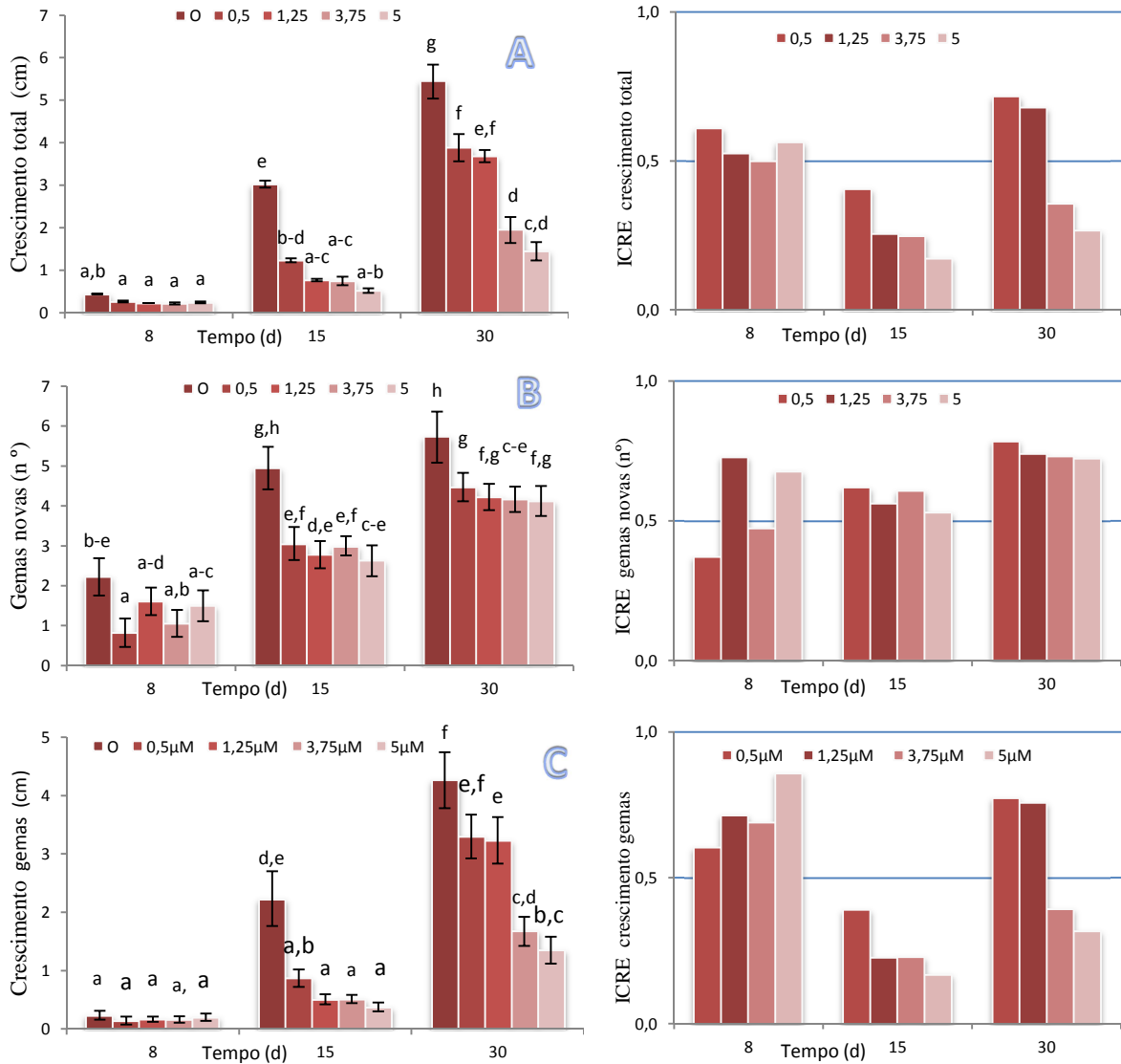


Figura 18 – *F. squamosa* exposta a concentrações de As durante 30 dias: A) crescimento total; B) nº gemas novas; C) crescimento lateral e ICRES. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). [As] em  $\mu\text{M}$ .



Figura 19 – Explantes de *F. squamosa* exposta a soluções de As durante 90 dias. À esquerda para concentrações de As de 0,5  $\mu\text{M}$  e à direita de 5,0  $\mu\text{M}$ . Escala em cm.



### 3.5.3 Antimónio (Sb)

#### 3.5.3.1 *Fontinalis antipyretica*

Aos 30 dias de ensaio, todas as concentrações Sb tiveram um crescimento superior ao controlo, apresentando todas elas cerca de metade do número de novas formações. O crescimento lateral na concentração 5,0  $\mu\text{M}$  foi semelhante ao do controlo, ocorrendo um menor número de novas gemas mas também um crescimento maior das ramificações formadas.

Após 60 dias de ensaio, as amostras em meio com 5,0  $\mu\text{M}$  de Sb destacaram-se pelo crescimento apresentado, com um índice de crescimento do eixo principal de 1,35 e com um índice de crescimento lateral de 2,38, apesar de apresentar sensivelmente o mesmo número de ramificações que o controlo (ICRE=1,13).

Nas concentrações inferiores, os parâmetros medidos revelam resultados inferiores ao controlo, exceptuando o crescimento do explante principal na concentração mais baixa, 0,5  $\mu\text{M}$  de Sb (Figura 20).

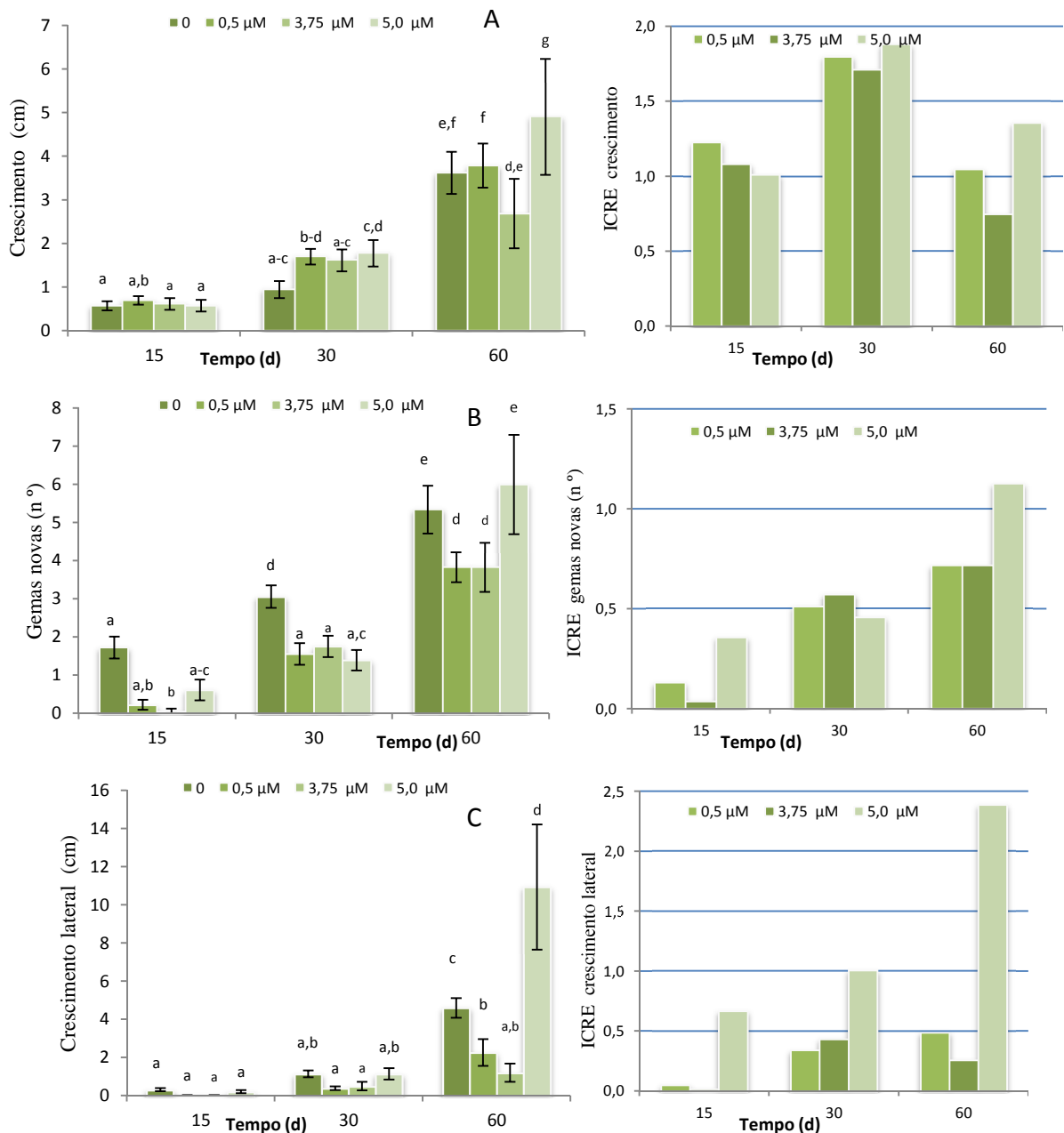


Figura 20 – Ensaio com *F. antipyretica* na presença de uma solução de Sb: A) crescimento explante principal; B) n° de novas gemas; C) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). [Sb] em  $\mu\text{M}$ .

### 3.5.3.2 *Fontinalis squamosa*

Para a *F. squamosa* a concentração óptima de crescimento foi de 0,5  $\mu\text{M}$  de Sb, quase parecendo um ensaio com um elemento essencial, uma vez que se observaram índices crescimento acima do controlo em todas as concentrações testadas, bem como em todos os parâmetros medidos, no final dos 60 dias de ensaio (Figura 21). Tendo em conta

os dados deste ensaio, prevê-se que a planta possa suportar valores de Sb ainda mais elevados.

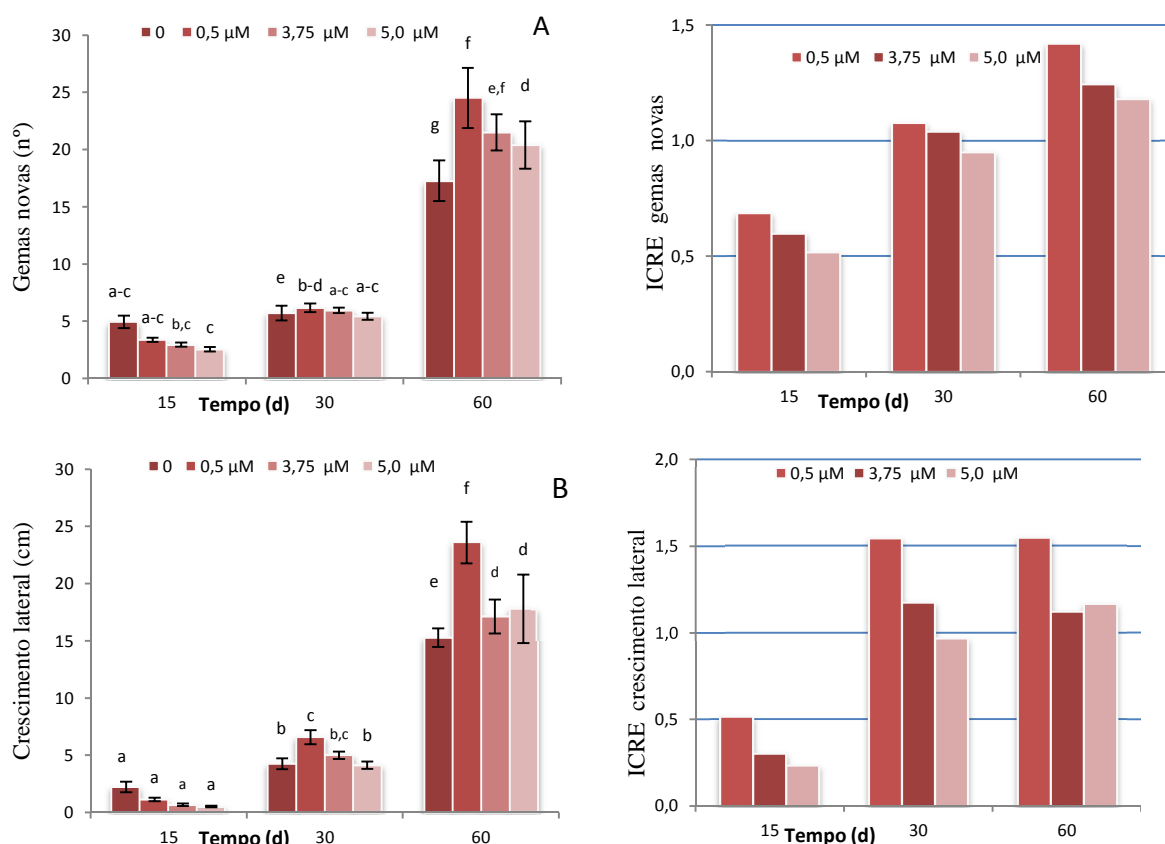


Figura 21 – *F. squamosa* exposta a concentrações de antimónio durante 60 dias. A) n° de gemas novas; B) crescimento lateral e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas para ( $p < 0,05$ ). [Sb] em  $\mu\text{M}$ .

### 3.5.4 Prata (Ag)

#### 3.5.4.1 *Fontinalis antipyretica*

No ensaio com Ag, a concentração de 3,75  $\mu\text{M}$  reflectiu-se num ICRE do eixo principal superior a 1 durante todo o ensaio. Aos 60 dias, o crescimento lateral era o dobro do controlo apesar de se verificar um número inferior de ramificações. Nas concentrações de Ag 0,5  $\mu\text{M}$  e 5,0  $\mu\text{M}$ , os explantes apresentam valores ligeiramente inferiores ao controlo (Figura 22). Porém, notou-se na concentração de 5,0  $\mu\text{M}$ , a presença, em alguns explantes, de um crescimento lateral mais intenso com maior formação de gemas novas.

No ensaio com a presença de Ag, ocorreu uma forte inibição na concentração de 20 $\mu\text{M}$ . Nesta situação, os tecidos ficaram necróticos a partir da base enquanto a

extremidade superior permanecia ainda verde, fenómeno este característico das briófitas (Figura 23).

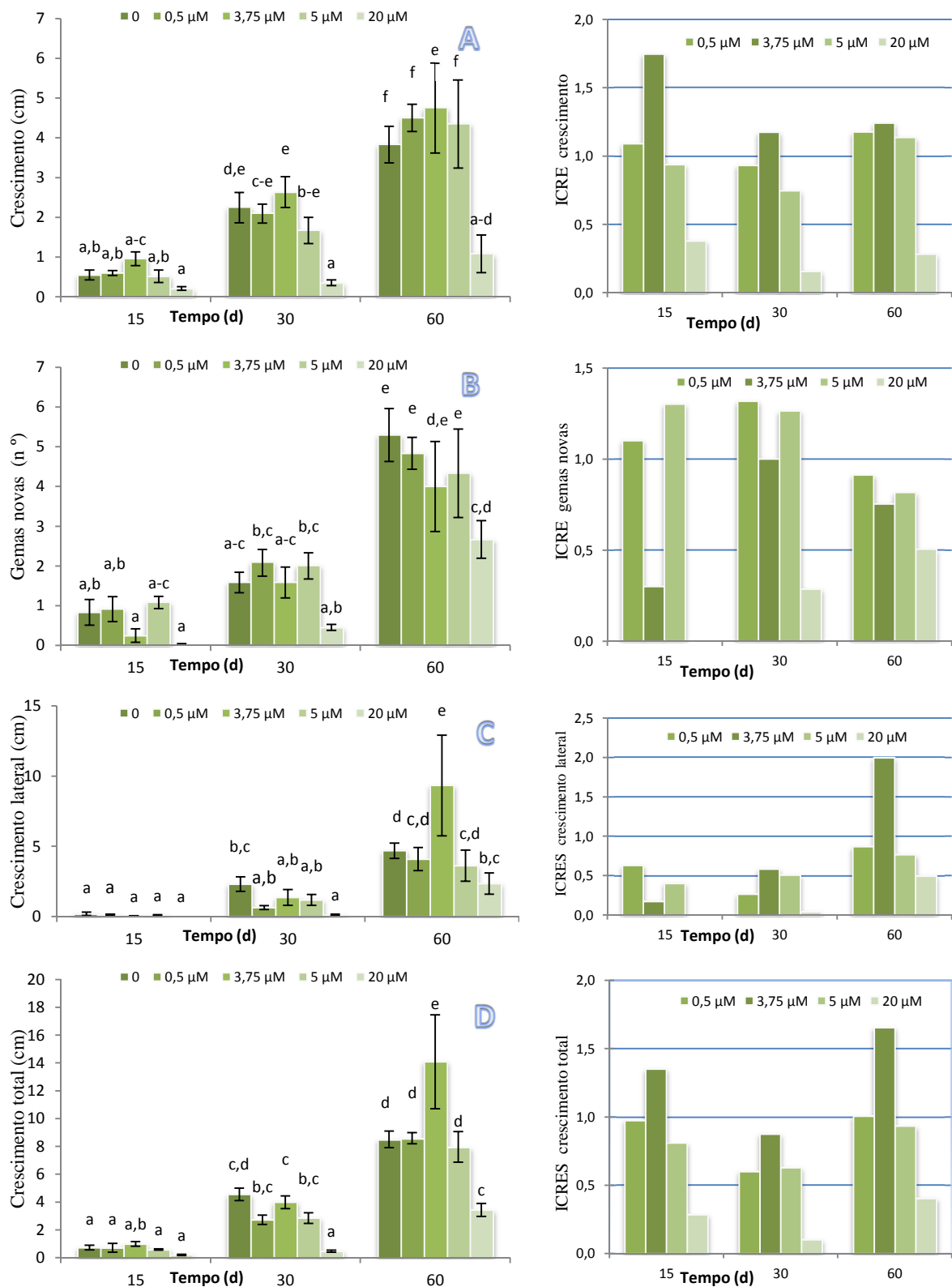


Figura 22 – Ensaio com *F. antipyretica* na presença de uma solução de Ag. A) crescimento explante principal; B) n° de gemas novas; C) crescimento lateral; D) crescimento total e os índices de crescimento ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas ( $p < 0,05$ ). [Ag] em  $\mu\text{M}$ .

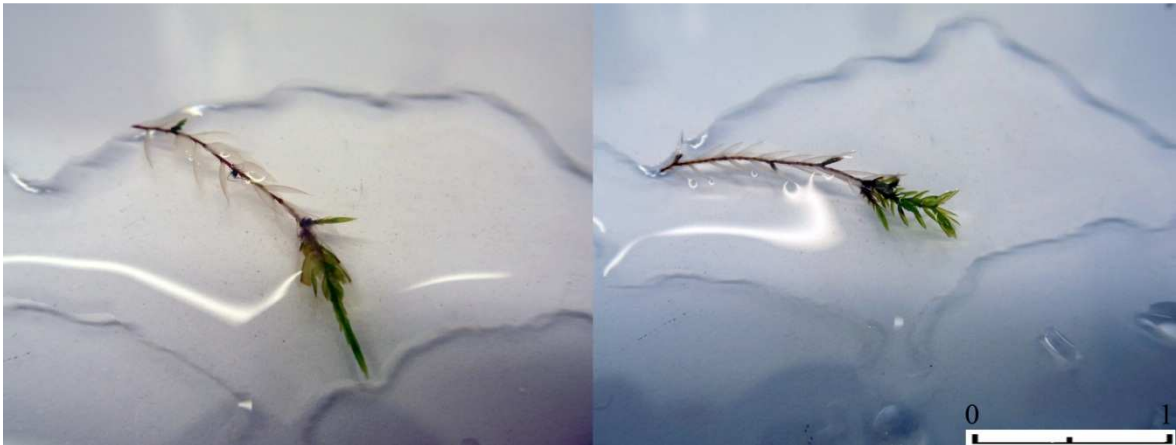


Figura 23 – À esquerda *F. antipyretica* com 20  $\mu\text{M}$  Ag. À direita *F. squamosa* com 20  $\mu\text{M}$  de Ag. Escala em cm.

#### 3.5.4.2 *Fontinalis squamosa*

Nesta espécie verificou-se que o crescimento do eixo principal apenas era afectado na concentração de 20  $\mu\text{M}$ . Uma situação semelhante observou-se com o crescimento lateral (Figura 24).

Neste ensaio, a inibição dos parâmetros estudados está de acordo com o gradiente de concentração. Todos os parâmetros revelaram índices de crescimento inferiores ao controlo, sendo a concentração de 0,5  $\mu\text{M}$ , a que mais se aproximou dos valores do controlo.

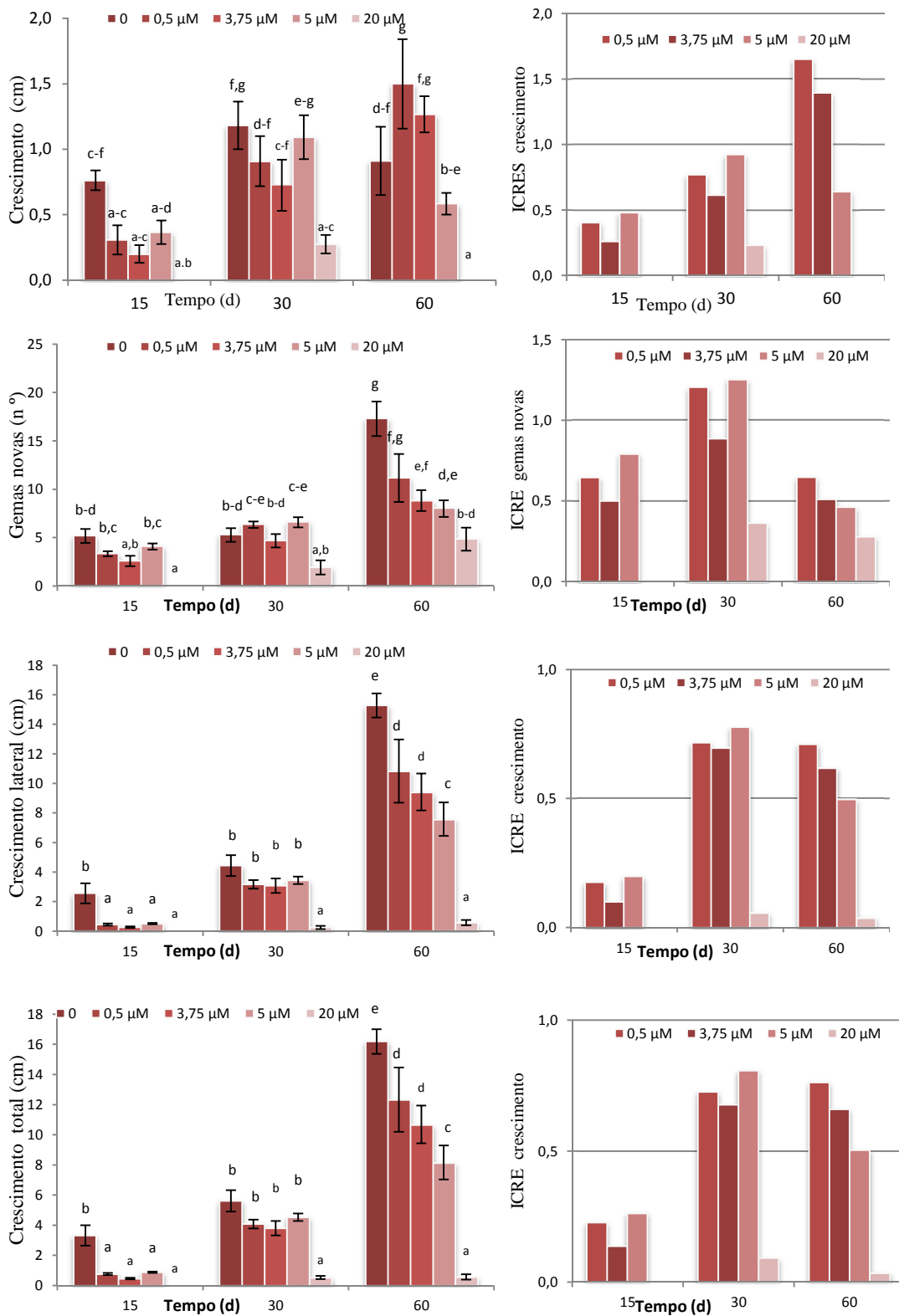


Figura 24 – *F. squamosa* exposta a concentrações de Ag durante 60 dias. A) crescimento explante principal; B) n° de gemas novas; C) crescimento lateral; D) crescimento total e ICRES. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas (p < 0,05). [Ag] em µM.

### 3.5.5 pH

O valor de pH de 4,5 foi inibidor do crescimento em ambas as espécies. A *Fontinalis antipyretica* foi claramente mais afectada, alterando a sua cor para castanho e deixando de crescer. A *Fontinalis squamosa*, dos 15 aos 30 dias desenvolveu-se e, apesar de a planta apresentar um escurecimento, revelou uma maior capacidade adaptativa ao meio mais ácido (Figura 25).

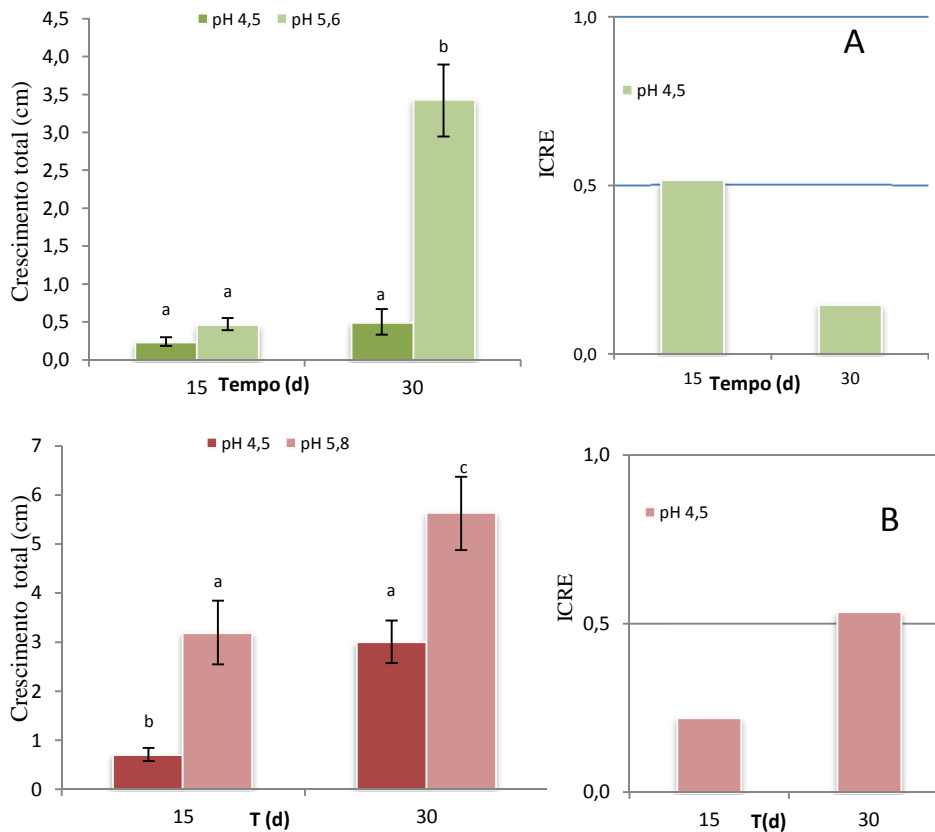


Figura 25 – A) explantes de *F. antipyretica*; B) explantes de *F. squamosa* e ICREs. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ).

## 3.6 Acumulação de Metais

### 3.6.1 Ouro

Na exposição às soluções auríferas de menor concentração, verificou-se que a espécie *F. antipyretica* exibe um padrão de acumulação semelhante (Figura 26). Nas primeiras 48 horas de cultura ocorreu uma acumulação rápida, tendo-se atingido neste momento os valores de acumulação mais elevados. Seguiu-se um período de libertação de metal mais prolongado que pode durar mais de 6 dias (aproximadamente 150 horas), e uma

segunda acumulação mais lenta, superior a 12 dias (aproximadamente 300 horas). Os valores mais elevados foram obtidos com a presença de iodo. A espécie *F. squamosa* apresenta um comportamento semelhante na presença de cloro. Para a solução com iodo e cianeto, a planta tem uma tendência positiva e gradual na acumulação com o prolongar do ensaio, terminando no ensaio com cianeto num valor extraordinariamente alto. Na presença de iodo a acumulação foi inferior à observada com *F. antipyretica* (Figura 26).

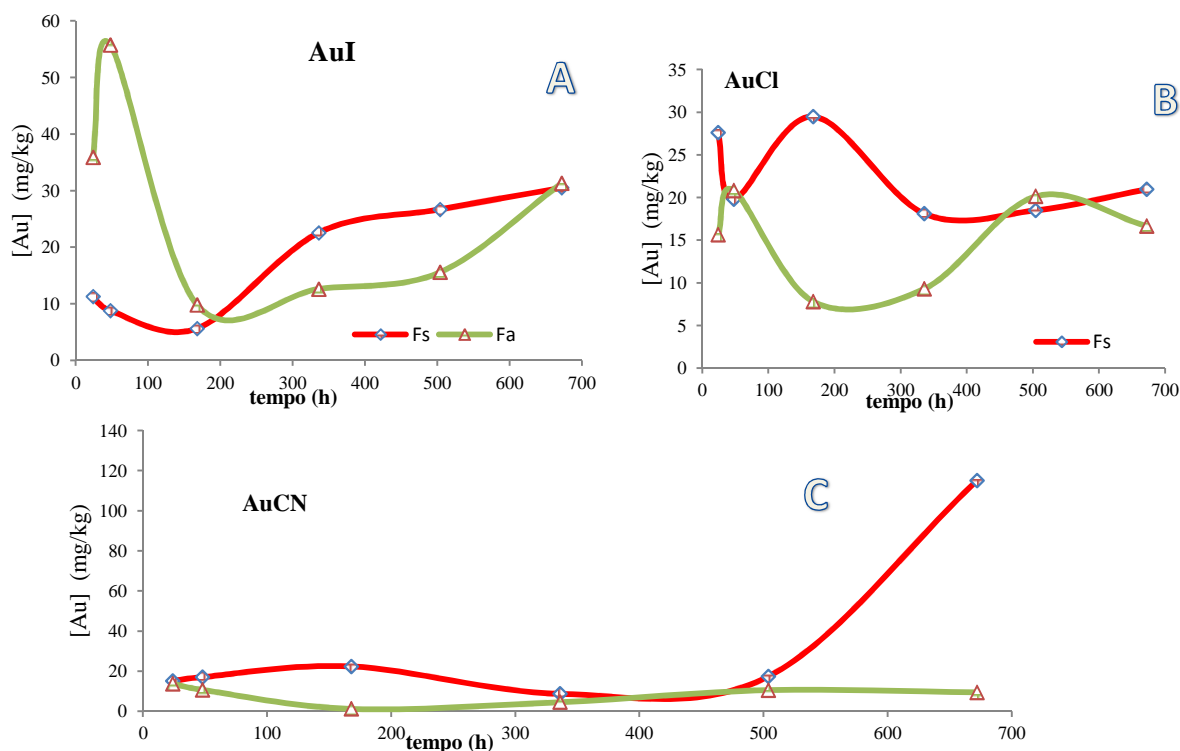


Figura 26 – Ensaio com *F. antipyretica* (a verde) e *F. squamosa* (a vermelho) expostas a diferentes soluções auríferas. A) AuI  $[Au]_i = 0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; B) AuCl  $[Au]_i = 0,03 \text{ mg.kg}^{-1}$ ; C) AuCN  $[Au]_i = 0,05 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Para a concentração intermédia, *F. antipyretica* demonstra um padrão idêntico, sendo que na presença de cloro, a acumulação máxima só foi atingida após 14 dias (336 horas) de ensaio (Figura 27). Na presença de iodo, a acumulação e libertação inicial verificou-se nas primeiras 48 horas, ocorrendo depois um período superior a 16 dias (400 horas) de retenção de metal na planta, até á sua libertação quase total. Os valores mais altos foram obtidos na presença de iodo, tendo ocorrido alterações morfológicas, com a planta a apresentar uma textura mais gelatinosa e uma coloração mais clara.

No caso de *F. squamosa*, à excepção da grande acumulação inicial na presença de iodo, ocorreu de novo um aumento da concentração de metal com o prolongar do ensaio,



na presença de cloro e de cianeto, tendo os melhores resultados sido obtidos com iodo (Figura 27).

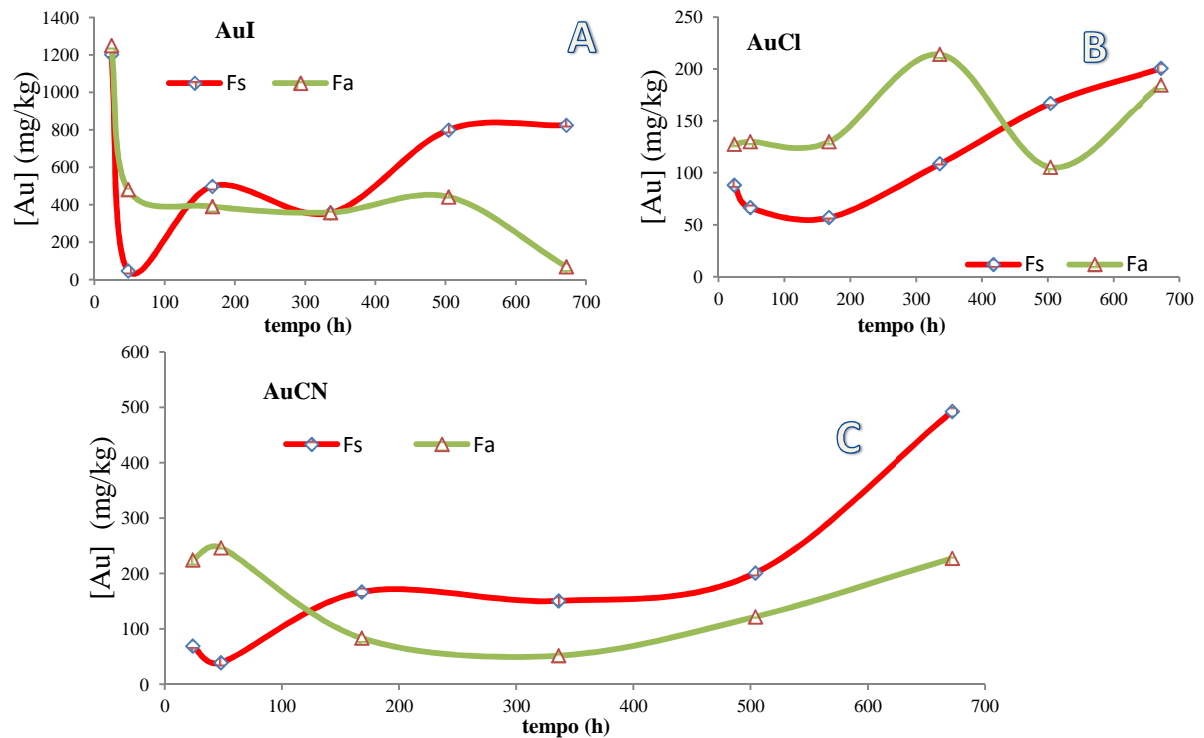


Figura 27 – Ensaio com *F. antipyretica* (a verde) e *F. squamosa* (a vermelho) expostas a diferentes soluções auríferas. A) AuI  $[Au]_i = 0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ ; B) AuCl  $[Au]_i = 0,55 \text{ mg.L}^{-1}$ ; C) AuCN  $[Au]_i = 0,75 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Na concentração mais elevada, o comportamento é em tudo idêntico ao da *F. antipyretica* e de *F. squamosa* (Figura 28). Na presença de cloro, a acumulação foi mais intensa na espécie *F. squamosa*. Na presença de cianeto<sup>1</sup>, o padrão é amplificado pelos valores mais altos obtidos com *F. antipyretica*, acima de  $5000 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Na presença de iodo houve alterações morfológicas graves, existindo uma acentuada necrose dos tecidos. Apesar disso as plantas conseguiram reter a acumulação de ouro acima dos  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

<sup>1</sup> Ensaio com cuidados dobrados: Cianeto na forma gasosa (HCN) é rapidamente letal para o Homem, pela inibição da respiração celular, em concentrações acima de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ . Tolerável por 1 hora sem efeito imediato entre  $45\text{-}54 \text{ mg.L}^{-1}$ . O odor limite situa-se entre  $2\text{-}5 \text{ mg.L}^{-1}$  (van Zyl, 1985).

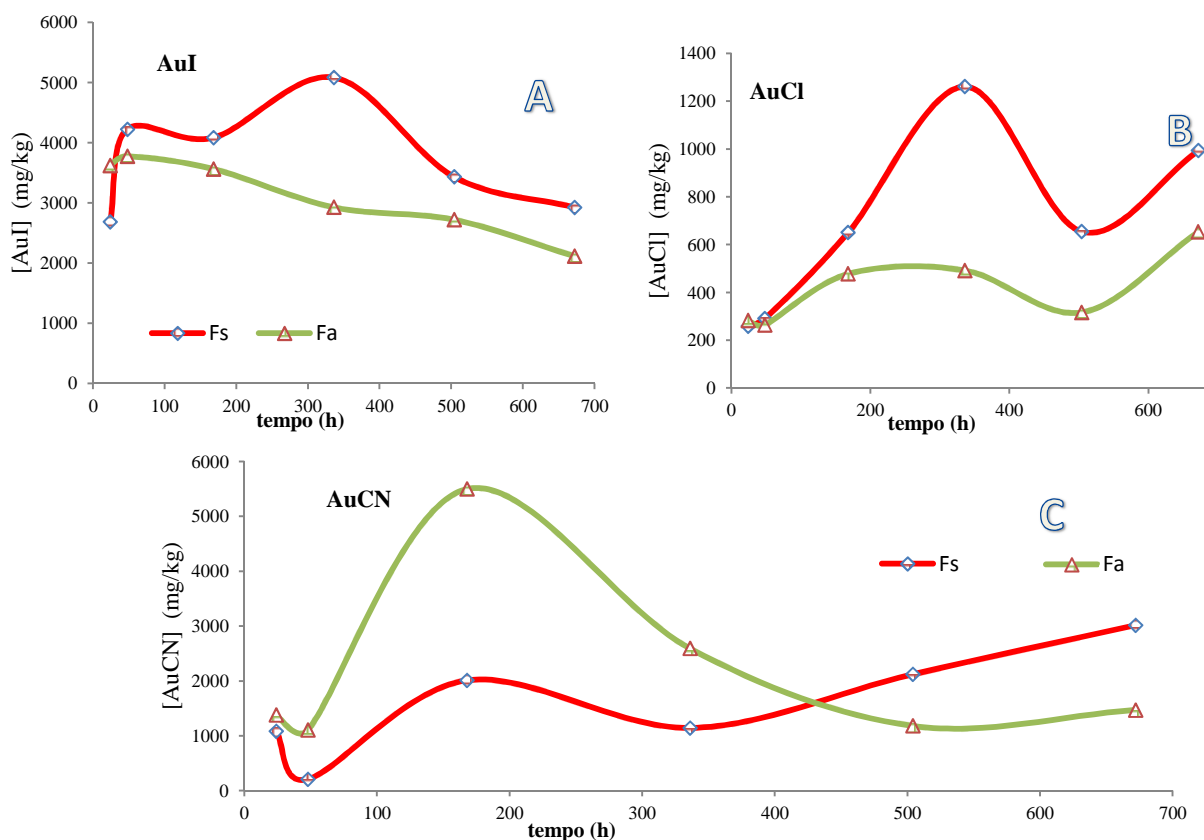


Figura 28 – Ensaio com *F. antipyretica* (a verde) e *F. squamosa* (a vermelho) expostas a diferentes soluções auríferas. A) AuI  $[Au]_i = 4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ; B) AuCl  $[Au]_i = 2,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ; C) AuCN  $[Au]_i = 4,0 \text{ mg.L}^{-1}$ .

### 3.6.2 Arsénio

Para o ensaio com concentração inicial de  $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$  de As, a acumulação na *F. squamosa* oscilou entre  $1,47 \text{ mg.kg}^{-1}$  e  $3,25 \text{ mg.kg}^{-1}$  e entre  $1,08 \text{ mg.kg}^{-1}$  e  $2,07 \text{ mg.kg}^{-1}$  para a *Fontinalis antipyretica*. Foram notórios dois períodos nítidos de acumulação de As em ambas as espécies, embora com um ciclo mais rápido no caso da *F. antipyretica*. A gama de valores de acumulação é muito baixa e muito limitada (Figura 29).

Na concentração intermédia de  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ , as concentrações obtidas continuam a ser baixas, com a *F. squamosa* a evidenciar um comportamento parabólico, com um máximo de acumulação de As às 48 horas, uma zona de equilíbrio inferior entre 7 dias (168 horas) e 21 dias (504 horas) e reacumulação a partir deste período até ao fim do ensaio.

*F. antipyretica* teve uma acumulação inicial rápida e depois, até final do ensaio, oscilou entre  $4,68 \text{ mg.kg}^{-1}$  e  $7,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Não se verificou toxicidade evidente nas plantas, mantendo estas a cor e a textura normais durante todo o ensaio.

Para a concentração mais alta,  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , houve sinais de escurecimento na cor verde da *F. antipyretica*. Os registos de acumulação são semelhantes entre as espécies. Há uma acumulação inicial mais rápida na squamosa, e libertação gradual do metalóide até final do ensaio.

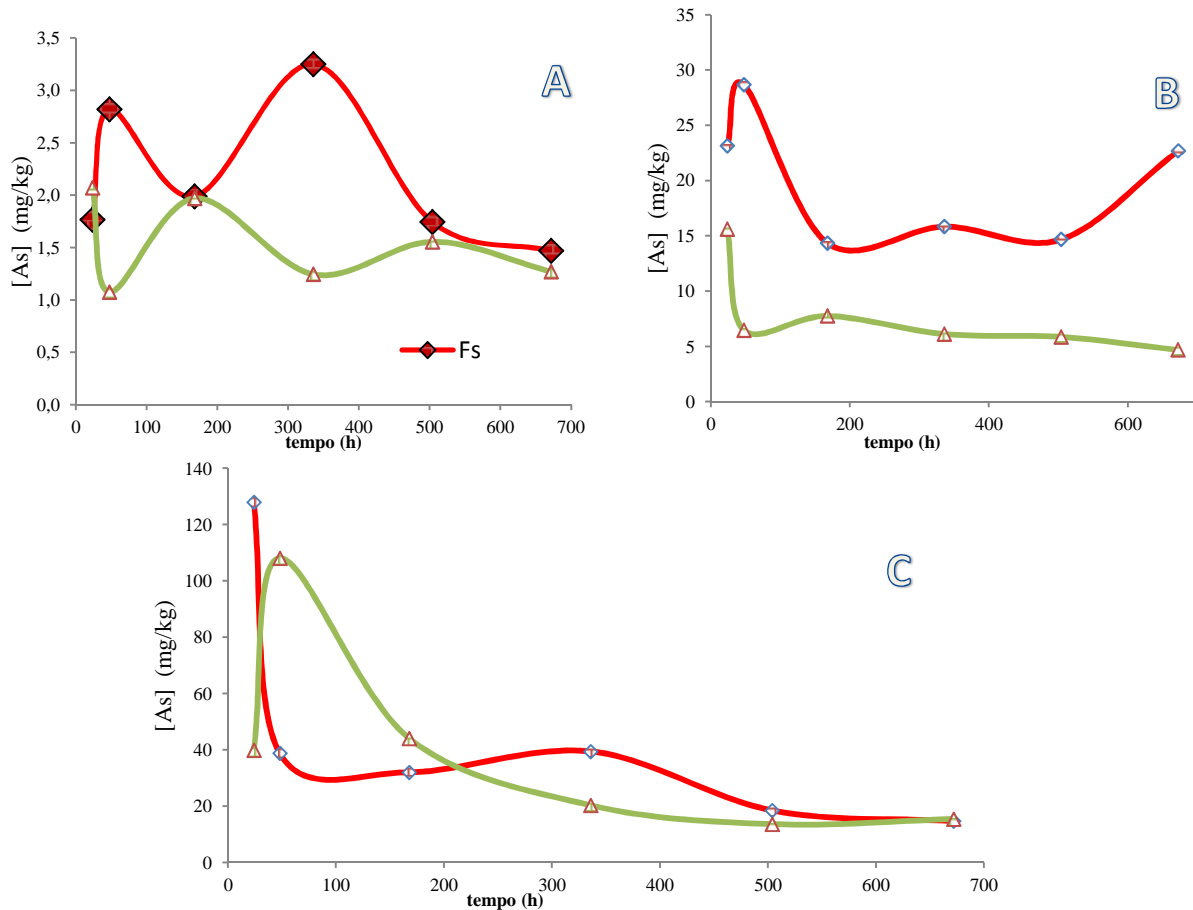


Figura 29 – Ensaio com *F. antipyretica* (a verde) e *F. squamosa* (a vermelho) expostas a soluções As com diferentes concentrações iniciais. A)  $[As]_i = 0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ ; B)  $[As]_i = 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ; C)  $[As]_i = 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

### 3.6.3 Antimónio

Para a concentração mais baixa de Sb, ocorreu uma forte acumulação numa fase inicial, sendo esta maior na *F. squamosa*, seguida de libertação até final do ensaio.

Para a concentração intermédia, ambas as espécies apresentaram uma acumulação crescente do início ao fim do ensaio, desde 634 a  $3586 \text{ mg.kg}^{-1}$  para *F. squamosa* e de 358 até  $2379 \text{ mg.kg}^{-1}$  para *F. antipyretica*.

Na concentração mais alta a acumulação foi de novo muito elevada, com *F. squamosa* a apresentar resultados superiores. No caso de *F. squamosa* verificaram-se 3

picos de acumulação, um inicial até  $2440 \text{ mg.kg}^{-1}$  às 24h , outro aos 14 dias (336 h) com  $3746 \text{ mg.kg}^{-1}$  e um final, após 28 dias (672 h), onde ocorreu o valor mais alto  $5099 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Neste caso não ocorreram perdas de metal durante os momentos de equilíbrio (Figura 30).

Em termos de morfologia das plantas não houve nenhum efeito tóxico visível, mantendo as plantas uma coloração verde muito viva.

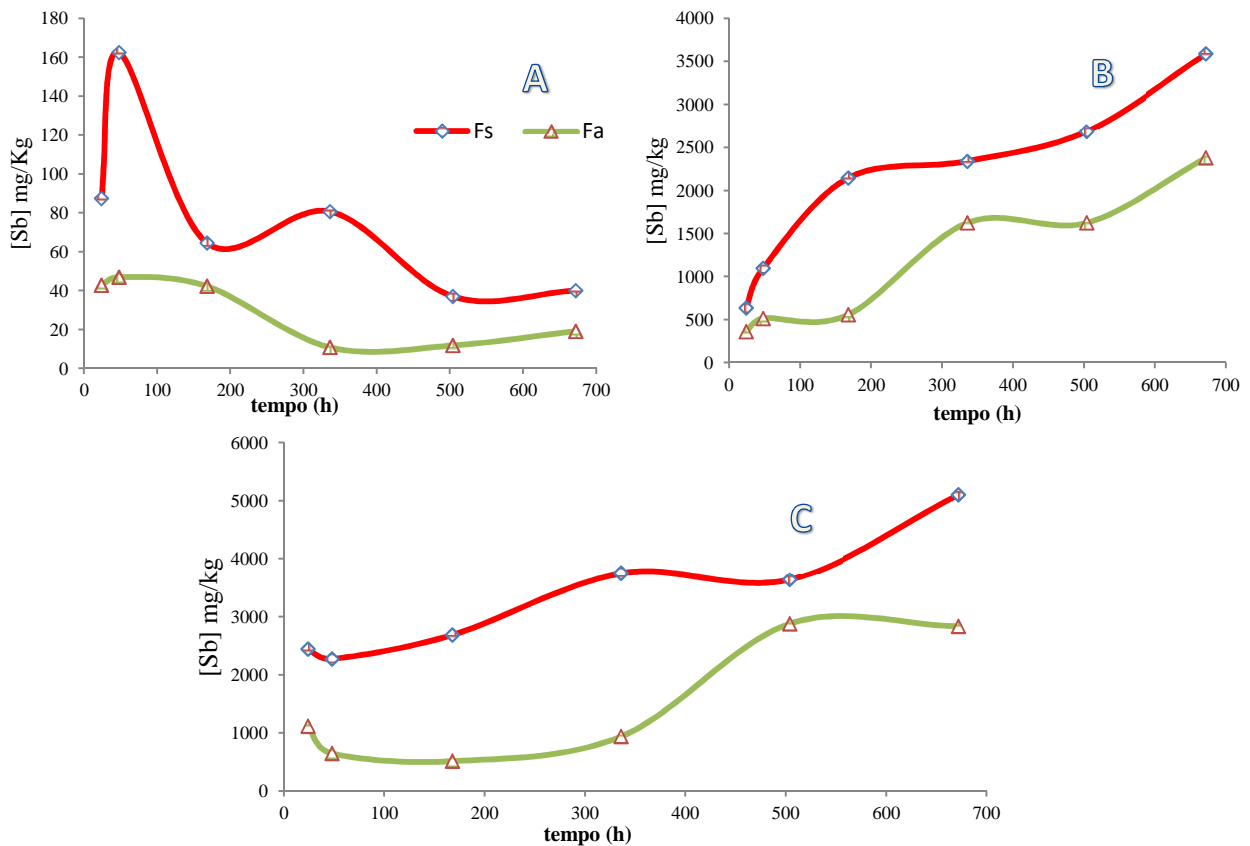


Figura 30 – Ensaio com *F. antipyretica* (verde) e *F. squamosa* (vermelha) expostas a soluções de antimônio com diferentes concentrações iniciais. A)  $[Sb]_i = 0,025 \text{ mg.L}^{-1}$ ; B)  $[Sb]_i = 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ; C)  $[Sb]_i = 2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

### 3.6.4 Prata

As concentrações mais elevadas de prata provocaram alterações morfológicas acentuadas nos explantes, tendo sido notadas diferenças de textura e perda de cor.

Para a concentração mais baixa, em *F.squamosa* ocorreu um máximo de absorção às 48h com  $49,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ , e posterior libertação de metal até aos 28 dias (672 h) onde se verificou um teor de  $18 \text{ mg.kg}^{-1}$ . No caso de *F.antipyretica* foi registado um valor anormalmente elevado aos 7 dias (168 horas), 10 vezes superior ao resto dos valores, com  $308 \text{ mg.kg}^{-1}$ . Para a concentração intermédia, *F.squamosa* apresentou um valor máximo aos 21 dias (504 h) com  $883 \text{ mg.kg}^{-1}$  e um mínimo de  $7 \text{ mg.kg}^{-1}$  decorridos 28 dias (672 h).

A *F.antipyretica* apresentou dois picos de acumulação, às 48h com  $448 \text{ mg.kg}^{-1}$  e aos 14 dias (336 h) com  $820 \text{ mg.kg}^{-1}$ , havendo uma libertação acentuada até ao final do ensaio, onde o teor registado é de  $126 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

Na concentração mais alta de Ag, ambas as espécies têm o seu máximo ao fim de 14 dias (336 h) com  $4268 \text{ mg.kg}^{-1}$  na *F.squamosa* e com  $8291 \text{ mg.kg}^{-1}$  na *F.antipyretica*. Praticamente toda a prata foi libertada durante os 7 dias seguintes. No caso de *F.antipyretica*, registou-se o valor mais alto de toda a experiência neste ensaio, com  $8291 \text{ mg.kg}^{-1}$  (Figura 31).

Nos ensaios com Ag houve acumulações e libertações de metal muito rápidas, e de grande magnitude, bem como grande toxicidade, provocando alterações morfológicas na textura e cor das plantas.

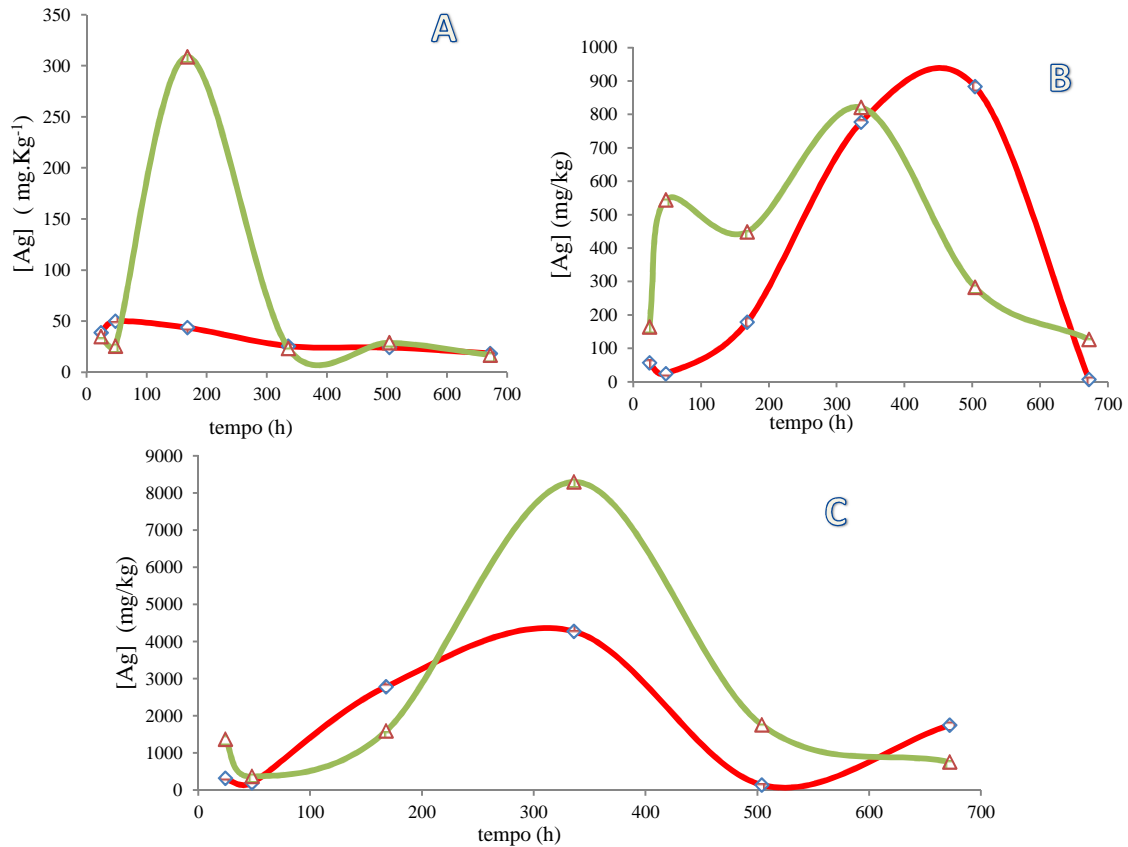


Figura 31 – Ensaio com *F. antipyretica* (a verde) e *F. squamosa* (a vermelho) expostas a soluções de Ag com diferentes concentrações iniciais. A)  $[Ag]_i = 0,005 \text{ mg.L}^{-1}$ ; B)  $[Ag]_i = 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ; C)  $[Ag]_i = 1,5 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Na tabela 10, observa-se a relação do metal colocado no início dos ensaios com aquele que é encontrado nas análises de água no final da experiência. Este valor é meramente indicativo, e sugere que há efectivamente capacidade das plantas em retirar Au da água. Estes dados permitem também confirmar que os melhores resultados de acumulação ocorrem nas soluções auríferas com iodo, seguido do cianeto e por fim do cloro

Tabela 8 - Cálculo estimativo da % recuperação de Au na análise das águas dos aquários.

Composto	Aquário	[Au] <sub>i</sub> mg.L <sup>-1</sup>	m <sub>i</sub> (mg)	[ ] <sub>f</sub> mg.L <sup>-1</sup>	m <sub>f</sub> (mg)	% (m <sub>f</sub> /m <sub>i</sub> )
NaAuCl <sub>4</sub>	1	0,03	0,15	0,03	0,09	36,68
	2	0,55	2,75	0,55	2,10	23,80
	3	2,93	14,66	2,47	8,86	39,58
AuI	1	0,05	0,25	0,00	0,01	96,98
	2	0,75	3,75	0,01	0,02	99,40
	3	4,00	20,00	0,06	0,23	98,85
AuCN	1	0,05	0,25	0,03	0,09	63,32
	2	0,75	3,75	0,44	1,69	54,93
	3	4,00	20,00	1,90	7,71	61,43

### 3.7 Estudos Estruturais

#### 3.7.1 Microscopia óptica

Do material vegetal recolhido dos ensaios *in vitro* e com o intuito de detectar a presença de Au, foram realizados cortes para observação em microscópio óptico, obtendo-se observações de menor ampliação em caulóides (Figura 32) e filóides (Figura 33), onde se visualiza a sua morfologia geral. As secções parecem indicar uma redução no tamanho dos órgãos na presença de Au, resultante da menor dimensão celular. Nas visualizações dos filóides, por microscopia electrónica, foi possível observar partículas electronodensas depositadas na face da parede celular, podendo estas estruturas representar a acumulação de Au (Figura 34). Também foi possível a identificação de vários organelos de um filóide (Figura 35), não sendo notórias alterações nos organelos resultantes da cultura na presença de Au.

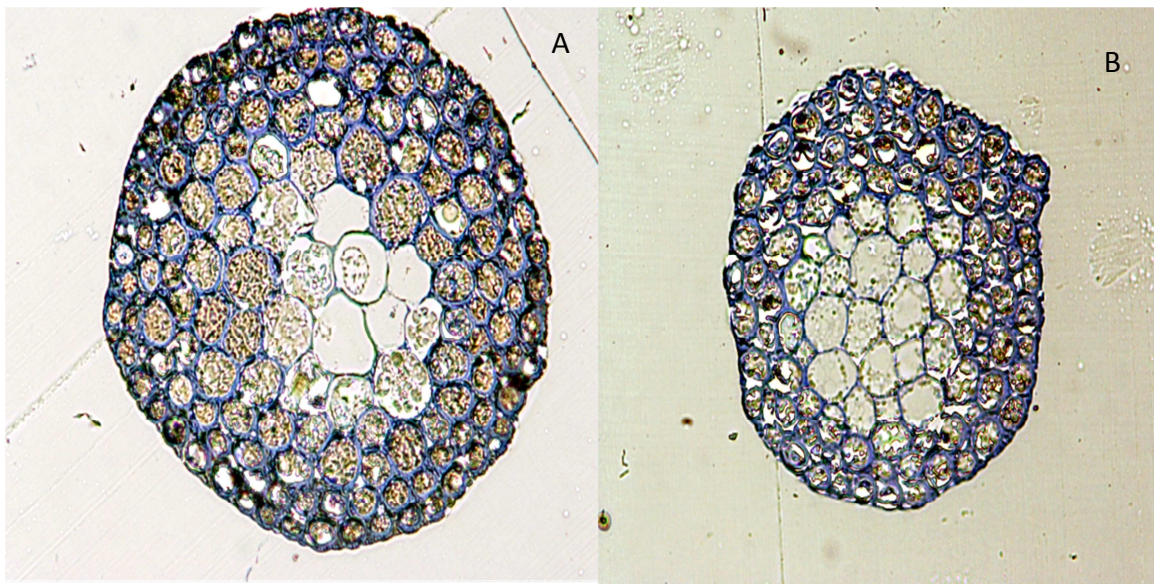


Figura 32 – Secções transversais de caulóides de *F. antipyretica* expostos a diferentes concentrações de Au coradas com azul toluidina, observadas ao microscópio óptico com ampliação de 40x: A) controlo; B) caulóide exposto a uma concentração de 0,5μM de Au.

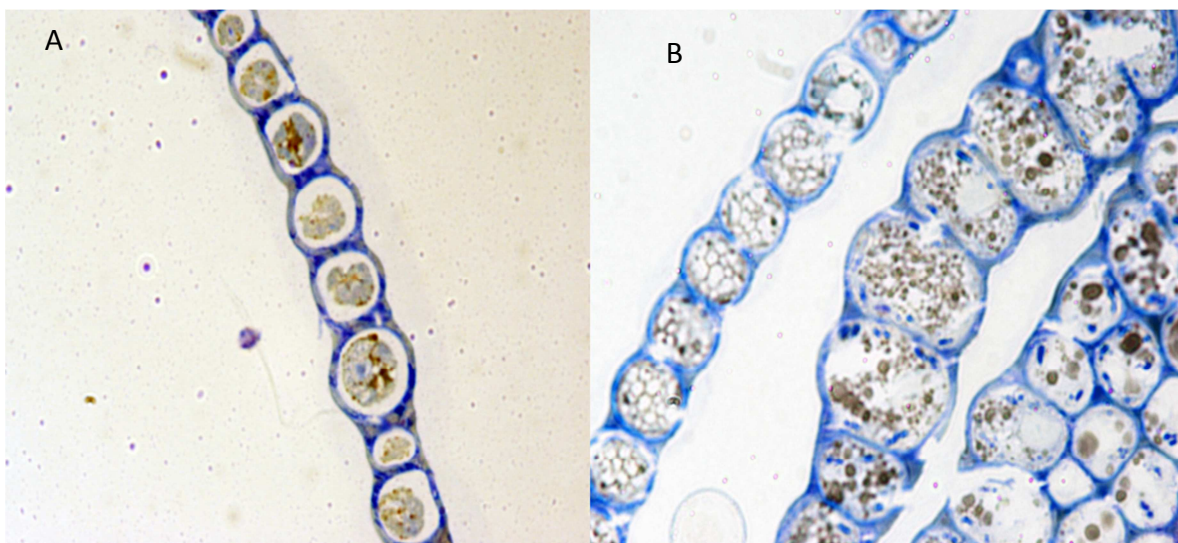


Figura 33 – Secções transversais de filóides de *F. antipyretica* expostos a diferentes concentrações de Au coradas com azul toluidina, observadas ao microscópio óptico com ampliação de 40x: A) filóide exposto a uma concentração de 0,5μM de Au; B) controlo.



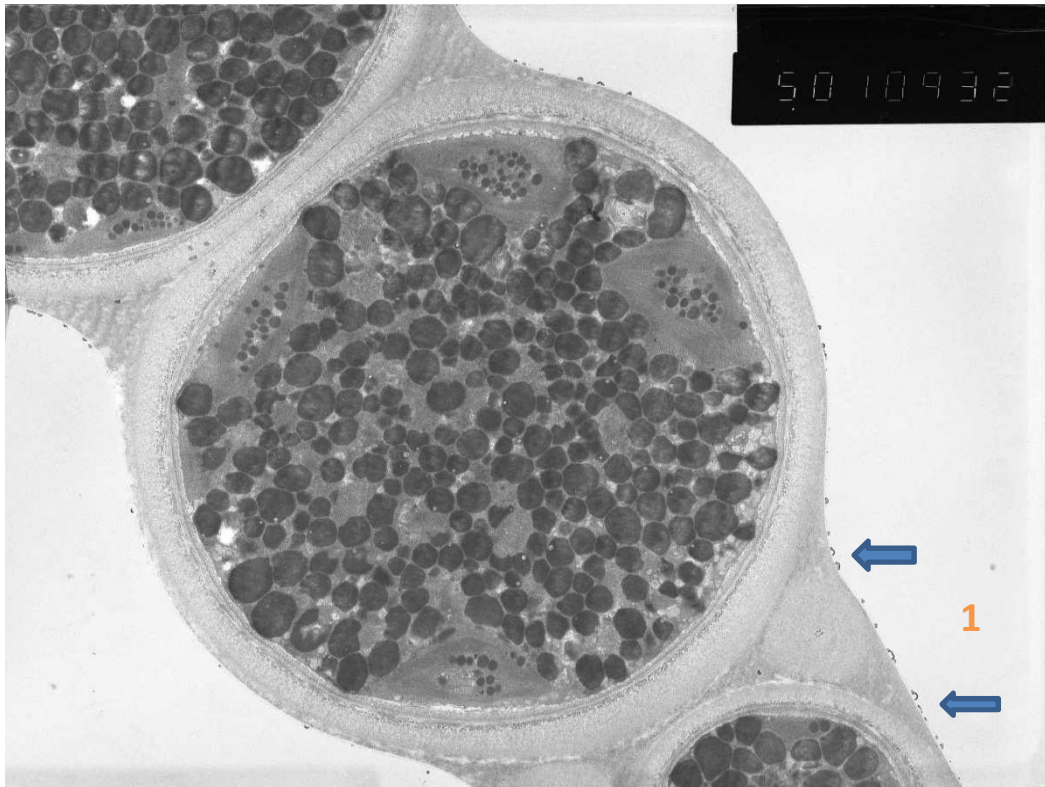


Figura 34 – Células de filóide de *F. antipyretica* na presença de  $5\mu\text{M}$  de Au observadas em microscopia electrónica, com ampliação de 5000x: 1) partículas electronodensas na parede celular.

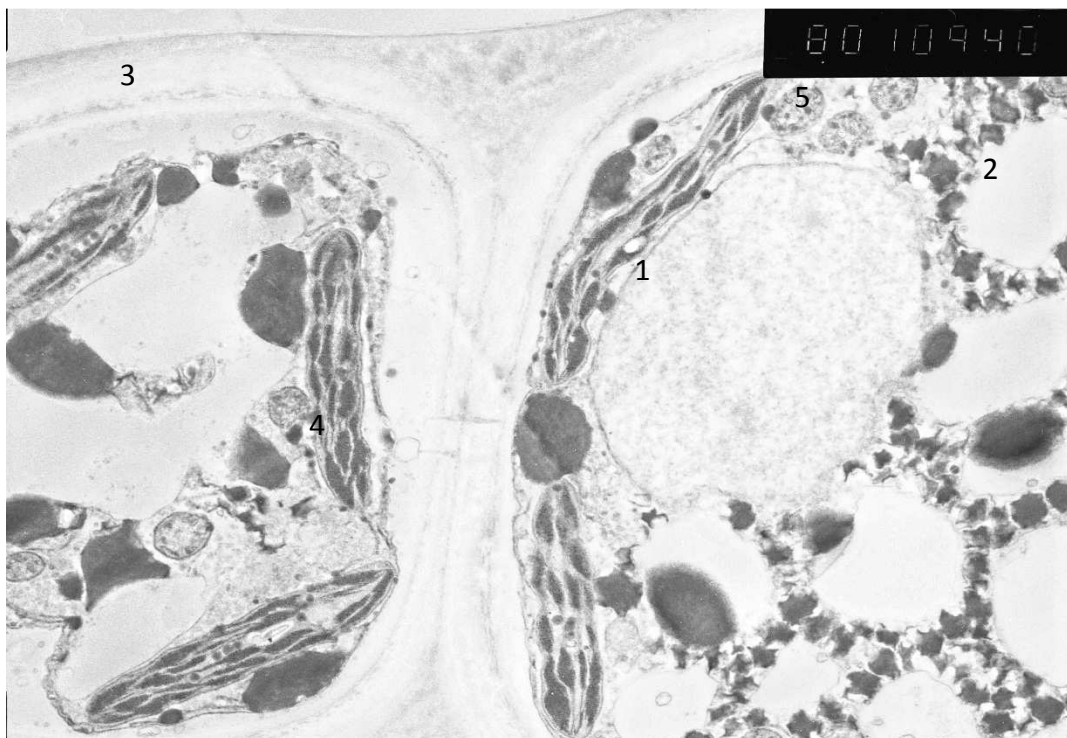


Figura 35 – Células de um filóide de *F. antipyretica* expostas a uma concentração de  $5\mu\text{M}$  de Au observadas por TEM com ampliação de 8000x: 1) núcleo; 2) vacúolo; 3) parede celular; 4) cloroplasto; 5) mitocôndrias.

### 3.7.2 SEM-EDS

Nos estudos realizados por microscopia de varrimento, recolheram-se imagens tridimensionais da estrutura dos filóides e caulóides da *F. squamosa* (Figura 36). Nestas amostras foram também efectuados estudos com microsonda com o intuito de quantificar o teor em elementos minerais (Figura 37).

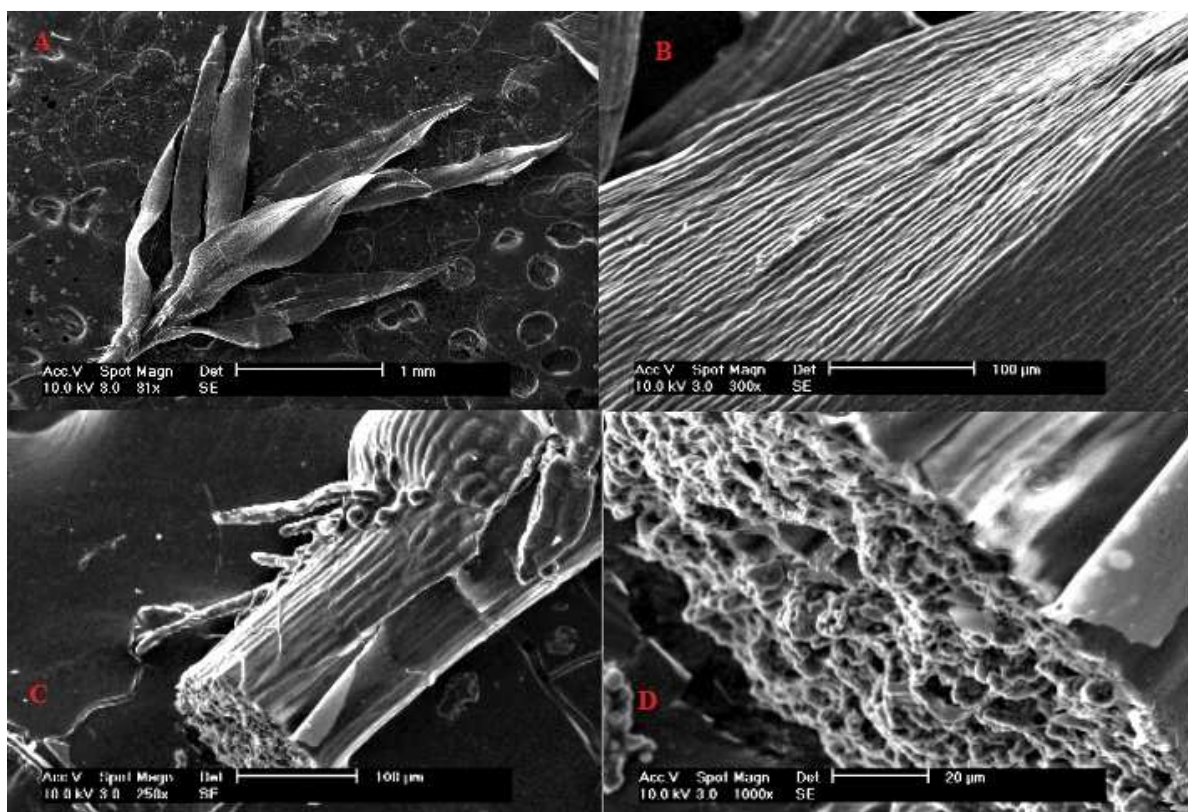


Figura 36 – Fotografias obtidas em microscopia electrónica de varrimento de *F. squamosa*: A) filóides; B) superfície de um filóide; C) caulóides; D) corte de caulóide.

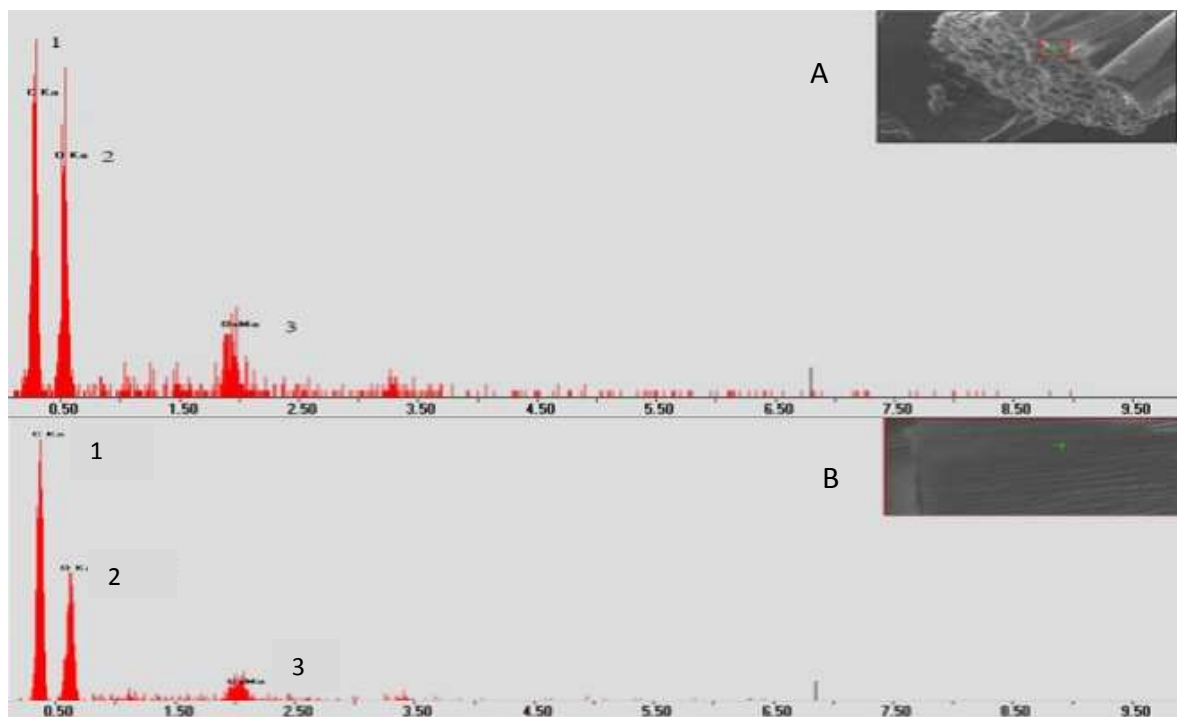


Figura 37 – Análise da composição química de uma amostra de *F. squamosa*, destacando-se a presença de ósmio: A) caulóides; B) filóides; 1) carbono; 2) oxigénio; 3) ósmio.

## 4 Discussão

### 4.1 Esterilização e meios de cultura usados:

A maior dificuldade deste estudo prendeu-se com a estabilização da planta em condições de assepsia e de crescimento. A planta, pelo seu papel no ecossistema e pelas suas relações simbióticas com outros organismos, está repleta de bactérias, fungos e microalgas. No único estudo encontrado que refere a tentativa de estabelecer em condições de assepsia *Fontinalis antipyretica*, o autor utiliza combinações de esterilização bastante completas e complexas, tais como cortes de folhas, métodos ultra-sónicos de lavagens com soluções de iodo e um tratamento prolongado com antibióticos (Trautenberg, 2003). Neste mesmo estudo acaba por ser demonstrada a grande dificuldade em recuperar um organismo tão sensível como é a *Fontinalis*, quando sujeita a um método agressivo de esterilização ficando também dependente da correcta escolha de meio a usar., tendo as culturas acabado por degenerar após 7 meses de cultura. No presente trabalho, a metodologia adoptada foi diferente, optando-se por técnicas menos agressivas que permitissem uma esterilização eficaz sem causar danos irreversíveis nas plantas. Os resultados obtidos indicam que este procedimento foi o mais adequado pois as duas espécies permanecem em cultura há 12 meses livres de contaminantes.

As briófitas absorvem os nutrientes do meio maioritariamente através da superfície das folhas, que no caso da *Fontinalis* é constituída por uma única camada de células, onde estão incorporados canais de entrada de iões. Essa facilidade de comunicação com o meio permite à planta um rápido acesso nutritivo, mas também uma dificuldade, pois não tem mecanismos para reter a entrada, caso estes se encontrem em concentrações indesejadas para a planta. A ocupação dos locais de entrada na superfície das plantas é favorecida para os elementos presentes no meio em maior concentração e de maior tamanho, que mais facilmente podem entrar dentro da planta e, ao mesmo tempo, impedir que outros elementos o façam.

Por outro lado, meios nutritivos muito ricos provocam um choque osmótico na planta, que, não tendo impermeabilização nas cutículas das suas folhas tem dificuldades em impedir a entrada de elementos não necessários quando estes se encontram em grandes quantidades no meio.

Em diversos estudos publicados, a inibição de um elemento essencial não provocou alterações morfológicas em *F. antipyretica*, confirmando a grande capacidade adaptativa da planta ao meio. Pelo contrário, há referências de toxicidade em briófitas, devidas à presença em excesso de elementos essenciais como o azoto (N). O nitrato pode aumentar o conteúdo de clorofila, mas nalguns casos deixa a planta acastanhada, provavelmente devido à interferência na absorção de outros iões essenciais (Glime, 2007). Já no que diz respeito ao amónio este é tóxico, podendo afectar, a longo prazo, a actividade fotossintética em *Fontinalis antipyretica*.

Neste trabalho, o efeito inibidor do crescimento observado em meios ricos em nutrientes confirma a reduzida necessidade nutritiva da planta e o porquê (a razão?) da sua preferência por águas oligotróficas.

O aumento linear do peso fresco da *Fontinalis antipyretica*, quando inoculada durante 60 dias no meio de crescimento usado (Knop modificado), permite-nos pensar ser este o meio adequado para os ensaios de cultura *in vitro* em *Fontinalis*.

#### **4.1.1 BA**

Os reguladores de crescimento, como as citocininas, das quais a benziladenina (BA) faz parte, têm geralmente um papel indutor na divisão celular das plantas. Os musgos, à semelhança de outras plantas, possuem citocininas endógenas, mas usam-nas especialmente no estabelecimento de relações simbióticas com bactérias e fungos. Exemplos da formação de gemas no protonema da *Funaria hygrometrica* e na *F. squamosa* por citocininas neste tipo de associação foi referido por Hornschuh et al. (2002) e Glime e Knoop (1986).

Os resultados não puderam comprovar os estudos prévios, fundamentalmente pelo uso de altas concentrações de benziladenina no ensaio. A falta de crescimento e a escassa formação de gemas estará relacionada com um excesso de hormona que terá inibido o crescimento da planta. De facto, é conhecido o efeito indutor das citocininas na formação de gemas adventícias mas também o seu papel inibitório no alongamento dessas mesmas gemas (Canhoto, 2010).

## 4.2 Testes de Toxicidade

Os testes de toxicidade efectuados tiveram uma duração entre 30 e 60 dias e com medições desde os 8 ou 15 dias. É possível afirmar que a extensão do ensaio permite uma maior sensibilidade na apreciação dos parâmetros em estudo em gamas de concentração reduzidas e que medições muito curtas não permitem perceber a diferença entre toxicidade e dificuldades de crescimento de explantes de muito reduzidas dimensões. No entanto, também apresenta dificuldades, como o excesso de desenvolvimento e complexidade das estruturas das plantas. Além disso, há grande dificuldade na gestão de recursos para efectuar ensaios tão longos. Pelos resultados obtidos, verifica-se que, para maior optimização de recursos e maior brevidade na obtenção de resultados, as plantas em estudo permitem obter resultados válidos após 30 dias de cultura, aconselhando-se este período para ensaios ulteriores.

Para *F. antipyretica*, verificou-se que o crescimento do eixo principal do caulóide é o parâmetro que melhor e mais rapidamente reflecte a toxicidade do meio. Outras alterações morfológicas também foram notadas, tais como um aumento de ramificações laterais por vezes associado ao aumento do crescimento lateral desproporcionado com o crescimento principal. Estas alterações tornam-se mais evidentes à observação, não sendo tão representativas numa análise gráfica. A alteração de cor ou alteração da morfologia das folhas também foram detectadas. Análises do teor em clorofila ou em proteína poderão vir a ser utilizadas para melhor perceber os efeitos toxicológicos a nível celular.

A espécie *F. antipyretica* apresentou alterações morfológicas para concentrações acima de 1,25  $\mu\text{M}$  de As, acima de 3,75  $\mu\text{M}$  no Au e Ag e sem alterações para o Sb. Verificaram-se alterações morfológicas acentuadas a 5 e 20  $\mu\text{M}$  no As, a 5  $\mu\text{M}$  no Au e a 20  $\mu\text{M}$  na Ag, existindo os maiores níveis de toxicidade com necrose acentuada em todos os explantes. Para o caso específico da concentração de 20  $\mu\text{M}$  de As, foi perfeitamente visível o facto de que a níveis de elevada toxicidade está associada a formação de um maior número de gemas, sugerindo uma tentativa de expansão da planta para outras direcções com melhores condições de crescimento.

Para *F. squamosa*, o crescimento lateral ou o crescimento total, funcionaram como os melhores parâmetros para avaliar a toxicidade. A alteração de cor e outros fenómenos pontuais também foram detectados. Pelo excesso de ramificação típico desta espécie,

torna-se muito complexo este tipo de estudo, em especial para ensaios acima de 30 dias, sendo preferível o uso do peso da planta, por exemplo.

A espécie apresentou alterações morfológicas de crescimento para as concentrações de Au no meio até 3,75  $\mu\text{M}$ , mas as mesmas não se confirmaram nem a 5  $\mu\text{M}$  Au nem a 20  $\mu\text{M}$  Au. Nestas concentrações houve maior dificuldade inicial na formação de gemas, que rapidamente ficavam necróticas.

Para todas as concentrações de As houve alterações morfológicas, sendo mais evidentes a 3,75  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ . Para a Ag há alterações morfológicas em todas as concentrações, sendo que a 20  $\mu\text{M}$  ocorreu necrose a partir da base da planta, situação esta que parece sugerir a translocação de nutrientes das zonas mais diferenciadas para as zonas meristemáticas dos explantes e o envolvimento de alterações na disponibilidade de nutrientes essenciais. Não se verificaram alterações acentuadas no caso do Sb.

### **4.3 Estudos de microscopia**

Nos estudos estruturais não se confirmou a presença de Au na planta. Para isso, coloco a hipótese de se testar novamente as mesmas técnicas de observação, mas alterando o método de tratamento da amostra. Pela microsonda verificou-se a presença de ósmio quer em filóides, quer em caulóides. O ósmio (Os) é um metal de transição como o Au, pertencentes ao mesmo período da tabela periódica e apresentam semelhanças electrónicas muito grandes. Tudo isto são condições que podem ter permitido que a fixação do material vegetal com Os tenha induzido uma troca do Au intracelular pelo Os. Num novo ensaio seria interessante promover essa alteração e realizar a fixação celular utilizando apenas gluteraldeído. Observações de TEM mostraram a acumulação de partículas electronodensas na parede celular, podendo-se especular que estas partículas resultem da acumulação de Au. No entanto, são necessárias observações mais cuidadosas de forma a verificar esta hipótese.

Assim, apesar de não se ter detectado Au, não se pode dizer que não tenha existido acumulação intracelular, mas também não foi possível confirmar a sua presença por estas técnicas.

#### 4.4 Acumulação de metais

Da análise quantitativa, afere-se que a capacidade de acumular metal pela planta nos ensaios *in vitro* foi bastante inferior ao ensaio efectuado em aquários (dados mostrados em anexo). A falta de arejamento, o uso de ensaios em apenas 20 mL de meio, as alterações da qualidade do meio, fizeram desta análise um mero indicador da capacidade da planta acumular os metais. Nessa perspectiva verificou-se que faria sentido realizar uma experiência mais próxima das condições naturais das plantas.

Ficaram demonstradas as potencialidades do cloro, do iodo e do cianeto para tornar o Au biodisponível para as duas espécies. O cloro e o cianeto não provocaram efeitos tóxicos assinaláveis.

A solução de iodo permitiu obter bons resultados em todos os ensaios. No entanto, foi também a que originou maior stresse fisiológico na planta, com necrose acentuada nas concentrações mais elevadas.

Nos estudos dos elementos da paragénesse do Au, a planta mostrou uma grande resistência à acumulação de As. Obtiveram-se resultados bastante elevados para o Sb e para a Ag, embora com elevada toxicidade nesta.

A *F. squamosa* teve acumulações maiores na presença de Sb e As, mistas nas soluções auríferas e reduzidos níveis de acumulação para a Ag.

Verificamos uma acumulação inicial, rápida, facilmente observável em ensaio com concentrações de metal mais baixas, porventura representando alterações químicas provocadas pela competição do metal pelos locais de entrada de nutrientes existentes nos filóides.

Picos de acumulação muito altos numa fase intermédia do ensaio, sugerem que as plantas crescidas em meio de cultura terão mais dificuldades num curto espaço de tempo de desenvolver mecanismos de protecção contra toxicidade do meio, (Fernandez and Carballeira, 2000).

Nos ensaios com concentrações de metal mais elevadas percebe-se uma acumulação mais tardia com maior magnitude, fruto da entrada continuada de metal na célula, pois a acumulação inicial, limitada fisicamente, deixa de ser facilmente observável graficamente. Em concentrações de metal no meio, tóxicas á planta, verifica-se que a planta não re acumula o metal, libertando mais rapidamente o tóxico quando ainda tem mecanismos metabólicos activos. Quando o metabolismo da planta fica afectado, verificam-se períodos alargados de retenção do metal , associados a uma toxicidade elevada.



## **5 Conclusão e Trabalhos Futuros**

Neste trabalho tentou dar-se um contributo para permitir que no futuro o uso de plantas em processos de descontaminação ambiental ou mesmo de extracção de metais seja uma realidade.

Pudemos observar a reacção das plantas em condições de stresse toxicológico e a sua capacidade em acumular Au, As, Sb e Ag. Seria interessante comprovar a presença de Au no interior das células e estudar a possibilidade de implementar o uso destas plantas no campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adriano, D.C., 2001. Trace Elements in Terrestrial Environments: Biogeochemistry, Bioavailability and Risks of Metals (2<sup>nd</sup> Edn) Springer-Verlag; New York, 879 pp.

Anderson, C.W.N., Brooks, R.R., Stewart, R.B., Simcock, R., 1998. Gold uptake by plants. Gold Bulletin, 32, 48–51.

Anderson, C., Moreno, F., Geurts, F., Wreesmann, C., Ghomshei, M., Meech, J., 2005. A comparative analysis of gold-rich plant material using various analytical methods. Microchem. J., 81, 81 – 85.

Andren, A.W., Bober, T.W., (Eds), 2002. Silver. Environment, transport, fate and effects. SETAC Press, Pensacola

Axtell, N.R., Sternberg, S.P.K., Claussen, K., 2003. Lead and Nickel Removal Using *Microspora* and *Lemma minor*. Bioresource technology, 89, 41– 48.

Bates, J.W., 2000. Mineral nutrition substratum ecology, and pollution. In: Shaw, A.J., Goffinet, B. (Eds.), Bryophyte Biology. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 248 – 311.

Boyle, R.W., 1969. The geochemistry of silver and its deposits with notes on geochemical prospecting for the element. Geol. Surv. Can., Ottawa, 264 pp.

Brooks, R.R., McCleave, J.A., Schofield, E.K., 1977. Cobalt and nickel uptake by the Nysaceae, Taxon, 26, 197 – 201.

Brooks, R.R., Chambers, M.F., Nicks, L.J., Robinson, B.H., 1998. Phytomining. Trends Plant Sci., 1, 359 – 362.

Brooks, R.R., Robinson, B.H., 1998. The potential use of hyperaccumulators and other plants for phytomining. In: Brooks, R.R. (Ed.), Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: their Role in Archaeology, Microbiology, Mineral Exploration, Phytomining and Phytoremediation. CAB International, Wallingford, pp. 327 – 356.

Bruns, I., Friese K., Markert, B., Krauss, G.-J., 1997. The use of *Fontinalis antipyretica* L. ex. Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 2. Heavy metal accumulation and physiological reaction of *Fontinalis antipyretica* L. ex. Hedw. in active biomonitoring in the river Elbe. The Science of the Total environment, 204, 161 – 176.

Bruns, I., Sutter, K., Menge, S., Neumann, D., 2001. Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes. Journal of Plant Physiology, 158, 79 – 89.

Canhoto, J.M., 2010. Biotecnologia Vegetal – da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra.

Carpio, D.S., 2004. Avaliação do potencial de *Myriophyllum spicatum* em ensaios de toxicidade *in vitro*. Tese de mestrado, departamento de Zoologia, FCTUC Coimbra.

Clark, I.D., Raven, K.G., 2004. Sources and circulation of water and arsenic in the Giant Mine, Yellowknife. NWT Canada Isotopes Environmental Health Studies, 115 – 128.

Decreto-Lei n.º 243/2001 de 5 de Setembro. Ministério do Ambiente e do Ordenamento do Território. Diário da República – I Série – A n.º 206 – 5/9/2001.

Fernández, J.A., Carballeira, A., 2000. Differences in the responses of native and transplanted mosses to atmospheric pollution: a possible role of selenium. *Environ Pollut.*, 110, 73 – 78.

Gaillardet, J., Viers, J., Dupré, B., 2003. Trace elements in river waters. In: Drever, J.I. (Ed.) *Surface and groundwater, weathering and soils*. In: Holland H.D., Turekian, K.K. (Eds.) *Treatise on Geochemistry*, 5, 225 – 227. Elsevier, Oxford.

Gardea-Torresdey, J.L., Parsons, J.G., Gomez, E., Peralta-Videa, J., Troiani, H.E., Santiago, P., Jose Yacamán, M., 2002. Formation and growth of Au nanoparticles inside live alfalfa plants. *Nano Lett.*, 2, 397 – 401.

Gautheret, R. J., 1959. *La culture des tissus végétaux: techniques et réalisations*. Masson & Cie, Editeurs. Paris.

Glime, J.M., Knoop, B.C., 1986. Spore germination and protonemal development of *Fontinalis squamosa*. *Journal of Hattori Botanical Laboratory, Japan*, 61, 487 – 497.

Glime, J.M., 2007. *Bryophyte Ecology, Vol 1. Physiological Ecology*. Ebook sponsored by Michigan Technological University and the International Association of Bryologists. Accessed on July 2011 at <<http://www.bryoecol.mtu.edu/>>.

Gonçalves, E.P.R., Boaventura, R.A.R., Mouvet, C., 1992. Sediments and aquatic mosses as pollution indicators for heavy metals in the Ave River basin (Portugal). *The Science of the Total Environment*, 114, 7 – 24.

Grosbois, C., Schäfer, J., Bril, H., Blanc, G., Bossy, A., 2009. Deconvolution of trace element (As, Cr, Mo, Th, U) sources and pathways to surface waters of a gold mining-influenced watershed. *Science of the total environment*, 407, 2063 – 2076.

Horne, A.J., Goldman, C.R., 1994. *Limnology* (2nd Ed). McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 480 pp.

Hornschuh, M., Grotha, R., Kutschera, U., 2002. Epiphytic bacteria associated with the bryophyte *Funaria hygrometrica*: Effect of *Methylobacterium* strains on protonema development. *Plant Biol* 4, 682 – 682.

Kabata-Pendias, A., 2001. *Trace elements in soils and plants*(3<sup>rd</sup> Ed.). Boca Raton: CRC Press, 413 pp.

Keskinkan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A., Basibuyuk, M., Forster, C.F., 2003. Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (*Myriophyllum spicatum*). *Process Biochemistry*, 39, 179 – 183.

- Kramer, J.R.; Adams, N.W.H.; Manolopoulos, H. et al., 1999. Silver at an old mining camp, Cobalt, Ontario, Canada. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 23–29.
- Kramer, J.R., Benoit, G., Bowles, K.C. et al., 2002. Environmental chemistry of silver; in: Andren, A.W., Bober, T.W. (Eds), *Silver in the Environment: Transport Fate and Effects*; Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL.
- Nicks, L.J., Chambers, M.F., 1998. A pioneering study of the potential of phytomining for nickel, in: R.R. Brooks (Ed.), *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals*, CAB International, pp. 313 – 326.
- Nimis, P.L., 1990. Air quality indicators and indices: the use of plants as bioindicators for monitoring air pollution. In: Colombo, A.G., Premazzi, G. (Eds), *EUR 13060 EN*, pp. 93 – 126.
- Mahimairaja, S., Bolan, N.S., Adriano, D.C., Robinson, B., 2005. Arsenic contamination and its risk management in complex environmental settings. *Advances in Agronomy*, 86, 1 – 82.
- Medved, J., Bujdos, M., Matus, P., Kubova, J., 2004. Determination of trace amounts of gold in acid-attacked environmental samples by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization after pre-concentration. *Anal. Bioanal. Chem.*, 379, 60 – 65.
- Mkandawire, M., Dudel, E.G., 2005. Accumulation of arsenic in *Lemna gibba* L. (duckweed) in tailing waters of two abandoned uranium mining sites in Saxony, Germany. *Science of the Total Environment*, 336, 81-89.
- Mouvet, C., 1984. Accumulation of chromium and copper by aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. Ex *Hedw* transplanted in a metal contaminated river. *Environmental Technology Letters*, 5, 541 – 548.
- Mouvet, C., 1985. The use of aquatic bryophytes to monitor heavy metal pollution of freshwaters as illustrated by case studies. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 22, 2420 – 2425.
- Mouvet, C., 1989. Utilisation des mousses aquatiques pour la surveillance de la pollution des milieux aquatiques par les métaux lourds et les micropolluants organiques. *Laboratoire d'écologie. Université de Metz*, 149 pp.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- O'Neill, P., 1995. Arsenic. In "Heavy Metals in Soil" (B. J. Alloway, Ed.). Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Pokrovski, G., Gout, R., Schott, J., Zotov, A., Harrichoury, J.C., 1996. Thermodynamic properties and stoichiometry of As (III) hydroxide complexes at hydrothermal conditions. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 60, 737 – 749.
- Powell, R.L., Kimerle, R.A., Moser, E.M., 1996. Development of a plant bioassay to assess toxicity of chemical stressors to emergent macrophytes. *Environmental Toxicology and*

Chemistry, 15, 1570 – 1576.

Pratas, J., Prasad, M. N. V., Freitas, H., Conde, L., 2005. Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *J. Geochem. Explor.*, 85, 99 – 107.

Pratas, J., Favas, P., Rodrigues, N., Prasad, M., Freitas, H., 2010. Phytofiltration of uranium by aquatic plants of Central Portugal. *Advances in Waste Management, 4<sup>th</sup> WSEAS International Conference on Waste Management, Water Pollution, Air Pollution, Indoor Climate (WWAI'10), University of Sfax, Tunisia, May 3-6.*

Purcell, T.W., Peters, J.P., 1998. Sources of silver in the environment. *Environ. Toxicol. Chem.*, 17, 539–546.

Renner, H., 1993. Silver, silver compounds and silver alloys. In: Elvers, B., Hawkins, S., Russey, W., Schulz, G. (Eds), *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5th edn. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Rish, M.A., 2004. Antimony. In: Merian E, Anke M, Ihnat M, Stoeppler M (eds) *Elements and their compounds in the environment*. 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, pp 659–670.

Robinson, B.H., Brooks, R.R., Howes, A.W., Kirkman, J.H., Gregg, P.E.H., 1997. The potential of high biomass nickel hyperaccumulator *Berkheya coddii* for phytoremediation and phytomining. *Journ. Geochem. Explor.*, 60, 115 – 126.

Salt, D.E., Smith, R.D., Raskin, I., 1998. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio.*, 49, 643 – 648.

Samecka-Cymerman, A., Kempers, A.J., 2002. Aquatic Macrophytes as Biomonitors of Pollution by Textile Industry. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 69, 82 – 96.

Selim *et al.*, 1989. In: *Am. Soc. for Testing and Materials*, 2000. E 1913-97. Standard guide for conducting static, axenic, 14-day phytotoxicity tests in test tubes with the submersed aquatic macrophytes *Myriophyllum sibiricum* Komarov.

Sequeira, J.L.F., 2009. Avaliação do potencial de *Callitriche brutea* como fitoremediadora de urânio em ensaios de cultura *in vitro*. Tese de mestrado, departamento de Botânica, FCTUC Coimbra.

Sharma, V.K., Sohn, M., 2009. Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations and remediation. *Environment International*, 35, 743 – 759.

Siebert, A., Bruns, I., Krauss, G.J., Miersh, J., Markert, B., 1996. The use of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. as a bioindicator for heavy metals. 1. Fundamental investigations into heavy metal accumulation in *Fontinalis antipyretica* L. ex Hedw. *The Science of the Total Environment*, 177, 137 – 144.

Smith, I.C., Carson, B.L., 1977. *Trace Metals in the Environment*, Vol. 2, Ann Arbor Scientific Publications, Ann Arbor, MI, 469 pp.

The National Institute of Standards and Technology in the USA  
<http://www.nist.gov/index.html> <http://www.nist.gov/environment-srm-portal.cfm>.

Trautenberg, C.R., Ah-Peng, C., 2004. A procedure to purify and culture a clonal strain of the aquatic moss *Fontinalis antipyretica* for use as a bioindicator of heavy metals. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 46, 289-295.

Trindade, R.B.E, Filho, O.B., 2002. *Extracção de Ouro – Princípios, Tecnologia e Meio Ambiente*. CETEM. Rio de Janeiro. 322 pp.

Tschan, M., Robinson, B., Schulin, R., 2008. Antimony uptake by *Zea mays* (L.) and *Helianthus annuus* (L.) from nutrient solution. *Environmental Geochemistry and Health*, 30, 187 – 191.

Van Loon, L. C., Barefoot, R. R., 1988. *Analytical methods for geochemical exploration*. Academic press inc. Toronto, 344 pp.

Van ZYL, D.(Eds), 1985. *Cyanide and the Environment*, Proceedings, Vol 2. Geotech.Eng.Program, Colorado State University.

Vázquez, M.d., López, U.J. Carballeira, A., 1999. Modification of the sequential elution technique for the extraction of heavy metals from bryophytes. *The Science of the Total Environment*, 241, 53 – 62.

Vieira, A.R., Gonzalez, C., Martins-Loução, M.A., Branquinho, C., 2009. Intracellular and extracellular ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) uptake and its toxic effects on the aquatic biomonitor *Fontinalis antipyretica*. *Ecotoxicology*, 18, 1087 – 1094.

Warren, H.V., Delavault, R.E., 1950. Gold and silver content of some trees and horsetails in British Columbia. *Geological Society of American Bulletin*, 61, 123 – 128.

Welch, W.A., 1960. *A Monograph of Fontinalaceae*. M. Nijhoff, The Hague, Neth.

Wetzel, R.G., 1983. *Limnology*, 2ª Edição. Fundação Calouste Glubenkian. 919 pp.

Whitton, B.A., Say, P.J., Jupp, B.P., 1982. Accumulation of zinc, cadmium and lead by the aquatic liverwort *Scapania*. *Environ. Pollut. (Ser. B)*, 3, 299 – 316.

Williams, C.A., Ward, N.I., Brodie, K., 1995. The analysis of gold in plant materials from an operating gold mine by ICP-MS. In: Wilken, R.-D., Forstner, U., Knochel, A. (Eds.) *Heavy Metals in the Environment*, 2nd Edition, 395 pp.

World Health Organisation (WHO), 1981. *Environmental Health Criteria*, 18, Arsenic. World Health Organisation, Geneva.

World Health Organisation (WHO), 1996. *Guidelines for Drinking-water Quality*, vol. 2: Health Criteria and Other Supporting Information. World Health Organization, Geneva.

## 6 Anexos

Tabela A1 - Acumulação Au nos explantes de *Fontinalis* usados nos testes toxicológicos.

Ensaio I								
Espécie	P (g)	T (d)	[Au] <sub>i</sub> (mg. L <sup>-1</sup> )	μM <sub>i</sub>	m <sub>i</sub> Au (μg)	[Au] <sub>f</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	m <sub>f</sub> (μg)	%(m/m)
Fa	0,02	30	0,01	0,05	2,00	1,30	0,02	0,98
	0,03	30	0,10	0,51	20,00	1,80	0,05	0,23
	0,01	30	1,00	5,08	200,00	39,50	0,51	0,25

Ensaio II								
Espécie	P (g)	T (d)	[Au] <sub>i</sub> (mg. L <sup>-1</sup> )	μM <sub>i</sub>	m <sub>i</sub> Au (μg)	[Au] <sub>f</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	m <sub>f</sub> (μg)	%(m/m)
Fa	0,02	30	0,25	1,27	85,00	29,60	0,54	0,63
	0,02	30	0,50	2,54	170,00	145,90	3,05	1,79
	0,06	60	0,75	3,81	165,00	61,30	3,60	2,18
Fs	0,06	30	0,10	0,51	32,00	5,04	0,32	1,01
	0,05	30	0,25	1,27	80,00	44,95	2,05	2,57
	0,08	30	0,50	2,54	160,00	61,28	4,72	2,95
	0,04	30	1,00	5,08	200,00	74,19	2,76	1,38
	0,04	30	4,00	20,31	880,00	738,56	30,65	3,48
	0,07	60	0,75	3,81	75,00	89,73	6,07	8,10
	0,09	65	0,75	3,81	75,00	208,17	17,90	23,87
	0,27	65	0,75	3,81	75,00	83,56	22,64	30,19
	0,11	60	1,00	5,08	100,00	77,76	8,18	8,18
0,09	60	4,00	20,31	400,00	802,05	68,17	17,04	

Ensaio III								
Espécie	P (g)	T (d)	[Au] <sub>i</sub> (mg. L <sup>-1</sup> )	μM <sub>i</sub>	m <sub>i</sub> Au (μg)	[Au] <sub>f</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	m <sub>f</sub> (μg)	%(m/m)
Fa	0,17	15	0,75	3,81	375,00	42,99	7,38	1,97
	0,25	35	0,75	3,81	300,00	37,13	9,43	3,14
	0,06	35	0,75	3,81	75,00	17,08	0,97	1,29
	0,08	35	0,75	3,81	75,00	16,66	1,31	1,75
Fs	0,21	15	0,75	3,81	375,00	26,40	5,59	1,49
	0,16	35	0,75	3,81	75,00	2,75	0,43	0,57
	0,14	35	0,75	3,81	75,00	47,75	6,60	8,81
	0,30	35	0,75	3,81	150,00	18,39	5,59	3,73

Tabela A2 – Acumulação de Ag, As e Sb nos explantes de *Fontinalis* usados nos testes toxicológicos.

Prata (Ag)								
Espécie	P (g)	T (d)	$[\text{I}]_i$ (mg. L <sup>-1</sup> )	$\mu\text{M}_i$	$m_i$ ( $\mu\text{g}$ )	$[\text{I}]_f$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$m_f$ ( $\mu\text{g}$ )	%(m/m)
Fa	0,02	30	0,05	0,50	6,5	3,60	0,07	1,11
	0,01	30	0,40	3,75	40,5	8,30	0,10	0,24
	0,01	30	0,54	5,00	53,9	53,16	0,75	1,39
	0,04	60	0,05	0,50	6,5	14,77	0,64	9,91
	0,05	60	0,40	3,75	40,5	30,86	1,59	3,93
	0,02	60	0,54	5,00	53,9	877,66	18,52	34,34
	0,01	60	2,00	20,00	215,7	285,9	3,32	1,5
Fs	0,02	30	0,05	0,50	6,5	5,36	0,11	1,66
	0,02	30	0,40	3,75	40,5	8,66	0,20	0,51
	0,03	30	0,54	5,00	53,9	36,32	0,92	1,70
	0,10	60	0,05	0,50	6,5	16,9	1,63	25,2
	0,06	60	0,40	3,75	40,5	26,5	1,67	4,1
	0,12	60	0,54	5,00	53,9	47,0	5,80	10,8
	0,01	60	2,00	20,00	215,7	225,0	2,90	1,3

Arsénio (As)								
Espécie	P (g)	T (d)	$[\text{I}]_i$ (mg. L <sup>-1</sup> )	$\mu\text{M}_i$	$m_i$ ( $\mu\text{g}$ )	$[\text{I}]_f$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$m_f$ ( $\mu\text{g}$ )	%(m/m)
Fa	0,05	30	0,04	0,50	12,8	0,1	0,65	0,05
	0,01	90	0,04	0,50	0,8	0,0	0,00	0,00
	0,09	30	0,09	1,25	31,9	0,2	0,89	0,05
	0,05	30	0,28	3,75	95,6	1,9	9,58	0,11
	0,03	30	0,38	5,01	127,5	0,7	3,59	0,02
	0,01	90	0,38	5,01	7,5	0,0	0,00	0,00
	0,02	30	1,33	17,75	319,2	5,3	26,96	0,03
Fs	0,01	60	1,33	17,75	159,6	1,7	8,79	0,01
	0,07	30	0,04	0,50	18,8	0,0	0,24	0,02
	0,09	30	0,09	1,25	159,4	0,2	0,89	0,01
	0,08	30	0,28	3,75	506,3	1,8	9,08	0,03
	0,03	30	0,38	5,01	600,0	1,1	5,62	0,01
	0,02	90	0,38	5,01	37,5	0,0	0,00	0,00

Antimónio (Sb)								
Espécie	P (g)	T (d)	$[\text{I}]_i$ (mg. L <sup>-1</sup> )	$\mu\text{M}_i$	$m_i$ ( $\mu\text{g}$ )	$[\text{I}]_f$ (mg.L <sup>-1</sup> )	$m_f$ ( $\mu\text{g}$ )	%(m/m)
Fa	0,02	30	0,06	0,50	14,6	14,5	0,20	1,60
	0,02	60	0,06	0,50	7,30	11,4	0,20	3,20
	0,01	30	0,46	3,75	109,6	135,0	1,90	1,70
	0,02	60	0,46	3,75	54,8	54,4	1,20	2,10



	0,02	30	0,61	5,00	146,1	130,4	2,90	2,00
	0,06	60	0,61	5,00	73,1	24,8	1,40	1,90
Fs	0,07	30	0,06	0,50	14,6	27,5	1,90	12,8
	0,15	60	0,06	0,50	7,30	7,50	1,10	14,9
	0,05	30	0,46	3,75	109,6	180,7	9,80	9,00
	0,18	60	0,46	3,75	54,8	45,8	8,20	15,0
	0,05	30	0,61	5,00	146,1	289,4	13,6	9,30
	0,13	60	0,61	5,00	73,1	81,4	10,3	14,1

Tabela A3 – Valores de concentração de Au (em mg.kg<sup>-1</sup>) determinados nas plantas de ambas as espécies de *Fontinalis* submetidas à experiência realizada em aquário.

NaAuCl <sub>4</sub>	[Au] <i>F. antipyretica</i>			[Au] <i>F. squamosa</i>		
	[Au] <sub>i</sub> =0,03	[Au] <sub>i</sub> =0,55	[Au] <sub>i</sub> =2,90	[Au] <sub>i</sub> =0,03	[Au] <sub>i</sub> =0,55	[Au] <sub>i</sub> =2,90
<b>24</b>	15,62	127,43	282,36	27,61	88,10	259,01
<b>48</b>	20,81	130,06	264,11	19,80	66,45	290,11
<b>168</b>	7,79	129,90	477,56	29,49	56,79	650,18
<b>336</b>	9,30	214,12	491,68	18,11	108,52	1261,20
<b>504</b>	20,12	105,35	316,13	18,49	166,84	654,24
<b>672</b>	16,66	184,54	653,79	20,95	200,69	993,54

AuI	[Au] <i>F. antipyretica</i>			[Au] <i>F. squamosa</i>		
	[Au] <sub>i</sub> =0,05	[Au] <sub>i</sub> =0,75	[Au] <sub>i</sub> =4,00	[Au] <sub>i</sub> =0,05	[Au] <sub>i</sub> =0,75	[Au] <sub>i</sub> =4,00
<b>24</b>	35,86	1249,49	3621,50	11,25	1201,14	2682,40
<b>48</b>	55,77	479,78	3774,02	8,79	47,04	4223,06
<b>168</b>	9,81	390,44	3563,01	5,63	498,21	4083,25
<b>336</b>	12,59	357,79	2926,36	22,53	3,5541	5083,33
<b>504</b>	15,57	441,14	2720,41	26,68	798,42	3432,99
<b>672</b>	31,28	68,09	2113,81	30,49	824,37	2924,83

AuCN	[Au] <i>F. antipyretica</i>			[Au] <i>F. squamosa</i>		
	[Au] <sub>i</sub> =0,05	[Au] <sub>i</sub> =0,75	[Au] <sub>i</sub> =4,00	[Au] <sub>i</sub> =0,05	[Au] <sub>i</sub> =0,75	[Au] <sub>i</sub> =4,00
<b>24</b>	13,68	224,48	1380,76	15,15	69,08	1085,09
<b>48</b>	10,69	246,57	1106,95	17,08	39,16	209,85
<b>168</b>	1,19	83,36	5498,88	22,38	166,87	2011,19
<b>336</b>	4,56	51,73	2592,19	8,75	150,49	1144,38
<b>504</b>	10,55	121,80	1180,73	17,42	200,84	2120,50
<b>672</b>	9,43	227,43	1471,21	115,00	492,60	3015,57

Tabela A4 – Peso seco (em gramas) das amostras de ambas as espécies de *Fontinalis* recolhidas no decorrer dos ensaios com Au em aquário.

<b>NaAuCl<sub>4</sub></b>	<b>Peso seco (g) <i>F. antipyretica</i></b>			<b>Peso seco (g) <i>F. squamosa</i></b>			
	<b>T(h)</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,03</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,55</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=2,90</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,03</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,55</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=2,90</b>
<b>24</b>		0,028	0,054	0,046	0,071	0,046	0,067
<b>48</b>		0,063	0,085	0,057	0,046	0,156	0,090
<b>168</b>		0,042	0,026	0,044	0,019	0,037	0,048
<b>336</b>		0,031	0,032	0,042	0,053	0,033	0,051
<b>504</b>		0,022	0,058	0,061	0,027	0,063	0,017
<b>672</b>		0,041	0,105	0,043	0,074	0,075	0,172

<b>AuI</b>	<b>Peso seco (g) <i>F. antipyretica</i></b>			<b>Peso seco (g) <i>F. squamosa</i></b>			
	<b>T(h)</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,05</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,75</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=4,00</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,05</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,75</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=4,00</b>
<b>24</b>		0,041	0,064	0,084	0,092	0,041	0,047
<b>48</b>		0,088	0,040	0,043	0,065	0,046	0,046
<b>168</b>		0,025	0,029	0,039	0,036	0,044	0,042
<b>336</b>		0,049	0,019	0,052	0,045	0,030	0,020
<b>504</b>		0,031	0,021	0,047	0,042	0,024	0,038
<b>672</b>		0,058	0,042	0,057	0,107	0,028	0,059

<b>AuCN</b>	<b>Peso seco (g) <i>F. antipyretica</i></b>			<b>Peso seco (g) <i>F. squamosa</i></b>			
	<b>T(h)</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,05</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,75</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=4,00</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,05</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=0,75</b>	<b>[Au]<sub>i</sub>=4,00</b>
<b>24</b>		0,088	0,032	0,092	0,064	0,078	0,109
<b>48</b>		0,068	0,082	0,087	0,059	0,025	0,034
<b>168</b>		0,024	0,025	0,017	0,014	0,030	0,024
<b>336</b>		0,086	0,030	0,040	0,012	0,034	0,016
<b>504</b>		0,052	0,069	0,050	0,007	0,015	0,016
<b>672</b>		0,114	0,073	0,100	0,024	0,040	0,027