

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL**

**CAROLINE QUENUPE CAMPOS**

**EFEITOS DA SALINIDADE NO ACÚMULO DE METAIS PESADOS  
E NAS CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, FISIOLÓGICAS E  
BIOQUÍMICAS EM PLANTAS DO MANGUEZAL**

VITÓRIA - ES

2018

CAROLINE QUENUPE CAMPOS

**EFEITOS DA SALINIDADE NO ACÚMULO DE METAIS PESADOS  
E NAS CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, FISIOLÓGICAS E  
BIOQUÍMICAS EM PLANTAS DO MANGUEZAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientador(a): Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> CAMILLA ROZINDO DIAS  
MILANEZ

VITÓRIA - ES

2018

[PÁGINA DA FICHA CATALOGRÁFICA]

# **EFEITOS DA SALINIDADE NO ACÚMULO DE METAIS PESADOS E NAS CARACTERÍSTICAS ANATÔMICAS, FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM PLANTAS DO MANGUEZAL**

**CAROLINE QUENUPE CAMPOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018.

**Comissão Examinadora:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Camilla Rozindo Dias Milanez - UFES**  
Orientador e Presidente da Comissão

---

**Dr<sup>a</sup>. Silvia Tamie Matsumoto - UFES**  
Examinador Interno

---

**Dr<sup>a</sup>. Gloria Maria de Farias Viegas Aquije – IFES**  
Examinador Externo

*Aos meus pais, Angela e Francisco, pelo amor incondicional.*

*Aos meus irmãos, meus maiores presentes.*

*Ao Júlio, por todo amor e incentivo.*

*À Madonna, meu amor em forma de ronron que deixou saudade.*

*Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Vegetal, pela infraestrutura disponibilizada.

À FAPES pelo subsídio ao projeto de pesquisa (processo nº 67666248).

À Capes pela bolsa de mestrado fornecida.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camilla Rozindo Dias Milanez, por aceitar me orientar e acreditar na minha capacidade. Muito obrigada pelos ensinamentos, pelo incentivo e pelas palavras amigas dadas em momentos mais frágeis.

Aos professores do PPGBV-UFES por todo ensinamento.

Às professoras doutoras Gloria Maria de Farias Viegas Aquije e Silvia Tamie Matsumoto por aceitarem compor a banca.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Geisamanda Pedrini Brandão, coordenadora do Laboratório de Espectrometria Atômica (LEA), LabPetro-DQUI/UFES, pela realização e auxílio nas análises químicas.

Aos alunos do Laboratório de Espectrometria Atômica (LEA), LabPetro-DQUI/UFES, pela convivência agradável e por fazerem eu me sentir parte da equipe.

À doutoranda Bruna Miurim Dalfior, por toda dedicação e colaboração nas análises químicas.

À Dr.<sup>a</sup> Iara da Costa Souza e ao Msc. Vinícius Cavicchioli Azevedo pelo apoio com as análises estatísticas.

À amiga Dr.<sup>a</sup> Hiulana Pereira Arrivabene pela idealização do projeto e apoio dado.

A toda equipe do Laboratório de Anatomia Vegetal (LABAV) da UFES, pelo convívio e apoio recebido. Em especial à doutoranda Dayana Effgen Fantinato pela paciência e suporte dado para realização das análises enzimáticas e ao aluno Ricardo Santana Galego pelo suporte no preparo do laminário histológico..

.Aos amigos de mestrado da turma de 2016, em especial a Miriely Xavier Bernardes e Karyna Batisti Knupp.

À técnica de química e amiga Débora pela ajuda com preparo de soluções e incentivo.

À amiga Ranna Batista Wanzeler pela ajuda com a formatação e convívio de laboratório.

Às amadas amigas Jusielly Sorte e Lecyane Falcão pelos momentos únicos que vocês me proporcionaram. Obrigada pela preocupação, incentivo e amizade para o que der e vier.

Aos meus familiares e todos que direta ou indiretamente contribuíram e torceram por mim.

À Deus, pois sem ele tudo seria mais difícil.

*Muito obrigada!*

## RESUMO

Os manguezais são ecossistemas costeiros frequentemente expostos à poluição por metais pesados, os quais se acumulam em teores elevados no sedimento. Sabe-se que a biodisponibilidade e toxicidade desses metais no sedimento é alterada pela salinidade, pH, teor de matéria orgânica, entre outros fatores. De acordo com o relatório do Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) espera-se uma diminuição da precipitação e, conseqüentemente, um aumento da salinidade nas regiões tropicais. Apesar da relevância do tema, há um vasto campo a ser conhecido sobre os mecanismos morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos das espécies de manguezal no acúmulo de metais, sob diferentes condições ambientais. Nas plantas, o acúmulo de metais em seus tecidos é determinado pela biodisponibilidade destes elementos no sedimento e pela eficiência da planta em absorver e translocar os metais na raiz e nos tecidos vasculares. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de diferentes níveis de salinidade no acúmulo de cromo, arsênio, mercúrio e chumbo e nas características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. e *Rhizophora mangle* L. Para tanto, propágulos foram cultivados durante 16 meses, em casa de vegetação e, após o cultivo, as plantas foram expostas a três concentrações distintas de NaCl (3, 7 e 11 g L<sup>-1</sup>) com adição de 28 µg L<sup>-1</sup> de Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 µg L<sup>-1</sup> de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10 µg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> e 10 µg L<sup>-1</sup> de PbCl<sub>2</sub> na solução de Hoagland e Arnon (1950). Os dados foram submetidos ao teste de Tukey, com 5% de significância, à análise fatorial multivariada (FA), à análise discriminante linear e ao teste de correlação de Spearman. Foram realizadas as seguintes análises: quantificação do teor de cromo, arsênio, mercúrio e chumbo em folhas, caules e raízes; determinação do fator de translocação; anatomia foliar; trocas gasosas e atividade das enzimas APX, CAT e SOD. Os resultados mostraram que *R. mangle* sofre maior influência da salinidade em suas características do que *L. racemosa*, com correlação negativa entre a salinidade e a atividade da CAT, a concentração de As no caule, e o fator de translocação de As (caule/raiz). Houve também correlação positiva entre a salinidade e o fator de translocação de Hg (parte aérea/raiz). Por outro lado, *L. racemosa* mostrou-se mais sensível às concentrações de metais pesados, sobretudo, a presença do cromo, arsênio e mercúrio na raiz. Esses



metais influenciaram de forma positiva a densidade e condutância estomática e a área do feixe vascular da nervura central. Os resultados também indicam que, sob uma condição mais salina, há maior absorção de Cr, Pb, As e Hg, em *L. racemosa*. Enquanto, maiores concentrações de Cr e Hg são observadas em *R. mangle* sob menor salinidade. Os resultados evidenciam que *L. racemosa* e *R. mangle* apresentam respostas anatômicas, fisiológicas e bioquímicas distintas quanto aos diferentes níveis de salinidade analisados, bem como, quanto à bioacumulação de Cr, Pb, As e Hg.

**Palavras-chave:** Bioacumulação • estresse • *Laguncularia racemosa* • mudanças climáticas • *Rhizophora mangle* •

## ABSTRACT

The mangroves are coastal ecosystems frequently exposed to the pollution by heavy metals, which accumulate in sediments at high level content. It is known that the bioavailability and toxicity by such metals in the sediment is modified by the salinity, pH, soil organic matter, and other factors. According to the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC), there is a forecasting of decreasing in precipitation with a consequent increasing of the salinity in tropical regions. Despite of the relevance of this theme, few is known about the morphological, anatomical, physiological and biochemical mechanisms of mangrove species in metal accumulation under different environmental conditions. The accumulation of metals in plant tissues is determined by the bioavailability of such elements in the sediment and by the efficiency of the plant absorption and translocation of such metals in root and vascular tissues. In this context, the present study has the objective of evaluate the effect of different levels of salinity on the accumulation of Chrome, Arsenio, Mercury, Lead; and into the anatomical, physiological and biochemical traits of *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. e *Rhizophora mangle* L. Thus, propagules of *L. racemosa* and *R. mangle* were cultivated during to 16 months in a vegetation green-house and afterwards exposed to modified Hoagland and Arnon (1950) solutions, containing three distinct NaCl concentration (3, 7 and 11 g L<sup>-1</sup>) with addition of 28 µg L<sup>-1</sup> of Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 µg L<sup>-1</sup> of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10 µg L<sup>-1</sup> of HgCl<sub>2</sub> and 10 µg L<sup>-1</sup> of PbCl<sub>2</sub>. The outcomes were statistically analyzed by the Tukey test in 5% of significance; the multivariate factorial analysis (FA); the linear discriminant analysis; and the Spearman correlation test. We performed the following analysis: 1) quantification of Chrome, Arsenio, Mercury and Lead in leaves, stem and roots; 2) determination of the factor of translocation; 3) leaf anatomy; gas exchanges; and 4) APX, CAT and SOD enzyme activity. The results show that *R. mangle* traits is more affected by salinity than *L. racemosa*, exhibiting a negative correlation to CAT activity, As stem content, and translocation factor of As (stem/root). Moreover, the results show a positive correlation between salinity and the Hg translocation factor (shoot/root). However, *L. racemosa* show a higher sensitivity to the heavy metal concentration, mainly to the Chrome, Arsenio and Mercury presence in roots. Those metals positively influenced the stomatal density and conductance, and the vascular

bundle area from the central vein. The results also indicated that, under a more saline condition, there is a higher absorption of Cr, Pb, As e Hg in *L. racemosa*. Whereas higher concentrations of Cr and Hg were observed in *R. mangle* under lower salinity conditions. The results highlight that *L. racemosa* and *R. mangle* exhibit distinct anatomical, physiological and biochemical responses to the different levels of salinity evaluated, and to the bioaccumulation of Cr, Pb, As and Hg, as well.

**Keywords:** Bioaccumulation • stress • *Laguncularia racemosa* • climate change •  
*Rhizophora mangle* •

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade das enzimas APX (A) e CAT (B) em folhas de *R. mangle* e *L. racemosa*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras comparam os tratamentos dentro da mesma espécie. ....32
- Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade da enzima SOD em folhas de *R. mangle* e *L. racemosa*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras comparam os tratamentos dentro da mesma espécie. ....33
- Figura 3. Secções transversais e impressões epidérmicas do limbo de *L. racemosa*. A-B. Secções transversais da região da nervura central. A. Tratamento com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl . B. Tratamento com  $3 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. C-D. Impressões epidérmicas. C. Tratamento com  $3 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. D. Tratamento com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl. (Fl:floema; Xi: xilema; as setas indicam estômatos) Barras =  $50 \mu\text{m}$ .....35
- Figura 4. Correlação de Spearman entre as concentrações salinas com a atividade da APX e com a concentração de Cr no caule em *L. racemosa*.....40
- Figura 5. Correlação de Spearman entre as concentrações salinas em *R. mangle* com a atividade da CAT, com [As] no caule, com o FTpar do Hg e com o FTcr As. ....41
- Figura 6. Correlação de Spearman entre as concentrações de Hg, As e Cr na raiz de *L. racemosa* com a condutância estomática, densidade estomática e área do cilindro vascular .....42
- Figura 7. Correlação de Spearman entre as concentrações de Hg na raiz com a concentração de Cr e As na raiz de *L. racemosa*. ....43

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl sobre a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (*A*), condutância estomática (*gs*), concentração de CO<sub>2</sub> interno (*Ci*), transpiração (*E*), eficiência instantânea de carboxilação (*A/Ci*) e a eficiência intrínseca do uso da água (*A/gs* e *A/E*) de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* os 45, 65 e 90 dias. ....31
- Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a anatomia foliar de *R. mangle* e *L. racemosa*. (espessura dos tecidos em µm; razão parênquima paliçádico/ parênquima esponjoso: Pp/Pe).....34
- Tabela 3. Concentração de Cr, Pb, As e Hg nas raízes, caules e folhas de *R. mangle* e *L. racemosa* em diferentes concentrações de NaCl. FTcr: fator de translocação entre caule e raiz; FTfc: fator de translocação entre folha e caule; FTfr: fator de translocação entre folha e raiz; FTpar: fator de translocação entre parte aérea e raiz.....37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ERO's</b>	espécies reativas de oxigênio
<b>[ ]</b>	concentração
<b>FTcr</b>	[metal] caule / [metal] raiz
<b>FTfc</b>	[metal] folha / [metal] caule
<b>FTfr</b>	[metal] folha / [metal] raiz
<b>FTpar</b>	[metal] (folha+caule) / [metal] raiz
<b>CAT</b>	catalase
<b>APX</b>	peroxidase do ascorbato
<b>SOD</b>	superóxido dismutase
<b>Deab</b>	densidade estomática face abaxial
<b>ACV</b>	área do cilindro vascular

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. HIPÓTESE.....	18
3. OBJETIVO GERAL.....	18
3.1 <i>Objetivos específicos</i> .....	18
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
4.1 <i>O ecossistema manguezal</i> .....	19
4.2 <i>Influência da salinidade na absorção de metais</i> .....	20
4.3 <i>Os metais arsênio, chumbo, cromo e mercúrio e sua influência na anatomia, fisiologia e bioquímica de plantas</i> .....	21
4.4 <i>Descrição das espécies em estudo</i> .....	23
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
5.1 <i>Material vegetal e condição experimental</i> .....	25
5.2 <i>Trocas Gasosas</i> .....	26
5.3 <i>Extração e atividade enzimática</i> .....	26
5.4 <i>Anatomia foliar</i> .....	27
5.5 <i>Determinação do teor de Cr, Pb, As e Hg</i> .....	28
5.5.1 <i>Cr, Pb, As e Hg em folhas, caules e raízes</i> .....	28
5.6 <i>Análise estatística</i> .....	29
6. RESULTADOS.....	30
6.1. <i>Trocas gasosas</i> .....	30
6.2. <i>Atividade enzimática</i> .....	32
6.3. <i>Anatomia foliar</i> .....	33
6.4. <i>Concentração de Cr, Pb, As e Hg em folhas, caules e raízes</i> .....	35
6.5. <i>Fatores de translocação</i> .....	36
6.6. <i>Estatística multivariada</i> .....	39
6.6.1. <i>Análise multivariada fatorial (FA)</i> .....	39
6.6.2. <i>Análise discriminante linear (LDA)</i> .....	40
6.6.3. <i>Correlação de postos Spearman</i> .....	40
7. DISCUSSÃO.....	43
8. CONCLUSÕES.....	48
9. REFERÊNCIAS.....	49

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O manguezal é um ecossistema de transição entre os ambientes terrestre e marinho, sujeito ao regime de marés e fisicamente e geologicamente dinâmico (ALONGI, 2015). Típicos de regiões tropicais e subtropicais, esse ecossistema desempenha papel fundamental na manutenção da biodiversidade de espécies atuando no equilíbrio ecológico de toda região costeira (DU et al., 2013).

Devido à sua distribuição costeira e proximidade de centros urbanos, os manguezais frequentemente são expostos à poluição por metais pesados (DEFEW et al., 2005; PETERS et al., 1997), os quais se acumulam em teores elevados no sedimento. A contaminação dos sedimentos dos manguezais, com altos níveis de metais contaminantes, tem sido relatada em várias áreas do globo (LEWIS et al., 2011; BAYEN, 2012; SOUZA et al., 2014).

Sabe-se que a biodisponibilidade e toxicidade dos metais pesados no sedimento dos manguezais é alterada pela salinidade, pH, potencial redox, teor de matéria orgânica, biota residente, e interações entre estas variáveis (MARTIN et al., 2006; MORRISSEY & GUERINOT, 2009). Uma pequena fração biodisponível assume uma importância considerável no que diz respeito à bioacumulação de metais em diferentes espécies (GUHATHAKURTA & KAVIRAJ, 2000; MACFARLANE et al., 2003).

Nas plantas, o acúmulo de metais em seus tecidos é determinado pela biodisponibilidade destes elementos no sedimento e pela eficiência da planta em absorver e translocar os metais na raiz e nos tecidos vasculares (PILON-SMIT, 2005; QIAN et al., 2012). A flora do manguezal, normalmente, apresenta maior concentração de metais nas raízes do que na parte aérea (ARRIVABENE et al., 2016; LEWIS et al., 2011). Adaptações anatômicas e fisiológicas das raízes (LIU et al., 2009), presença de barreiras na epiderme e endoderme (MACFARLANE & BURCHETT, 2000), bem como a formação de placas de ferro na superfície radicular (MACHADO et al., 2005), promovem uma maior retenção de metais nas raízes (LIU et al., 2009; MACFARLANE et al., 2003). Recentemente, alguns trabalhos relataram a eliminação de alguns metais por meio da sua secreção em glândulas de sal presente nas folhas de



algumas espécies do manguezal (ARRIVABENE et al., 2011; MACFARLANE & BURCHETT 1999, 2000).

Todavia, o comportamento da flora do manguezal também deve ser analisado diante de outro problema de grande interesse para o meio científico e tão relevante quanto à poluição por metais, às mudanças climáticas. As alterações climáticas têm causado profundo impacto no meio ambiente, especialmente, nos recursos hídricos, florestais e agricultura, com implicações nos setores sociais, econômicos e ambientais.

O quinto relatório do Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) traz uma avaliação científica e técnica da mudança do clima, com previsão de um aumento de precipitação nas altas latitudes, o que acarretará diminuição da salinidade nessas regiões e, diminuição da precipitação e aumento da salinidade nas regiões tropicais (CIAS et al., 2013). Apesar da relevância do tema, há um vasto campo a ser conhecido sobre os mecanismos morfológicos, anatômicos, fisiológicos e bioquímicos dessas espécies no acúmulo de metais em plantas de manguezal sob condições ambientais adversas (SÁNCHEZ-ARIAS et al., 2008).

Além disso, sabendo que os metais acumulados nas plantas servem de alimento para caranguejos e outros animais podendo ser transportados pela cadeia alimentar costeira, e que as florestas de manguezal são consideradas barreiras biogeoquímicas para o transporte de poluentes em áreas costeiras (SILVA et al., 1990), investigações que avaliem a influência da variação da salinidade no acúmulo de metais em plantas de manguezal tornam-se fundamentais.

## 2. HIPÓTESE

Indivíduos de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. e *Rhizophora mangle* L. sujeitos a condições mais salinas apresentam maior acúmulo dos metais Cr, Pb, As e Hg, levando a um maior estresse oxidativo, danos nas trocas gasosas e alterações na anatomia foliar destas espécies.

## 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da salinidade no acúmulo de cromo, arsênio, mercúrio e chumbo e nas características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas de *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. e *Rhizophora mangle* L.

### 3.1 Objetivos específicos

- ✓ Quantificar o teor de cromo, arsênio, mercúrio e chumbo em folhas, caules e raízes de *R. mangle* e *L. racemosa*, sob diferentes níveis de salinidade;
- ✓ Determinar o fator de translocação de cromo, arsênio, mercúrio e chumbo em *R. mangle* e *L. racemosa*, sob diferentes níveis de salinidade;
- ✓ Analisar quantitativamente e qualitativamente a anatomia foliar de *R. mangle* e *L. racemosa*, sob diferentes salinidades;
- ✓ Analisar as trocas gasosas de *R. mangle* e *L. racemosa* sob diferentes níveis de salinidade;
- ✓ Verificar a ocorrência de estresse oxidativo nas espécies estudadas, por meio da análise da atividade das enzimas APX, CAT e SOD.

## 4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 *O ecossistema manguezal*

O manguezal é um ecossistema costeiro, sujeito ao regime de marés, que faz interface entre o ambiente marinho e terrestre (TOMLINSON, 1986). Possui distribuição predominantemente em regiões tropicais e subtropicais (YOKOYA, 1995), sendo a maior área desse ecossistema encontrada em menores latitudes (GIRI et al., 2011). Sua localização em estuários e deltas marinhos faz desse ecossistema uma barreira contra a erosão, protegendo a costa litorânea (CLOUGH, 2013), e sentinela das mudanças de climáticas (ALONGI, 2015). Embora sejam caracterizados pela constante ciclagem de nutrientes e matéria orgânica (SAENGER, 2002), os manguezais são sistemas abertos nos quais a água, sedimento, nutrientes e matéria orgânica são importados e exportados de ambientes adjacentes (CLOUGH, 2013).

Os sedimentos de manguezais apresentam condições anóxicas, redutoras, com um alto teor de matéria orgânica e de conteúdo de sal, o que acaba favorecendo a retenção de metais pesados (FERNANDES & PERIA, 1995; SILVA et al., 1990). Alguns estudos relatam que os sedimentos dos manguezais, geralmente, atuam como sumidouros de metais pesados, pois possuem grande capacidade de reter os metais pesados presente nas águas pluviais, das marés e dos rios (KJERFVE & LACERDA, 1993; TAM & WONG, 1993, 1995). Tipicamente argilosos, os sedimentos dos manguezais podem variar na sua composição química e textura (VANNUCCI, 1999), levando a uma variação espacial na distribuição das espécies vegetais ao longo de alguns manguezais (SAENGER, 2002).

O termo mangue é utilizado para identificar as plantas superiores que crescem em regiões costeiras tropicais e subtropicais, nas áreas entremarés, e que demonstram tolerância a altas concentrações salinas e anoxia do sedimento, e produzem propágulos dispersos pela água do mar (SAENGER, 2002). Tomlinson (1994) dividiu os mangues em três grupos distintos: (1) elementos principais de manguezal ou mangue verdadeiro, (2) elementos secundários de manguezal e (3) elementos associados de mangue. Sendo assim, os primeiros são caracterizados por serem restritos a esse ecossistema e apresentarem adaptações que permitem sua sobrevivência no

mesmo, tais como, rizóforos para fixação no sedimento instável, pneumatóforos que auxiliam nas trocas gasosas, reprodução por viviparidade e mecanismo fisiológico para exclusão de sal. Os elementos secundários de manguezal não possuem habilidades de formar uma vegetação conspícua e os elementos associados de mangue ocupam apenas ecótonos entre o mangue e o continente.

A distribuição moderna global dos manguezais apresenta três padrões principais: (1) diferenças taxonômica e numérica marcantes entre as espécies da África, Ásia e Américas; (2) um declínio no número de espécies com o aumento da latitude, associado, principalmente, a temperatura; (3) redução na diversidade de espécies com a diminuição da precipitação e aumento da aridez (CLOUGH, 2013).

No Brasil, existem cerca de 962.683 ha de manguezais (FERREIRA & LACERDA, 2016), cerca de 7% do total mundial (GIRI et al., 2011), entretanto, a riqueza de espécies arbóreas de mangues verdadeiros é pequena (*Rhizophora mangle* L., *Rhizophora racemosa* G. Mey, *Rhizophora harrisonii* Leechm., *Avicennia germinans* (L.) L., *Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke e *Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn.) (KJERFVE & LACERDA, 1993). Quatro dessas espécies são encontrados no estado do Espírito Santo, sendo popularmente conhecidas como: mangue vermelho (*Rhizophora mangle* L.), mangue preto ou siriúba (*Avicennia schaueriana* Stapf & Leechm. ex Moldenke), mangue preto (*Avicennia germinans* (L.) L.) e mangue branco (*Laguncularia racemosa* (L.) C. F. Gaertn.).

O estado do Espírito Santo possui uma área de 88,49 km<sup>2</sup> de manguezal, sendo 11 km<sup>2</sup> localizados em Vitória, capital do estado (EUGENIO et al., 2017). Devido à proximidade desses manguezais a áreas de atividade industrial, os manguezais do Espírito Santo, em geral, não apresentam um bom estado de conservação, contendo, muitas vezes, metais contaminantes em seu sedimento e água intersticial (SOUZA et al., 2014).

#### 4.2 Influência da salinidade na absorção de metais

A absorção de metais pesados pelas plantas depende que uma mínima fração do metal presente na água intersticial e nas partículas do solo, esteja

biodisponível no ambiente (LUTTS & LEFÉVRE, 2015). Sabe-se que a biodisponibilidade de metais pesados nos solos depende, além da sua concentração, de diversos fatores abióticos, tais como, a composição do solo, a acidez do solo, o potencial redox e a salinidade (BAYEN, 2012).

A salinidade vem sendo relatada como um dos fatores responsáveis por aumentar a mobilidade de metais, seja pela complexação de ânions derivados do sal com metais pesados, ou via competição de cátions derivados de sal com espécies de metais pesados (HATJE et al., 2003; ACOSTA et al., 2011). Experimentos realizados com água e sedimento de estuários indicaram que a cinética de adsorção e dessorção de metais em material particulado em suspensão é dependente do metal e da salinidade da água (HATJE et al., 2003).

Acosta et al. (2011) investigaram a influência da salinidade na mobilização dos metais Cd, Cu, Zn e Pb e constataram que os metais são mobilizados de forma diferente de acordo com o tipo de sal presente no solo. O Pb, em particular, mostrou maior mobilização quando exposto a maiores concentrações salinas, sobretudo, com o sal na forma de  $\text{CaCl}_2$  (ACOSTA et al., 2011). Ao estudarem os efeitos da salinidade na fracionamento de metais pesados em solos de um estuário no Sul da China, Chu et al. (2014) verificaram que a adição de NaCl aumentou as frações trocáveis de Cd, Pb e Zn, sugerindo que o aumento da salinidade no solo pelas marés, durante a estação seca, poderia aumentar a mobilidade desses metais. Já o cromo parece sofrer pouca influência da salinidade (CHU et al., 2014), exceto, em pH superior a 5, onde há um aumento na absorção desse metal (HATJE et al., 2003).

Ao estudar o efeito da salinidade na absorção de metais, deve-se considerar o estresse osmótico induzido no nível da raiz (LUTTS & LEFÉVRE, 2015). O aumento da salinidade no sedimento, pode induzir danos às membranas das células radiculares e comprometer a seletividade da raiz em relação a entrada de metais (HELAL et al., 1999; STEVENS et al., 2003)

#### *4.3 Os metais arsênio, chumbo, cromo e mercúrio e sua influência na anatomia, fisiologia e bioquímica de plantas*

Os metais pesados são um dos principais poluentes do nosso ambiente natural devido à sua toxicidade, persistência e problemas de bioacumulação (BAYEN, 2012; SOUZA et al., 2014). Muitos trabalhos avaliaram o acúmulo de metais contaminantes em plantas de manguezal como foco nos efeitos tóxicos desses elementos, nos aspectos anatômicos, fisiológicos e do desenvolvimento das plantas (ZHANG et al., 2007; MACFARLANE & BURCHETT, 2000; GARCIA et al., 2018).

Uma das principais respostas das plantas ao estresse por metais pesados é a geração de ERO's (DAS et al., 2015). Os metais pesados induzem o estresse oxidativo em células e tecidos vegetais de quatro formas: por transferência direta de elétrons em reações de elétrons únicos que geram radicais livres; pela interferência nas vias metabólicas, especialmente na membrana tilacoidal, resultando no aumento de radicais livres; pela inativação das enzimas antioxidantes POD, CAT, SOD, responsáveis pela remoção dos radicais livres e; via esgotamento de antioxidantes de baixo peso molecular, como a glutathione (SRIVASTAVA et al., 2005; DONG et al., 2007).

O cromo, chumbo arsênio e mercúrio, em particular, tem seus efeitos bem relatados na literatura. Segundo Das et al. (2015), o mercúrio promove a ruptura da biomembrana lipídica e interfere no metabolismo celular; o cromo altera a produção de pigmentos e aumenta a produção de metabólitos, como glutathione e ácido ascórbico; o chumbo inibe a germinação de sementes, induz o estresse oxidativo, promove efeitos adversos na morfologia, no crescimento e nos processos fotossintéticos.

A exposição prolongada ao As gera perda de pigmentos cloroplastídicos e estresse oxidativo nas plantas (SETH et al., 2007; DUMAN et al., 2010). Duman et al. (2010) verificaram aumento no nível de clorofila total e carotenóides, bem como da atividade das enzimas SOD, CAT e APX durante estágios iniciais de experimento. Contudo, após seis dias, esses autores observaram diminuição nos pigmentos fotossintéticos e da atividade das enzimas. Srivastava et al. (2007) também observaram declínio significativo na atividade da SOD e APX em *H. verticillata* exposta a As (III).

Naidoo et al. (2014) observaram em *Avicenia marina* uma diminuição na condutância estomática, na assimilação de CO<sub>2</sub> e na transpiração à medida que as concentrações de Pb, Hg, Cd e Zn, na solução nutritiva, aumentaram.

Comportamento similar também foi observado em *K. obovata* com o aumento de Cu, Pb e Zn no sedimento, em casa de vegetação (CHENG et al., 2017). Além disso, Cd, Pb e Hg ocasionaram um decréscimo no teor de clorofilas *a*, *b* e *totais* em *K. candel* e *B. gymnorrhiza* (HUANG & WANG, 2010).

Contudo, para ocasionarem os efeitos deletérios mencionados acima, os metais precisam ser translocados para as partes aéreas das plantas (LUTTS & LEFÉVRE, 2015). Todavia, muitos autores relatam que os metais pesados podem ser acumulados em maiores proporções em tecidos radiculares, com uma pequena porção sendo translocada para a parte aérea (MACFARLANE et al., 2003; PENG et al., 1997).

A principal barreira ao transporte de metais no corpo da planta encontra-se na epiderme das células da raiz, porém a endoderme também exerce grande contribuição em evitar a entrada de alguns metais, dentre eles o chumbo (MACFARLANE & BURCHETT, 2000; LU et al., 2014). A periderme radicular mostrou-se mais espessa em locais com um nível mais elevado de contaminação por metais (SOUZA et al., 2014, 2015). A epiderme mais espessa ocasionou menor acúmulo de As nas raízes de *L. racemosa* (SOUZA et al., 2014).

#### 4.4. Descrição das espécies em estudo

Popularmente conhecida como mangue vermelho, *Rhizophora mangle* L., pertence à família Rhizophoraceae. Com distribuição pantropical, a família Rhizophoraceae inclui 16 gêneros e cerca de 150 espécies. No Brasil ocorrem 4 gêneros e cerca de 15 espécies (SOUZA & LORENZI, 2008). A condição vivípara é uma particularidade da tribo Rhizophoreae, a qual possui 4 gêneros exclusivos de mangue: *Bruguiera*, *Ceriops*, *Kandelia* e *Rhizophora* (TOMLINSON, 1986).

Descrição da espécie: Sementes vivíparas, germinadas pela extensão do hipocótilo; propágulos com 15- 20 cm, sem lenticelas conspícuas. Folhas simples, inteiras, elípticas, com margens um pouco recurvadas. Textura foliar coriácea, glabra, mas com numerosos pontos suberizados na superfície abaxial, visíveis em folhas mais velhas como pontos escuros. Nervuras evidentes, mas não proeminentes. Pecíolo curto e cilíndrico. *R. mangle* se distingue das demais espécies do gênero por habitualmente possuir folhas

menores (TOMLINSON, 1986). Apresenta flores tetrâmeras; ovário bilocular com 2 óvulos anátropos. Presença de rizóforos com geotropismo negativo, responsável por fornecer estabilidade no sedimento inconsistente, os quais, quando em contato com o solo, formam as raízes (MENEZES, 2006).

*Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn, conhecida popularmente como mangue branco, pertence à família Combretaceae. A família é caracterizada por flores com ovário inferior unilocular com 2 óvulos usualmente pedunculares, um disco floral bem desenvolvido e pseudocarpo sem endosperma. Com distribuição predominantemente pantropical, a família Combretaceae abrange cerca de 20 gêneros e entre 400 e 500 espécies. Destas, aproximadamente 60 espécies, distribuídas em 6 gêneros, podem ser encontradas no Brasil (SOUZA & LORENZI, 2008). *Laguncularia* é um gênero monotípico de mangue com distribuição restrita na América e Oeste da África (TOMLINSON, 1986).

Descrição da espécie: Raízes subterrâneas extensas, como cabo, suportando pneumatóforos e raízes de absorção. Casca áspera, fissurada, cinza. Ramos com numerosas lenticelas proeminentes. Lâmina foliar um pouco carnosa, elíptica a oblonga, margem inteira, arredondada a ligeiramente emarginada apicalmente. Base truncada e glabra. Folhas com pecíolo curto, apoiando duas glândulas circulares na superfície adaxial da lâmina. Árvores dióicas ou hermafroditas. Cada flor com 5 pétalas arredondadas e pilosas e 10 estames em duas séries de 5, inseridas em níveis diferentes. Flores masculinas com estames funcionais e ovário ausente. Flores femininas com estames não-funcionais e ovários bem desenvolvidos com 2 óvulos funcionais. Flores perfeitas, com dimensões de flores femininas e estames e óvulos funcionais (TOMLINSON, 1986). Francisco et al. (2009) reconheceram 5 tipos de estruturas glandulares: um par de nectários extraflorais na porção adaxial do pecíolo; glândulas “tipo vulcão”, secretoras de sal, distribuídas por toda a superfície da lâmina foliar abaxial e adaxial; micro-pêlos na face abaxial, distribuídos desde a metade distal até o ápice da lâmina foliar, e sobre a nervura mediana; hidatódios na periferia da folha e sobre as nervuras secundárias no lado abaxial da lâmina foliar; e glândulas do bordo, imbricadas ao redor de toda a margem foliar.



## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Material vegetal e condição experimental

Propágulos de *L. racemosa* e *R. mangle* foram coletados na Estação Ecológica Municipal Ilha do Lameirão, Vitória, Espírito Santo, em parcelas situadas próximas à borda do manguezal. Os propágulos foram transportados para casa de vegetação, na Universidade Federal do Espírito Santo, onde foram cultivados em vasos de PVC (2,8 L) contendo areia lavada. Os vasos de areia foram colocados em bandejas contendo solução de Hoagland e Arnon (1950), com 1/4 de força iônica e 7 g L<sup>-1</sup> de sal. As bandejas com solução nutritiva foram cobertas com um filme PVC preto para prevenir foto-oxidação.

Os propágulos foram cultivados durante 16 meses e, após o cultivo, as plantas foram expostas a três concentrações distintas de NaCl (3, 7 e 11 g L<sup>-1</sup>) para avaliar os efeitos da salinidade no acúmulo de cromo (Cr), chumbo (Pb), arsênio (As) e mercúrio (Hg) em *L. racemosa* e *R. mangle*. A concentração de 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl foi escolhida por estar próxima à concentração de sal típica dos manguezais (correspondente a 20% da água do mar, MACFARLANE e BURCHETT, 1999). Ao passo que as concentrações de 3 e 11 g L<sup>-1</sup> foram escolhidas para representar um ambiente com menor e maior salinidade, respectivamente. O pH dos três tratamentos foi mantido em 6,5 com auxílio do tampão biológico MES.

A exposição aos metais ocorreu pela adição de 28 µg L<sup>-1</sup> de Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 µg L<sup>-1</sup> de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 10 µg L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub> e 10 µg L<sup>-1</sup> de PbCl<sub>2</sub> na solução de Hoagland e Arnon (1950). Essas concentrações foram definidas com base na literatura (BAYEN, 2012, SOUZA et al, 2014), com o objetivo de escolher concentrações de ocorrência em campo e que fossem suficientes para a absorção e translocação pela planta. A solução nutritiva foi trocada semanalmente.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com 5 repetições (n=5) de cada espécie, por tratamento. Após, 12 semanas de tratamento, foi realizada coleta para posterior análise. As folhas utilizadas para extração enzimática foram banhadas em nitrogênio líquido e levadas imediatamente para ultrafreezer à -80 °C.

## 5.2 Trocas Gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas aos 45, 65 e 90 dias de experimento em folhas totalmente expandidas do segundo nó, entre 8 e 11 horas da manhã, utilizando-se um analisador de gás infravermelho portátil (LI-6400XT, LI-COR, Lincoln, NE, USA) acoplado com fonte de luz vermelho/azul (LI-6400-02B LED). Utilizou-se, para ambas as espécies, irradiância constante de  $750 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (valor definido, previamente, por meio de curva de luz),  $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1} \text{ ar}$  e temperatura de  $27^\circ\text{C}$ . Foram obtidos os dados de assimilação líquida de  $\text{CO}_2$  ( $A$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), concentração intercelular de  $\text{CO}_2$  ( $C_i$ ) e transpiração ( $E$ ). A partir destas variáveis, foram calculadas a eficiência instantânea de carboxilação ( $A/C_i$ ) e as eficiências do uso da água, intrínseca  $A/g_s$  e instantânea  $A/E$ .

## 5.3 Extração e atividade enzimática

A avaliação do metabolismo antioxidante foi realizada por meio da quantificação indireta de proteínas totais e das enzimas catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e superóxido dismutase (SOD). Essa análise foi realizada nas mesmas folhas utilizadas para aferição das trocas gasosas.

Aproximadamente 0,4 g de massa fresca foliar foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado com 3 mL de solução tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 6,8), EDTA (0,1 mM), ácido ascórbico (10 mM) e polivinilpolipirrolidona (1% p/v). As extrações foram realizadas em almofariz e pistilo, sendo o extrato resultante centrifugado a 12.000 Xg durante 15 minutos, a  $4^\circ\text{C}$ . O sobrenadante foi recolhido e armazenado a  $-80^\circ\text{C}$ , compondo o extrato bruto para a quantificação de proteínas e enzimas.

A determinação do teor de proteínas totais seguiu o método descrito por Bradford (1976). Para tanto, foi utilizado o corante Azul de Coomassie G250 para coloração e a albumina sérica bovina como padrão. Alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  do extrato bruto, das duas espécies estudadas, foram adicionadas em 5 mL do corante. Após 2 minutos de reação foram realizadas as leituras em A595.

A atividade da CAT foi determinada pela adição de 100  $\mu\text{L}$  do extrato bruto, ao meio de reação constituído por 200  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 mM) e 1700  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (50 mM, pH 7,0). O consumo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em A240 foi monitorado durante 3 minutos, a  $25^\circ\text{C}$ . A atividade enzimática foi expressa

em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína (AEBI, 1984) e foi utilizado coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$  para seu cálculo.

A atividade da APX baseou-se no método de Nakano e Asada (1981). Uma alíquota de  $100 \mu\text{L}$  do extrato bruto foi adicionada a  $1900 \mu\text{L}$  de meio de reação contendo tampão fosfato de sódio ( $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,0$ ), EDTA ( $0,1 \text{ mM}$ ) e ácido ascórbico ( $0,5 \text{ mM}$ ). A reação teve início após adição de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0,1 \text{ mM}$ ) e o decréscimo da absorvância em  $\text{A}290$  foi monitorado por 3 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . O coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizado no cálculo da atividade enzimática foi de  $2,8 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ , e a mesma foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de ascorbato  $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  de proteína.

Determinou-se a atividade da SOD com base no método descrito por Giannopolitis e Ries (1977). Um volume de  $50 \mu\text{L}$  do extrato bruto foi adicionado em  $2950 \mu\text{L}$  de meio reação, composto de tampão fosfato de sódio ( $50 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,5$ ), metionina ( $13 \text{ mM}$ ), riboflavina ( $2 \mu\text{M}$ ), EDTA ( $0,1 \text{ mM}$ ) e NBT ( $75 \mu\text{M}$ ). A reação foi avaliada em  $\text{A}560$  após 40 minutos de incubação a  $25^\circ\text{C}$ . Uma unidade de atividade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da taxa de redução fotoquímica do NBT, sendo expressa em unidade de SOD  $\text{mg}^{-1}$  de proteína.

#### 5.4 *Anatomia foliar*

Para ambas as espécies estudadas, amostras do terço mediano de folhas totalmente expandidas, localizadas no terceiro nó a partir do ápice, foram fixadas em FAA 50% por 48 horas (JOHANSEN, 1940) e, posteriormente, armazenadas em etanol 70%. O material foi desidratado em série etílica crescente e incluído em historresina (Leica®). Foram realizadas secções transversais com auxílio de micrótomo rotativo, com espessura de  $8 \mu\text{m}$ . Posteriormente, os cortes foram corados com solução de Azul de Toluidina 0,05% (O'BRIEN et al., 1964) e montados em entellan. A análise anatômica quantitativa, na região internervural, foi realizada por meio de medições da espessura do limbo, da cutícula, das células epidérmicas de ambas as faces da folha e dos parênquimas aquífero, paliçádico e esponjoso. Na região da nervura central, foi medida a área do cilindro vascular. Para tanto, foram realizadas três medições de cinco indivíduos, totalizando quinze medições por tratamento, para cada espécie. Foi determinada, também, a densidade

estomática e glandular ( $n/mm^2$ ) por meio da técnica de impressão epidérmica, utilizando-se uma gota de adesivo instantâneo universal (SuperBonder®) em uma lâmina de vidro, de forma a obter a impressão da epiderme a ser analisada. Foram analisados três campos ópticos aleatórios da região internervural de cinco indivíduos, totalizando quinze campos ópticos em cada face foliar, por tratamento, para cada espécie. As mensurações foram feitas com auxílio de sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio Nikon E200 por meio do software –Tsview, e os resultados foram documentados por meio de fotomicrografias obtidas em fotomicroscópio Nikon E200.

### 5.5 *Determinação do teor de Cr, Pb, As e Hg*

Toda vidraria e recipientes plásticos utilizados para preparação e análise das amostras foram previamente lavados com detergente neutro Extran MA 02 (5% v/v), ácido nítrico concentrado (15%, v/v) e água purificada em sistema PURELAB Ultra (ELGA, UK) com resistividade de 18,2 M $\Omega$ , a fim de promover a descontaminação dos mesmos.

As concentrações de Cr, Pb, As e Hg foram determinadas em triplicata, por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), modelo Nexlon (Perkin Elmer, Alemanha). A garantia de qualidade (QG) e o controle de qualidade (QC) foram realizados utilizando-se um material de referência certificado CRM-Agro C1003a - Folhas de Tomate. As recuperações dos CRMs estavam acima de 80%, conforme recomendado pela USEPA. Também foram preparadas amostras de raízes, caules e folhas para verificar o efeito matriz. A faixa de recuperação desses ensaios foi de 86 a 102%.

#### 5.5.1 *Cr, Pb, As e Hg em folhas, caules e raízes*

Após coleta, as amostras de folha, caule e raiz de ambas as espécies estudadas foram lavadas com água deionizada, secas a 37 °C até peso constante, moídas e armazenadas em tubos Falcon® descontaminados e hermeticamente fechados.

O procedimento de digestão utilizado foi uma variação do método EPA 3051a (USEPA, 2007). Para tal, pesou-se uma massa aproximada de 0,100 g em peso seco das amostras e adicionou-se 5,0 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado e

1,0 mL de H<sub>2</sub>O ultra pura. Posteriormente, as amostras foram deixadas em pré decomposição por um tempo de 10 min e, após esse período, foram decompostas utilizando aquecimento por radiação micro-ondas. O programa de aquecimento utilizado consistiu em uma etapa de aquecimento onde a temperatura atingiu  $180 \pm 5^{\circ}\text{C}$ , em 5 min, e permaneceu nesta temperatura por um período de 20 min; o tempo de resfriamento foi de 20 min; após esse período aguardou-se por 90 min até que os tubos fossem abertos e as amostras filtradas e avolumadas para um volume final de 50,0 mL. As amostras foram armazenadas em geladeira até análise. Os brancos foram preparados utilizando o mesmo protocolo sem as amostras, somente os reagentes.

Os fatores de translocação (FT) dos quatro metais pesados analisados foram calculados entre os diferentes órgãos das plantas:

$$\text{FTcr} = [\text{metal}] \text{ caule} / [\text{metal}] \text{ raiz}$$

$$\text{FTfc} = [\text{metal}] \text{ folha} / [\text{metal}] \text{ caule}$$

$$\text{FTfr} = [\text{metal}] \text{ folha} / [\text{metal}] \text{ raiz}$$

$$\text{FTpar} = [\text{metal}] (\text{folha+caule}) / [\text{metal}] \text{ raiz}$$

## 5.6 *Análise estatística*

Todos os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, sendo adotado 5% de nível de significância.

Os seguintes métodos estatísticos multivariados foram aplicados a diferentes conjuntos de dados: análise fatorial (FA), análise discriminante linear (LDA) e o coeficiente de correlação de postos de Spearman. A análise fatorial (FA) foi realizada com todas as matrizes de dados, onde as variáveis foram escalonadas automaticamente. A extração dos principais fatores seguiu o critério de Kaiser, onde somente autovalores maiores que 1 são considerados. O ponto de corte para selecionar as variáveis incluídas nesses fatores foi de 0,75.

A LDA é um procedimento que maximiza as variações entre categorias e minimiza as variações dentro de categorias (ARRIVABENE et al., 2014). A LDA foi realizada usando os parâmetros que apresentaram autovalores

maiores que 1 durante FA. O teste de correlação de postos Spearman foi aplicado no presente trabalho para avaliar as correlações entre as matrizes de dados biológicos e químicos.

A análise multivariada foi realizada a fim de se obter uma visão integrada dos dados químicos e biológicos, na busca pelas variáveis mais relevantes para compreender a influência da salinidade no acúmulo de metais pesados (MONFERRÁN et al., 2011).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Trocas gasosas

Em *R. mangle*, as trocas gasosas foram significativamente alteradas aos 45 dias de experimento (Tabela 1). A maior assimilação líquida de CO<sub>2</sub> foi observada no tratamento com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Menores taxas de condutância estomática, concentração de CO<sub>2</sub> interno e transpiração foram observadas no tratamento com 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Esse tratamento também apresentou maiores taxas de eficiência do uso da água (*A/g<sub>s</sub>* e *A/E*). Aos 60 dias de experimento não foram verificadas alterações significativas das trocas gasosas. Já, a menor taxa de transpiração ocorreu aos 90 dias, no tratamento com 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Em *L. racemosa*, foram observadas alterações significativas nas trocas gasosas, aos 45 e 90 dias de experimento (Tabela 1). Aos 45 dias, as menores taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub>, de transpiração e de eficiência intrínseca no uso da água (*A/g<sub>s</sub>*) foram observadas no tratamento com 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Enquanto, que as maiores taxas de assimilação líquida de CO<sub>2</sub> e de transpiração foram notadas no tratamento com 3 g L<sup>-1</sup> e 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl e, os maiores valores de condutância estomática somente no tratamento com 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Aos 90 dias, foi verificada menor condutância estomática e transpiração e, maior concentração interna de CO<sub>2</sub>, no tratamento com 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Apenas a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> apresentou mudança significativa aos 65 dias, com a maior taxa sendo observada no tratamento com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl e a menor no tratamento com 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Tabela 1. Efeitos de diferentes concentrações de NaCl sobre a assimilação líquida de CO<sub>2</sub> (A), condutância estomática (gs), concentração de CO<sub>2</sub> interno (Ci), transpiração (E), eficiência instantânea de carboxilação (A/Ci) e a eficiência intrínseca do uso da água (A/gs e A/E) de *Rhizophora mangle* e *Laguncularia racemosa* os 45, 65 e 90 dias.

	[ ] NaCl	A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	gs ( $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	Ci ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol Ar}^{-1}$ )	E ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	A/Ci ( $\text{mol ar m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	A/gs ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$ )	A/E ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol H}_2\text{O}^{-1}$ )	
<i>Rhizophora mangle</i>	45 dias	11 g L <sup>-1</sup>	4,961 ± 0,741 b	0,038 ± 0,01 b	168,511 ± 25,219 b	0,888 ± 0,227 b	0,03 ± 0,004 a	135,019 ± 16,238 a	5,686 ± 0,562 a
		7 g L <sup>-1</sup>	5,938 ± 0,989 ab	0,057 ± 0,015 a	209,747 ± 32,405 a	1,195 ± 0,29 a	0,029 ± 0,005 a	109,03 ± 20,607 b	5,095 ± 0,776 b
		3 g L <sup>-1</sup>	6,688 ± 1,403 a	0,063 ± 0,014 a	213,521 ± 18,304 a	1,422 ± 0,275 a	0,032 ± 0,008 a	105,969 ± 11,418 b	4,706 ± 0,456 b
	65 dias	11 g L <sup>-1</sup>	3,965 ± 0,711 a	0,037 ± 0,007 a	248,577 ± 51,986 a	1,07 ± 0,41 a	0,016 ± 0,004 a	93,44 ± 18,17 a	3,311 ± 0,294 a
		7 g L <sup>-1</sup>	5,548 ± 0,844 a	0,061 ± 0,018 a	229,341 ± 21,019 a	1,39 ± 0,475 a	0,024 ± 0,003 a	99,01 ± 6,51 a	3,169 ± 0,397 a
		3 g L <sup>-1</sup>	5,87 ± 1,3 a	0,093 ± 0,026 a	255,438 ± 24,838 a	1,84 ± 0,53 a	0,027 ± 0,001 a	90,33 ± 12,71 a	2,905 ± 0,475 a
	90 dias	11 g L <sup>-1</sup>	5,234 ± 0,857 a	0,047 ± 0,008 a	204,716 ± 22,906 a	1,085 ± 0,171 b	0,026 ± 0,006 a	112,386 ± 14,493 a	4,843 ± 0,646 a
		7 g L <sup>-1</sup>	6,192 ± 1,725 a	0,065 ± 0,022 a	228,588 ± 16,843 a	1,391 ± 0,395 a	0,027 ± 0,007 a	97,13 ± 11,019 a	4,492 ± 0,389 a
		3 g L <sup>-1</sup>	6,314 ± 1,269 a	0,065 ± 0,015 a	226,867 ± 3,637 a	1,362 ± 0,266 a	0,028 ± 0,005 a	98,31 ± 2,768 a	4,635 ± 0,144 a
<i>Laguncularia racemosa</i>	45 dias	11 g L <sup>-1</sup>	3,508 ± 1,352 a	0,035 ± 0,01 a	227,71 ± 30,451 a	0,796 ± 0,23 a	0,016 ± 0,009 a	98,613 ± 18,745 a	4,339 ± 0,845 a
		7 g L <sup>-1</sup>	1,516 ± 0,919 b	0,018 ± 0,006 b	250,906 ± 69,816 a	0,407 ± 0,135 b	0,007 ± 0,006 a	86,644 ± 44,648 b	3,793 ± 1,925 a
		3 g L <sup>-1</sup>	2,533 ± 0,51 ab	0,023 ± 0,004 b	209,681 ± 38,078 a	0,549 ± 0,083 ab	0,013 ± 0,005 a	109,416 ± 23,94 a	4,656 ± 1,031 a
	65 dias	11 g L <sup>-1</sup>	1,477 ± 0,451 b	0,025 ± 0,003 a	290,658 ± 22,956 a	0,603 ± 0,088 a	0,005 ± 0,002 a	59,04 ± 14,549 a	2,439 ± 0,666 a
		7 g L <sup>-1</sup>	1,901 ± 0,45 ab	0,027 ± 0,004 a	272,374 ± 22,72 a	0,587 ± 0,076 a	0,007 ± 0,002 a	70,961 ± 14,133 a	3,253 ± 0,6 a
		3 g L <sup>-1</sup>	4,09 ± 2,1 a	0,022 ± 0,012 a	294,467 ± 38,485 a	0,447 ± 0,223 a	0,006 ± 0,006 a	59,981 ± 24,716 a	2,981 ± 1,355 a
	90 dias	11 g L <sup>-1</sup>	1,909 ± 0,516 a	0,021 ± 0,005 ab	243,202 ± 6,431 b	0,558 ± 0,119 a	0,008 ± 0,002 a	88,399 ± 3,938 a	3,397 ± 0,24 a
		7 g L <sup>-1</sup>	1,328 ± 0,724 a	0,02 ± 0,006 b	291,948 ± 38,039 a	0,515 ± 0,156 b	0,005 ± 0,003 a	62,092 ± 23,903 a	2,371 ± 0,88 a
		3 g L <sup>-1</sup>	2,108 ± 0,804 a	0,025 ± 0,004 a	253,906 ± 35,425 b	0,617 ± 0,096 a	0,009 ± 0,004 a	82,246 ± 22,075 a	3,371 ± 0,91 a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras comparam os tratamentos dentro do mesmo período de medida de uma espécie. Os valores são médias ± desvio padrão (n=5).

### 6.2. Atividade enzimática

Não foram observadas diferenças estatísticas para a atividade da CAT e da SOD, em *L. racemosa*. Contudo, nesta espécie, a atividade da APX foi diferente entre os três tratamentos (Figuras 1 e 2), com maiores valores nas plantas expostas à 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Já, *R. mangle* apresentou menor atividade da APX, CAT e SOD, sob tratamento com 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

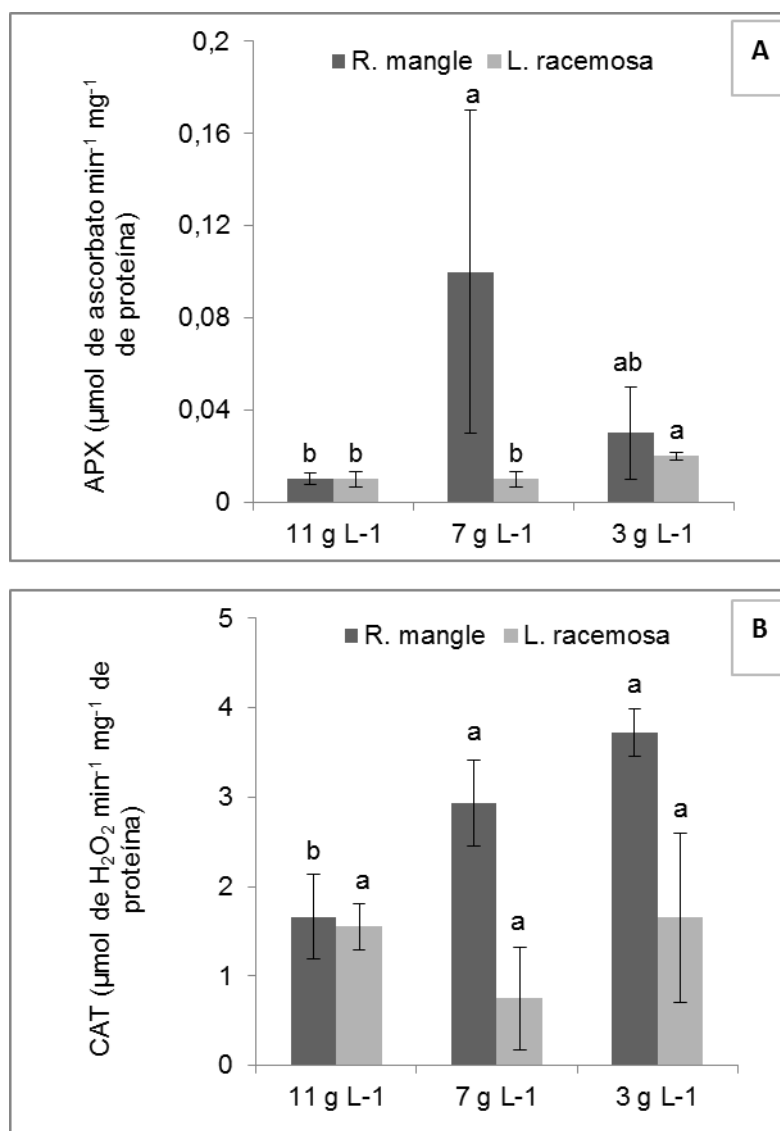


Figura 1. Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade das enzimas APX (A) e CAT (B) em folhas de *R. mangle* e *L. racemosa*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras comparam os tratamentos dentro da mesma espécie.



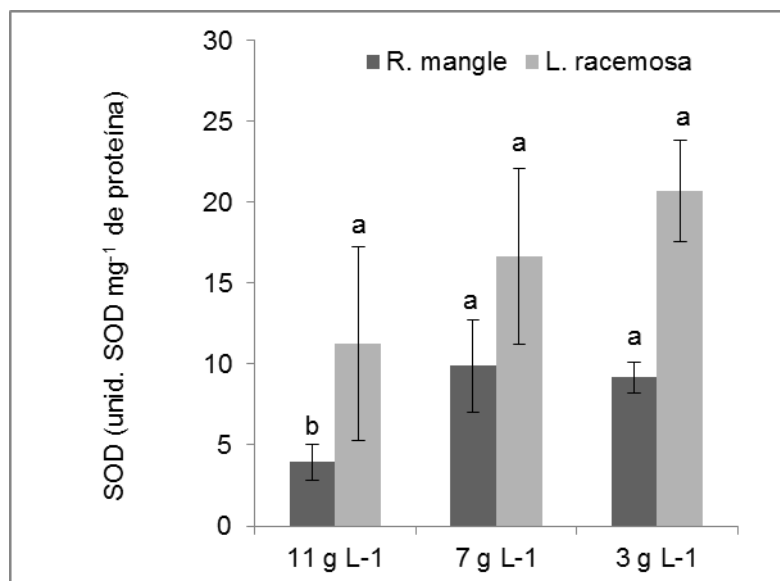


Figura 2. Efeito de diferentes concentrações de NaCl na atividade da enzima SOD em folhas de *R. mangle* e *L. racemosa*. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Letras comparam os tratamentos dentro da mesma espécie.

### 6.3. Anatomia foliar

A tabela 2 apresenta as variáveis anatômicas foliares analisadas em *R. mangle* e *L. racemosa*. Os indivíduos de *R. mangle* mostraram maior espessura da epiderme abaxial, no tratamento com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl e menor espessura deste tecido, no tratamento com 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl. *L. racemosa* apresentou valores maiores de área do cilindro vascular da nervura central no tratamento com 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl e, maiores valores de densidade estomática (ambas as faces), e densidade de glândulas de sal (face abaxial) no tratamento com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl (Figura 3).

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de NaCl sobre a anatomia foliar de *R. mangle* e *L. racemosa*. (espessura dos tecidos em  $\mu\text{m}$ ; razão parênquima paliçádico/ parênquima esponjoso: Pp/Pe).

Variáveis	<i>R. mangle</i>			<i>L. racemosa</i>		
	11 g L <sup>-1</sup>	7 g L <sup>-1</sup>	3 g L <sup>-1</sup>	11 g L <sup>-1</sup>	7 g L <sup>-1</sup>	3 g L <sup>-1</sup>
Limbo ( $\mu\text{m}$ )	495,3 $\pm$ 66,3 a	466,6 $\pm$ 58,6 a	555,2 $\pm$ 61,2 a	496,6 $\pm$ 69,0 a	426,9 $\pm$ 34,6 a	450,8 $\pm$ 18,5 a
Parênquima paliçádico ( $\mu\text{m}$ )	104,2 $\pm$ 10,5 a	99,5 $\pm$ 10,3 a	111,4 $\pm$ 13,3 a	87,2 $\pm$ 7,7 a	86,5 $\pm$ 7,5 a	80,1 $\pm$ 2,3 a
Parênquima aquifero ( $\mu\text{m}$ )	161,9 $\pm$ 35,2 a	150,3 $\pm$ 26,8 a	197,8 $\pm$ 59,7 a	303,3 $\pm$ 47,4 a	244,8 $\pm$ 18,5 a	274,7 $\pm$ 12,7 a
Parênquima esponjoso ( $\mu\text{m}$ )	188,3 $\pm$ 18,1 a	184,6 $\pm$ 25,4 a	216,5 $\pm$ 19,5 a	68,1 $\pm$ 6,9 a	64,4 $\pm$ 11,8 a	66,0 $\pm$ 6,8 a
Epiderme adaxial ( $\mu\text{m}$ )	20,0 $\pm$ 2,4 a	18,7 $\pm$ 0,4 a	22,3 $\pm$ 4,7 a	17,6 $\pm$ 1,1 a	19,7 $\pm$ 3,5 a	16,2 $\pm$ 0,5 a
Epiderme abaxial ( $\mu\text{m}$ )	23,3 $\pm$ 1,1 b	24,1 $\pm$ 1,2 ab	26,4 $\pm$ 1,8 a	20,4 $\pm$ 2,5 a	21,4 $\pm$ 2,5 a	19,8 $\pm$ 3,5 a
Cutícula adaxial ( $\mu\text{m}$ )	17,1 $\pm$ 2,1 a	17,9 $\pm$ 1,4 a	17,8 $\pm$ 1,5 a	na	na	na
Parênquima clorofiliano ( $\mu\text{m}$ )	292,5 $\pm$ 26,9 a	284,2 $\pm$ 27,4 a	327,9 $\pm$ 15,7 a	155,3 $\pm$ 11,2 a	151,0 $\pm$ 15,8 a	146,1 $\pm$ 8,4 a
Pp/Pe	0,56 $\pm$ 0,1 a	0,55 $\pm$ 0,1 a	0,52 $\pm$ 0,1 a	1,2 $\pm$ 0,1 a	1,37 $\pm$ 0,2 a	1,2 $\pm$ 0,1 a
Área cilindro vacular ( $\text{mm}^2$ )	0,29 $\pm$ 0,02 a	0,33 $\pm$ 0,1 a	0,43 $\pm$ 0,1 a	0,24 $\pm$ 0,0 b	0,31 $\pm$ 0,0 a	0,22 $\pm$ 0,0 b
Densidade estomática abaxial ( $\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$ )	51,8 $\pm$ 8,1 a	52,7 $\pm$ 2,1 a	50,6 $\pm$ 10,9 a	78,4 $\pm$ 14,8 ab	59,0 $\pm$ 6,4 b	84,3 $\pm$ 13,5 a
Densidade estomática adaxial ( $\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$ )	na	na	na	115,5 $\pm$ 14,9 b	94,5 $\pm$ 2,6 b	143,9 $\pm$ 18,3 a
Densidade de glândulas abaxial ( $\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$ )	na	na	na	2,4 $\pm$ 0,8 ab	1,7 $\pm$ 0,1 b	3,4 $\pm$ 0,6 a
Densidade de glândulas adaxial ( $\text{n}^\circ \text{mm}^{-2}$ )	na	na	na	3,4 $\pm$ 0,3 a	3,1 $\pm$ 0,5 a	3,4 $\pm$ 0,1 a

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores reportados são médias  $\pm$  desvio padrão. Letras comparam os tratamentos dentro da mesma espécie. (na: não avaliado)

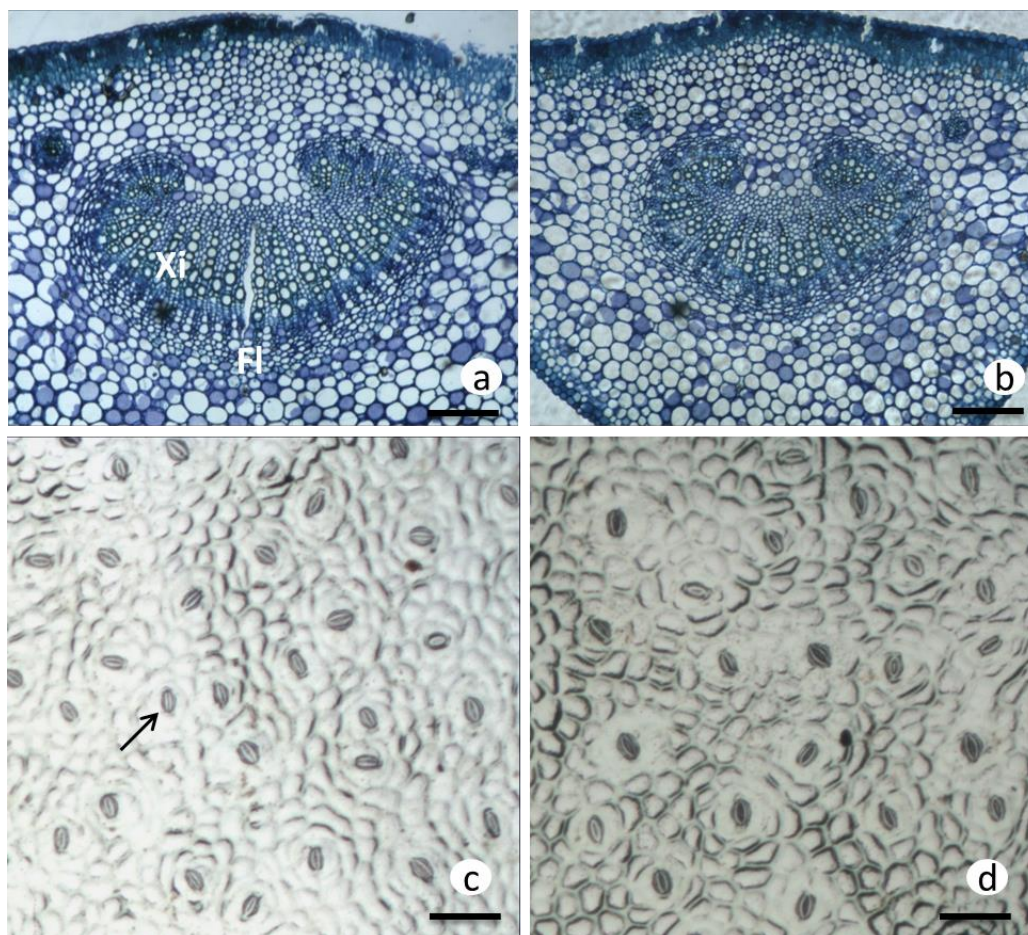


Figura 3. Secções transversais e impressões epidérmicas do limbo de *L. racemosa*. A-B. Secções transversais da região da nervura central. A. Tratamento com 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl . B. Tratamento com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl. C-D. Impressões epidérmicas. C. Tratamento com 3 g L<sup>-1</sup> de NaCl. D. Tratamento com 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl. (Fl:floema; Xi: xilema; seta indica estômatos) Barras = 50 μm.

#### 6.4. Concentração de Cr, Pb, As e Hg em folhas, caules e raízes

A tabela 3 apresenta as concentrações de Cr, Pb, As e Hg nas folhas, caules e raízes de ambas as espécies estudadas, sob diferentes condições de salinidade. Os indivíduos de *R. mangle* não apresentaram diferença estatística no acúmulo de Cr nas raízes e folhas. Entretanto, no caule, a maior concentração desse elemento foi observada nas plantas submetidas ao tratamento com 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Maior acúmulo de Pb nas folhas foi verificado nos tratamentos com 7 g L<sup>-1</sup> e 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl. Quanto ao As, os maiores valores em raízes e caules foram observados no tratamento com 7 g L<sup>-1</sup> de NaCl.

Em *L. racemosa*, o maior teor de Cr foi verificado nos tratamentos com 3 g L<sup>-1</sup> e 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl, para caule e raiz, respectivamente. Não houve

diferença estatística no acúmulo de Pb e As em folhas, caules e raízes, para essa espécie. A concentração de Hg foi maior nas folhas dos indivíduos submetidos ao tratamento com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl.

#### 6.5. Fatores de translocação

Na tabela 3 é possível notar que para *R. mangle* o FT do Cr entre caule e folha foi maior à medida que a concentração salina aumentou, enquanto que os FT de Cr entre as partes aéreas de *L. racemosa* e suas raízes (FTcr, FTfr e FTpar) foram maiores no tratamento com  $7 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl e menores nos tratamentos com 3 e  $11 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl.

O FT de Pb não apresentou diferenças significativas em *L. racemosa*. Já, em *R. mangle*, observou-se menores valores de FT entre as partes aéreas e suas raízes (FTcr, FTfr e FTpar) no tratamento com  $7 \text{ g L}^{-1}$  NaCl.

Para o As, os FT entre as partes aéreas e raízes (FTcr, FTfr e FTpar) de *R.mangle*, foram maiores no tratamento com concentração salina de  $3 \text{ g L}^{-1}$ . Por outro lado, o FT entre folha e caule foi maior no tratamento com  $11 \text{ g L}^{-1}$  de NaCl.

*L. racemosa* apresentou FT maior para As e Hg entre as partes aéreas e raízes (FTcr, FTfr e FTpar) no tratamento com concentração salina de  $7 \text{ g L}^{-1}$ . Menores valores de FT para Hg entre as partes aéreas e raízes (FTcr, FTfr e FTpar) de *R.mangle*, foram observados com a diminuição da concentração salina.

Tabela 3. Concentração de Cr, Pb, As e Hg nas raízes, caules e folhas de *R. mangle* e *L. racemosa* em diferentes concentrações de NaCl. FTcr: fator de translocação entre caule e raiz; FTfc: fator de translocação entre folha e caule; FTfr: fator de translocação entre folha e raiz; FTpar: fator de translocação entre parte aérea e raiz.

		<i>R. mangle</i>			<i>L. racemosa</i>		
		11 g L <sup>-1</sup>	7 g L <sup>-1</sup>	3 g L <sup>-1</sup>	11 g L <sup>-1</sup>	7 g L <sup>-1</sup>	3 g L <sup>-1</sup>
Cr	Raiz	1753,38 ± 333,03 a	1897,87 ± 463,11 a	2158,66 ± 119,03 a	13623,83 ± 702,04 a	<LQ	6596,85 ± 531,7 b
	Caule	444,42 ± 30,63 b	581,7 ± 100,83 a	565,34 ± 31,14 ab	429,27 ± 40,8 b	511,85 ± 37,5 ab	548,09 ± 71,16 a
	Folha	1948,66 ± 174,23 a	1847,41 ± 333,82 a	1667,58 ± 311,99 a	2869,1 ± 368,54 a	3724,49 ± 1253,95 a	2936,7 ± 2936,7 a
	FTcr	0,26 ± 0,07 a	0,32 ± 0,11 a	0,26 ± 0,03 a	0,04 ± 0,01 b	4,25 ± 0,31 a	1,09 ± 1,78 b
	FTfc	4,42 ± 0,7 a	3,22 ± 0,67 ab	2,97 ± 0,66 b	6,78 ± 1,51 a	7,28 ± 2,37 a	5,46 ± 1,13 a
	FTfr	1,14 ± 0,2 a	1,01 ± 0,27 a	0,77 ± 0,16 a	0,24 ± 0,1 b	30,96 ± 10,42 a	7,26 ± 12,27 b
	FTpar	1,4 ± 1,4 a	1,33 ± 0,36 a	1,04 ± 0,15 a	0,28 ± 0,11 b	35,21 ± 10,48 a	8,35 ± 14,05 b
Pb	Raiz	<LQ	503,61 ± 109,54 a	<LQ	124,31 ± 229,62 a	<LQ	21,4 ± 23,79 a
	Caule	233,22 ± 102,25 a	178,43 ± 210,89 a	394,04 ± 61,88 a	113,03 ± 207,06 a	196,7 ± 143,73 a	136,59 ± 107,28 a
	Folha	443,37 ± 120,9 a	620,66 ± 237,47 a	110,19 ± 68 b	51,76 ± 17,38 a	97,35 ± 122,06 a	125,05 ± 27,25 a
	FTcr	24,55 ± 10,76 b	0,43 ± 0,51 c	41,48 ± 6,51 a	11,65 ± 21,96 a	20,71 ± 15,13 a	11,89 ± 12,98 a
	FTfc	2,13 ± 0,77 a	43,09 ± 48,71 a	0,29 ± 0,18 a	4,44 ± 3,31 a	7,2 ± 14,03 a	2,87 ± 4,01 a
	FTfr	46,67 ± 12,73 a	1,21 ± 0,32 b	11,6 ± 7,16 b	3,49 ± 2,31 a	10,25 ± 12,85 a	10,18 ± 5,88 a
	FTpar	71,22 ± 19,09 a	1,64 ± 0,5 b	53,08 ± 7,18 a	15,14 ± 22,55 a	30,95 ± 6,58 a	22,07 ± 18,08 a
As	Raiz	205,75 ± 12,88 ab	243,51 ± 28,99 a	191,1 ± 20,27 b	490,69 ± 64,42 a	<LQ	313,32 ± 198,38 a
	Caule	91,12 ± 7,21 b	114,69 ± 3,1 a	114,05 ± 10,7 a	83,28 ± 4,32 a	78,72 ± 8,31 a	83,79 ± 15,09 a
	Folha	246,4 ± 24,61 a	247,23 ± 30,02 a	270,07 ± 15,3 a	308,19 ± 4,85 a	297,46 ± 33,8 a	310,16 ± 17,07 a
	FTcr	0,44 ± 0,05 b	0,48 ± 0,05 b	0,6 ± 0,08 a	0,17 ± 0,03 b	2,39 ± 0,25 a	0,7 ± 0,97 b
	FTfc	2,71 ± 0,29 a	2,16 ± 0,26 b	2,38 ± 0,23 ab	3,71 ± 0,24 a	3,8 ± 0,53 a	3,82 ± 0,89 a
	FTfr	1,2 ± 0,1 ab	1,04 ± 0,23 b	1,42 ± 0,09 a	0,64 ± 0,09 b	9,04 ± 1,03 a	3,07 ± 4,62 b

	FTpar	1,64 ± 0,13 ab	1,51 ± 0,28 b	2,02 ± 0,16 a	0,81 ± 0,11 b	11,43 ± 1,1 a	3,78 ± 5,59 b
Hg	Raiz	79,05 ± 14,75 a	98,69 ± 9,75 a	113,92 ± 30,86 a	211,92 ± 105,03 a	<LQ	107,37 ± 65,65 a
	Caule	67,19 ± 5,88 a	51,85 ± 7,54 a	46,65 ± 17,99 a	58,86 ± 2,68 a	56,38 ± 2,91 a	37,63 ± 20,6 a
	Folha	59,87 ± 1,86 a	64,47 ± 3,79 a	47,81 ± 14,38 a	33,58 ± 20,23 b	60,02 ± 4,25 a	53,81 ± 4,03 ab
	FTcr	0,87 ± 0,18 a	0,53 ± 0,09 ab	0,43 ± 0,23 b	0,34 ± 0,16 b	2,85 ± 0,15 a	0,51 ± 0,37 b
	FTfc	0,9 ± 0,1 a	1,26 ± 0,19 a	1,34 ± 1,12 a	0,56 ± 0,32 a	1,06 ± 0,06 a	1,89 ± 1,12 a
	FTfr	0,78 ± 0,14 a	0,66 ± 0,09 ab	0,44 ± 0,14 b	0,17 ± 0,07 b	3,03 ± 0,21 a	0,99 ± 1,15 b
	FTpar	1,65 ± 0,3 a	1,19 ± 0,15 ab	0,87 ± 0,24 b	0,51 ± 0,21 b	5,88 ± 0,33 a	1,5 ± 1,49 b

Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores reportados são médias ± desvio padrão. Letras comparam os tratamentos dentro da mesma espécie. (na: não avaliado)

## 6.6. Estatística multivariada

### 6.6.1. Análise multivariada fatorial (FA)

Primeiramente, foi realizada a análise fatorial (FA) utilizando-se todas as matrizes de dados (variáveis anatômicas, fisiológicas, bioquímicas e químicas). A FA extraiu seis fatores (F1 a F6) que representam 77,54% da variância acumulada. O primeiro fator (F1) foi responsável por 25,13% da variância e mostrou altas cargas para as seguintes variáveis de *R. mangle*: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> aos 45 e 65 dias, eficiência instantânea de carboxilação aos 45 dias, condutância estomática aos 65 dias, atividade da CAT, concentração de As e Hg caulinar, FT entre caule e raiz para As e Hg, FT entre folha e caule e, parte aérea e raiz, para Hg. As variáveis de *L. racemosa* que apresentaram altas cargas foram: assimilação líquida de CO<sub>2</sub> aos 65 dias, eficiência instantânea de carboxilação em 65 dias, atividade da APX e SOD, concentração caulinar de Cr.

O segundo fator (F2), com 20,37% de informação retida, apresentou altas cargas para atividade da APX, concentração de Pb na raiz, FT de Pb entre caule e raiz e entre parte aérea e raiz, todos de *R. mangle*. Em *L. racemosa*, F2 apresentou altas cargas para as variáveis área do cilindro vascular, densidade estomática da face abaxial, condutância estomática aos 45 dias, concentração de Cr, As e Hg na raiz, FT de Cr, As e Hg entre as partes aéreas e raízes (FTcr, FTfr e FTpar). O terceiro componente principal (F3), com 9,11% de informações retidas, apresentou altas cargas para espessura do limbo, do parênquima aquífero e clorofiliano de *R. mangle*, e para espessura do parênquima esponjoso, razão Pp/Pe, eficiência no uso da água (A/E) aos 45 dias e concentração foliar de Cr, de *L. racemosa*.

O quarto fator (F4), apresenta 8,05% de informação retida, com altas cargas para espessura da cutícula da face adaxial de *R. mangle* e, em *L. racemosa*, para concentração de Pb caulinar, e no FT de Pb entre caule e raiz, e parte aérea e raiz. O quinto e sexto componentes principais (F5 e F6), apresentam, respectivamente, 7,47% e 7,38% de informação retida. Para F5 foram obtidas altas cargas para espessura da epiderme da face adaxial de *R. mangle* e para concentração de Hg foliar. F6 apresentou altas cargas para atividade da CAT, concentração de As e Hg caulinar, FT do As e Hg entre folha e caule, todos de *L. racemosa*. Os parâmetros extraídos de F1 a F6 são

responsáveis por 77% da variabilidade observada, e devem apontar diferenças entre os tratamentos.

### 6.6.2. Análise discriminante linear (LDA)

A LDA foi realizada a partir das 54 variáveis selecionadas pela FA e apontou 26 parâmetros com mais de 50% de classificação (dados não apresentados), como representantes das diferenças entre os tratamentos. Dessa forma, a matrix complexa de dados fisiológicos, anatômicos, bioquímicos e químicos poderia ser reduzida a 26 parâmetros e, apenas estes explicariam o comportamento das espécies estudadas em diferentes concentrações salinas. Das 26 variáveis selecionadas, apenas nove são variáveis de *R. mangle*.

### 6.6.3. Correlação de postos Spearman

O teste de Spearman apontou que *L. racemosa* sofre menor influência da salinidade em suas características do que *R. mangle*, visto que somente a atividade da APX e a concentração de Cr no caule, dessa espécie, correlacionaram-se com as condições salinas (Figura 4).

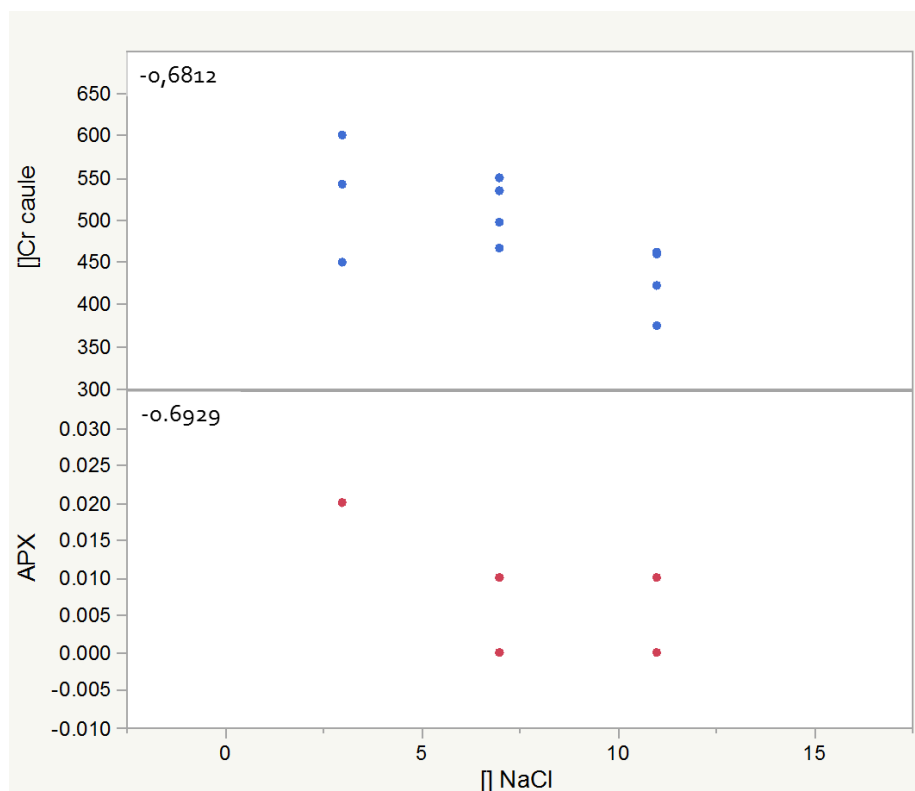


Figura 4. Correlação de Spearman entre as concentrações salinas com a atividade da APX e com a concentração de Cr no caule em *L. racemosa*.



Já, *R. mangle*, apresentou correlação negativa entre as concentrações de sal com a atividade da CAT, com a concentração de As no caule, com o FT do As entre caule e raiz e, ainda, uma correlação positiva com o FT do Hg entre parte aérea e raiz (Figura 5).

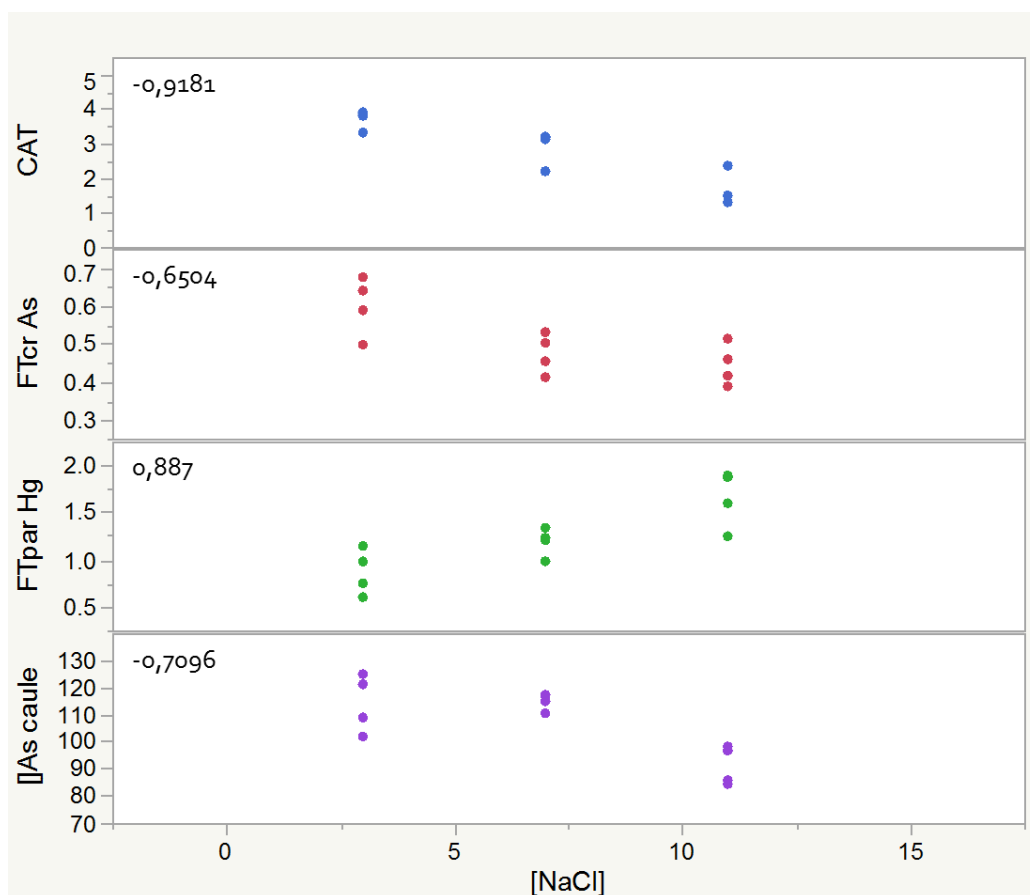


Figura 5. Correlação de Spearman entre as concentrações salinas em *R. mangle* com a atividade da CAT, com [As] no caule, com o FTpar do Hg e com o FTcr As.

Por outro lado, a concentração de Cr, Pb, As e Hg presente na folha, caule e raiz de ambas as espécies estudadas mostrou ter maior influência sobre as características biológicas (anatômicas, fisiológicas e bioquímicas) de *L. racemosa* do que em *R. mangle*.

A concentração de Cr, As e Hg presente na raiz, o FT do Cr entre folha e raiz, e do Hg entre caule e raiz de *L. racemosa*, apresentaram forte influência sobre a DE da face abaxial, condutância estomática e área do cilindro vascular dessa espécie. Além disso, a concentração de As e Hg na raiz de *L. racemosa* correlacionou-se positivamente com a concentração de Cr na raiz

(Figura 6 e 7). O Hg também influenciou de forma positiva a quantidade de As presente na raiz dessa espécie. O Pe e a razão Pp/Pe correlacionaram-se de forma negativa e positiva, respectivamente, com a concentração de Cr foliar em *L. racemosa*. Também foi observado nessa espécie que o aumento da concentração de Pb no caule leva a maior translocação desse metal entre a parte aérea e a raiz e, entre o caule e a raiz.

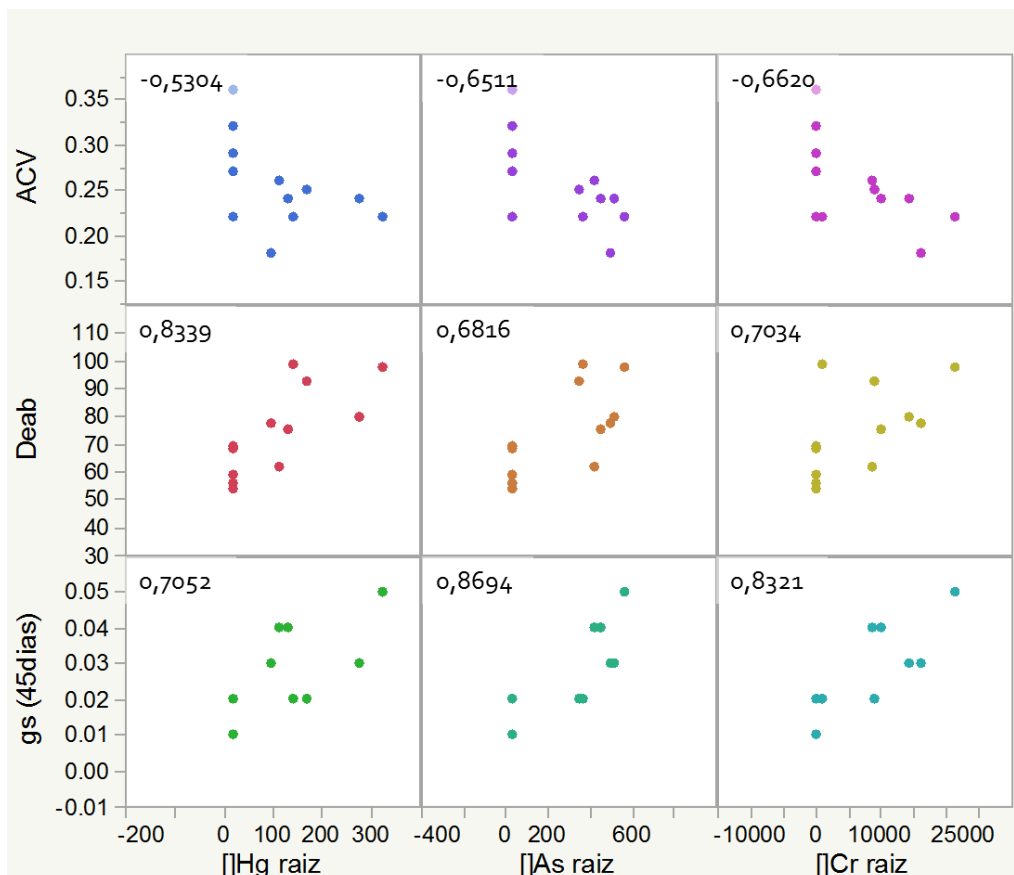


Figura 6. Correlação de Spearman entre as concentrações de Hg, As e Cr na raiz de *L. racemosa* com a gs, densidade estomática (Deab) e área do cilindro vascular (ACV).

Em *R. mangle* apenas três características biológicas correlacionaram-se com os metais pesados. Maiores valores de FT do As entre caule e raiz, e do Hg entre a parte aérea e raiz ocasionaram, respectivamente, maior e menor atividade da CAT. A atividade da APX, nessa espécie, correlacionou-se positivamente com a concentração de Pb radicular. Também, em *R. mangle*, foi observada correlação positiva entre os FT do Pb e As entre o caule e raiz e o parênquima clorofiliano.

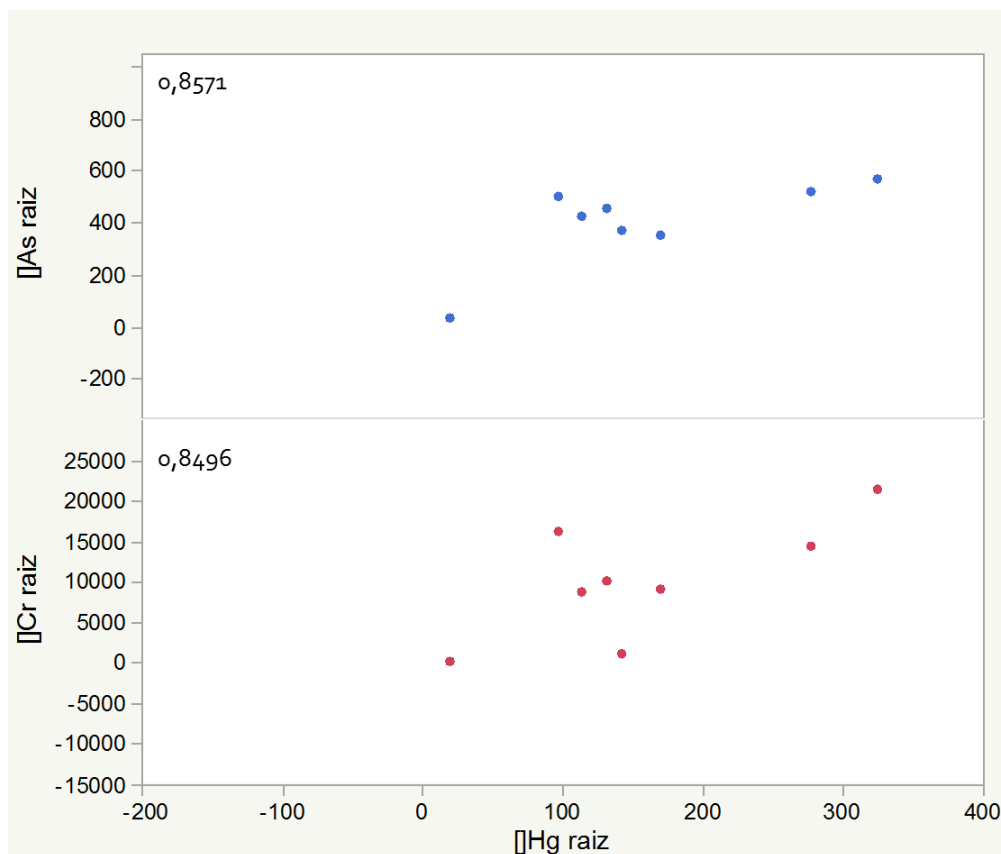


Figura 7. Correlação de Spearman entre as concentrações de Hg na raiz com a concentração de Cr e As na raiz de *L. racemosa*.

## 7. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos verificou-se que a salinidade influencia de maneira distinta a bioacumulação de Cr, Pb, As e Hg, bem como, as características anatômicas, fisiológicas e bioquímicas de *R. mangle* e *L. racemosa*. Os indivíduos de *R. mangle* sofreram maior influência da salinidade, sendo mais sensíveis a maiores níveis de NaCl. Enquanto, *L. racemosa* mostrou maior sensibilidade ao Cr, As e Hg.

Os resultados encontrados para *R.mangle*, referentes à bioacumulação e translocação do Hg e Pb, corroboram o observado na literatura. Em *Tamarix smyrnensis*, uma halófita, o aumento da salinidade promoveu maior translocação de Cd das raízes para as partes aéreas da planta (MANOUSAKI et al., 2011). O aumento de concentrações salinas promove maior biodisponibilidade de metais pesados no sedimento (HATJE et al., 2003; ACOSTA et al., 2011) e, conseqüentemente, maior absorção pelas plantas

(LUTTS & LEFÈVRE, 2015). A translocação dos metais nas plantas também é positivamente influenciada pela salinidade (MANOUSAKI et al., 2011).

*L. racemosa* apresentou resultados contrários ao observado na literatura no que se refere à absorção e translocação de metais pesados. A salinidade não apresentou grande influência sobre o acúmulo de cromo, chumbo, arsênio e mercúrio, nessa espécie. Contudo, esse comportamento pode ser reflexo do tipo de sal usado no experimento. Acosta et al. (2011) demonstraram que tipos diferentes de sais influenciam de forma distinta a mobilidade e liberação de metais no sedimento, devido à cloro complexação ou pela competição de cátions derivados do sal com espécies de metais pesados. Para o Pb, por exemplo, maior mobilidade desse elemento ocorre na presença de  $\text{CaCl}_2$ .

Em relação à densidade estomática, os valores encontrados em *L. racemosa* corroboram os resultados de Sobrado et al. (2007) os quais verificaram redução da densidade estomática em *L. racemosa*, em resposta ao aumento da concentração salina. Essa relação também foi observada em outras espécies de mangue (PARIDA et al., 2004; WERNER & STELZER, 1990).

O aumento na densidade de glândulas de sal é comum em indivíduos sujeitos à maior salinidade, em comparação com aqueles que ocorrem em ambientes menos salinos (BARHOUMI et al., 2007; MARCUM, 2006). As glândulas de sal representam estruturas adaptativas que conferem tolerância à salinidade em algumas espécies de mangue (SOBRADO et al., 2004; GARCIA et al., 2017). Contudo, no presente estudo, não foi observada relação da densidade de glândulas de sal presentes nas folhas de *L. racemosa* com os teores salinos. Por se tratar de uma espécie com folhas longevas (SUÁREZ, 2003), acreditamos que as folhas analisadas, provavelmente, estavam em expansão durante o período dos tratamentos nos quais os indivíduos foram submetidos, e portanto, o número de glândulas de sal já havia sido determinado. A formação de glândulas de sal, normalmente, cessa com o início da expansão foliar, podendo ser observado um decréscimo na densidade glandular, em algumas espécies (MACHADO & RODRIGUES, 2013).

Quanto ao efeito da salinidade nas trocas gasosas, os resultados obtidos para *R. mangle* corroboram dados relatados na literatura para espécies de

mangue (FERNANDES & PERIA, 1995; PARIDA & JHA, 2010; REEF & LOVELOCK, 2015; GARCIA et al., 2017). Em geral, o excesso de sal afeta o processo fotossintético, sobretudo, a assimilação de CO<sub>2</sub> (NAIDOO et al., 2011). A maior concentração de sal na solução nutritiva, reduz o potencial osmótico, o que diminui a disponibilidade de água para a planta (VERSLUES et al., 2006). Contudo, chama a atenção os resultados obtidos em *L. racemosa*, cuja taxa de assimilação de CO<sub>2</sub>, condutância estomática, transpiração e eficiência intrínseca do uso da água aumentaram em condições mais salinas. Tal fato pode ser explicado pelos mecanismos de exclusão de sal presentes nessa espécie. Uma vez que *L. racemosa* é uma espécie sal secretora, ou seja, elimina o excesso de sal via glândulas de sal (PARIDA & JHA, 2010), essas estruturas secretoras desempenham um papel fundamental na manutenção do equilíbrio osmótico interno, permitindo maior atividade metabólica com o aumento dos níveis de salinidade (TAN et al., 2013; GARCIA et al., 2017).

O excesso de salinidade também pode gerar maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (KOSOVA et al., 2013). As ERO's são produzidas como subprodutos durante as atividades de transporte de elétrons ligadas à membrana, por várias vias metabólicas (SHAH et al., 2001) e acarretam danos às biomoléculas, como lipídios de membrana, proteínas, pigmentos cloroplastídicos, entre outros (MISHRA & SINGHAL, 1992). De modo geral, quando sujeitas a maiores salinidades, as espécies de mangue promovem um aumento na atividade da CAT, SOD e APX (TAKEMURA et al., 2000; PARIDA et al., 2004; ATREYA et al., 2009) para minimizar os danos do estresse oxidativo ocasionado por ERO's. No presente estudo, entretanto, o aumento dos níveis de salinidade ocasionou uma diminuição da atividade das enzimas CAT, SOD e APX, em *R. mangle*. Esse resultado, somado à menor taxa de assimilação de CO<sub>2</sub> observada, indica danos no aparato fotossintético. Resultados semelhantes foram relatados em *Kandelia candel* e *Rhizophora stylosa* quando expostas a altos níveis de salinidade (HOSSAIN et al., 2017). Embora a tolerância ao sal seja constantemente associada com o aumento na atividade de enzimas antioxidantes, nem sempre essa tolerância depende de atividades antioxidantes mais altas (KIM et al., 2004). Atividades enzimáticas mais altas podem ser interpretadas como um sintoma

de sensibilidade ao sal, em alguns casos (ABOGADALLAH et al., 2010). A menor atividade da SOD em salinidades elevadas tem sido explicada pela atividade de oxidases alternativas, no controle da regeneração de superóxido (GIRAUD et al., 2008) e pela extinção direta desse radical livre, via osmólitos (PARIDA et al., 2004; ZHU et al., 2011). Já a menor atividade da CAT pode estar associada a baixa produção de  $H_2O_2$  devido à menor atividade da SOD (HOSSAIN et al., 2017), bem como a APX.

A correlação de Spearman evidenciou que *L. racemosa* é mais sensível às concentrações de metais pesados, sobretudo, a presença do cromo, arsênio e mercúrio na raiz. De modo geral, o aumento da concentração de metais pesados causa prejuízos à fotossíntese nas halófitas, levando à fotoinibição e possíveis danos aos centros de reação do PSII (LUTS & LEFÈVRE, 2015; GARCIA et al., 2018; NAIDOO et al., 2014). Entretanto, no presente estudo, os metais pesados influenciaram de forma positiva a densidade e condutância estomática. O aumento da densidade estomática pode permitir maior condutância estomática (PEARCE et al., 2005), levando a maiores taxas fotossintéticas (MOTT & MICHAELSON, 1991). Verificamos uma correlação negativa entre a área do feixe vascular e o acúmulo de cromo e arsênio na raiz de *L. racemosa*. O estresse por metais pesados ocasiona menor eficiência no uso da água (LEFÈVRE et al., 2014), e esta pode estar relacionada com alterações na anatomia dos vasos condutores (BACELAR et al., 2007). Todavia, maiores investigações são necessárias.

A correlação positiva entre a concentração de mercúrio e a concentração de arsênio e cromo na raiz deve-se ao fato de que alguns metais tendem a ficar retidos nas raízes, como observado para o cobre, chumbo, zinco e mercúrio (MACFARLANE et al., 2007; AGORAMOORTHY et al., 2008; HUANG & WANG, 2010). A retenção de metais nas raízes tem sido relatada como uma estratégia para evitar os efeitos deletérios na parte aérea, do estresse induzido pelos metais (HUANG & WANG, 2010).

A concentração de cromo no caule de *L. racemosa* foi positivamente correlacionada com a concentração de sal. O cromo é um metal comumente translocado para as partes aéreas da planta (RICHTER et al., 2016), sendo assim, o aumento da salinidade, pode refletir maior fluxo desse metal do caule para as folhas (NGUYEN et al., 2017). O maior teor salino ocasiona maior

atividade das glândulas de sal (GARCIA et al., 2018) e, juntamente com a secreção salina, maior quantidade de íons tóxicos podem ser eliminados pela folha (NAIDOO et al., 2014; MANOUSAKI et al., 2014, FLOWERS et al., 2010).

Em *R. mangle* a atividade da CAT mostrou-se negativamente correlacionada com os tratamentos salinos, com o FT do As entre a raiz e o caule e com o FT do Hg entre a raiz e a parte aérea. Menores atividade da CAT em condições mais salinas também foram relatadas para outras espécies de mangues (ASHIHARA et al., 1997; PARIDA et al., 2004). Além disso, a principal resposta das plantas ao estresse por metais pesados é a formação de ERO's (DAS et al., 2016) que pode ser resultado da inativação das enzimas antioxidantes SOD, POD e CAT (DONG et al., 2007).

Os resultados obtidos pela LDA e pela correlação de Spearman indicam que *L. racemosa* apresenta maior eficiência como espécie bioindicadora ambiental do que *R. mangle*.

## 8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

1. *L. racemosa* e *R. mangle* possuem respostas distintas no que tange a bioacumulação de cromo, chumbo, arsênio e mercúrio em função da salinidade.
2. *L. racemosa* é mais responsiva a concentração de cromo, arsênio e mercúrio do que *R. mangle*, sobretudo na raiz.
3. O acúmulo de cromo, arsênio e mercúrio na raiz afeta a densidade estomática, a condutância estomática, bem como a área de feixe vascular da nervura central de *L. racemosa*.
4. *R. mangle* é mais sensível a salinidade de 11 g L<sup>-1</sup> de NaCl, em relação a *L. racemosa*, sendo a atividade da catalase o principal parâmetro biológico afetado.
5. Considerando as espécies estudadas, *L. racemosa* é mais indicada como bioindicadora ambiental em estudos de poluição por metais pesados.



## 9. REFERÊNCIAS

ABOGADALLAH, G.M., SERAG, M.M., QUICK, W.P. Fine and coarse regulation of reactive oxygen species in the salt tolerant mutants of barnyard grass and their wild type parents under salt stress. **Physiol. Plant.**, v. 138, n. 1, p. 60-73, 2010.

ACOSTA, J.A.; JANSEN, B.; KALBITZ, K.; FAZ, A.; MARTÍNEZ, S.M. Salinity increases mobility of heavy metals in soils, **Chemosphere**. 85. 1318-1324, 2011.

AEBI, H. **Catalase in vitro**, in: Methods in Enzymology. pp. 121–126. 1984.

AGORAMOORTHY, G; CHEN, F; HSU, M. J. Threat of heavy metal pollution in halophytic and mangrove plants of Tamil Nadu, India. **Environmental Pollution**, v.155, p. 320-326, 2008.

ALONGI, D. M. The Impact of Climate Change on Mangrove Forests. **Curr Clim Change**, v.1, p. 30–39, 2015.

ARRIVABENE, H. P.; CAMPOS, C. Q.; SOUZA, I. C.; WUNDERLIN, D. A.; MILANEZ, C. R. D.; MACHADO, S.R. Differential bioaccumulation and translocation patterns in three mangrove plants experimentally exposed to iron. Consequences for environmental sensing. **Environmental Pollution**, v. 215, p. 302-313, 2016.

ARRIVABENE, H.; SOUZA, I.; LUIZ, O.C.W.; ANTÔNIO, R. R.; ALBERTO, W. D.; ROZINDO M. C. Functional traits of selected mangrove species in Brazil as biological indicators of different environmental conditions. **Science of The Total Environment**. s 476–477. 496–504. 2014.

ASHIHARA, H., ADACHI, K., OTAWA, M., YASUMOTO, E., FUKUSHIMA, Y., KATO, M., SANO, H., SASAMOTO, H., BABA, S. Compatible solutes and inorganic ions in the mangrove plant *Avicennia marina* and their effects on the activities of enzymes. **J. Biosci**, v. 52, p. 433–440, 1997.

ATREYA, A., VARTAK, V., BHARGAVA, S. Salt priming improves tolerance to desiccation stress and to extreme salt stress in *Bruguiera cylindrica*. **Int J Integr Biol**, v. 6,p. 68–73, 2009.

BACELAR, E. A.; MOUTINHO-PEREIRA, J. M.; GONÇALVES, B. C.; FERREIRA, H. F.; CORREIA, C. M. Changes in growth, gas exchange, xylem hydraulic properties and water use efficiency of three olive cultivars under contrasting water availability regimes. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 183-192, 2007.

BARHOUMI, Z., DJEBALI, W., SMAOUI, A., CHAÏBI, W., ABDELLY, C. Contribution of NaCl excretion to salt resistance of *Aeluropus littoralis* (Willd) Parl. **J. Plant Physiol.**, v. 164, p. 842-850, 2007.

BAYEN, S. Occurrence, bioavailability and toxic effects of trace metals and organic contaminants in mangrove ecosystems: A review. **Environment international**, v. 48, p. 84-101, 2012.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CHENG, S.; TAM, N.F.Y.; LI, R.; SHEN, X.; NIU, Z. & CHAI, M.; YU QIU, G. Temporal variations in physiological responses of *Kandelia obovata* seedlings exposed to multiple heavy metals. **Marine Pollution Bulletin**, v. 124, p. 1089-1095, 2017.

CHU, B., CHEN, X.; LI, Q.; YANG, Y.; MEI, X.; HE, B.; LI, H.; TAN, L. Effects of salinity on the transformation of heavy metals in tropical estuary wetland soil. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n.2, 186-198, 2014.

CIAS, P. C. et al. Carbon and Other Biogeochemical Cycles. In: Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. [Stocker, T.F., D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S.K. Allen, J. Boschung, A. Nauels, Y. Xia, V. Bex and P.M. Midgley (eds.)]. **Climate Change 2013: The Physical Science Basis**. Cambridge University Press, United Kingdom and New York, NY, USA, 2013.

CLOUGH, B. Continuing the Journey Amongst Mangroves. In: ISME **Mangrove Educational Book Series No. 1**. International Society for Mangrove Ecosystems

(ISME), Okinawa, Japan and International Tropical Timber Organization (ITTO). Yokohama, Japan, 2013.

DAS, S. K.; PATRA, J. K.; THATOI, H. Antioxidative response to abiotic and biotic stresses in mangrove plants: A review. **International Review of Hydrobiology**, v. 101, p. 3-19, 2016.

DEFEW, L.H.; MAIR, J.M.; GUZMAN, H.M. An assessment of metal contamination in mangrove sediments and leaves from Punta Mala Bay, Pacific Panama. **Marine Pollution Bulletin**, v.50, p. 547–552, 2005.

DONG, L. L.; XIAO-MING, L.; ZE-YU, P.; BIN-GUI, W. Flavanol derivatives from *Rhizophora stylosa* and their DPPH radical scavenging activity. **Molecules**, v. 12, p. 1163-1169, 2007.

DU, J., YAN, C., LI, Z. Formation of iron plaque on mangrove *Kandalar. Obovata* (SL) root surfaces and its role in cadmium uptake and translocation. **Mar. Pollut. Bull**, v. 74, p. 105-109, 2013.

DUMAN, F.; OZTURK, F.; AYDIN, Z. Biological responses of duckweed (*Lemna minor* L.) exposed to the inorganic arsenic species As(III) and As(V): effects of concentration and duration of exposure. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 983-993, 2010.

EUGENIO, F.C.; SANTOS, A.R.; FIEDLER, N.C.; RIBEIRO, G.A.; SILVA, A.G.; SOARES, V.P.; GLERIANI, J.M. Mapeamento das áreas de preservação permanente do estado do Espírito Santo, Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 27, n. 3, p. 897-906, 2017.

FERNANDES, A. J.; PERIA, L. C. S. Características do ambiente. In: Yara Schaeffer-Novelli (Ed.). **Manguezal: Ecossistema entre a terra e o mar**. São Paulo: Caribbean ecological research, p. 13-15, 1995.

FERREIRA, A. C.; LACERDA, L. D. Degradation and conservation of Brazilian mangroves, status and perspectives. **Ocean & Coastal Management**, v. 125, p. 38-46, 2016.

FLOWERS TJ, GALAL HK, BROMHAM L. Evolution of halophytes: multiple origins of salt tolerance in land plants. **Functional Plant Biology**, v. 37, p. 604–612, 2010.

FRANCISCO, A. M.; Díaz, M.; Romano, M.; Sánchez, F. Descripción morfoanatomía de los tipos de glândulas foliares em El mangle blanco *Laguncularia racemosa* L. Gaertn (f.). **Acta Microscopica**, v. 18, n. 3, p. 237-252, 2009.

GARCIA, J.S., DALMOLINA, A.C., FRANÇA, M.G.C., MANGABEIRA, P.A.O. Different salt concentrations induce alterations both in photosynthetic parameters and salt gland activity in leaves of the mangrove *Avicennia schaueriana*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.141, p. 70-74. 2017.

GARCIA, J.S.; DALMOLIN, A.C.; CORTEZ, P.A.; BARBEIRA, P.S.; MANGABEIRA, P.A.O.; FRANÇA, M.G.C. Short-term cadmium exposure induces gas exchanges, morphological and ultrastructural disturbances in mangrove *Avicennia schaueriana* young plants. **Marine Pollution Bulletin**, v.131, p. 122-129, 2018.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases: II. Purification and Quantitative Relationship with Water-soluble Protein in Seedlings. **Plant Physiol**, v. 59, p. 315-318, 1977.

GIRAUD, E., HO, L.H.M., CLIFTON, R., CARROLL, A., ESTAVILLO, G., TAN, Y.F., HOWELL, K.A., IVANOVA, A., POGSON, B.J., MILLAR, A.H., WHELAN, J. The absence of ALTERNATIVE OXIDASE1a in *Arabidopsis* results in acute sensitivity to combined light and drought stress. **Plant Physiol.**, v. 147, p. 595-610, 2008.

GIRI, C., OCHIENG, E., TIESZEN, L.L., ZHU, Z., SINGH, A., LOVELAND, T., MASEK, J., DUKE, N. Status and distribution of mangrove forests of the world using earth observation satellite data. **Glob. Ecol. Biogeogr**, v. 20, p.154-159, 2011.

GUHATHAKURTA, H.; KAVIRAJ, A. Heavy Metal Concentration in Water, Sediment, Shrimp (*Penaeus monodon*) and Mullet (*Liza parsia*) in Some Brackish

Water Ponds of Sunderban, India. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 11, p. 914-920, 2000.

HATJE, V.; PAYNE, T.E.; HILL, D.M.; MCORIST, G.; BIRCH, G.F.; SZYMCZAK, R. Kinetics of Trace Element Uptake and Release by Particles in Estuarine Waters: Effects of pH, Salinity, and Particle Loading. **Environment international**, v. 29, p.619-29, 2003.

HELAL, H. M.; UPENOV, A.; ISSA, G. J. Growth and uptake of Cd and Zn by *Leucanea leucocephala* in reclaimed soils as affected by NaCl salinity. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 162, p. 589-592, 1999.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: **California Agricultural Experimental Station**, 1950.

HOSSAIN, M.D.; INAFUKU, M.; IWASAKI, H.; TAIRA, N.; MOSTOFA, M.; OKU, H. Differential enzymatic defense mechanisms in leaves and roots of two true mangrove species under long-term salt stress. **Aquatic Botany**, v.142, p. 32-40, 2017.

HUANG, G. Y.; WANG, Y. S. Physiological and biochemical responses in the leaves of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*) exposed to multiple heavy metals. **Journal of Hazardous Materials**, v. 182, p. 848-854, 2010.

JOHANSEN, D.A. Plant microtechnique. New York: McGraw Hill Book. 523p. 1940.

KIM, Y., ARIHARA, J., NAKAYAMA, T., NAKAYAMA, N., SHIMADA, S., USUI, K. Antioxidative responses and their relation to salt tolerance in *Echinochloa oryzicola* Vasing and *Setaria viridis* L. Beauv. **Plant Growth Regul.**, v. 44, p. 87-92, 2004

KJERFVE, B.; LACERDA, L. D. Mangroves of Brazil. In: Lacerda LD (Ed.). **Conservation and sustainable utilization of mangrove forest in Latin America and Africa regions**. Part I - Latin America. Mangrove Ecosystem Technical

Report No. 2. ITTO/ISME, Okinawa: International Society for mangrove ecosystems, p. 245-272, 1993.

KOSOVÁ K, PRÁŠIL IT, VÍTÁMVÁS P. Protein Contribution to Plant Salinity Response and Tolerance Acquisition. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 4, p. 6757-6789, 2013.

LEFÈVRE, I.; VOGEL-MIKUŠ, K.; JEROMEL, L.; VAVPETIČ, P.; PLANCHON, S.; ARČON, I.; ELTEREN, J.T.V.; LEPOINT, G.; GOBERT, S.; RENAUT, J.; PELICON, P.; LUTTS, S. Differential cadmium and zinc distribution in relation to their physiological impact in the leaves of the accumulating *Zygophyllum fabago* L. **Plant, Cell and Environment**, v. 37, 1299–1320, 2014.

LEWIS, Michael; PRYOR, Rachel; WILKING, Lynn. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: a review. **Environmental Pollution**, v. 159, n. 10, p. 2328-2346, 2011.

LIU, Y.; TAM, N.F.Y.; YANG, J.X.; PI, N.; B, WONG, M.H.; YE, Z.H. Mixed heavy metals tolerance and radial oxygen loss in mangrove seedlings. **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 1843–1849, 2009.

LUTTS, S. & LEFÈVRE, I. How can we take advantage of halophyte properties to cope with heavy metal toxicity in salt-affected areas?. **Annals of botany**, v. 115, p. 1–20, 2015.

MACFARLANE, G. R.; KOLLER, C. E.; BLOMBERG, S. P. Accumulation and partitioning of heavy metals in mangroves: A synthesis of field-based studies. **Chemosphere**, v. 69, p. 1454-1464, 2007.

MACFARLANE, G.R.; BURCHETT, M.D. Cellular distribution of copper, lead and zinc in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. **Aquatic Botany**, v. 68, p. 45–59, 2000.

MACFARLANE, G.R.; BURCHETT, M.D. Zinc distribution and excretion in the leaves of the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. Environ. **Exp. Bot.**, v. 41, p. 167–175, 1999.

MACFARLANE, G.R.; PULKOWNIK, A.; BURCHETT, M.D. Accumulation and distribution of heavy metals in the grey mangrove, *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.: biological indication potential. **Environmental Pollution**, v. 123, p.139–151, 2003.

MACHADO, S. R.; RODRIGUES, T. M. Estruturas Secretoras Externas. IN: EVERT, R. F: Coordenação e tradução de Carmen Regina Marcati. **Anatomia das Plantas de Esau**. São Paulo: Blucher, p. 533-561, 2013.

MACHADO, W; GUEIROS, B.B.; LISBOA-FILHO, S.D.; LACERDA, L.D. Trace metals in mangrove seedlings: role of iron plaque formation. **Wetlands Ecol. Manage.**, v. 13, p. 199–206, 2005.

MANOUSAKI, E.; KALOGERAKIS, N. Halophytes present new opportunities in phytoremediation of heavy metals and saline soils. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 50, n. 2, p. 656-660, 2011.

MARCUM, K. B. Use of saline and non-potable water in the turfgrass industry: Constraints and developments. **Agricultural Water Management**, v. 80, p. 132-146, 2006.

MARTIN, R., NAFTEL, S., MACFIE, S., JONES, K., FENG, H., TREMBLEY, C. High variability of the metal content of tree growth rings as measured by synchrotron micro x-ray fluorescence spectrometry. **X-Ray Spectrom**, v.35, p. 57–62, 2006.

MENEZES, N.L. Rhizophores in *Rhizophora mangle* L: an alternative interpretation of so-called "aerial roots". **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 78, p. 213-226, 2006.

MISHRA, R.K.; SINGHAL, G.S.; Function of photosynthetic apparatus of intact wheat leaves under high light and heat stress and its relationship with peroxidation of thylakoid lipids, **Plant Physiol**, v. 98, p. 1-6, 1992.

MONFERRÁN MV, GALANTI LN, BONANSEA RI, AMÉ MV, WUNDERLIN DA. Integrated survey of water pollution in the Suquía River basin (Córdoba, Argentina). **J Environ Monit**, v.13, p. 398–40, 2011.

MORRISSEY, J., GUERINOT, M. Iron uptake and transport in plants: the good, the bad, and the ionome. **Chem. Ver**, v. 109, p. 4553–4567, 2009.

MOTT, K. A.; MICHAELSON, O. Amphistomy as an Adaptation to High Light Intensity in *Ambrosia cordifolia* (Compositae). **American Journal of Botany**, v. 78, n. 1, p. 76-79, 1991.

NAIDOO, G.; HIRALAL, O.; NAIDOO, Y. Hypersalinity effects on leaf ultrastructure and physiology in the mangrove *Avicennia marina*. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, p. 814-820, 2011.

NAIDOO, G.; HIRALAL, T.; NAIDOO, Y. Ecophysiological responses of the mangrove *Avicennia marina* to trace metal contamination. **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 209, p. 63-72, 2014.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, v. 22, p. 867-880, 1981.

NGUYEN, K. L.; NGUYEN, H. A.; RICHTER, O.; PHAM, M. T.; NGUYEN, V. P. Ecophysiological responses of young mangrove species *Rhizophora apiculata* (Blume) to different chromium contaminated environments. **Science of the Total Environment**, v. 574, p. 369-380, 2017.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, p. 368-373, 1964.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees Struct Funct**, v. 18, p. 167-174, 2004.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B.; MITTRA, B. Effects of salt on growth, ion accumulation photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove, *Bruguiera parviflora*. **Trees Struct Funct**, v. 18, p. 167-174, 2004.

PARIDA, A. K.; JHA, B. Salt tolerance mechanisms in mangroves: a review. **Trees**, v. 24, p. 199-217, 2010.



PEARCE, D.W., MILLARD, S., BRAY, D.F., ROOD, S.B.. Stomatal characteristics of riparian poplar species in a semi-arid environment. **Tree Physiology**, v. 26, p. 211-218, 2005.

PENG, L.; WENJIAN, Z.; ZHENJI ,L. Distribution and accumulation of heavy metals in *Avicennia marina* community in Shenzhen,China.**J.Environ.Sci**, v. 9, p. 472–479, 1997.

PETERS, E.C.; GASSMAN, N.J.; FIRMAN, J.C.; RICHMOND, R.H.; POWER, E.A. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 12–40. 1997.

PILON-SMIT, E. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol*, v. 56, p. 15–39, 2005.

QIAN, Y., GALLAGHER, F.J., FENG, H., WU, M. A geochemical study of toxic metal translocation in an urban brown field wetland.**Environ. Pollut**, v. 16, p. 23–30, 2012.

REEF, R., LOVELOCK, C.E. Regulation of water balance in mangroves. **Ann. Bot.**, v. 115, p. 385-395, 2015.

RICHTER, O.; NGUYEN, H. A.; NGUYEN, K. L.; NGUYEN, V. P.; BIESTER, H.; SCHMIDT, P. Phytoremediation by mangrove trees: Experimental studies and model development. **Chemical Engineering Journal**, v. 294, p. 389-399, 2016.

SAENGER, P. **Mangrove Ecology, Silviculture and Conservation**. Kluwer Academic Publishers, 2002.

SÁNCHEZ-ARIAS LE, AUGUSTO RUIZ CASTRO .The Effect of Temperature on the Accumulation of Salts and Chromium in Seedlings of *Avicennia germinans* (“Mangle Salado”) and *Rhizophora mangle* (“Mangle Rojo”) Exposed to Tannery Wastewaters. 2008.

SETH, C. S.; CHATURVEDI, P. K.; MISRA, V. Toxic effect os arsenate and cadmium alone and in combination on giant duckweed (*Spirodela polyrrhiza* L.) in response to its accumulation. **Environ. Toxicol.**, v. 22, p. 539-549. 2007.

SHAH, K.; KUMAR, R.G.; VERMA, S.; DUBEY, R.S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings, **Plant Sci**, v. 161, 2001.

SILVA, C.A.R.; LACERDA, L.D.; REZENDE, C.E. Metals reservoir in a red mangrove forest. **Biotropica**, v. 22, n.4, p. 339-345, 1990.

SOBRADO, M. A. Relationship of water transport to anatomical features in the mangrove *Laguncularia racemosa* grown under contrasting salinities. **New Phytologist**, v. 173, p. 584-591, 2007.

SOBRADO, M.A. Influence of external salinity on the osmolality of xylem sap, leaf tissue and leaf gland secretion of the mangrove *Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn. **Trees**, v. 18, p. 422-427, 2004.

SOUZA, I.C. et al. Adaptive plasticity of *Laguncularia racemosa* in response to different environmental conditions: integrating chemical and biological data by chemometrics. **Ecotoxicology (London)**. v. 23, p. 335-348. 2014.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SRIVASTAVA, A. K.; BHARGAVA, P.; RAI, L. C. Salinity and copper-induced oxidative damage and changes in the antioxidative defense system of *Anabaena doliolum*. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 21, p. 1291-1298, 2005.

STEVENS, D. P.; MCLAUGHLIN, M. J.; HEINRICH, T. Determining toxicity of lead and zinc run off in soils: salinity effects on metal partitioning and phytotoxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 22, p. 3017-3024, 2003.

SUAREZ, N. Leaf Longevity, Construction, and Maintenance Costs of Three Mangrove Species Under Field Conditions. **Photosynthetica**, v. 41, p. 373-381, 2003.

TAKEMURA, T., HANAGATA, N., SUGIHARA, K., BABA, S., et al. Physiological and biochemical responses to salt stress in the mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. **Aquat Bot.**, v. 68, p. 15–28, 2000.

TAM, N.F.Y., WONG, Y.S. Retention and distribution of heavy metals in mangrove soils receiving wastewater. **Environmental Pollution**, v. 94, p. 283-291, 1995.

TAM, N.F.Y.; WONG, Y. S. Retention of nutrients and heavy metals in mangrove sediments receiving wastewater of different strengths. **Environmental Technology**, v. 14, p. 719-729, 1993.

TAN, W.-K., LIN, Q., LIM, T.-M., KUMAR, P., LOH, C.-S. Dynamic secretion changes in the salt glands of the mangrove tree species *Avicennia officinalis* in response to a changing saline environment. **Plant Cell Environ.**, v. 36, p. 1410-1422, 2013.

TOMLINSON P.B. The botany of mangroves. 1st ed. New York: Cambridge University Press; 1994

TOMLINSON, P. B. **The botany of mangroves**. Cambridge University Press, New York, 1986.

USEPA - US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY –. **Method 3051a: MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SEDIMENTS, SLUDGES, SOILS, AND OILS**. United States, 2007.

VANNUCCI, M. **Os manguezais e nós: Uma síntese de percepções**. EDUSP, São Paulo, SP, p. 276, 1999.

VERSLUES, P.E., AGARWAL, M., KATIYAR-AGARWAL, S., ZHU, J., ZHU, J.K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stress that affect plant water status. **Plant J.**, v. 45, p. 523-539, 2006.

WERNER, A., STELZER, R. Physiological responses of the mangrove *Rhizophora mangle* grown in the absence and presence of NaCl. **Plant Cell Environ.**, v. 13, p. 243-255, 1990.

YOKOYA, N. S. Distribuição e origem. In: Yara Schaeffer-Novelli (Ed.). **Manguezal: Ecossistema entre a terra e o mar**. Caribbean ecological research, São Paulo, SP, p. 9-12, 1995.

ZHANG, F.Q., et al. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*. **Chemosphere**, v. 67, n.1, 44-50. 2007.

ZHOU, Y-W.; PENG, Y. S; LI, X. L.; CHENG, G. Z. Accumulation and partitioning of heavy metals in mangrove rhizosphere sediments. **Environmental Earth Sciences**, v. 64, n. 3, p. 799-807, 2011.