



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

Campus São Gabriel

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE *PHYSCOMITRIUM*
ACUTIFOLIUM BROTH. COMO FITORREMEDIADOR
DE FERRO *IN VITRO*

BRUNA MOTA BERNARDES

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE *PHYSCOMITRIUM*
ACUTIFOLIUM BROTH. COMO FITORREMEIADOR DE
FERRO *IN VITRO*

BRUNA MOTA BERNARDES

Monografia apresentada à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pampa — UNIPAMPA, *Campus* São Gabriel, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Frederico Costa Beber Vieira

Rio Grande do Sul
Dezembro de 2019

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE *PHYSCOMITRIUM ACUTIFOLIUM*
BROTH. COMO FITORREMEIADOR DE FERRO *IN VITRO*

BRUNA MOTA BERNARDES

ORIENTADOR: FREDERICO COSTA BEBER VIEIRA

Monografia submetida à Comissão de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

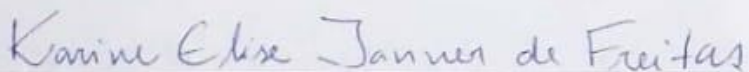
Aprovada por:



Prof. Dr. Frederico Costa Beber Vieira



Ms. Guilherme Afonso Kessler de Andrade



Ms. Karine Elise Janner de Freitas

São Gabriel, dezembro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

B522a Bernardes, Bruna Mota

Avaliação da eficiência de *Phiscomitrium acutifolium* como fitorremediador de ferro in vitro / Bruna Mota Bernardes.

50 p.

Trabalho de Conclusão de Curso(Graduação)-- Universidade Federal do Pampa, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, 2019.

"Orientação: Frederico Costa Beber Vieira Vieira".

1. Briófitas. 2. Biorremediação. 3. Solo. 4. Metais pesados. 5. Musgos. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus pais, Sabrina e Henrique, por todo carinho, cuidado, confiança e por não medirem esforços na realização de cada sonho meu. Sem vocês nada disso seria possível. Obrigada por acreditarem mais em mim do que eu mesma. E a Rita, por me incentivar a não adiar meus sonhos e me fazer começar essa trajetória.

À minha família, por todo amor e compreensão nas minhas ausências e por sempre me receberem com um colo aconchegante nos finais de semana. Obrigada por fazerem a saudade valer a pena.

Aos meus amigos, que apesar da distância, seguem aquecendo meu coração. À Marina pela amizade e companheirismo ao longo desses anos, ao Israel pela paciência e por tornar meus dias mais coloridos e engraçados e ao Felipe por toda ajuda e incentivo. Obrigada por tornarem até os piores dias mais leves e fáceis.

Ao "Team Moss", minha coorientadora Maria Victória por me apresentar aos musguinhos e me ensinar com tanta paciência e delicadeza, ao Guilherme, por tornar tudo mais engraçado e ser quase um coorientador também e a Sara, pelas tantas experiências que compartilhamos e por ser minha parceira de laboratório favorita. Obrigada por todo apoio e amizade, fazer ciência e aprender ao lado de vocês é maravilhoso.

Ao meu orientador, Filipe Victoria, por sempre acreditar em mim e por ser meu melhor exemplo de pesquisador. Obrigada pela oportunidade de poder pesquisar ao seu lado, é uma honra carregar seu nome e passar adiante seus ensinamentos. E ao professor Frederico Vieira pela dedicação e por estar sempre disposto a me ajudar.

Aos professores e técnicos da UNIPAMPA e do Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA), por todo apoio e incentivo.

A UNIPAMPA e ao NEVA por me acolherem e tornarem possível a realização deste trabalho, assim como a CAPES e o CNPq pelo incentivo e apoio a minha pesquisa.

RESUMO

Avaliação da eficiência de *Physcomitrium acutifolium* Broth. como fitorremediador de ferro *in vitro*

A superdivisão *Bryophyta* é composta pelas hepáticas, antóceros e musgos. Muitas espécies de musgos são conhecidas por atuarem como indicadores de poluição ambiental por metais pesados e de forma a testar essa característica em laboratório, a cultura de tecidos vegetais se faz essencial como uma ferramenta importante para o conhecimento de diversas respostas das plantas à estresses. Para melhor compreensão dos assuntos relacionados a “metal” e “musgos” os metadados documentam e organizam de forma estruturada os dados das organizações com o objetivo de minimizar duplicação de esforços e facilitar a manutenção dos dados. Com isso os objetivos foram realizar o levantamento de metadados para explorar a temática de correlação entre musgos e metais e avaliar a atuação do musgo *Physcomitrium acutifolium* como biorremediador de ferro *in vitro*. No primeiro trabalho, foram pesquisadas as palavras “musgo metal” nas plataformas Web of Science, Google Acadêmico e NCBI/PubMed e podemos concluir o quão recente é a pesquisa que envolve musgos e metais pesados além de nos dar uma noção sobre as principais revistas científicas que publicam sobre o tema e qual a plataforma de pesquisa mais apropriada. No segundo, foram preparadas trélicas de três meios de cultura MS com diferentes concentrações de Fe-EDTA, incluindo um controle com 27,8mg/L e três tratamentos com 50mg/L, 300mg/L e 600mg/L e cultivados seis gametófitos por tréplica dos tratamentos. Com as análises, podemos concluir que o musgo *Physcomitrium acutifolium* sob estresse por ferro atua como bom fitorremediador pois, não sofre alterações significativas. Entretanto, para sua total eficácia como fitorremediador, análises posteriores sobre a quantidade de ferro presente no meio e a absorvida por ele se fazem necessárias.

Palavras-chave: Briófitas; biorremediação; metais pesados; musgos; solo

ABSTRACT

Evaluation of the efficiency of *Physcomitrium acutifolium* as an *in vitro* iron phyto mediator

Bryophyta superdivision is composed by liverworts, anthoceres and mosses. Many species of mosses are known to act as indicators of environmental pollution by heavy metals and in order to test this characteristic in the laboratory, plant tissue culture is essential as an important tool for understanding various plant responses to stress. For a better understanding of "metal" and "moss" issues, metadata documents and structures organizational data in a structured manner to minimize duplication of effort and facilitate data retention. Thus, the objectives were to conduct a metadata survey to explore the theme of correlation between moss and metals and to evaluate the role of the *Physcomitrium acutifolium* moss as an *in vitro* iron bioremediator. In the first paper, we searched for the words "moss metal" on the Web of Science, Google Scholar, and NCBI / PubMed platforms and we can conclude how recent the research involving moss and heavy metals is and give us an insight into the major scientific journals. who publish about the topic and which research platform is most appropriate. In the second, three replicates of three MS culture media with different Fe-EDTA concentrations were prepared, including one control with 27.8mg/L and three treatments with 50mg/L, 300mg/L and 600mg/L, and six gametophytes were cultured per treble. of the treatments. With the analysis, we can conclude that the *physcomitrium acutifolium* moss under iron stress acts as a good phyto mediator because it does not suffer significant changes. However, for its full effectiveness as a phyto mediator, further analysis of the amount of iron present in the medium and its absorption is necessary.

Key-words: Bryophytes; bioremediation; heavy metals, moss, soil

SUMÁRIO

Resumo.....	VI
Abstract.....	VII
Sumário.....	VIII
Sumário de figuras, tabelas e gráficos/Capítulo 1.....	IX
Sumário de figuras, tabelas e gráficos/Capítulo 2.....	X
Capítulo 1: 33 anos revelando a correlação entre briófitas e metais pesados através de metadados.....	1
1. INTRODUÇÃO.....	1.2
2. OBJETIVOS.....	1.6
2.1 Objetivo geral.....	1.6
2.2 Objetivos específicos.....	1.6
3. MATERIAL, TÉCNICAS E MÉTODOS.....	1.7
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	1.8
5. CONCLUSÃO.....	1.16
6. REFERÊNCIAS.....	1.17
Capítulo 2: Avaliação da eficiência de <i>Physcomitrium acutifolium</i> como fitorremediador de ferro <i>in vitro</i>	2
1. INTRODUÇÃO.....	2.2
1.1 <i>Bryophyta Sensu Lato</i>	2.2
1.2 Ciclo de vida.....	2.2
1.3 <i>Bryophyta Sensu Strictu - Physcomitrium acutifolium</i> Broth....	2.2
1.4 Estresse abiótico em cultivos <i>in vitro</i>	2.3
1.5 Metais pesados e suas origens nas matrizes ambientais.....	2.3
1.6 Ferro, solo e plantas.....	2.4
1.7 Toxidez de ferro.....	2.4
1.8 Biorremediação, fitorremediação e fitoextração.....	2.4
1.9 Recuperação de áreas degradadas através de musgos.....	2.5
1.10 Soluções nutritivas de ferro.....	2.5
2. OBJETIVOS.....	2.7
2.1 Objetivo geral.....	2.7
2.2 Objetivos específicos.....	2.7
3. MATERIAL, TÉCNICAS E MÉTODOS.....	2.8
3.1 Amostras.....	2.8
3.2 Solução nutritiva de Fe-EDTA.....	2.8
3.3 Preparação dos meios de cultura e cultivo dos gametófitos.....	2.8
3.4 Análise dos Resultados.....	2.9
3.4.1 Imagens.....	2.9
3.4.2 Comprimento e biomassa.....	2.9
3.4.3 Scanner.....	2.9
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	2.10
4.1 Imagens dos gametófitos após 7 dias.....	2.10
4.2 Comprimento e biomassa dos gametófitos.....	2.11
4.3 Comprimento dos rizoides.....	2.12
4.4 Análise de correlação.....	2.15
5. CONCLUSÕES.....	2.18
6. REFERÊNCIAS.....	2.19

SUMÁRIO DAS FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Capítulo 1

Figura 1. Aglomerado de artigos sobre análise bibliométrica baseados na co-ocorrência de palavras-chave.....1.12

Gráfico A. Relação entre o número de artigos encontrados com a relevância destes com o assunto buscado em cada plataforma.....1.9

Gráfico B. Correspondência entre quantidade de artigos publicados e ano de publicação em cada plataforma.....1.10

Gráfico C. Relação entre as revistas científicas de onde pertenciam os artigos encontrados e o número de vezes na qual apareceram na busca em cada plataforma.....1.11

Gráfico D. Correlação entre as palavras-chave encontradas e o número de vezes que apareceram nos artigos buscados em cada plataforma.....1.12

Gráfico E.1. Relação entre os principais metais pesados encontrados e o número de aparições nos artigos da plataforma Web of Science, onde o eixo x apresenta os principais metais e o y o número de vezes encontradas.....1.13

Gráfico E.2. Relação entre os principais metais pesados encontrados e o número de aparições nos artigos da plataforma Google Acadêmico, onde o eixo x apresenta os principais metais e o y o número de vezes encontradas.....1.13

Gráfico E.1. Relação entre os principais metais pesados encontrados e o número de aparições nos artigos da plataforma NCBI/PubMed, onde o eixo x apresenta os principais metais e o y o número de vezes encontradas.1.13

SUMÁRIO DAS FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

Capítulo 2

Figura 1: Imagem comparativa com explantes de cada tratamento lado a lado para melhor visualização de alterações na planta. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.....	2.10
Figura 2: Explante de uma das trélicas do tratamento 1 controle, onde as cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) representam os rizoides com respectivamente 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.....	2.13
Figura 3: Explante de uma das trélicas do tratamento 2, onde as cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) representam os rizoides com respectivamente 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.....	2.13
Figura 4: Explante de uma das trélicas do tratamento 3, onde as cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) representam os rizoides com respectivamente 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.....	2.13
Figura 5: Explante de uma das trélicas do tratamento 4, onde as cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) representam os rizoides com respectivamente 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.....	2.14
Figura 6: Imagem comparativa com explantes de cada tratamento lado a lado com foco na sua parte inferior onde estão presentes os rizoides. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.....	2.14
Tabela 1: Concentrações de Fe-EDTA em cada tratamento para 1L de meio MS.....	2.7
Tabela 2: Correlação de Pearson entre os valores dos comprimentos totais dos gametófitos, área de projeção, área superficial, diâmetro e tamanho dos rizoides e biomassa.....	2.15
Gráfico 1: Box-splot feito no programa R com os médias dos comprimentos em cada trélica dos tratamentos. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.....	2.11
Gráfico 2: Box-splot feito no programa R com os médias dos pesos em cada trélica dos tratamentos. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.....	2.12
Gráfico 3: Box-splot feito no programa R com os médias dos tamanhos de rizoides em cada trélica dos tratamentos. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.....	2.12

"...Now my heart feel like an ember
And it's lighting up the dark
I'll carry these torches for ya
That you know I'll never drop..."

- Maroon 5

Capítulo 1

33 anos: revelando a correlação entre briófitas e metais pesados através de metadados

1. INTRODUÇÃO

Os metais pesados ocorrem naturalmente na crosta terrestre, da qual são liberados na atmosfera e nos corpos d'água (NAGAJYOTI et al., 2010). Alguns deles são essenciais para o funcionamento normal do metabolismo dos organismos, porém quando em baixas ou elevadas quantidades, podem levar ao estresse fisiológico e ter consequências prejudiciais aos organismos vegetais (NAGAJYOTI et al., 2010; KRZESTOWSKA, 2011). Já outros, como Pb, Cd, Al e Hg são prejudiciais independente da concentração (KRZESTOWSKA, 2011). O uso imprudente desses metais pelos humanos, juntamente à urbanização e ao desenvolvimento industrial, alterou drasticamente a distribuição e os ciclos geoquímicos dos metais pesados (SINGH et al., 2011). Assim, vários metais foram introduzidos no ambiente ou tiveram suas concentrações alteradas drasticamente. (NAGAJYOTI et al., 2010; VARELA et al. 2013). E uma vez introduzidos no meio ambiente, eles são difíceis de serem removidos e tendem a se acumular nos tecidos de plantas e outros organismos através das cadeias alimentares (LEE E VON LEHMEN, 1973; MAEVSKAYA et al. 2001). A crescente contaminação requer monitoramento contínuo das concentrações de metais pesados no ambiente e sua influência e efeitos sobre os ecossistemas (MARKERT E WECKERT, 1989).

Uma das definições mais aceitas sobre quais fatores levam determinado elemento a ser considerado metal pesado é que possuem uma densidade específica de mais de 5 g/cm^3 (JÄRUP, 2003). Entretanto essa definição inclui os metais alcalinos, metais alcalino-terrosos, lantanídeos e os actinídeos que, no sentido químico, não são considerados "pesados", ao mesmo tempo que exclui outros elementos, como o Arsênio, que geralmente é considerado metal pesado devido aos seus efeitos químico-ecológicos (MARTIN E COUGHTREY, 1982; AGARWAL 2009). Uma das classificações que podem combinar essas propriedades e explicar as semelhanças nos mecanismos de toxicidade de metais pesados entre os diferentes organismos é baseada nas constantes de equilíbrio que descrevem a formação dos complexos íon-ligante de metal (NIEBOER E RICHARDSON, 1980).

O monitoramento da poluição por metais pesados no meio ambiente é um processo muito complexo, especialmente quando se trata de poluentes atmosféricos (LITTLE E MARTIN, 1974). Os métodos usualmente utilizados estão associados a altos gastos com equipamentos e mão-de-obra, e geralmente consomem muito tempo, porque envolvem amostragem de longo prazo em um grande número de locais (LITTLE E MARTIN, 1974; WOLTERBEEK, 2002) e não revelam as quantidades de metais que são acumuladas pela vegetação na área monitorada, nem seus efeitos nesses sistemas biológicos (WOLTERBEEK, 2002). Assim, se faz necessário o uso de sistemas biológicos capazes de absorver metais pesados de forma que suas cargas teciduais reflitam as concentrações no ambiente (FERNÁNDEZ et al., 2013) e sua distância das fontes consigam fornecer informações

quantitativas sobre a poluição por metais pesados no meio ambiente e explicar seus efeitos sobre a biosfera (ONIANWA 2001; CHAKRABORTTY E PARATKAR, 2006). Nesse sentido, as briófitas, especialmente os musgos, são muito importantes (MARKERT E WECKERT, 1989; BOQUETE et al., 2014) além de terem sido as primeiras plantas verdes a colonizar o ambiente terrestre (NICKRENT et al., 2000) e, como tal, tiveram que desenvolver mecanismos para trabalhar com as quantidades muito maiores de metais pesados presentes na terra do que na água (DEGOLA et al., 2014) resultando na capacidade de muitas briófitas serem colonizadores consistentes de metais (SHAW et al., 1989), ou para acumular grandes quantidades de metais pesados, em áreas extremamente poluídas, sem qualquer efeito negativo visível no seu crescimento e desenvolvimento (SASSMANN et al., 2010). Sendo este, um dos pré-requisitos para seu uso como biomonitores (ZECHMEISTER et al., 2007).

Devido à sua distribuição generalizada e à capacidade de acumular grandes quantidades de metais pesados, as briófitas têm sido usadas como um importante sistema de monitoramento biológico para a poluição por metais pesados desde 1968 (TREMPER et al., 2004). Além disso, o fenômeno de que algumas briófitas tendem a crescer em substratos contendo certos metais pesados levou à sua utilização como bioindicadores que poderiam implicar a presença de um metal específico naquele ambiente particular (SHAW 1987). A relativa simplicidade dessas plantas (MARKERT E WECKERT, 1989; RESKI, 1998) faz delas um modelo importante para a investigação de alterações morfológicas e genômicas em plantas devido à toxicidade de metais pesados (CARGINALE et al., 2004; PANDA; 2005). Finalmente, a posição filogenética das briófitas na evolução das plantas, conectando o modo de vida terrestre e aquático (SHAW E RENZAGLIA, 2004; SHAW et al., 2011; STROTBEK et al., 2013), e o fato de que são o grupo mais conservado de plantas terrestres (RESKI, 1998), enfatizam sua importância para os estudos da evolução dos mecanismos de resistência das plantas a esse tipo de poluição ambiental.

As briófitas são geralmente divididas em três grandes filos: as hepáticas (*Marchantiophyta*), musgos (*Bryophyta*) e antóceros (*Anthoceroophyta*) (Shaw et al. 2011). Devido às suas propriedades morfo-fisiológicas, musgos (BERG E STEINNES, 1997; ZECHMEISTER et al., 2007; ZVEREVA E KOZLOV, 2011) e, hepáticas também (CARGINALE et al., 2004; TIPPING et al., 2008), têm sido amplamente utilizados em sistemas de monitoramento da poluição por metais pesados em ambientes terrestres e aquáticos. A ausência de um sistema radicular indica a capacidade dessas plantas absorverem metais pesados em toda a superfície (BERG E STEINNES, 1997; DEGOLA et al., 2014). A falta da camada de cutícula, que torna suas paredes celulares facilmente acessíveis para íons metálicos (PANDA, 2005; KOZ e CEVIK, 2014), acentuou as propriedades de troca iônica (LITTLE E MARTIN, 1974) e uma grande relação superfície-peso

também contribui significativamente para essa habilidade (SUN et al. 2009). Consequentemente, elas podem reagir e refletir as mudanças nas concentrações de metais pesados mais rapidamente do que a maioria das plantas vasculares (ZVEREVA E KOZLOV, 2011). Por outro lado, devido à ausência de tecidos condutores especializados (ONIANWA, 2001) e a lenta taxa de crescimento (CHAKRABORTTY E PARATKAR, 2006), os segmentos de crescimento de musgo podem fornecer informações sobre a exposição integrada a metais pesados durante períodos de tempo mais longos, e não apenas sobre o estado atual, que é particularmente importante nas áreas onde os níveis de metais pesados introduzidos mudam rapidamente. As vantagens da monitoração realizada por briófitas, comparadas às medidas convencionais, são custo-efetividade e amostragem mais fácil que resultam em densidade de amostragem muito maior e um número maior de locais que podem ser incluídos na pesquisa (BERG E STEINNES, 1997; SCHRÖDER et al., 2010). Também é mais fácil realizar análises químicas e há menos problemas de contaminação (BERG et al., 1995; BERG E STEINNES, 1997). Elas fornecem informações sobre as interações entre diferentes metais pesados e seus efeitos nos sistemas vivos, que não podem ser obtidos usando medições instrumentais (TREMPER et al. 2004). Devido a todas essas características, as briófitas têm sido usadas com sucesso há décadas, não apenas em estudos de monitoramento da poluição do ar, onde são de imensa importância (ZECHMEISTER et al. 2003), mas também no monitoramento da poluição por metais pesados em ambientes aquáticos (KELLY et al. 1987).

As briófitas acumulam metais pesados por vários mecanismos, mas a etapa inicial e frequentemente limitante é a adsorção reversível na superfície celular (GONZÁLEZ E POKROVSKY, 2014). Os metais adsorvidos podem ser capturados como partículas na camada superficial, dissolvidos em líquidos ou depósitos nas células circundantes (fração intercelular), ligados em forma trocável a locais de troca ou quelação na parede celular e superfície externa da membrana plasmática (fração extracelular) ou transportados no interior das células e mantidos na forma solúvel ou insolúvel (fração intracelular) (VÁZQUEZ et al., 1999; SALEMAA et al., 2004; CASTELLO, 2007; GONZÁLEZ E POKROVSKY, 2014). O acúmulo extracelular de metais pesados é mediado pelo processo de troca iônica (WELLS E BROWN, 1990) e a formação de complexos entre os metais e os grupos funcionais orgânicos nas paredes celulares das briófitas (SHAKYA et al., 2008). Como exemplo de espécie de briófita utilizada na biorremediação temos o musgo *Pseudoscleropodium purum* (Hedw.) M. Fleisch por Fernández et al. (2013) que apresentou uma relação similar entre as concentrações extracelular e intracelular de Cd. Com o intuito de aprofundar a pesquisa bibliográfica na literatura sobre o assunto, os metadados se tornaram uma forma ideal.

Metadados são descrições de dados armazenados em um banco de dados, ou como é comumente definido "dados sobre dados a partir

de um dicionário de dados digital” (DE SOUZA, T. B., et al., 2012). A finalidade principal dos metadados é documentar e organizar de forma estruturada os dados das organizações com o objetivo de minimizar duplicação de esforços e facilitar a manutenção dos dados (DE SOUZA, T. B., et al., 2012). A tecnologia de metadados está surgindo em função das necessidades de as organizações conhecerem melhor os dados que elas mantêm e conhecer com mais detalhes os dados de outras organizações (DE SOUZA, T. B., et al., 2012). A catalogação dos dados propiciará a maior utilização deles por usuários com múltiplos interesses. Sem uma documentação eficiente dos dados é dificultada aos usuários a localização de dados necessários para suas aplicações. Os dados precisam conter informações que auxiliem seus usuários a tomar decisões sobre a sua devida aplicação (DE SOUZA, T. B., et al., 2012). Existem diversas plataformas para acesso aos periódicos, entre elas, as citadas abaixo:

O Google Acadêmico fornece uma maneira simples para os autores acompanharem as citações de seus artigos, possibilitando que possamos verificar quem está citando suas publicações, fazer citações de gráficos ao longo do tempo e calcular várias métricas de citações (Disponível em <https://scholar.google.com/intl/en/scholar/citations.html>).

A Web of Science possui uma equipe editorial que trabalha em tempo integral em avaliações e gerenciamento de coleções, além de o processo de seleção de periódicos ser neutro para editores e aplicado consistentemente a todos os periódicos de nossos 3.300 parceiros de publicação. Os títulos existentes estão constantemente sob revisão para garantir que eles mantenham os níveis iniciais de qualidade. Ainda é possível acessar uma variedade incomparável de literatura de pesquisa de classe mundial vinculada a um núcleo de periódicos rigorosamente selecionado e descobrir novas informações com exclusividade por meio de conexões de metadados e citações meticulosamente capturadas (Disponível em <https://clarivate.com/products/web-of-science/web-scienceform/web-science-core-collection/>).

A plataforma NCBI/PubMed compreende mais de 28 milhões de citações de literatura biomédica da MEDLINE, revistas de ciências da vida e livros on-line. As citações e resumos do PubMed incluem os campos da biomedicina e saúde, abrangendo partes das ciências da vida, ciências comportamentais, ciências químicas e bioengenharia. Também fornece acesso a sites relevantes adicionais e links para outros recursos de biologia molecular do NCBI (Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3827/>).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar o levantamento de metadados para explorar a temática de correlação entre musgos e metais.

2.2 Objetivos específicos

Descobrir qual das três plataformas de pesquisa mais populares, Web of Science, Google Acadêmico e NCBI, apresenta resultados mais refinados e de acordo com o tema buscado.

Quais foram os anos de maiores publicações sobre o tema.

Quais os assuntos relacionados ao tema buscado de acordo com as palavras-chave dos artigos encontrados.

Quais revistas científicas publicam mais sobre o tema proposto.

Quais metais pesados são frequentemente estudados.

3. MATERIAL, TÉCNICAS E MÉTODOS

Os dados foram coletados em março de 2018 nas três plataformas de pesquisa: Web of Science, Google Acadêmico e NCBI/PubMed, levando em conta o uso mais frequente. As palavras-chave "musgo metal" foram pesquisadas em cada plataforma e os artigos resultantes foram analisados quanto à sua relevância para o assunto, data de publicação, periódico científico, palavras-chave e frequência de metais;

Foram pesquisados artigos a partir do ano de 1985, pois antes desse intervalo o número de artigos publicados sobre o tema por ano, em geral, não era significativo. Os programas Excel e VOSviewer foram usados para computação de dados e gráficos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

É evidente que a informação obtida por análise bibliométrica fornece uma visão geral e contribui para informações sobre a literatura em um determinado campo de forma mais clara e fornecendo uma análise mais profunda.

Na Web of Science, os 335 artigos encontrados eram todos, de fato, relacionados ao tema proposto (Gráfico A), o ano de maior publicação foi o de 2010 com 22 artigos e os de menor foram 1989 e 1991 com apenas 3 artigos em cada ano (Gráfico B). A revista científica mais frequente foi a Science of Total Environment encontrada 29 vezes (Gráfico C) e as palavras-chave mais populares foram heavy metal e biomonitor, encontradas, respectivamente, 123 e 97 vezes (Gráfico D). Os metais mais comuns foram cádmio e cobre (Gráfico E.1).

No Google Acadêmico, de 17600 artigos encontrados, apenas 281 foram contabilizados como relevantes (Gráfico A), o ano de maior publicação foi o de 2000 com 20 artigos e o de menor foi o de 1988 com apenas 1 artigo (Gráfico B). A revista científica mais popular foi a Science of the total environment encontrada 38 vezes (Gráfico C) e as palavras-chave mais comuns foram biomonitoring e bryophytes, encontradas, respectivamente, 49 e 35 vezes (Gráfico D). Os metais mais recorrentes foram zinco e cobre (Gráfico E.2).

Na plataforma NCBI, foram encontrados um total de 560 artigos sendo que apenas 187 deles estavam de fato relacionados ao tema buscado (Gráfico A), o ano de maior número de publicações foi o de 2016 com um total de 24 artigos e o de menor publicação foi o intervalo de 1985 até 1999 com apenas 7 artigos (Gráfico B). A revista científica mais popular foi a Sci Total Environment encontrada 29 vezes (Gráfico C) e dentre as palavras-chave mais frequentes estavam heavy metals e biomonitoring aparecendo, respectivamente, 56 e 29 vezes (Gráfico D). E dentre os metais mais frequentes estavam chumbo e cobre (Gráfico E.3).

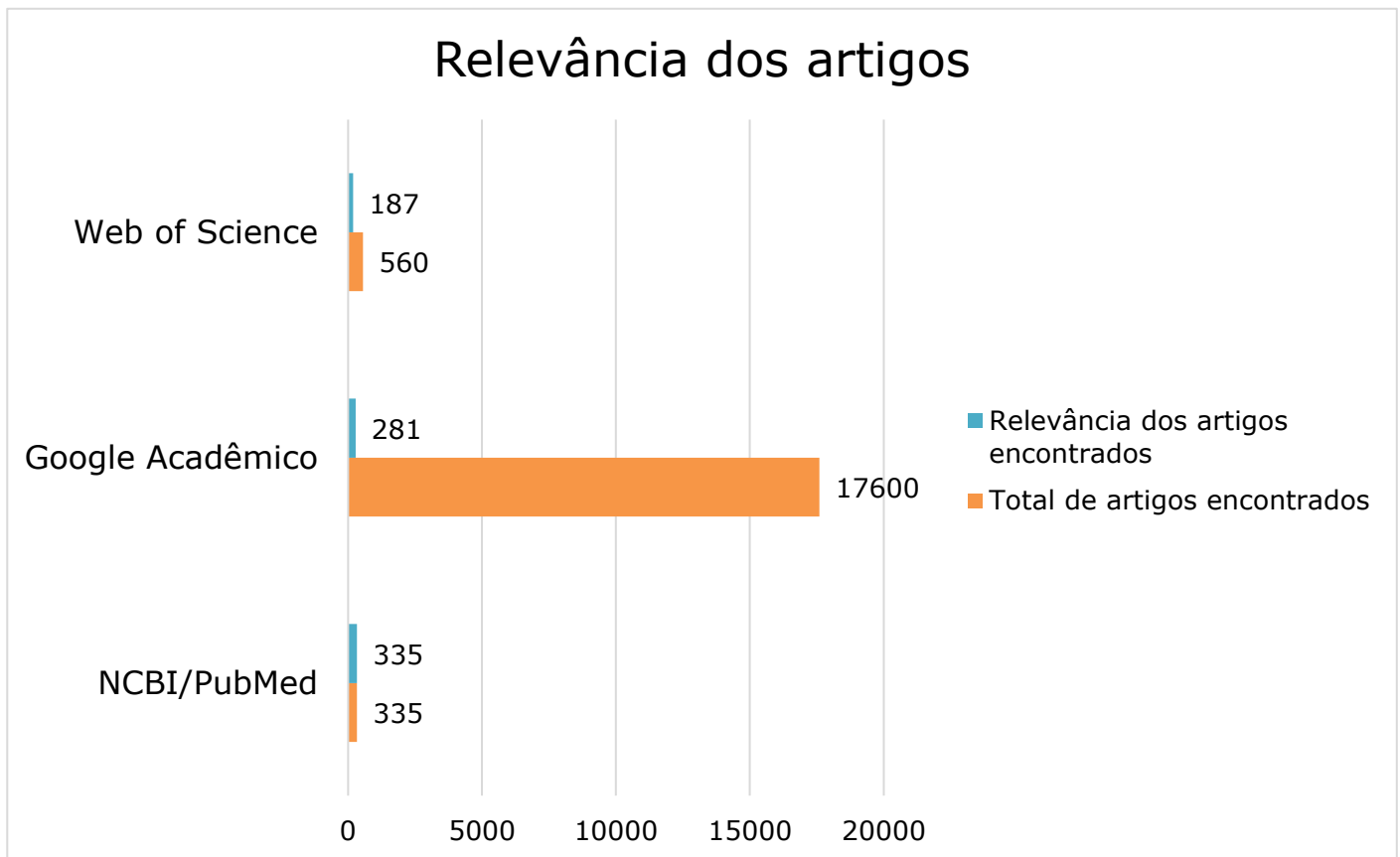


Gráfico A: Relação entre o número de artigos encontrados com a relevância destes quanto ao assunto buscado em cada plataforma.

Quanto a relevância dos artigos encontrados, a plataforma Web of Science foi a melhor dentre as três, pois apresentou absoluto aproveitamento dos artigos, estando relacionado com sua capacidade de filtrar melhor os resultados encontrados, como mostra uma ferramenta de seu próprio site. Enquanto o Google Acadêmico, que é muitas vezes a plataforma mais utilizada e mais popular, apresentou o maior número de resultados e, em contrapartida, a menor relevância, nos indicando a importância da relação quantidade X qualidade pois não necessariamente onde se obtém maiores resultados estes sejam os melhores. A justificativa para o Google Acadêmico não ter resultados tão exatos está na falta de recursos para filtragem e até mesmo na sua popularidade em comparação com as outras plataformas.

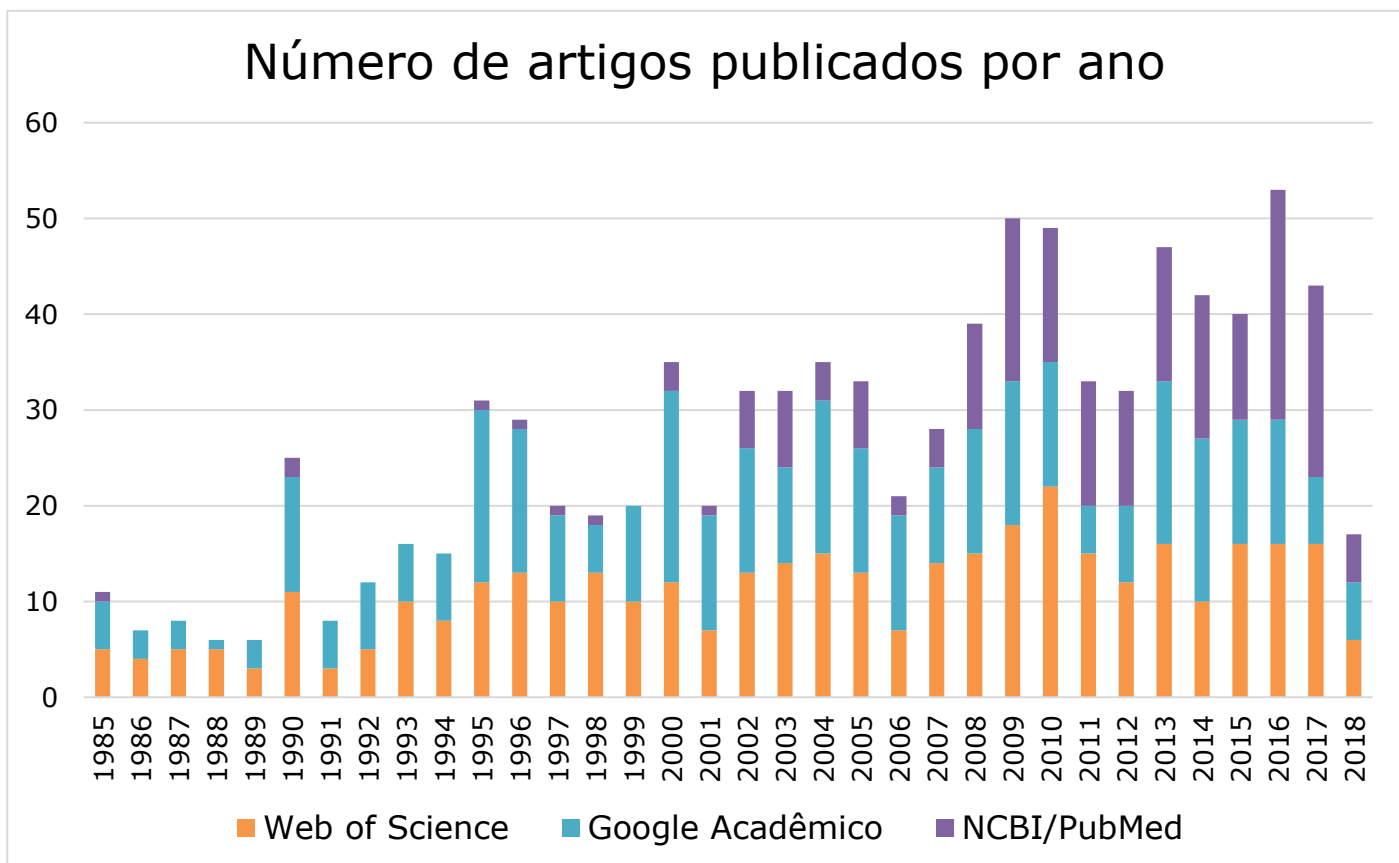


Gráfico B: Correspondência entre quantidade de artigos publicados e ano de publicação em cada plataforma.

Os anos de maior publicação foram todos acima dos anos 2000, com maior ênfase depois de 2010, o que nos mostra o quão recente é o assunto sobre a correlação de metais e musgos e quão necessário se é conhecer melhor essa área.

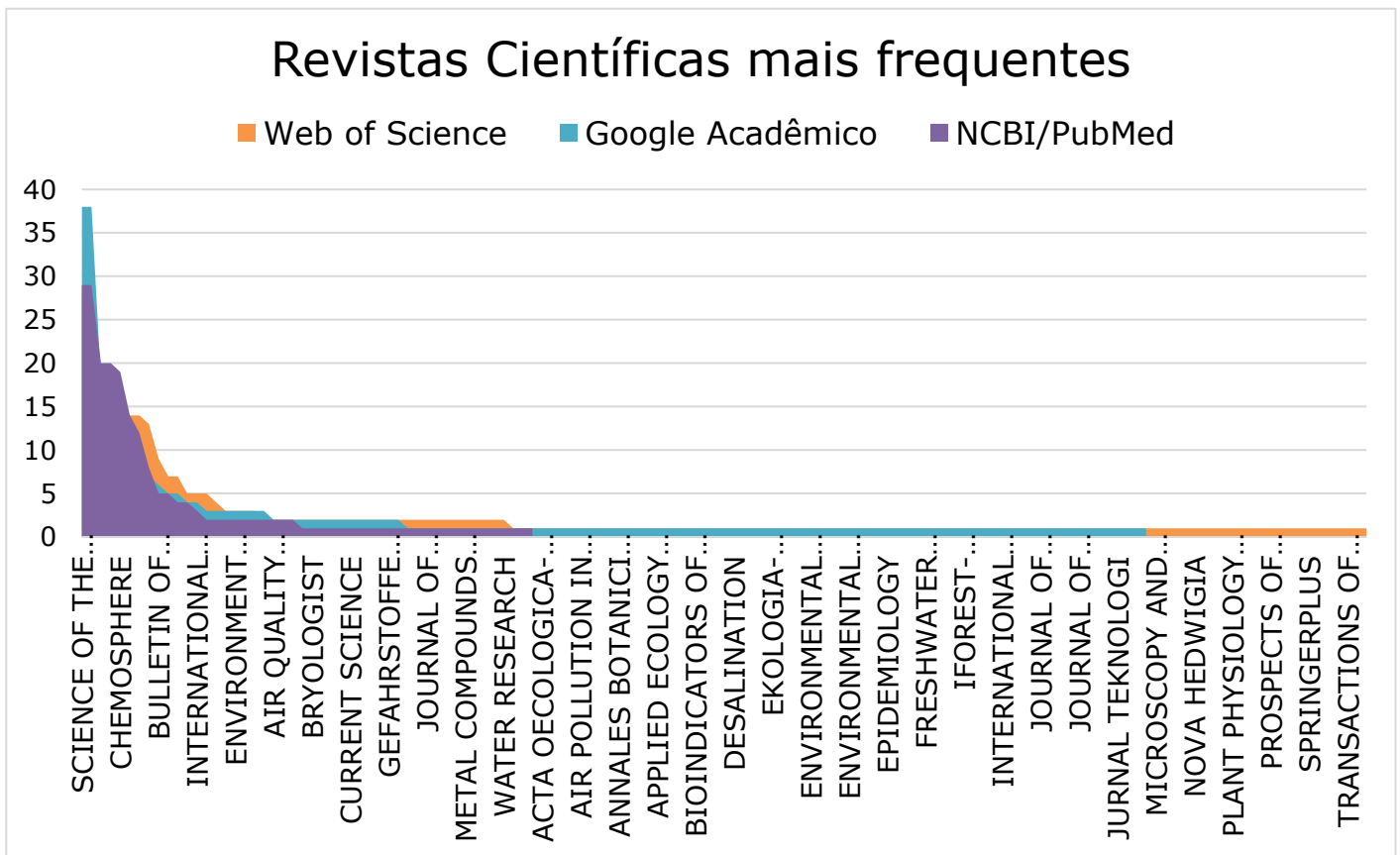


Gráfico C: Relação entre as revistas científicas de onde pertenciam os artigos encontrados e o número de vezes na qual apareceram na busca feita em cada

A revista científica mais recorrente foi a Science of the total environment o que é explicado com o tema proposto pela mesma: a pesquisa científica sobre o meio ambiente e sua relação com a humanidade.

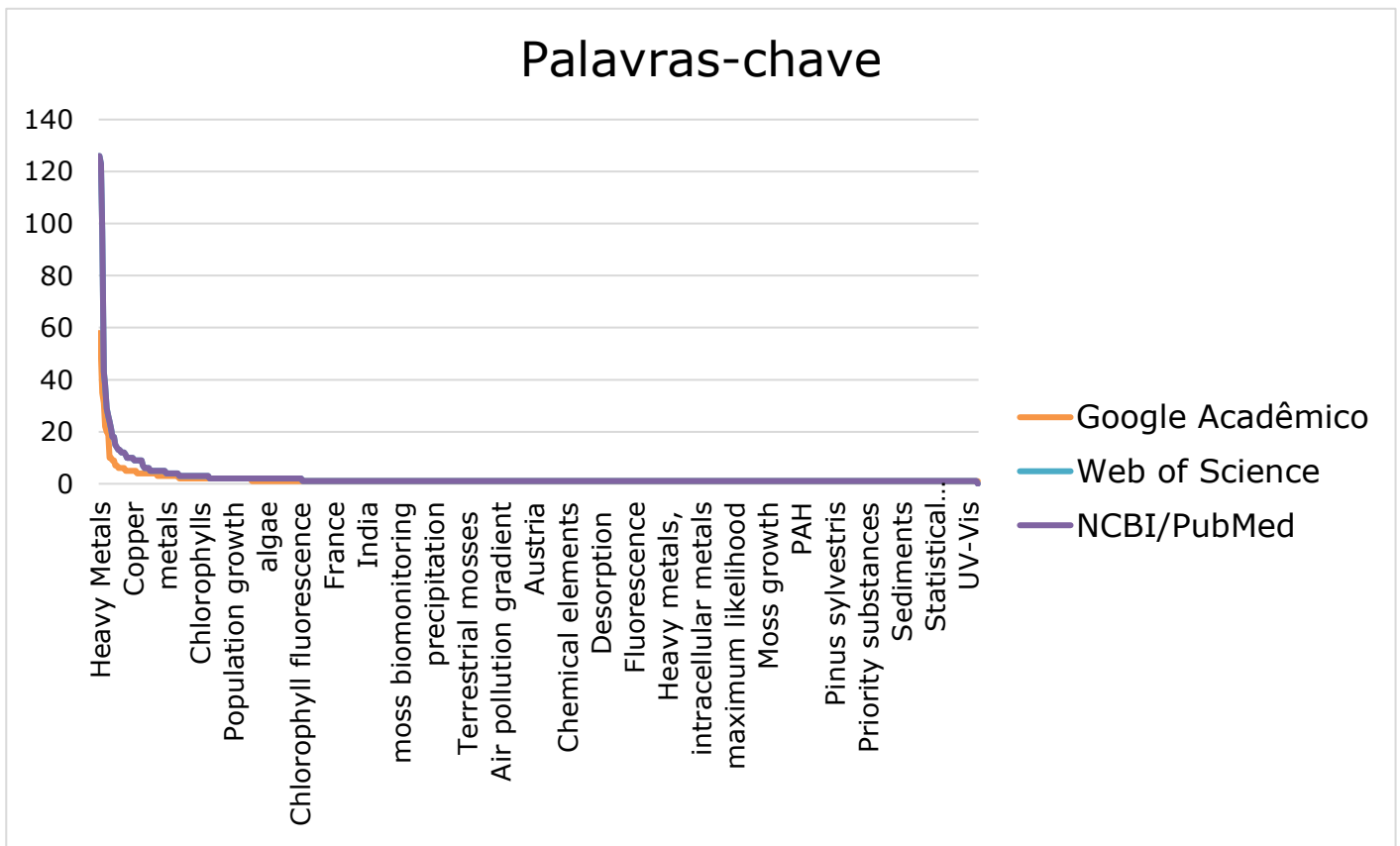
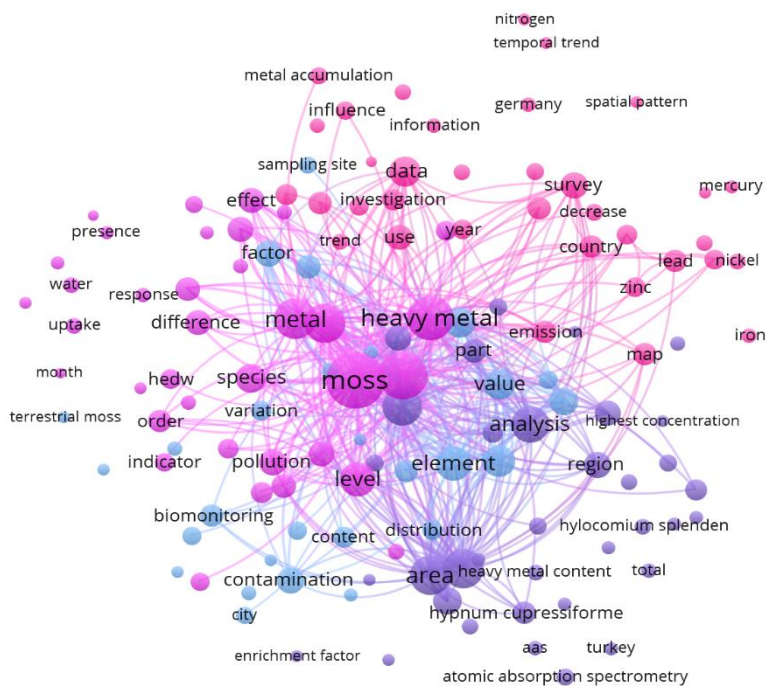


Gráfico D: Correlação entre as palavras-chave encontradas e o número de vezes que apareceram nos artigos buscados em cada plataforma.

Figura 1. Aglomerado de artigos sobre análise bibliométrica baseados na co-ocorrência de palavras-chave.



Dentro das nossas expectativas, estava encontrar biorremediação e biomonitoramento como principais assuntos relacionados a metais e musgos como, de fato, aconteceu, concretizando ainda mais a ideia de que musgos atuam de forma excelente como biorremediadores de solos contaminados por metais pesados como já citado em 2011 por Zvereva e Kozlov.

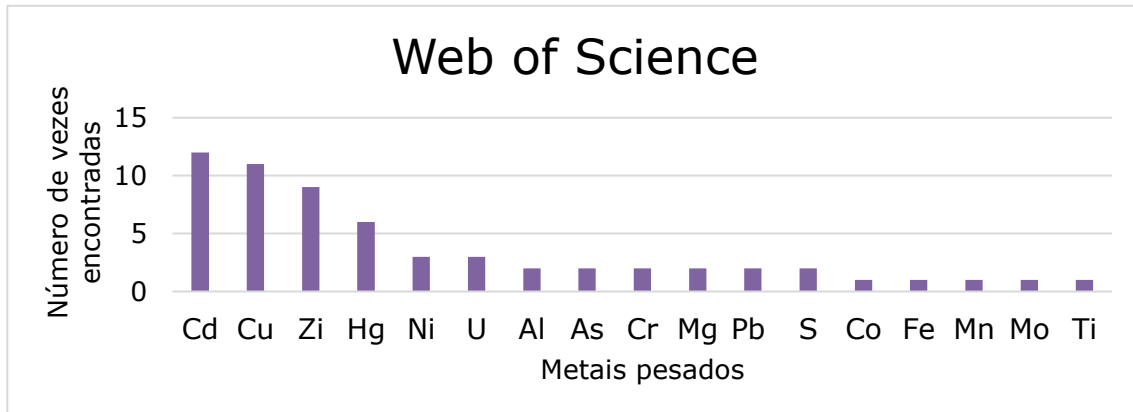


Gráfico E.1. Relação entre os principais metais pesados encontrados e o número de aparições nos artigos da plataforma Web of Science.

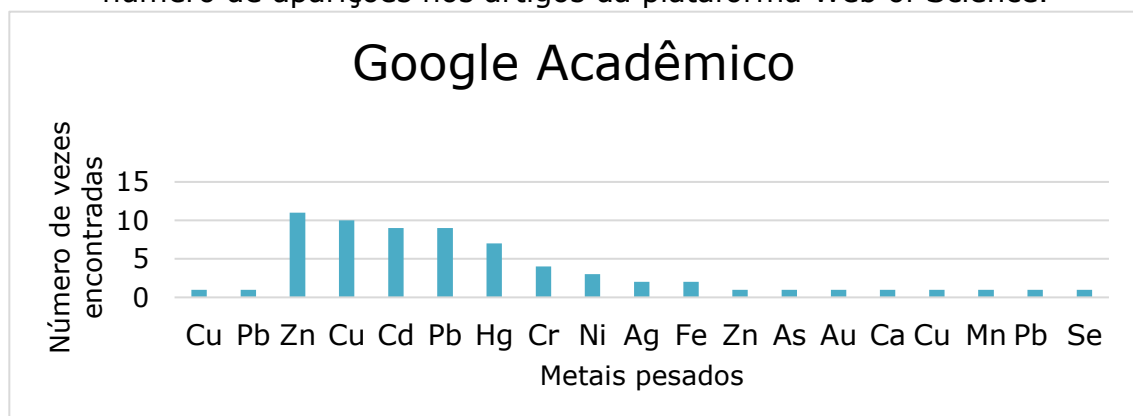


Gráfico E.2. Relação entre os principais metais pesados encontrados e o número de aparições nos artigos da plataforma Google Acadêmico.

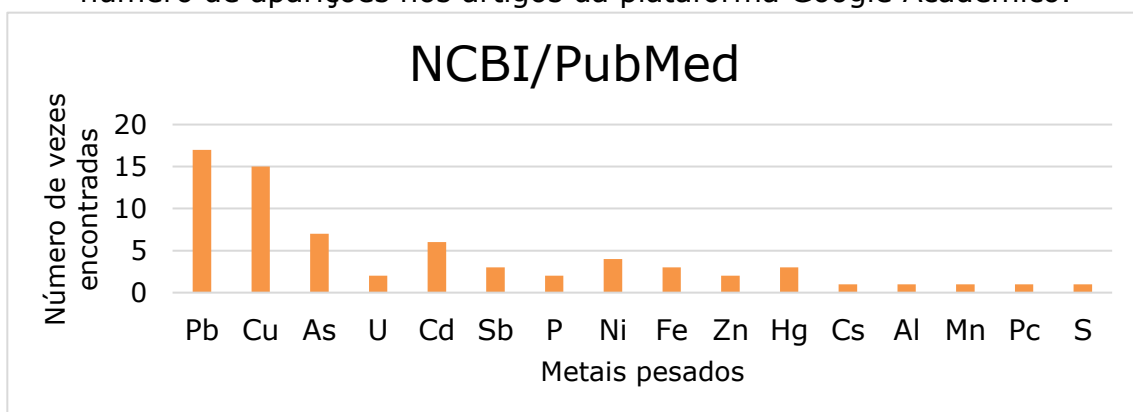


Gráfico E.3. Relação entre os principais metais pesados encontrados e o número de aparições nos artigos da plataforma NCBI/PubMed.

Quanto aos metais com maior correspondência encontram-se chumbo, cobre e cádmio que desde a Revolução Industrial sua produção vem aumentando exponencialmente. Metais tóxicos como o chumbo não são degradados na natureza, acumulando-se no solo e a seguir são lixiviados para as águas subterrâneas podendo contaminar diversos compartimentos ambientais e provocar impactos negativos persistentes durante várias décadas (ADAMU et al. 2015, MAHMOOD E MALIK, 2014; SHARMA E DUBEY, 2005). Recentemente, o Brasil presenciou o maior desastre ambiental da sua história no município de Mariana em Minas Gerais, onde houve o rompimento da barragem da mineradora Samarco e mais de 62.000.000 m³ de rejeitos de mineração foram liberados, atingindo 41 municípios, inclusive áreas estuarinas, aumentando os teores de metais em águas naturais e comprometendo espécies aquáticas (NEVES et al. 2016, SEGURA et al. 2016). Indústrias de processamento de minerais e de acabamento de metais também produzem grandes quantidades de efluentes contendo metais pesados, por exemplo, cádmio, zinco, cobre, chumbo, níquel e crômio. Mesmo para baixas concentrações o efeito destes metais pesados na saúde é agudo, sendo que a grande maioria deles podem ser bioacumulados.

O chumbo presente no solo pode causar efeitos diretos no desenvolvimento dos vegetais, comprometendo a germinação de sementes e o crescimento da planta, reduzindo a transpiração e a pressão osmótica da seiva celular, o potencial de água no xilema, o conteúdo de água, a absorção e transporte de nutrientes minerais, e, além disso, tem sido reportado evidências de que prejudica o desenvolvimento radicular (ALMEIDA et al., 2007). O chumbo tem sido apontado como um dos metais com maior potencial de toxicidade e é considerado um importante poluente ambiental (CAO et al., 2016, ALVES et al., 2014, LIU et al., 2013, ALMEIDA et al., 2011). Este metal não é essencial para as plantas ou animais e no ambiente encontra-se principalmente sob a forma particulada com relativamente baixa mobilidade e disponibilidade para ser utilizado. O chumbo, em geral, não é bioacumulável e não há um aumento da sua concentração nas cadeias alimentares. Sua mobilidade nas plantas é limitada e a maior parte localiza-se nas raízes e superfície das folhas. Como resultado, em muitos estudos experimentais de toxicidade do chumbo, foram necessárias elevadas concentrações de metal na ordem dos 100 a 1000 mg kg⁻¹ de solo para causar efeitos tóxicos visíveis na fotossíntese, crescimento, ou outros parâmetros. Assim, podemos concluir que o chumbo só afeta as plantas em locais com concentrações ambientais muito elevadas.

O cádmio (Cd) é um elemento químico relativamente raro, não encontrado em estado puro na natureza, sendo utilizado em ligas, indústrias automotivas, pigmentos, estabilizantes para plásticos de polivinil, baterias e fertilizantes fosfatados (MALAVOLTA, 1994). No ambiente, tende a se concentrar nos solos e nos sedimentos de sistemas aquáticos, tornando-se disponível ao sistema radicular de

plantas. Dessa maneira, o acúmulo de Cd nos tecidos de espécies vegetais aumenta o risco de transferência, por meio da cadeia alimentar, para seres humanos e animais (VECCHIA et al., 2005). A exposição de plantas a quantidades tóxicas de Cd resulta em rápido declínio da capacidade de absorção e acúmulo deste elemento pelas raízes, principalmente em função da redução generalizada do metabolismo (OLIVEIRA et al., 2001). Diversos estudos têm demonstrado que Cd causa diminuição da transpiração e da fotossíntese, aumento da taxa respiratória, clorose foliar, inibição do crescimento de raízes e da parte aérea e redução no acúmulo de matéria seca (KNECHT et al., 1994; SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001; SOLTAN & RASHED, 2003; VECCHIA et al., 2005). O Cd interfere em muitas funções celulares, principalmente pela formação de complexos com grupos externos de compostos orgânicos, tais como as proteínas, resultando na inibição de atividades essenciais (METWALLY et al., 2003). Além disso, pode provocar alterações nos sistemas antioxidantes, estimulando o acúmulo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e eventualmente morte celular (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001).

No seu trabalho sobre a acumulação de cádmio e cobre pelo musgo *Rhynchostegium riparioides*, Mersch et al. (1993) constataram a existência de uma relação linear entre a quantidade de Cd²⁺ e Cu²⁺ acumulada pelo musgo e a concentração média de metal na água e o tempo de exposição. Conclusões idênticas haviam sido obtidas em experiências de acumulação de Zn²⁺ por musgos aquáticos (EMPAIN, 1977; WEHR et al., 1987). As correlações altamente significativas entre as concentrações de metal nos musgos e na água no fim das fases de acumulação e de descontaminação sugerem que os musgos possam ser considerados como biomonitores adequados de ecossistemas de água doce contaminados por cádmio e cobre. O género *Fontinalis* é particularmente sensível ao cobre, exibindo clorose nas suas extremidades quando permanece de um dia para o outro em tubagens contaminadas. Para concentrações de 3 ppm, o cobre é geralmente tóxico, causando perda dos cloroplastos, elevadas concentrações de feofitina e uma aparência clorótica nas extremidades da planta. A 10 ppm ocorre plasmólise irreversível e as células perdem a cor. É relativamente insensível ao cádmio, não exibindo efeitos prejudiciais até níveis similares àqueles que são tolerados por invertebrados e peixes como citado na literatura por Crum, 1981.

5. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho podemos concluir o quão recente é a pesquisa que envolve musgos e metais pesados, embora, como apontado pelos estudos, estes atuem muito bem como biorremediadores, além de nos dar uma noção sobre as principais revistas científicas que publicam sobre o tema e qual a plataforma de pesquisa mais apropriada. Sendo a Web of Science, a plataforma com resultados mais específicos e a Science of the total environment a principal revista onde artigos sobre o tema são publicados. Esta pesquisa serve também como ponto de partida para trabalhos envolvendo a temática metais e musgos.

6. REFERÊNCIAS

- Adamu CI, Nganje TN, Edet A. 2015. Heavy metal contamination and health risk assessment associated with abandoned barite mines in Cross River State, southeastern Nigeria. *Environmental Nanotechnology, Monitoring e Management* 3 10–21.
- Almeida AAF, Valle RR, Mielke MS, Gomes FP. 2007. Tolerance and prospection of phytoremediator woody species of Cd, Pb, Cu and Cr. *Braz J Plant Physiol* 19:83–98.
- Almeida AAF, Mielke MS, Gomes FP, Gomes LMC, Mangabeira PAO, Valle RR. 2011. Phytoremediation of Cd, Pb and Cr by woody plants. In: Golubev IA (ed) *Handbook of phytoremediation*. Nova Science Publishers, New York, pp 529–550.
- Alves LQ, de Jesus RM, de Almeida A. F., Souza VL, Mangabeira PAO. 2014. Effects of lead on anatomy, ultrastructure and concentration of nutrients in plants *Oxycaryum cubense* (Poep. & Kunth) Palla: a species with phytoremediator potential in contaminated watersheds. *Environ Sci Pollut Res*, 21: 6558.
- Agarwal, S. K., 2009: Heavy metal pollution (Vol. 4). APH publishing, New Delhi.
- Berg T., Røyset O., Steinnes E., 1995: Moss (*Hylocomium splendens*) used as biomonitor of atmospheric trace element deposition: estimation of uptake efficiencies. *Atmospheric Environment* 29, 353-360.
- Berg, T., Steinnes E., 1997: Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleuroziumscreberi*) as biomonitors of heavy metal deposition: from relative to absolute deposition values. *Environmental Pollution* 98, 61-71.
- Boquete, M. T., Bermúdez-Crespo, J., Aboal, J. R., Carballeira, A., Fernández, J. Á., 2014: Assessing the effects of heavy metal contamination on the proteome of the moss *Pseudoscleropodium purum* cross-transplanted between different areas. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2191-2200.
- Carginale, V., Sorbo, S., Capasso, C., Trinchella, F., Cafiero, G., Basile, A., 2004: Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma* 223, 53-61.
- Castello, M., 2007: A comparison between two moss species used as transplants for airborne trace element biomonitoring in NE Italy. *Environmental Monitoring and Assessment* 133, 267-276.
- Cao S, Duan X, Zhao X, Chen Y, Wang B, Sun C, Zheng B, Wei F. 2016. Health risks of children's cumulative and aggregative exposure to metals and metalloids in a typical urban environment in China. *Chemosphere* 147, 404 e 411.
- Chakraborty, S., Paratkar, G. T., 2006: Biomonitoring of trace element air pollution using mosses. *Aerosol and Air Quality Research* 6, 247-258.
- de Souza, Terezinha Batista, Maria Elizabete Catarino, and Paulo Cesar dos Santos. "Metadados: catalogando dados na Internet." *Transinformação* 9.2 (2012).
- Crum H A, Anderson L E. *Mosses of Eastern North America*. Columbia Univ Press, Vol. 2, New York, 1981.
- Degola, F., De Benedictis, M., Petraglia, A., Massimi, A., Fattorini, L., Sorbo, S., Basile, A., di Toppi L. S., 2014: A Cd/Fe/Zn-responsive phytochelatin synthase is constitutively present in the ancient liverwort *Lunularia cruciata* (L.) Dumort. *Plant and Cell Physiology* 55, 1884-1891.
- Degola, F., De Benedictis, M., Petraglia, A., Massimi, A., Fattorini, L., Sorbo, S., Basile, A., di Toppi L. S., 2014: A Cd/Fe/Zn-responsive phytochelatin synthase is constitutively present in the ancient liverwort *Lunularia cruciata* (L.) Dumort. *Plant and Cell Physiology* 55, 1884-1891.
- Empain AM. *Ecologie des populations bryophytiques aquatiques de la Meuse, de la Sambre et de le Somme. Relations avec la qualité des eaux, écophysologie comparée et étude de la contamination par métaux lourds*. PhD diss, Uni Liège, Belgium, 1977;179p.
- Fernández, J. Á., Pérez-Llamazares, A., Carballeira, A., Aboal J. R., 2013: Temporal variability of metal uptake in different cell compartments in mosses. *Water, Air, Soil Pollution* 224, 1-9.
- Fernández, J. Á., Pérez-Llamazares, A., Carballeira, A., Aboal J. R., 2013: Temporal variability of metal uptake in different cell compartments in mosses. *Water, Air, Soil Pollution* 224, 1-9.
- González, A. G., Pokrovsky, O. S., 2014: Metal adsorption on mosses: toward a universal adsorption model. *Journal of Colloid and Interface Science* 415, 169-178.
- González, A. G., Pokrovsky, O. S., 2014: Metal adsorption on mosses: toward a universal adsorption model. *Journal of Colloid and Interface Science* 415, 169-178.
- Järup, L., 2003: Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68, 167-182.
- Kelly, M. G., Girton, C., Whitton B. A., 1987: Use of moss-bags for monitoring heavy metals in rivers. *Water Research* 21, 1429-1435.
- Knecht, J.A.; van Dillen, M.; Koevoets, P.L.M.; Schat, H.; Verkleij, J.A.C. & Ernst, W.H.O. 1994. Phytochelatin in cadmiumsensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris*. *Plant Physiology* 104: 255-261.

- Koz B., Cevik U., 2014: Lead adsorption capacity of some moss species used for heavy metal analysis. *Ecological Indicators* 36, 491-494.
- Krzyszowska, M., 2011: The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 35-51.
- Lee Jr, R. E., Von Lehmden, D. J., 1973: Trace metal pollution in the environment. *Journal of the Air Pollution Control Association* 23, 853-857.
- Little, P., Martin, M. H., 1974: Biological monitoring of heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 6, 1-19.
- Liu XM, Song QJ, Tang Y, Li WL, Xu JM, Wu JJ, Wang F, Brookes PC. 2013. Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: a multi-medium analysis. *Science of the Total Environment*.463-464, 530-540.
- Maevskaia, S. M., Kardash, A. R., Demkiv, O. T., 2001: Absorption of cadmium and lead ions by gametophyte of the moss *Plagiomnium undulatum*. *Russian Journal of Plant Physiology* 48, 820-824.
- Mahmood A, Malik RN. 2014. Human health risk assessment of heavy metals via consumption of contaminated vegetables collected from different irrigation sources in Lahore, Pakistan. *Arabian Journal of Chemistry*, 7, 91-99.
- Malavolta, E. 1994. *Fertilizantes e seu impacto ambiental, micronutrientes e metais pesados: Mitos, Mistificação e Fatos*. São Paulo, ProduQuímica.
- Markert, B., Weckert, V., 1989: Use of *Polytrichum formosum* (moss) as a passive biomonitor for heavy metal pollution (cadmium, copper, lead and zinc). *Science of the Total Environment* 86, 289-294.
- Martin, M. H., Coughtrey P. J, 1982: *Biological monitoring of heavy metal pollution: land and air*. Applied Science, London.
- Mersch J, Morhain E, Mouvet C. Laboratory accumulation and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere* 1993;27(8):1475-85.
- Metwally, A.; Finkemeier, I.; Georgi, M. & Diezt, K-J. 2003. Salicylic acid alleviates the cadmium toxicity in barley seedlings. *Plant Physiology* 132: 272-281.
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., Sreekanth, T. V. M., 2010: Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters* 8, 199-216.
- Neves ACO, Nunes FP, Carvalho FA, Fernandes GW. 2016. Neglect of ecosystems services by mining, and the worst environmental disaster in Brazil. *Natureza e Conservação*. 14. 24-27.
- Nickrent, D. L., Parkinson, C. L., Palmer, J. D., Duff R. J., 2000: Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1885-1895.
- Nieboer, E., Richardson, D. H., 1980: The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution Series B, Chemical and Physical* 1, 3-26.
- Onianwa, P. C., 2001: Monitoring atmospheric metal pollution: a review of the use of mosses as indicators. *Environmental Monitoring and Assessment* 71, 13-50.
- Panda, S. K., Choudhury, S., 2005: Changes in nitrate reductase activity and oxidative stress response in the moss *Polytrichum commune* subjected to chromium, copper and zinc phytotoxicity. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 191-197.
- Oliveira, J.A.; Cambraia, J.; Cano, M.A.O. & Jordão, C.P. 2001. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13: 329-341
- Reski, R., 1998: Development, genetics and molecular biology of mosses. *Botanica Acta* 111, 1-15.
- Salemaa, M., Derome, J., Helmisaari, H. S., Nieminen, T., Vanha-Majamaa, I., 2004: Element accumulation in boreal bryophytes, lichens and vascular plants exposed to heavy metal and sulphur deposition in Finland. *Science of the Total Environment* 324, 141-160.
- Sassmann, S., Wernitznig, S., Lichtscheidl, I. K., Lang, I., 2010: Comparing copper resistance in two bryophytes: *Mielichhoferia elongata* Hornsch. versus *Physcomitrella patens* Hedw. *Protoplasma* 246, 119-123.
- Schröder, W., Holy, M., Pesch, R., Harmens, H., Ilyin, I., Steinnes, E., Alber, R., Aleksiyenak, Y., Blum, O., Coşkun, M., Dam, M., 2010: Are cadmium, lead and mercury concentrations in mosses across Europe primarily determined by atmospheric deposition of these metals? *Journal of Soils and Sediments* 10, 1572-1584.
- Schützendübel, A.; Schwanz, P.; Teichmann, T.; Gross, K.; LangenfeldHeyser, R.; Godbold, D.L. & Polle, A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology* 127: 887-898.

- Segura FR, Nunes EA, Paniz FP, Paulelli ACC, Rodrigues GB, Braga GUL, Filho WRP, Barbosa Jr. F, Cerchiaro G, Silva FF, Batista BL. 2016. Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution V* 218, Pages 813–825.
- Shakya, K., Chettri, M. K., Sawidis, T., 2008: Impact of heavy metals (copper, zinc, and lead) on the chlorophyll content of some mosses. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 54, 412-421.
- Sharma P, Dubey RS. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz J Plant Physiol* 17:35–52.
- Shaw, A. J., Szövényi, P., Shaw, B., 2011: Bryophyte diversity and evolution: windows into the early evolution of land plants. *American Journal of Botany* 98, 352-369
- Shaw, A. J., Szövényi, P., Shaw, B., 2011: Bryophyte diversity and evolution: windows into the early evolution of land plants. *American Journal of Botany* 98, 352-369.
- Shaw, J., 1987: Evolution of heavy metal tolerance in bryophytes. II. An ecological and experimental investigation of the" copper moss, *Scopelophila cataractae* (Pottiaceae). *American Journal of Botany* 74, 813-821.
- Shaw, J., Beer, S. C., Lutz, J., 1989: Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. I. Variation within and among populations. *Bryologist* 92, 73-80.
- Shaw, J., Renzaglia, K., 2004: Phylogeny and diversification of bryophytes. *American Journal of Botany* 91, 1557-1581.
- Singh, R., Gautam, N., Mishra, A., Gupta, R., 2011: Heavy metals and living systems: an overview. *Indian Journal of Pharmacology* 43, 246-253.
- Strotbek, C., Krinninger, S., Frank, W., 2013: The moss *Physcomitrella patens*: methods and tools from cultivation to targeted analysis of gene function. *International Journal of Developmental Biology* 57, 553-564.
- Soltan, M.E. & Rashed, M.N. 2003. Laboratory study on the survival of water hyacinth under several conditions of heavy metal concentrations. *Advances in Environmental Research* 7: 321-334.
- Sun, S. Q., He, M., Cao, T., Zhang, Y. C., Han, W., 2009: Response mechanisms of antioxidants in bryophyte (*Hypnum plumaeforme*) under the stress of single or combined Pb and/or Ni. *Environmental Monitoring and Assessment* 149, 291-302.
- Tipping, E., Vincent, C. D., Lawlor, A. J., Lofts, S., 2008: Metal accumulation by stream bryophytes, related to chemical speciation. *Environmental Pollution* 156, 936-943.
- Tremper, A. H., Agneta, M., Burton, S., Higgs, D. E., 2004: Field and laboratory exposures of two moss species to low level metal pollution. *Journal of Atmospheric Chemistry* 49, 111-120.
- Varela, Z., Roiloa, S. R., Fernández, J. A., Retuerto, R., Carballeira, A., Aboal J. R., 2013: Physiological and growth responses of transplants of the moss *Pseudoscleropodium purum* to atmospheric pollutants. *Water, Air & Soil Pollution* 224, 1-10.
- Vazquez, M. D., Lopez, J., Carballeira, A., 1999: Uptake of heavy metals to the extracellular and intracellular compartments in three species of aquatic bryophyte. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 12-24.
- Vecchia, F.D.; La Rocca, N.; Moro, I.; De Faveri, S.; Andreoli, C. & Rascio, N. 2005. Morphogenetic ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. *Plant Science* 168: 329-338.
- Wells, J. M., Brown, D. H., 1990: Ionic control of intracellular and extracellular Cd uptake by the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst. *New Phytologist* 116, 541-553.
- Wehr JD, Kelly MG, Whitton BA. Factors affecting accumulation and loss of zinc by the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Aquat Bot* 1987;29:261-74.
- Wolterbeek, B., 2002: Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives. *Environmental Pollution* 120, 11-21.
- Zechmeister, H. G., Dirnböck, T., Hülber, K., Mirtl M., 2007: Assessing airborne pollution effects on bryophytes—lessons learned through long-term integrated monitoring in Austria. *Environmental Pollution* 147, 696-705.
- Zechmeister, H. G., Hohenwallner, D., Riss, A., Hanus-Illnar, A., 2003: Variations in heavy metal concentrations in the moss species *Abietinella abietina* (Hedw.) Fleisch. according to sampling time, within site variability and increase in biomass. *Science of the Total Environment* 301, 55-65.
- Zvereva, E. L., Kozlov, M. V., 2011: Impacts of industrial polluters on bryophytes: a meta-analysis of observational studies. *Water, Air & Soil Pollution* 218, 573-586.

Avaliação da eficiência de *Physcomitrium acutifolium* Broth. como fitorremediador de ferro *in vitro*

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Bryophyta Sensu Lato*

O segundo maior grupo de plantas terrestres verdes é representado pela superdivisão *Bryophyta*, composta por plantas pequenas conhecidas como hepáticas, antóceros e musgos (DE ALMEIDA et al., 2010). Essas plantas preferem desenvolvem-se, em sua maioria, em locais úmidos, pois a fecundação depende da presença de água (DE ALMEIDA et al., 2010; SAXENA, 2004). São criptógamas (sem flores), avasculares (sem um sistema de condução) e como não se encaixam no grupo das cormófitas (com folhas, caule ou raízes verdadeiras) são consideradas poiquilohídricas, pois não possuem uma estrutura especializada na regulação e controle sobre a sua perda de água (DE ALMEIDA et al., 2010). Existem desde o Paleozoico (300 milhões de anos) sendo assim, pertencentes as mais antigas linhagens de plantas terrestres (DE ALMEIDA et al., 2010). São conhecidas como "conservativas" pois se mantiveram sem muitas mudanças e com taxas de evolução relativamente baixas desde então (DE ALMEIDA et al., 2010). Habitavam os mais diferentes ambientes, desde os pântanos do Devoniano até as florestas do Permiano, desde os desertos do Mesozoico até as florestas tropicais do Terciário (GRADSTEIN et al., 2001). Ganham destaque como indicadoras das mudanças ambientais, porque em geral reagem facilmente as alterações climáticas (GRADSTEIN et al., 2001).

1.2 Ciclo de vida

As briófitas possuem um chamado ciclo haplodiplobionte, que é caracterizado pela alternância de duas gerações diferentes (DE ALMEIDA et al., 2010). A geração livre e dominante é a gametofítica (n) que também é produtora de gametas, e a esporofítica ($2n$) é dependente do gametófito, permanecendo aderida a este e retirando dele os nutrientes para o seu desenvolvimento, e é também produtora de esporos por meiose (DE ALMEIDA et al., 2010; COVE, 2005). Esses esporos ao germinar produzem o protonema que é uma estrutura filamentosa, globosa ou talosa de onde se origina o gametófito, que é haploide, pequeno, taloso ou folhoso e se encontra fixo no substrato pelos rizoides (DE ALMEIDA et al., 2010). Segundo Morris et al., 2018, as briófitas podem ser uma linhagem irmã das traqueófitas, que possuem raízes de fato, e do ponto de vista genômico, essas podem ter evoluído a partir das briófitas.

1.3 *Bryophyta Sensu Strictu: Physcomitrium acutifolium* Broth.

Os musgos diferem das hepáticas e dos antóceros pelas características macroscópicas dos seus gametófitos que são compostos por caulídeos com filídios dispostos espiraladamente, costados ou não, não divididos ou lobados, e do esporófito que apresenta seta pigmentada e firme que eleva a cápsula composta por opérculo e dentes (peristômio) que regulam a dispersão dos esporos (DE ALMEIDA et al., 2010). A espécie de musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. é nativo do Rio Grande do Sul, estando presente em regiões de Mata Atlântica do Brasil, abrangendo os estados do Rio de Janeiro até

o Rio Grande do Sul (COSTA et al., 2005; COSTA et al., 2011). Ele possui rápido desenvolvimento *in vitro* para realização dos testes de cultivo em laboratório, além de possibilitar comparações a nível de genoma com o organismo modelo que possui seu genoma já sequenciado, a *Physcomitrella patens* (Hedw.) Brunch&Schimp, por ambos serem pertencentes da Família Funariaceae (RESKI; FRANK, 2005). Estudos filogenéticos baseados em análises de sequências de DNA do cloroplasto mostraram que o gênero *Physcomitrium* está intimamente ligado ao *Physcomitrella* (GOFFINET, 2000; GOFFINET et al., 2007; WERNER et al., 2007).

1.4 Estresse abiótico em cultivos *in vitro*

Muitas espécies de musgos conseguem sobreviver e se adaptar a diferentes e elevados níveis de estresse biótico como insetos-praga, fungos, bactérias, vírus e nematóides e por fatores abióticos, como o déficit hídrico. Devido a sua capacidade de acumular poluentes nocivos em sua biomassa, são conhecidos por atuarem como indicadores de poluição ambiental por metais pesados. (ACETO et al., 2003). O mecanismo de dano oxidativo induzido por metais pesados tem sido amplamente estudado em plantas superiores, entretanto, são escassos os estudos que tratam desse estresse oxidativo em briófitas (PANDA 2003; CHOUDHURY; PANDA, 2004). Assim, a cultura de tecido vegetal, é uma ferramenta importante para o conhecimento de diversas respostas das plantas à estresses, sob o cuidado do cultivo axênico, não influenciando nos resultados obtidos. Através da cultura asséptica de células, tecidos, órgãos e seus componentes sob condições *in vitro* físicas e químicas definidas, é possível simular algum tipo de estresse (como por metais pesados) para a planta, tornando possível seu estudo e entendimento. A base teórica para cultura de tecidos foi proposta por Gottlieb Haberlandt em 1902 com o seu experimento sobre cultura de células isoladas (THORPE, 2007).

1.5 Metais pesados e sua origem nas matrizes ambientais

Os metais pesados são elementos naturais dos solos devido ao intemperismo e processos pedogênicos em rochas e até mesmo no material de origem do solo, onde, normalmente, ocorrem em concentrações baixas. Entretanto, ações antrópicas como mineração, refino de minério, industrialização, o rápido crescimento populacional, a produção de rejeitos antrópicos e agroquímicos têm aumentado o risco de poluição do solo (BISINOTI et al. 2004, SANTOS 2005). Uma vez introduzidos no meio ambiente, eles são difíceis de serem removidos e tendem a se acumular nos tecidos de plantas e outros organismos através das cadeias alimentares, o que os torna "bioacumuláveis" (MAEVSKAYA et al. 2001). Um exemplo recente da poluição foi o rompimento da barragem de Mariana lançou trinta e quatro milhões de metros cúbicos de lama no ambiente (IBAMA 2015) e com a velocidade da lama proveniente do rompimento da barragem, os sedimentos de fundo do rio foram revolvidos. Assim percebe-se como seria importante um estudo detalhado do novo cenário geoquímico de áreas degradadas como esta citada acima.

1.6 Ferro, solo e plantas

O pH do solo influencia na disponibilidade e absorção do ferro pelas plantas, assim como a presença ou ausência de matéria orgânica (LABORSOLO, 2013). Quando o pH se encontra acima de 6.0 ocorre uma drástica diminuição na absorção através da precipitação dos compostos tornando-se limitante ao crescimento das plantas. Ademais, para que possa ser absorvido pelas plantas, o ferro precisa sofrer uma redução da forma férrica (Fe^{3+}) para a ferrosa (Fe^{2+}) que pode acontecer após o intemperismo no solo. A Oxidase-redutase de ferro (FRO), uma proteína envolvida no processo de transporte de ferro, é responsável pela redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} . O Fe^{2+} é a forma solúvel deste metal, e possível de ser absorvido pelas plantas. A presença do gene codificador desta proteína determina a capacidade da planta em transformar o ferro na sua forma solúvel, assim sendo muito importante (JAIN et al, 2014). O ferro participa da ativação e formação de enzimas, atua no desenvolvimento de troncos e raízes, age como catalisador na biossíntese da clorofila além de influenciar na fixação do nitrogênio, apresentando papel fundamental para os organismos vivos. (LABORSOLO, 2013).

1.7 Toxidez por ferro

Em áreas com solo contaminado por metais pesados geralmente ocorrem danos ao meio ambiente (RIBEIRO FILHO et al., 1999), devido ao impacto sobre a vegetação, sobre os organismos e processos do solo (KLAUBERG-FILHO et al., 2002). A destruição da cobertura vegetal facilita a dispersão das partículas de solo facilitando a formação de erosão, alterando o balanço hídrico e podendo aumentar o volume de água que percola no solo, permitindo que a contaminação (de água e partículas do solo) atinja o lençol freático e os corpos d'água (VANGRONVELD et al., 1995). As plantas podem usar duas estratégias para trabalhar com teores elevados de metais no meio radicular, sendo elas: a exclusão, mecanismo pelo qual a absorção ou a translocação do metal das raízes para a parte aérea é restringida; e mecanismos internos de tolerância, pelos quais a planta imobiliza, compartimentaliza ou desintoxica metais no simplasma mediante a produção de compostos complexantes (YANG et al., 2005b). Quando em excesso o ferro induz as células a produzirem radicais de hidroxila que podem danificar lipídios, proteínas e o DNA (CONNOLLY, 2002).

1.8 Biorremediação, fitorremediação e fitoextração

A biorremediação é definida como o processo pelo qual os resíduos orgânicos tóxicos são retirados ou modificados em uma matriz ambiental através do uso de organismos biológicos (VIDALI, 2001). Esses compostos contaminantes são transformados pelos organismos vivos através de reações que ocorrem como parte de seus processos metabólicos (VIDALI, 2001). A recuperação de áreas contaminadas por metais pesados visa minimizar ou evitar a dispersão dos contaminantes para outros nichos ecológicos e a contaminação da população humana (CURI, 2000). Na literatura constam duas formas de biorremediação: a microbiana e a fitorremediação, foco do presente

trabalho, que consiste em procedimentos que envolvem o emprego de plantas e sua microbiota associada (CURI, 2000). Dentro da fitorremediação estão incluídas ainda três diferentes técnicas como: a fitoextração, que é uso de plantas para remoção de metais dos solos mediante absorção pelas raízes, transporte e concentração na biomassa; a fito estabilização que é o uso de plantas para minimizar a mobilidade de metais em solos contaminados mediante a acumulação nas raízes ou precipitação na rizosfera; e fito volatilização que é baseada na capacidade das plantas para volatilizar metais no solo, aplicável a Se e Hg (LASAT, 2002; McGRAHTet al., 2002; ERNST, 2005).

1.9 Recuperação de áreas degradadas

O método de revegetação apresenta vantagens, dada a sua natureza permanente combinada aos baixos custos de manutenção, a proteção contra a erosão eólica e hídrica, a melhoria na estrutura e fertilidade do solo e a recuperação da estética das áreas (RIBEIRO et al., 2000). Entretanto, devido a toxicidade alta dos metais pesados, a sobrevivência e o crescimento das plantas são limitados em áreas contaminadas (RIBEIRO et al., 2000). Assim, o reestabelecimento da funcionalidade dos ecossistemas degradados presume o conhecimento da importância de macro e microcomponentes acima e abaixo da superfície do solo e da tolerância das espécies biológicas aos contaminantes presentes em formas disponíveis (RIBEIRO et al., 2000). O sucesso da fitoextração de metais no solo depende da habilidade das plantas em produzir biomassa e acumular metais sob condições climáticas e de solo da área a ser remediada (RIBEIRO et al., 2000), assim como, para que seja considerada um bom fitorremediador a planta precisa suportar níveis altos de metais sem que estes a afetem negativamente. Devido à sua distribuição generalizada e à capacidade de acumular grandes quantidades de metais pesados, as briófitas têm sido usadas como um importante sistema de monitoramento biológico para a poluição por metais pesados desde 1968 (TREMPEL et al. 2004). A relativa simplicidade dessas plantas faz delas um modelo importante para a investigação de alterações morfológicas e a nível de genoma em plantas devido à toxicidade de metais pesados (CARGINALE et al. 2004).

1.10 Soluções nutritivas de ferro

A maior parte dos metais em solos encontram-se em formas pouco solúveis ou disponíveis (RIBEIRO et al., 2000). Assim as condições do solo têm de ser alteradas para que ocorra a fitoextração, visto que esta depende da abundância relativa do metal solúvel para que ocorra absorção e translocação deste na planta (RIBEIRO et al., 2000). Para isso, alguns quelantes orgânicos sintéticos têm sido utilizados para favorecer essa solubilização. O EDTA sal dissódico (Na_2EDTA) é provavelmente o quelante mais estudado (RIBEIRO et al., 2000). A formação de complexos quelante-metal previne a precipitação e a sorção dos metais, mantendo a disponibilidade para absorção pelas plantas (RIBEIRO et al., 2000). Um problema significativo das soluções nutritivas feitas em laboratório simulando o

estresse por ferro é a disponibilidade desse elemento, especialmente em altas concentrações. Quando fornecido na forma de um sal inorgânico como FeSO_4 ou $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$ sem adição de EDTA, o ferro pode precipitar da solução como hidróxido de ferro e essa precipitação torna-o fisicamente indisponível à planta (RIBEIRO et al., 2000).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atuação do musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. como fitorremediador de ferro *in vitro*, verificando principalmente se a espécie sofre alterações fenotípicas como resposta as diferentes concentrações de ferro no meio.

2.2 Objetivos específicos

Inferir sobre as principais alterações em situações de toxidez por ferro, simuladas em meio de cultura em laboratório.

Analisar a correlação entre o comprimento e peso dos gametófitos, além dos tamanhos dos seus rizoides, com o aumento do teor de ferro.

3. MATERIAL, TÉCNICAS E MÉTODOS

3.1 Amostras

As amostras de *Physcomitrium acutifolium* foram retiradas dos cultivos pré-estabelecidos no laboratório Núcleo de Estudos da Vegetação Antártica (NEVA) na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) *campus* São Gabriel, onde estavam mantidos em uma estufa de fotoperíodo a $\pm 20^{\circ}\text{C}$ com 8h luz e 16h escuro.

3.2 Solução nutritiva de Fe-EDTA

A solução de $\text{FeSO}_4 + \text{EDTA}$ foi preparada seguindo o protocolo de DOS SANTOS, 2017. Foram dissolvidos 50 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 450 ml de água e 60g de Na_2EDTA em 450 ml. As soluções foram aquecidas a 70°C em banho maria para melhor diluição. Após junta-las, o volume foi ajustado para 1L e a solução ficou borbulhando durante 12h e depois mantida envolta em alumínio. Como a concentração desta solução estava em 10mg/ml de ferro a mesma teve que ser diluída conforme a concentração desejada em cada tratamento.

3.3 Preparação dos meios de cultura e cultivo dos gametófitos

Foram preparados meios de cultura MS (MURASHIGE E SKOOG, 1962) sem adição de ágar com diferentes concentração de Fe-EDTA. Para a preparação de 1 litro, o meio MS foi suplementado com sacarose ($30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) e mio-inositol ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), autoclavado por 20 minutos a 121°C e 1 atm. para esterilização. O meio MS contém, além de $27.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de ferro, 74g de magnésio, 3,38g de manganês, 1,72g de zinco, 95g potássio, 82,5g nitrato de amônio, 5mg de cobre, 82,12g de cloro, 1,24g de boro e 34g de fosforo. Os tratamentos foram: o controle (tratamento 1) que, sem adição da solução de Fe-EDTA, já possui $27.8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, o tratamento 2 que possuía $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (o equivalente a 0,2ml da solução de Fe-EDTA), o tratamento 3 com $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (1,5ml) e tratamento 4 com $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (3ml). Os 4 tratamentos foram feitos em trélicas, totalizando 12 vidros e em cada um deles foram transferidos seis gametófitos de 6mm de comprimento, os vidros foram vedados e mantidos em uma mesa agitadora Tecnal® durante 7 dias.

Tabela 1: Concentrações de Fe-EDTA em cada tratamento para 1L de meio MS

Tratamento	[] de Fe-EDTA / L	Quantidade da solução de FeEDTA
1	27.8mg	-
2	50mg	0.2ml
3	300mg	1.5ml
4	600mg	3ml

3.4 Análise dos resultados

3.4.1 Imagens

Foram feitas fotografias na câmera AxioCamERc5s da lupa Zeiss para melhor visualização e comparação dos gametófitos dos diferentes tratamentos.

3.4.2 Comprimento e biomassa

O comprimento de cada gametófito foi medido utilizando paquímetro Mitutoyo® de alta precisão, para a biomassa eles foram pesados na balança analítica de alta precisão Bioscale® e depois foram feitas as médias de ambas análises no programa Excel (MICROSOFT, 2013) e os gráficos box-plot no programa R Studio (R Core Team, 2018) através do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO, 1965), utilizando o pacote ggplot (WICKHAM H., 2016). Os valores de p para o teste de Shapiro foram 0,002545 para o comprimento e $1,035^{-0,5}$ para o peso.

3.4.3 Scanner

O comprimento dos gametófitos, projeção de área, área superficial, diâmetro e tamanho dos rizóides foram analisados através do scanner Epson Expression 10000XL com o software WinRhizo (ARSENAULT, J. et al., 1995) da Regent Instruments no qual todos os gametófitos foram inseridos tratamento por tratamento. Para a avaliação dos rizóides, foram analisados cada um dos seis gametófitos por tréplica e depois estipulada uma média entre os resultados no programa Excel (MICROSOFT, 2013) e o gráfico box-plot foi feito no programa R Studio (R Core Team, 2018) através do teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO, 1965), utilizando o pacote ggplot (WICKHAM H., 2016). O valor de p para o teste de Shapiro foi de 0,3767.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Imagens dos gametófitos após 7 dias

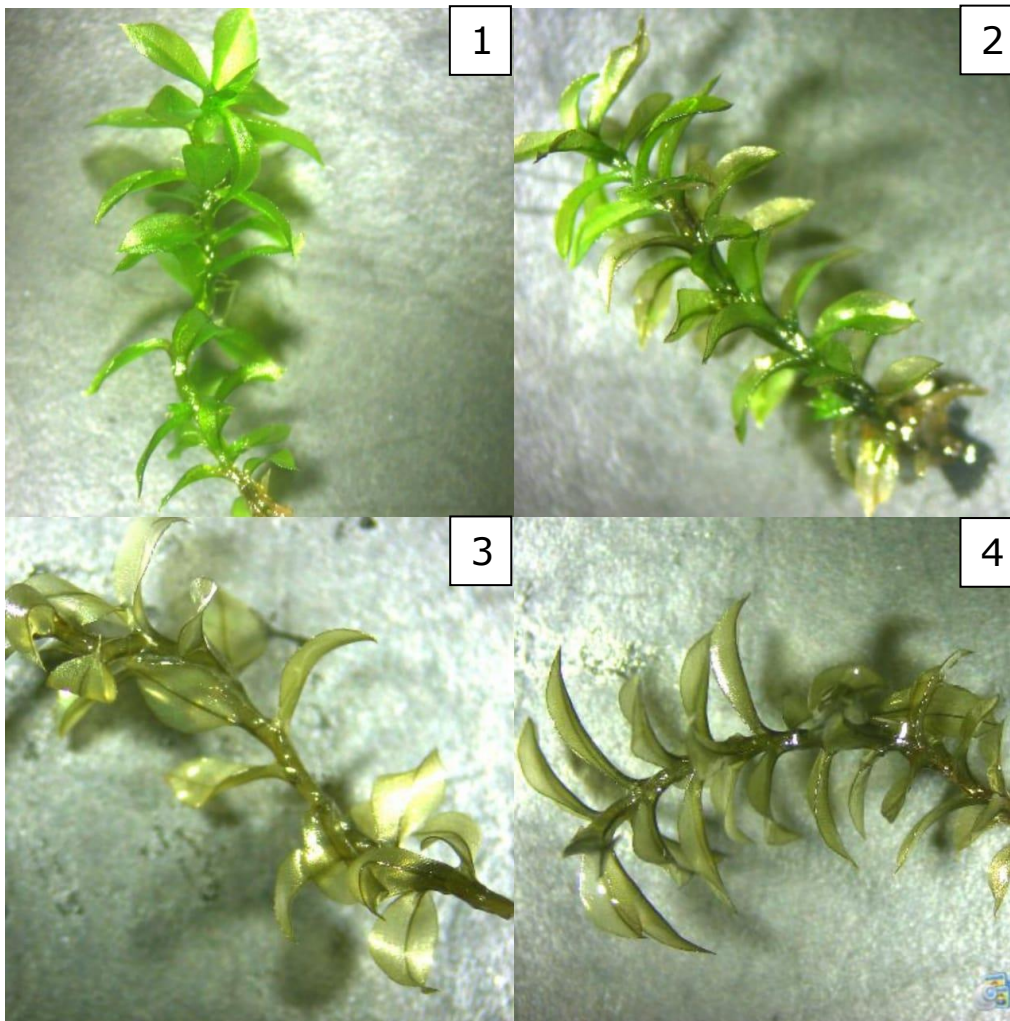


Figura 1: Imagem comparativa com explantes de cada tratamento lado a lado para melhor visualização de alterações na planta. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente. Fonte: autor.

De acordo com o que se pode ser observado na figura 1, a concentração de ferro no meio influencia na aparência dos gametófitos, principalmente quando este se encontra em excesso. Os sintomas de toxidez por ferro podem ser observados a olho nu nas plantas mesmo à vista desarmada. O sintoma visual típico em plantas superiores como o arroz, é o "bronzamento" das folhas (BECKER, 2005). Os sintomas de bronzamento começam em folhas de origem mais antigas, totalmente desenvolvidas, com a ocorrência de pequenas manchas marrons que se espalham até a base. No desenvolvimento posterior do sintoma, as pontas das folhas tornam-se amarelo alaranjadas e secam em algumas situações. Eventualmente, toda a folha se torna alaranjada a marrom enferrujada ou marrom roxa quando a toxicidade é extremamente grave (FAIRHURST E WITT, 2002).

4.2 Comprimento e biomassa dos gametófitos

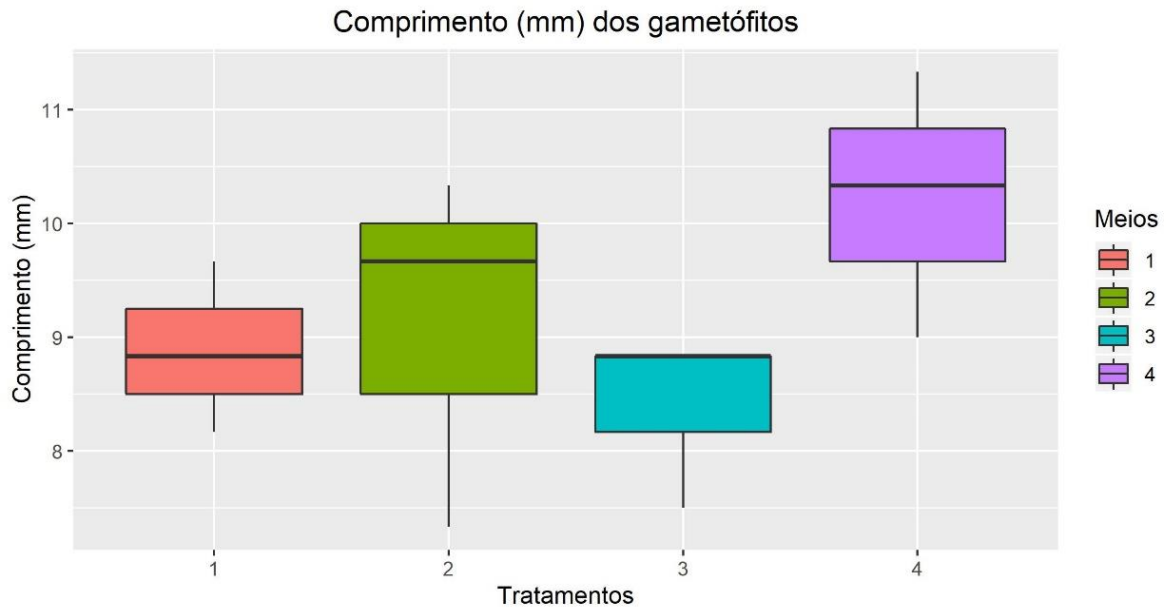


Gráfico 1: Box-splot feito no programa R com os médias dos comprimentos em cada tréplica dos tratamentos. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.

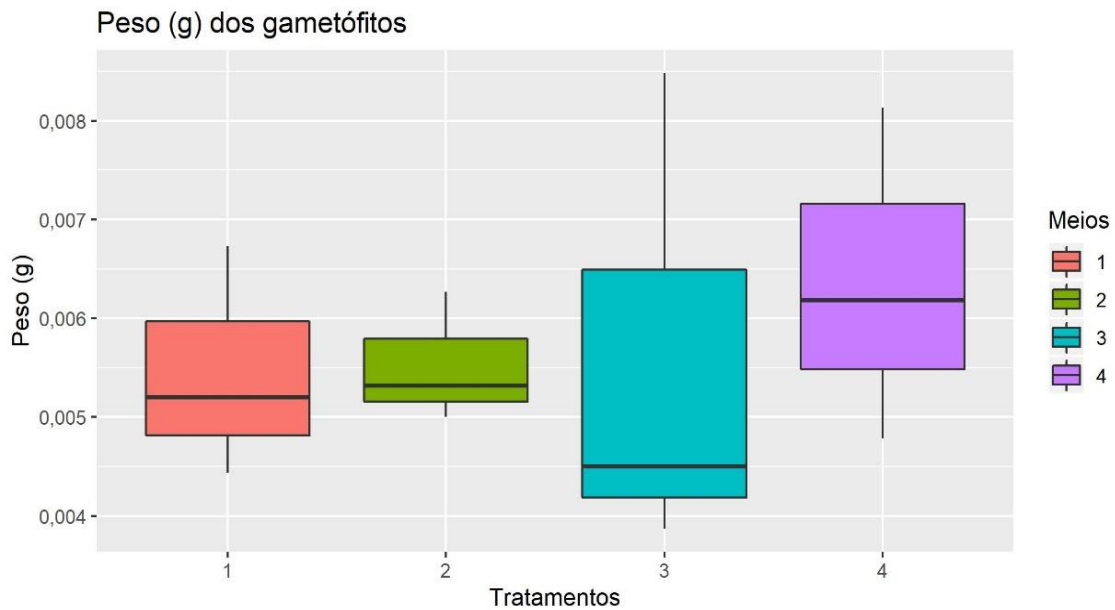


Gráfico 2: Box-splot feito no programa R com os médias dos pesos em cada tréplica dos tratamentos. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.

Como observado nos gráficos 1 e 2, a relação, principalmente, ao crescimento dos gametófitos, observa-se que foi maior nos tratamentos com maior teor de ferro. Na literatura de plantas superiores, quando a toxicidade por ferro acontece durante as fases vegetativas iniciais de crescimento pode ocorrer a redução da altura das plantas e, ao acúmulo de matéria seca sendo a parte aérea mais afetada que a biomassa radicular (FAGERIA, 1989). E como o sucesso da fitoextração de metais no solo depende da habilidade das plantas em produzir biomassa para melhor acumular metais (RIBEIRO et al., 2000) o aumento do crescimento dos gametófitos pode ter relação com o aumento de biomassa encontrada em uma das maiores concentrações de ferro. Por outro lado, há duas formas pelas quais as plantas trabalham com o estresse por ferro, sendo elas: diretamente, quando o elemento é absorvido em excesso e se torna letal na planta; ou indiretamente, causada pelo desequilíbrio nutricional causado pelo excesso de ferro no meio de cultura. Este último está relacionado a inibição da absorção de outros nutrientes, assim como seus transportes, acabando por inibir a absorção de diferentes nutrientes. Ottow et al. (1982) descreveram a toxicidade do ferro como um distúrbio nutricional múltiplo, que também envolve outros elementos (nutrientes). Sua disponibilidade química pode ser afetada como resultado da redução de ferro (P, Mo, Al), ou sua absorção pelas plantas pode ser prejudicada como resultado do acúmulo de ferro na rizosfera (K, Zn, Mn). Assim, as alterações relatadas podem não ter relação unicamente com o ferro, como também outros nutrientes.

4.3 Comprimento dos rizoides

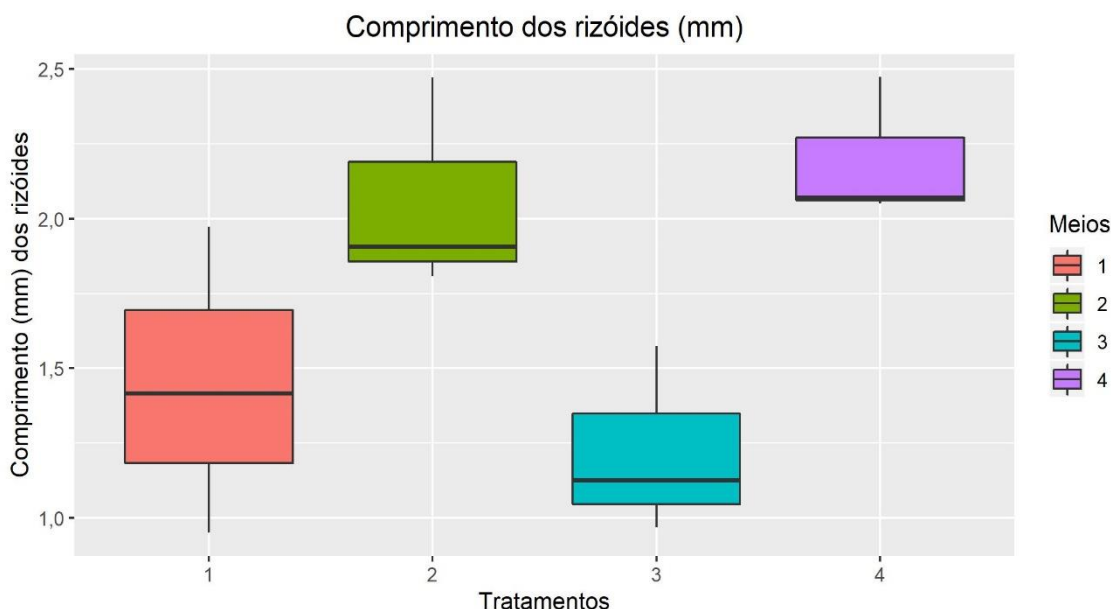


Gráfico 3: Box-plot feito no programa R com os médias dos tamanhos de rizoides em cada réplica dos tratamentos. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente.

O tamanho dos rizóides foi analisado no programa WinRhizo onde os gametófitos foram analisados da superfície inferior até sua metade, onde normalmente encontram-se os rizóides. Os comprimentos em mm utilizados como parâmetros e marcados nas cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) corresponderam a respectivamente, 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.

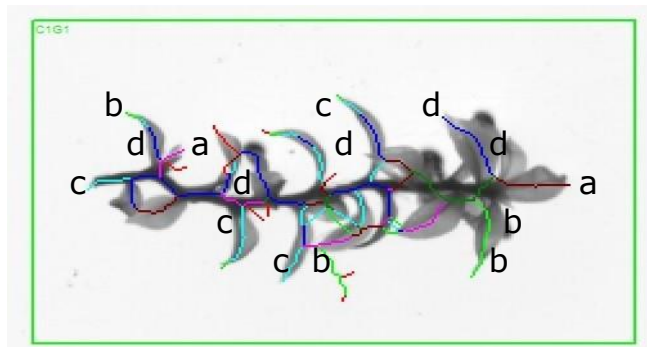


Figura 2: Explante de uma das tréplicas do tratamento 1 controle, onde as cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) representam os rizóides com respectivamente, 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.

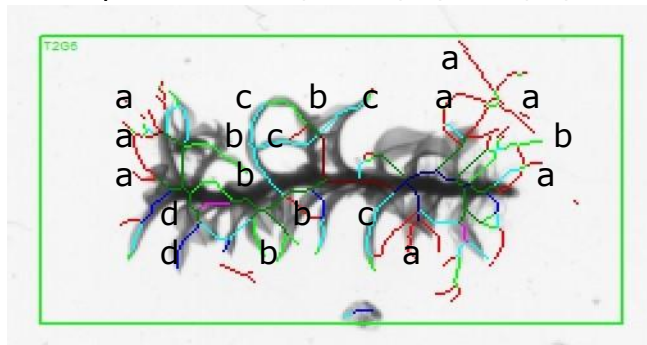


Figura 3: Figura de um dos gametófitos pertencentes a uma das tréplicas do tratamento 2, onde as cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) representam os rizóides com respectivamente, 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.

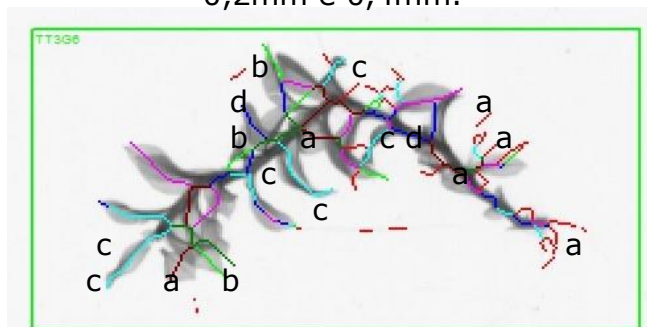


Figura 4: Figura de um dos gametófitos pertencentes a uma das tréplicas do tratamento 3, onde as cores vermelho (a), verde (b), verde-água (c) e azul (d) representam os rizóides com respectivamente, 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.

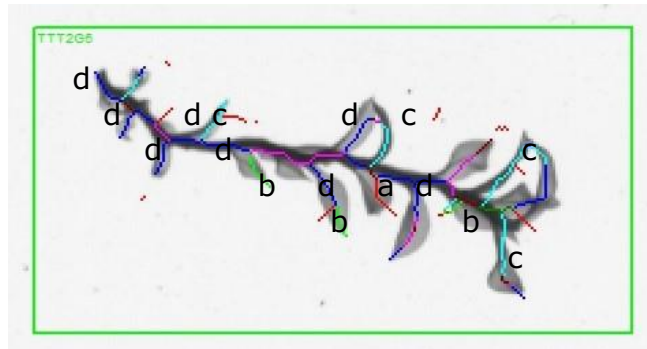


Figura 5: Figura de um dos gametófitos pertencentes a uma das tréplicas do tratamento 4, onde as cores vermelho, verde, verde-água e azul representam os rizóides com respectivamente, 0mm, 0,1mm, 0,2mm e 0,4mm.



Figura 6: Imagem comparativa com explantes de cada tratamento lado a lado com foco na sua parte inferior onde estão presentes os rizoides. Sendo 1 o tratamento controle; 2, 3 e 4 os tratamentos com 50mg, 300mg e 600mg de Fe-EDTA, respectivamente. Fonte: autor.

Podemos observar que o tamanho dos rizóides parece diminuir na concentração de 600mg, inversamente ao encontrado na literatura, entretanto sem seguir uma correlação expressiva a respeito do teor de ferro. As auxinas podem ter sido afetadas pelo ferro no meio de cultura, entretanto, não foi em um valor significativo. Essa característica precisa ser mais explorada, uma vez que, no presente trabalho os valores não apresentaram significância estatística para as diferenças observadas.

4.4 Análise de correlação

Os valores dos comprimentos totais dos gametófitos, área de projeção, área superficial, diâmetro e tamanho dos rizoides foram utilizados para correlacionar com os demais dados através da correlação de Pearson. Nesta correlação a seguir, os números das primeiras linhas de cada comparação representam o coeficiente de correlação entre elas, sendo que quanto mais próximo de 1 estiver o coeficiente de correlação maior é a relação entre os fatores analisados. A segunda linha indica o valor de p, onde para que seja considerada uma correlação este precisa estar próximo de 0,5. A terceira linha é o número de amostras utilizadas, no caso 12 pois havia tréplicas de cada um dos quatro tratamentos.

Tabela 2: Correlação de Pearson entre os valores dos comprimentos totais dos gametófitos, área de projeção, área superficial, diâmetro e tamanho dos rizoides e biomassa.

	Biomassa	Compr_Paq	Compr_Scanner
Ferro	0.247	0.384	0.346
	0.440	0.218	0.271
	12	12	12
Massa		-0.389	0.117
		0.212	0.717
		12	12
Comprimento			0.417
			0.178
			12

	Projeção	Superfície	Diâmetro	Rizoides
Ferro	0.109	0.109	-0.223	-0.0144
	0.735	0.735	0.486	0.965
	12	12	12	12
Massa	0.312	0.312	0.403	0.536
	0.324	0.324	0.194	0.0723
	12	12	12	12
Comprim.	0.0198	0.0198	-0.405	-0.323
	0.951	0.951	0.192	0.305
	12	12	12	12
Compr_sc	0.808	0.808	0.208	0.344
	0.00147	0.00147	0.516	0.273
	12	12	12	12
Projeção		1.000	0.741	0.228
		2.891E-0400	0.00578	0.477
		12	12	12
Superfície			0.741	0.228
			0.00578	0.477
			12	12
Diâmetro				-0.00562
				0.986
				12

Como o coeficiente de correlação de todos os dados contra todos foi distante de 1 e o valor de p deles foi também distante de 0,5 pode-se afirmar que não existiram correlações significativas entre os parâmetros analisados e o aumento do teor de ferro no meio. Essa característica pode estar relacionada a resistência dos musgos a concentrações elevadas de ferro, já que ele não sofreu com o aumento do metal no meio de cultura. Entretanto, para o cultivo de arroz, por exemplo, 300 mg de Fe L⁻¹ solúvel em água na solução do solo é geralmente considerada o limite crítico (LANTIN E NEEUE, 1989) o que destaca ainda mais o crescente potencial dos musgos como bons bioacumuladores e fitoextratores.

Até o momento, existem poucos estudos sobre a função dos rizoides, mas há indicações de que são importantes na ancoragem e na captação de água e nutrientes. É afirmado na literatura que seu principal papel está na fixação ao substrato (GOFFINET et al. , 2008) e estão envolvidos na captação e transporte de água. Entretanto, muitas briófitas são ecto-hídricas, ou seja, não possuem cutículas espessas e absorvem água por toda sua superfície (PROCTOR, 2000). Embora os rizóides não sejam necessários para a absorção direta de água nesses casos, muitos musgos produzem um tomento, uma espessa cobertura de rizoides que crescem do caule auxiliando o transporte de água por ação capilar (PROCTOR, 2000).

Fitter e Moyersoen, em 1996, apontaram que 'sistemas radiculares complexos são uma característica das plantas terrestres há muito tempo, embora no registro fóssil não esteja claro quanto exatamente seja esse quanto tempo'. Estudos comparativos sobre as

estruturas de "enraizamento" mostraram que, pelo menos algumas das funções radiculares clássicas das raízes dos esporófitos de plantas vasculares terrestres são compartilhadas com os rizoides. Do ponto de vista genômico, Morris et al., 2018, sugere que briófitas sejam linhagens irmãs das traqueófitas e que as raízes tenham evoluído a partir dos rizoides. Uma rede reguladora de genes semelhantes controla o desenvolvimento de rizoides em gametófitos de musgo e pelos radiculares nas raízes de esporófitos de plantas vasculares. É provável que essa rede tenha operado pela primeira vez no gametófito das primeiras plantas terrestres. Essa transferência da função do gene de gametófito para esporófito pode fornecer um mecanismo que, pelo menos em parte, explica o aumento da diversidade morfológica de esporófitos que ocorreram durante o período devoniano (VICTOR, 2012).

Há na literatura registro de ocorrência de genes, como o HvYS, responsável por codificar o transportador de ferro-fitossideróforo (HvYS1), nas raízes de cevada (MURATA, 2006). Também há estudos onde verifica-se que plantas em crescimento em meios privados de ferro causaram um aumento significativo no número de pelos radiculares e raízes (VICTOR, 2012). Um sistema radicular atrofiado e baixo desenvolvimento radicular é um sintoma significativo da toxicidade do ferro, mas ainda pouco se sabe sobre esses efeitos, principalmente em briófitas (BECKER E ASCH, 2005). Há estudos onde a deficiência de ferro aumentou a produção de auxinas que controla o desenvolvimento dos rizóides através da regulação da expressão de genes e que o excesso diminuiu a expressão da proteína PIN2 nas pontas das raízes. (BECKER E ASCH, 2005)

5. CONCLUSÃO

Podemos concluir que o musgo *Physcomitrium acutifolium* Broth. sob estresse por ferro de até 600mg/L, aparenta não sofrer alterações significativas, possibilitando seu crescimento e desenvolvimento em áreas contaminadas. Sua sobrevivência a condições de estresse por metal o torna um possível fitorremediador, no entanto são necessárias análises posteriores sobre a quantidade de ferro presente no meio, a absorvida e metabolizada pela planta.

6. REFERÊNCIAS

- Aceto, M., ABOLLINO, O., CONCA, R., MALANDRINO, M., MENTASTI, E., & SARZANINI, C. The use of mosses as environmental metal pollution indicators. *Chemosphere*, v. 50, n. 3, p. 333-342, 2003.
- Arsenault, J.-L., S. Pouleur, C. Messier, and R. Guay. 1995. "WinRHIZO™, a root-measuring system with a unique overlap correction method"; *HortScience* 30: 906. (Abstract).
- Becker, Mathias, and Folkard Asch. "Iron toxicity in rice—conditions and management concepts." *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168.4 (2005): 558-573.
- Bisinoti, MC, Yabe MJS, Gimenez SMN (2004) Avaliação da influência de metais pesados no sistema aquático da bacia hidrográfica da cidade de Londrina – PR. *Revista Analytica* 8: 22-27.
- CARGINALE V, Sorbo S, Capasso C, Trinchella F, Cafiero G, Basile A (2004) Accumulation, localization and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciata*. *Protoplasma* 223:53-61.
- CHOUDHURY S, Panda SK (2004a) Induction of oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under lead (Pb) and arsenic (As) phytotoxicity. *Curr. Sci.* 87:342-348.
- CONNOLLY, EL, Guerinot, ML Estresse de ferro em plantas. O genoma Biol 3 é um dos principais componentes do sistema imunológico humano. 2002.
- COVE D. 2005. The moss *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* 39, 339–358.
- COSTA, D. P.; ET AL. Diversidade e Importância das Espécies de Briófitas na Conservação dos Ecossistemas do Estado do Rio De Janeiro. *Rodriguésia*, v. 56, n.87, p. 13–49, 2005.
- COSTA, D. P. et al. Synopsis of the Brazilian moss flora: checklist, distribution and conservation. *Nova Hedwigia*, v. 93, n. 3, p. 277–334, 1 nov. 2011.
- CURI, Nilton (ed.). *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. 430 p. v. III. ISBN 1519-3934.
- DE ALMEIDA, Jozy Souza dos Santos et al. *Manual de Briologia*. Rio de Janeiro: Interciência, 2010. 207 p. ISBN 978-85-7193-237-1.
- DeKock, P. C. "Heavy metal toxicity and iron chlorosis." *Annals of Botany* 20.1 (1956): 133-141.
- DOS SANTOS, Osmar Souza. Preparo de soluções nutritivas. In: *Preparo de soluções nutritivas*. UFSM, 2017. Disponível em: <http://atividaderrural.com.br/artigos/50576e593f662.pdf>. Acesso em: 12 nov. 2019.
- ERNST, W.H.O. Phytoextraction of mine wastes – Options and impossibilities. *Chemie der Erd.*, 65:29-42, 2005.
- GOFFINET, B., and C. J. Cox. 2000. Phylogenetic relationships among basal-most arthrodontous mosses with special emphasis on the evolutionary significance of the Funariaceae. *Bryologist* 103:212–223.
- Fageria, N. K., and V. C. Baligar. "Response of legumes and cereals to phosphorus in solution culture." *Journal of plant nutrition* 12.9 (1989): 1005-1019.
- Fairhurst, T. H., Witt, C. (2002): *Rice: A practical guide to nutrient management*. The International Rice Research Institute, Manila, The Philippines.
- Fitter, AH e Bernard Moyersoen. "Tendências evolutivas nas simbioses dos micróbios radiculares". *Transações Filosóficas da Sociedade Real de Londres. Série B: Ciências Biológicas* 351.1345 (1996): 1367-1375.
- GOFFINET, B., N. J. Wickett, O. Werner, R. M. Ros, A. J. Shaw, and C. J. Cox. 2007. Distribution and phylogenetic significance of the 71-kb inversion in the plastid genome in Funariidae (Bryophyta). *Ann. Bot.* 99:747–753.
- Goffinet, Bernard. *Bryophyte biology*. Cambridge University Press, 2008.
- GRADSTEIN, S. R.; S. P. Churchill & N. Salazar-Allen. 2001. *Guide to the Bryophytes of Tropical America*. *Memories of the New York Botanical Garden* 86: 1-577.
- IBAMA 2015. *Laudo Técnico Preliminar: Impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais*.
- JAIN A, Wilson GT, Connolly EL. The diverse roles of FRO family metalloreductases in iron and copper homeostasis. *Frontiers in Plant Science*, v5:a100, 2014.
- KLAUBERG-FILHO, O.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Fungos micorrizicos arbusculares em solos de área poluída com metais pesados. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:125-134, 2002.
- LABORSOLO (Londrina/PR). *Micronutrientes: Conhecendo o Ferro*. In: *Micronutrientes: Conhecendo o Ferro*. Londrina/PR, 10 set. 2013. Disponível em: <https://www.laborsolo.com.br/analise-quimica-de-solo/micronutrientes-conhecendo-o-ferro/>. Acesso em: 6 nov. 2019.
- Lantin, R. S., Neue, H. U. (1989): Iron toxicity: a nutritional disorder in wetland rice. 17th Irrigated Rice Meeting. Brazil. 26–30 Sep. 1989. *Lavoura-Arrozeira* 42, 3–8.

- LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Quality*, 31:109-120, 2002
- McGRATH, S.P.; ZHAO, F.J. & LOMBI, E. Phytoremediation of metals, metalloids, and radionuclides. *Adv. Agron.*, 75:1-56, 2002.
- MAEYSKAYA, S. M., A. R. Kardash, and O. T. Demkiv. "Absorption of Cadmium and Lead Ions by Gametophyte of the Moss *Plagiomnium undulatum*." *Russian Journal of Plant Physiology* 48.6 (2001): 820-824.
- "Microsoft Office Excel 2010". Download.com. CBS Interactive. Retrieved February 7, 2013.
- MORRIS, Jennifer L., et al. "The timescale of early land plant evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.10 (2018): E2274-E2283.
- Murashige, Toshio, and Folke Skoog. "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Physiologia plantarum* 15.3 (1962): 473-497.
- Murata, Yoshiko, et al. "A specific transporter for iron (III)-phytosiderophore in barley roots." *The Plant Journal* 46.4 (2006): 563-572.
- Ottow, J. C. G., G. Benckiser, and I. Watanabe. "Iron toxicity of rice as a multiple nutritional soil stress." *Tropical Agriculture. Research Series* (1982).
- PANDA SK (2003) Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss, *Taxithelium* sp. *Curr. Sci.* 84:631-663.
- Ligrone, R., J. G. Duckett, and K. S. Renzaglia. "Conducting tissues and phyletic relationships of bryophytes." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355.1398 (2000): 795-813.
- R Core Team (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- RIBEIRO FILHO, M.R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J.O. & MOTTA, P.E.F. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:453-464, 1999.
- RIBEIRO, Mateus Rosas et al, (ed.). *Tópicos em Ciência do Solo*. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. 497 p. v. VI. ISBN 1519-3934.
- RESKI, R.; FRANK, W. Moss (*Physcomitrella patens*) functional genomics—gene discovery and tool development, with implications for crop plants and human health. *Briefings in functional genomics & proteomics*, v. 4, n. 1, p. 48–57, 2005.
- SANTOS GCGD (2005). *Comportamento de B, Zn, Mn, e Pb em solo contaminado sob cultivo de plantas e adição de fontes de matéria orgânica como amenizantes do efeito tóxico*. Tese de Doutorado. Curso de Agronomia, Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP.
- SAXENA, D.K. Uses of bryophytes. *Resonance*, v.9, p. 56-65, 2004.
- TREMPER, Anja H., et al. "Field and laboratory exposures of two moss species to low level metal pollution." *Journal of Atmospheric Chemistry* 49.1-3 (2004): 111-120.
- Shapiro, S. S.; Wilk, M. B. (1965). "An analysis of variance test for normality (complete samples)". *Biometrika*. 52 (3-4): 591-611. doi:10.1093/biomet/52.3-4.591. JSTOR 2333709. MR 0205384. p. 593
- THORPE, T. A.. History of plant tissue culture. *Molecular biotechnology*, 37(2), 169-180, 2007.
- VANGGRONSVELD, J.; STERCKX, J.; VAN ASSCHE, F. & CLIJSTERS, H. Rehabilitation studies on an old non-ferrous waste dumping by beringite. *J. Geochem. Expl.*, 52:221-229, 1995.
- VIDALI, Mn. "Bioremediation. an overview." *Pure and Applied Chemistry* 73.7 (2001): 1163-1172.
- Victor A.S. Jones, Liam Dolan, The evolution of root hairs and rhizoids, *Annals of Botany*, Volume 110, Issue 2, 1 July 2012, Pages 205–212
- WERNER, O., R. M. Ros, and B. Goffinet. 2007. A reconsideration of the systematic position of *Goniomitrium* (Funariaceae) based on chloroplast sequence markers. *Bryologist* 110:108–114.
- Wickham H (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- YANG, X-E.; FENG, Y.; HE, Z. & STOFFELLA, P.J. Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 18:339-353, 2005^a
- YANG, X-E.; JIN, X-F.; FENG, Y. & ISLAM, E. Molecular mechanisms and genetic basis of heavy metal tolerance/hyperaccumulation in plants. *J. Integrative Plant Biol.*, 47:1025-1035, 2005b.