

UFRRJ
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO

TESE

**Remediação da Contaminação com
Metais Pesados Provenientes da Disposição de
Resíduos Perigosos da Produção de Zinco.**

Fabiana Soares dos Santos

2005



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**REMEDIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO
COM METAIS PESADOS PROVENIENTES DA DISPOSIÇÃO DE
RESÍDUOS PERIGOSOS DA PRODUÇÃO DE ZINCO.**

FABIANA SOARES DOS SANTOS

Sob a Orientação do Professor
Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho
e Co-orientação do Professor
Nelson Mazur

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências em Agronomia, Área de
Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2005

628.55
S237r
T

Santos, Fabiana Soares dos, 1975-
Remediação da contaminação com metais
pesados provenientes da disposição de
resíduos perigosos da produção de zinco /
Fabiana Soares dos Santos. - 2005.
85f. : il.(color) ; tab.

Orientador: Nelson Moura Brasil do
Amaral Sobrinho.

Tese(doutorado)- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Instituto de
Agronomia.

Bibliografia: f. 73-81.

1. Resíduos industriais - Teses. 2.
Resíduos industriais - Aspectos ambientais
- Teses. 3. Resíduos - Eliminação no solo
- Teses. 4. Plantas - Efeito dos metais
pesados - Teses. I. Amaral Sobrinho,
Nelson Moura Brasil do. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto
de Agronomia. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA-CIÊNCIA DO SOLO

FABIANA SOARES DOS SANTOS

Tese submetida ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, em Agronomia.

TESE APROVADA EM 11/02/2005

Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho. Dr. UFRRJ
(Orientador)

Nelson Mazur. Dr. UFRRJ
(Co-orientador)

Sonia Regina de Souza. Dr. UFRRJ

Maria da Conceição Rivoli Costa. Dr. UNITAU-SP

Otávio Antonio Camargo. PhD. IAC-SP

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho eterno e compreensão nos momentos de ausência;
Aos professores Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho, Nelson Mazur e Clarice de Oliveira, pelos valiosos ensinamentos, amizade, dedicação e confiança no meu trabalho;

À Carlos Garbisu, José María Becerrill Soto, Oihana Barrutia e Javier Hernandez pela orientação, amizade, ajuda e aprendizado;

Ao Kepa, que sem a sua amizade, teria sido muito mais difícil a minha adaptação na Espanha;

Aos bolsistas de iniciação científica Ricardo, Márcio e Vinícius pela dedicação e valiosa ajuda nos trabalhos de campo e laboratório;

Aos estagiários do Laboratório de Química do Solo pela ajuda nas várias etapas do trabalho;

À Carol, Conceição, Fabiana Dias, Maurel e Waleska, amigas que foram fundamentais nessa jornada e que vão sempre continuar presentes ao longo de minha vida;

Ao CNPq pelo apoio financeiro na bolsa de doutorado e de doutorado sanduíche na Espanha;

À UFRRJ, que por mais de uma década vem me dando oportunidade de crescimento pessoal e profissional;

Ao Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER) e à Universidad del País Vasco (UPV) pela oportunidade de trabalho e infra-estrutura concedida durante o doutorado sanduíche.

Aos colegas do curso e aos professores do Departamento de Solos;

Aos funcionários do Departamento de Solos, em especial Moraes, Marcos, Luciene e Roberto;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho o meu muito obrigada.

BIOGRAFIA

Fabiana Soares dos Santos nasceu na cidade de Barra do Piraí – RJ em 25 de junho de 1975. Iniciou o curso de graduação em Agronomia na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em 1993, diplomando-se em 1998. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Biologia Vegetal, área de Fitopatologia, sob a orientação do Dr. Fujio Akiba e no Departamento de Solos, área de Química e Poluição de Solos sob a orientação da Dra. Clarice de Oliveira. Em março de 1999 ingressou no Curso de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo (UFRRJ), sob a orientação do professor Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho, obtendo o grau de Magister Scientiae em fevereiro de 2001. Em março deste mesmo ano, na mesma Instituição e sob a mesma orientação, iniciou suas atividades de Doutorado. Em setembro de 2003 foi contemplada com uma bolsa de Doutorado Sanduíche pelo CNPq por um ano, realizando parte do experimento de tese no Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Espanha) sob a co-orientação do Dr. Carlos Garbisu.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1	Fontes Antropogênicas de Contaminação por Metais Pesados.....	2
2.2	Remediação de Solos Contaminados por Metais Pesados	4
2.2.1	Remediação química de solos.....	5
2.2.2	Biorremediação.....	7
2.2.3	Respostas fisiológicas à contaminação com metais pesados.....	8
3.	CAPÍTULO I AVALIAÇÃO DA CONTENÇÃO QUÍMICA E FITORREMEDIAÇÃO DE Zn E Cd PRESENTES EM UM RESÍDUO CLASSE I DE INDÚSTRIA DE PRODUÇÃO DE ZINCO.....	11
3.1	Introdução	14
3.2	Material e Métodos	15
3.2.1	Seleção de plantas tolerantes a Zn e Cd em cultivo hidropônico	15
3.2.2	Coleta e caracterização do resíduo da Ingá	15
3.2.3	Inertização do resíduo Ingá.....	16
3.2.4	Determinação das possíveis frações químicas de metais pesados.....	17
3.3	Resultados e Discussão	18
3.3.1	Experimento em solução nutritiva.....	18
3.3.2	Caracterização do resíduo Ingá.....	23
3.3.3	Inertização do resíduo.....	24
3.3.4	Efeitos dos tratamentos na classificação do resíduo Ingá.....	35
3.4	Conclusões	36
4.	CAPÍTULO II OTIMIZAÇÃO DO POTENCIAL FITOEXTRATOR DE <i>Brachiaria decumbens</i> DESENVOLVIDA EM DOIS SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS, PELO USO DE QUELANTES.	37
4.1	Introdução	40
4.2	Material e Métodos	42
4.3	Resultados e Discussão	44
4.4	Conclusões	50
5.	CAPÍTULO III AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITOQUELATINAS E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS SUBMETIDAS À CONTAMINAÇÃO COM Zn E Cd.....	51
5.1	Introdução	54
5.1.1	Fitoquelatinas	54
5.1.2	Sistemas fotoprotetores e antioxidantes	56
5.1.3	Pigmentos fotossintéticos	57
5.2	Material e Métodos	58
5.2.1	Determinação dos teores de metais pesados nos tecidos.....	58
5.2.2	Análise de compostos tiólicos por HPLC.....	58
5.2.3	Ascorbato.....	58
5.2.4	Pigmentos fotoprotetores.....	59
5.3	Resultados e Discussão	60
5.4	Conclusões	71
6.	CONCLUSÕES GERAIS	72
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8.	ANEXOS	82

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

β -Ala = beta alanina
 γ -Glu-Cys = gama-glutamilcisteína
As = arsênio
Cd = cádmio
CH₃COONa = acetato de sódio
CH₃COONH₄ = acetato de amônio
CH₃COOH = ácido acético
Co = cobalto
CTC = capacidade de troca catiônica
Cu = cobre
Cys = cisteína
DHA = desidroascorbato
DTPA = ácido dietileno triamino pentaacético
DTT = ditioneitol
EDTA = ácido etileno diamino tetraacético
EDDS = ácido etileno diamino disuccinato
F1 = extração com água \Rightarrow fração solúvel em água
F2 = extraído com NaNO₃ – extraído com água \Rightarrow corresponde aos metais ligados eletrostaticamente à superfície do resíduo.
F3 = extraído com DTPA – extraído com NaNO₃ \Rightarrow fração associada predominantemente à superfície de óxidos de Fe e compostos orgânicos mais estáveis pela formação de complexos de esfera interna.
F4 = extraído com ácido acético – extraído com NaNO₃ \Rightarrow fração associada predominantemente a precipitados de carbonatos.
F5 = total – Σ das frações (F1; F2; F3 e F4) \Rightarrow fração associada a compostos de Fe com alto grau de cristalinidade (Fração residual).
HNO₃ = ácido nítrico
H₂O₂ = peróxido de hidrogênio
KH₂PO₄ = fosfato de potássio
Gly = glicina
GSH = glutathiona reduzida
Hg = mercúrio
Mg(NO)₃ = nitrato de magnésio
Mn = manganês
Ni = níquel
O₂ = oxigênio molecular
OH⁻ = radical hidroxila
Pb = chumbo
Se = selênio
Tris = Tris (hidroximetil)-aminometano
VAZ = violaxantina, anteraxantina, zeaxantina
Zn = zinco

RESUMO GERAL

SANTOS, Fabiana Soares dos. **Remediação da contaminação com metais pesados provenientes da disposição de resíduos perigosos da produção de zinco.** Seropédica: UFRRJ, 2005. 84 p. (Tese, Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo).

Este trabalho teve por objetivo avaliar técnicas alternativas de remediação para recuperação de áreas onde foram dispostos, de forma inadequada, resíduos perigosos contaminados com metais pesados provenientes da extração de zinco da calamina, bem como o estudo fisiológico de plantas tolerantes ao Zn e Cd. Foi realizado, inicialmente, um experimento em solução nutritiva para selecionar plantas tolerantes ao Zn e Cd, sendo cinco espécies de gramíneas e cinco de leguminosas. Essas plantas foram cultivadas em solução nutritiva contendo doses crescentes de Zn e Cd. Após seleção das plantas, foi conduzido um experimento de contenção química de Zn e Cd presentes no resíduo INGÁ, avaliando o potencial de inertização pelo uso de um resíduo alcalino (silicato de cálcio) e resíduo orgânico (lodo do biodigestor de uma cervejaria), onde foram cultivadas as espécies *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* para avaliar o potencial de tolerância e a capacidade de extração de Zn e Cd presentes no resíduo INGÁ. Para comparar o potencial da fitoextração natural pela hiperacumuladora de Zn e Cd *Thlaspi caerulescens* e da fitoextração induzida por agentes quelantes, como EDTA e EDDS na concentração de 10 mmol L^{-1} , pela *B. decumbens*, essas plantas foram desenvolvidas em potes contendo solos com altas doses naturais de Cd, Zn e Pb. Um experimento em solução nutritiva contaminada com 50 e 100 μM de Cd; 500 e 2000 μM de Zn também foi conduzido visando avaliar a indução de resposta antioxidante de defesa pela *B. decumbens* pela contaminação com esses metais. Após a colheita, essas plantas foram congeladas em N líquido e liofilizadas, sendo as análises feitas em HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência). A adição de produtos de reação alcalina e resíduo orgânico promoveu maior eficiência na redução da biodisponibilidade de metais pesados, passando-os para formas químicas de menor disponibilidade como formação de complexos de esfera interna e precipitação na forma de carbonatos. A *B. decumbens* foi a espécie vegetal mais promissora, e respondeu significativamente à adição dos inertizantes, com maior produção de matéria seca e absorção de metais pesados. Apesar da redução na solubilidade de metais pesados, nenhum tratamento mudou a classificação do resíduo INGÁ quanto à sua periculosidade, permanecendo na Classe I – perigoso. Essas técnicas são alternativas promissoras para a revegetação e minimização dos impactos ambientais provocados por esse resíduo na região. O EDDS foi mais efetivo que o EDTA na absorção e translocação de metais pesados nas plantas, e sua aplicação aumentou significativamente a concentração de Zn e Cd na parte aérea das plantas. No entanto, a *T. caerulescens* foi mais eficiente que a *B. decumbens* na fitoextração de Cd, Zn e Pb nos solos. A *B. decumbens* também respondeu à contaminação por Zn e Cd induzindo a formação de fitoquelatinas e compostos antioxidantes como ascorbato e carotenóides, sendo o Cd o maior indutor de fitoquelatinas nessas plantas. A contaminação com Cd e Zn reduziu a produção de clorofila, no entanto, somente nos tratamentos severos, como Cd 100 μM , que os sistemas fotoprotetores sofreram uma rápida redução.

Palavras chave: Fitorremediação, fitoquelatinas, resíduos industriais, estresse oxidativo.

GENERAL ABSTRACT

SANTOS, Fabiana Soares dos. **Remediation of heavy metals contamination from disposition of dangerous residues of a Zn industrial unit.** Seropédica: UFRRJ, 2005. 84p. (Thesis, Doctor in Agronomy, Soil Science).

The objective of this work was to evaluate alternative techniques of remediation to recuperate areas with a dangerous residue contaminated with heavy metals, as well as the physiological study of tolerant plants to Zn and Cd. It was carried out, initially, an experiment in nutrient solution to select plants tolerant to Zn and Cd, with five grasses and five leguminous. These plants were cultivated in nutrient solution contaminated with Zn and Cd. After selection of plants, it was carried out an experiment to evaluate the inertization potential of Ingá residue by using an alkaline residue (calcium silicate) and an organic residue (brewery sewage sludge), where *Brachiaria humidicola* and *B. decumbens* has been cultivated to assess the potential of tolerance and extraction of Zn and Cd in the INGÁ residue. To compare the potential of natural phytoextraction using the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and the chemically enhanced phytoextraction using EDTA and EDDS 10 mmol L⁻¹ with *Brachiaria decumbens*, these plants were cultivated in vases with soils of a calamine mine contaminated with Cd, Zn and Pb. An experiment in nutritional solution contaminated with 50 and 100 µM Cd; and 500 and 2000 µM Zn was also carried out to evaluate the antioxidative defense in *B. decumbens* for the heavy metal contamination. After harvest, the plants were frozen in liquid N, lyophilized and analysed by HPLC. The addition of alkaline and organic residues provoked an accentuated reduction in the Zn and Cd bioavailability, by forming sphere complexes and precipitate in the carbonate form. *B. decumbens* presented the greatest capacity of Zn and Cd extraction in the Ingá residue. Although the reduction of the heavy metals solubility, any treatment change the classification of the Ingá residue, staying in the Class I- dangerous. This study demonstrated the promising potential of this technique to revegetation and reduction of the environment impact provoked by the residue in the area studied. EDDS was more effective than EDTA in increasing the absorption and uptake of Cd, Zn and Pb by the *B. decumbens*. However, *T. caerulescens* was far more efficient than *B. decumbens* in phytoextracting Cd, Zn and Pb from soils. *B. decumbens* increased the defense of antioxidative systems, inducing the production of phytochelatins, ascorbate and carotheno. Cd was the most effective activator of phytochelatins. The contamination of Cd and Zn reduced the photosynthetic activity, but only in treatment Cd 100 µM, the photoprotective systems had a rapid reduction.

Key words: Phytoremediation, phytochelatins, industrial residues, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A poluição do solo por metais pesados provocada por atividades industriais tem levado a situações de riscos ao ambiente envolvido. Esses impactos negativos afetam não somente a qualidade do solo, mas também diversos outros parâmetros ambientais.

Nos últimos anos, a prevenção da poluição e limpeza de áreas contaminadas tornou-se uma prioridade ambiental, existindo atualmente uma grande demanda comercial e ambiental para a remediação de áreas com poluentes, tais como os metais pesados, para prevenir sua descarga nos cursos de água e sua entrada na cadeia alimentar.

A Cia Mercantil e Industrial INGÁ, localizada no município de Itaguaí-RJ, era uma usina produtora de metal primário zinco, que teve sua atividade operacional iniciada em julho de 1965 e foi fechada recentemente, em função de seu passivo ambiental estimado em 2 milhões de m³ de resíduo contaminado com metais pesados, provenientes do processamento da mineração, redução e refino do metal.

A extração de Zn a partir do minério calamina (teor de Zn entre 20 e 25% e 30% de sílica) era feita pelo processo Via Úmida ou Hidrometalurgia, onde o seu princípio fundamental era produzir um composto solúvel, lixiviável, separar da lixívia as impurezas, obtendo uma solução purificada para fazer a eletrólise. Os produtos obtidos eram o zinco puro e o ácido sulfúrico, que era reutilizado como solvente.

No processo de extração do metal, era produzido um resíduo sólido que contém impurezas contidas no minério e obtidas no processo de extração do zinco, como os metais pesados Cd, Pb, Mn, Ni, Co, As, Zn, entre outros. Esse resíduo foi disposto em áreas de rejeito da indústria, sem condições apropriadas de armazenamento, o que aumentam os riscos de contaminação do meio ambiente.

A melhoria das condições químicas do resíduo de forma a reduzir a solubilidade de metais pesados e o estabelecimento de espécies vegetais para fitorremediação é de fundamental importância para a recuperação das áreas impactadas na região circunscrita à indústria INGÁ.

A fitoextração de metais pesados é uma tecnologia desenvolvida com o objetivo de extrair metais pesados do solo e tem sido muito estudada nas últimas décadas, por ser uma tecnologia limpa e barata (McGrath, 1998). No entanto, a maioria das plantas hiperacumuladoras já identificadas possuem desenvolvimento lento e baixa produção de biomassa, sendo necessários muitas vezes, anos ou décadas para limpar uma área contaminada (Mulligan et al., 2001).

A fitoextração induzida tem sido desenvolvida para minimizar esses problemas. A fitoextração pode ser otimizada pela adição de compostos quelantes de metais pesados, como EDTA, EDDS, CDTA, DTPA entre outros, visando aumentar a solubilidade, absorção e translocação de metais pelas plantas.

As plantas podem apresentar diferentes mecanismos de tolerância em resposta ao excesso de metais pesados, e um desses mecanismos está relacionado com a síntese de peptídeos tiólicos chamados fitoquelatinas, que formam complexos com metais pesados, especialmente com o Cd, no enxofre livre presente na cisteína.

Diante disso, este trabalho tem como objetivos a seleção de técnicas alternativas de remediação visando à recuperação de áreas de disposição de resíduos perigosos com metais pesados provenientes da extração de zinco da calamina, que seja eficaz e de baixo custo, bem como o estudo fisiológico de plantas tolerantes ao Zn e Cd.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fontes Antropogênicas de Contaminação por Metais Pesados

Ao contrário de muitos poluentes orgânicos, que são antrópicos e freqüentemente degradados no solo por plantas, microrganismos ou fatores abióticos, os metais pesados podem ocorrer naturalmente e são estáveis no ambiente (Wade et al., 1993).

Segundo Schalscha (1996), os metais pesados podem estar presentes no solo, devido a um processo natural ou antrópico. Com relação ao processo natural, os metais pesados podem ser encontrados no solo dependendo do material de origem e dos processos pedológicos (Malavolta, 1994). Em geral, solos derivados de basalto, granito e siltito tendem a ter, nesta mesma ordem, a seqüência decrescente no conteúdo de metais pesados, com variações conforme a localização geográfica, especificamente para basalto e siltito, sendo esta tendência similar às variações do conteúdo de óxidos férricos do solo (Sposito, 1989). Resende et al. (1996), comentam a respeito destas tendências para solos brasileiros.

As fontes antrópicas são as principais responsáveis pela contaminação ambiental, principalmente devido ao crescimento populacional e industrial. As principais fontes de contaminação antrópicas são os fertilizantes, pesticidas, águas de irrigação contaminadas, combustão de carvão e óleo, gases emitidos por veículos a combustão, incineração de resíduos urbanos e industriais, e indústrias de mineração, fundição e refinamento.

A questão dos resíduos sólidos é, atualmente, um dos temas centrais para aqueles que se preocupam com o ambiente, na perspectiva de garantir a existência das gerações futuras.

Pearson (1995) afirma que a degradação de áreas ambientais já podia ser observada no Oriente Médio e na Índia em 2000 a.C. Segundo ele, a alteração no solo era causada pelo sistema de irrigação com água salobra, utilizada na época. As altas concentrações de sal na água causavam desertificação do solo.

Os problemas de poluição e degradação ambiental agravaram-se com a formação dos centros urbanos e, segundo Leite (1995), com a Revolução Industrial no final do século XVIII, a produção de resíduos intensificou-se devido à mecanização dos processos de produção.

A disposição e o tratamento dados a estes resíduos produzidos eram bastante precários, assim como a aceleração dos processos industriais, principalmente no século XX, geraram os chamados poluentes ambientais, decorrentes da sua produção e má administração que se refletem atualmente nas inúmeras áreas contaminadas em todo o mundo (Dias, 2000).

No Brasil, a legislação ambiental não é bem implementada, e muitas companhias depositam resíduos industriais em locais não apropriados e a falta de cuidado pode ameaçar o solo, a água e o ar.

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1987), norma NBR 10004:2004, os resíduos podem ser classificados em:

- (I) Resíduos Classe I - Perigosos;
- (II) Resíduos Classe II - Não perigosos;
 - Resíduos Classe II A – Não inertes;
 - Resíduos Classe II B – Inertes.

Pertencem a Classe I os resíduos perigosos que têm características de inflamabilidade, corrosividade, reatividade, toxicidade e patogenicidade, apresentando riscos à saúde pública quando manuseados de forma inadequada. Os resíduos de Classe II A podem ter propriedades como combustibilidade, biodegradabilidade ou solubilidade em água, enquanto que os da Classe II B são aqueles que quando submetidos a teste de solubilização, conforme ABNT 10006/04, não apresentam nenhum de seus constituintes solubilizados a concentrações superiores aos padrões de potabilidade da água.

Em função das suas características específicas, os resíduos exigem cuidados especiais quanto ao manuseio, acondicionamento, coleta, transporte e destino final (Amaral Sobrinho, 1993).

Segundo Corrêa (1998), o Brasil situa-se entre os cinco maiores países produtores de minério do mundo ocidental. Extensas áreas têm sido utilizadas para mineração organizada (por exemplo: minérios de ferro, alumínio e fosfatos) e não-organizada (por exemplo: garimpos, extração de areia e cascalheiras), resultando, freqüentemente, em sítios de degradação e contaminação.

As denúncias de poluição ambiental, ocorridas recentemente no Brasil, são herdadas de uma prática antiga de irresponsabilidade no destino final do lixo industrial.

O Brasil é carente de informações sobre áreas contaminadas, no entanto, segundo dados da ANBio (Associação Nacional de Biosegurança), existem cerca de 20000 sítios contaminados, incluindo resíduos domésticos, industriais e hospitalares, que requerem ações de remediação. Segundo esses estudos, as atividades industriais que mais contribuem para a degradação ambiental no Brasil são empresas de petróleo (exploração, refino e comercialização), extração e beneficiamento do minério, produção de cimento e artefatos, desdobramento de madeira, indústria automotiva e periféricas, hospitais e estabelecimentos de saúde. Esses estudos apontam também que 97% das cidades brasileiras dispõem seus resíduos de forma inadequada, aumentando o número de sítios que requerem ações de remediação (www.anbio.org.br/bio/biodiver_art103.htm).

No Estado do Rio de Janeiro, os resíduos gerados por atividades industriais vêm aumentando os níveis de metais pesados no solo, rios, e mar da região. Dados apresentados pela CPRM (Companhia de Pesquisas de Recursos Minerais) indicam níveis de chumbo, cádmio, alumínio, arsênio, cobre e zinco, nos rios Paraíba do Sul e Guandu, acima dos limites tolerados. Além de contaminação também relatadas na Baía de Sepetiba e Baía de Guanabara (Costa, 2001).

A Cia. Industrial e Mercantil INGÁ, localizada no município de Itaguaí, Rio de Janeiro, é considerada a maior poluidora da história da Baía de Sepetiba. Essa fábrica era produtora do metal primário zinco e depositou uma quantidade estimada em 2 milhões de m³ de resíduos altamente contaminados com metais pesados, principalmente Zn e Cd, à beira da Baía de Sepetiba, contaminando a biota da área, especialmente crustáceos, peixes e moluscos. A empresa faliu recentemente deixando pilhas de resíduos contaminados com metais pesados às margens da Baía de Sepetiba, aumentando os riscos de ocorrerem sérios impactos ambientais.

A Figura 1 mostra a área ao redor da INGÁ, com o resíduo contaminando a área de mangue e a Baía de Sepetiba.



Figura 1. Vista aérea da área de influência pela contaminação do resíduo da Cia. INGÁ.

Na escolha de um método de tratamento ou de disposição de um resíduo perigoso, é necessário conhecer as características do resíduo, sua origem, seus constituintes e a faixa de variação desses constituintes. Os processos de tratamento têm como objetivo submeter o resíduo à reações físicas, químicas ou biológicas para fazer com que o mesmo perca sua característica de periculosidade, promovendo uma redução de volume ou mudança de alguma propriedade física ou química.

2.2 Remediação de Solos Contaminados por Metais Pesados

O interesse é contínuo no estudo de solos poluídos com metais pesados, por causa do efeito direto na toxicidade à biota e indireto pela ameaça à saúde humana com a contaminação do lençol freático e alimentos produzidos. Diversos procedimentos de descontaminação ou de estabilização dos metais no solo são conhecidos, sendo que a escolha de um ou combinação deles para determinado sítio deve levar em consideração, além da dimensão do impacto provocado pelo contaminante no ecossistema, a viabilidade econômica do processo de remediação (Mulligan et al., 2001).

Todos os programas de remediação *in situ*, seguem ou uma estratégia de contenção (estabilização) ou de redução do contaminante (“limpeza”). No que diz respeito à contenção, não há nenhuma redução efetiva do contaminante presente, mas os riscos à saúde e ao ambiente são reduzidos a níveis aceitáveis por uma manipulação física ou química da área. Um exemplo mais recente é o desenvolvimento de métodos de estabilização baseados em mudanças na química do solo e no crescimento de plantas. Estratégias de redução *in situ* do contaminante incluem degradação microbiana, lavagem do solo, ventilação, aquecimento e eletroose. Estratégias de descontaminação baseadas em plantas estão entre as técnicas mais recentes utilizadas para a redução de contaminantes *in situ* (Cunningham & Lee, 1995; Cunningham & Ow, 1996).

Há considerável interesse no desenvolvimento de estratégias de remediação *in situ* de solos poluídos com metais pesados que sejam eficientes e duráveis. No entanto, há uma clara falta de dados experimentais para apoiar os benefícios destas propostas. Algumas formas de remediação *in situ* têm tido destaque na literatura, como a remediação química e a biorremediação.

2.2.1 Remediação química de solos

Contenção ou imobilização química

A imobilização *in situ*, consiste em minimizar a migração de contaminantes para a subsuperfície do solo. Essas técnicas são baseadas na incorporação de agentes com potencial para complexação e precipitação de metais pesados.

A retenção e a solubilidade de metais pesados no solo são influenciados por parâmetros como pH, concentração do íon, CTC, teor de matéria orgânica e mineralogia do solo, sendo que os processos envolvidos na estabilização são a precipitação, complexação, humificação e as transformações redox (Alloway, 1995).

pH do solo

O pH do solo é um dos mais importantes fatores que afetam a mobilidade e biodisponibilidade de metais pesados. A solubilidade do metal muda com o pH, alterando a adsorção e dessorção dos metais na fase sólida. A hidrólise de íons metálicos em pH alto tende a aumentar a adsorção porque espécies hidrolizadas têm maior afinidade por superfícies ligantes do que íons solúveis. Além disso, o aumento do pH reduz a competição com prótons, favorecendo a adsorção (Kabata-Pendias & Pendias, 1992).

A maior parte da CTC de solos tropicais e subtropicais é devida à desprotonação de grupamentos carboxílicos e fenólicos da matéria orgânica, e das hidroxilas funcionais da superfície de óxidos de Fe e Al, que é influenciada pelo pH do solo.

Grimm et al. (1991) estudando a complexação de Cu em substâncias húmicas, verificou que em baixo pH (2,5) a maior parte da superfície estava ocupada por prótons. No entanto, em pH mais elevado (4,5), a maior parte dos sítios ligantes estava ocupada por Cu por causa do decréscimo da competição com prótons. Yin et al. (1997), também mostrou que menos Hg^{2+} foi complexado a substâncias húmicas em valores baixos de pH devido à competição com H^+ .

Anderson & Christensen (1988) estudaram a adsorção de Cd, Co, Ni e Zn em 38 solos e mostraram que o pH foi o parâmetro mais importante afetando a disponibilidade de metais pesados.

Jackson & Alloway (1992) apontam que a calagem em 18 solos contaminados com altos teores de metais pesados pela aplicação de lodo, elevou o pH a 7,0, reduzindo o conteúdo de Cd em couve (*Brassica oleracea*) na faixa de 43% e alface (*Lactuca sativa*) em 41%.

A precipitação também pode ocorrer, principalmente em valores de pH superiores a 6,0. Com isso, os efeitos da aplicação de calcário em solo contaminado por metais pesados incluem o aumento da adsorção, precipitação e complexação pela matéria orgânica do solo (Pappadopoulus & Rowell, 1988).

Matéria orgânica

A matéria orgânica tem sido usada com bastante frequência para a recuperação de áreas contaminadas com metais pesados (Oliveira, 1998; Mesquita, 2002). Normalmente, são utilizadas como resíduos e incluem esterco de gado, lodo de esgoto, composto de lixo urbano e muitos outros. A importância da matéria orgânica se fundamenta na diminuição da solubilidade dos metais pesados, sendo as cargas negativas dos colóides dependentes do pH. Sob condições extremamente ácidas, o colóide exibe carga positiva e, assim, é pequena sua capacidade adsortiva. Sob

condições alcalinas, a capacidade adsorptiva do húmus excede consideravelmente a da maioria das argilas silicatadas laminares.

Entre as recomendações de adição de amenizantes, como prática de recuperação de solos contaminados por metais pesados, o suprimento de matéria orgânica tem sido considerado o mais importante. Embora a calagem possa substituir alguns atributos dos diferentes resíduos orgânicos, o suprimento de matéria orgânica no solo é altamente benéfico para o estabelecimento bem sucedido da vegetação e, portanto, de um sistema ecologicamente viável.

Deve-se destacar que, apesar da matéria orgânica atuar na redução da solubilidade de metais pesados no solo, existem moléculas orgânicas solúveis de baixo peso molecular produzidas durante a decomposição microbiana do resíduo orgânico no solo, e podem formar complexos solúveis (quelatos) com os metais pesados. Sob tal forma, vinculados à molécula orgânica, os metais ficam protegidos contra reações com os componentes inorgânicos da superfície das partículas do solo. Estes complexos formados se apresentam muito móveis, menos rapidamente adsorvidos e, possivelmente menos absorvidos pelas plantas do que os íons de metal livre (Neal & Sposito, 1986), favorecendo a contaminação da água subterrânea.

Zeólitas

As zeólitas são aluminossilicatos cristalinos que podem ser usadas para o controle da poluição e remediação de solos contaminados e seu uso dependerá da capacidade de troca iônica e seletividade da zeólita em relação aos poluentes. Pode-se usar zeólitas naturais ou sintéticas. As zeólitas agem reduzindo a disponibilidade dos metais no solo, devido à propriedade de troca iônica (Erdem, 2004).

García-Sánchez et al., (1999), avaliando o potencial de diferentes materiais na adsorção de metais pesados no solo, concluíram que as zeólitas foram mais eficientes na imobilização de Zn, Cd, Mn e Co. Essa eficiência não foi somente devido a CTC mas também pela redução da acidez do solo.

Andrews et al. (1991), avaliaram a remoção de metais pesados como Cu, Zn, Cd, Ni, Mn e Fe por zeólitas sódicas. Os resultados demonstraram que a adsorção dos metais se verificou principalmente por troca iônica com o Na^+ . A adsorção de metais pesados foi lenta mas efetiva, apresentando os melhores resultados para Cu, Zn e Cd (99,91%) e para Mn (60%).

Fosfatos

Trabalhos de pesquisa, tais como realizados por Pierzynski et al. (1998), têm citado a eficiência do uso de KH_2PO_4 na imobilização *in situ* de metais pesados tais como Pb, Cd e Zn.

O uso de fosfato tem sido mostrado eficiente na redução da toxicidade e mobilidade de metais pesados, principalmente o Pb, por meio da formação de piromorfitas (Cunningham & Berti, 2000), que são compostos de menor solubilidade. Baseado na baixa solubilidade desse composto, um número considerável de estudos envolvendo fosfatos foram conduzidos visando a estabilização de Pb (Ma et al., 1993).

No entanto, Mesquita (2002) observou que a adição de fosfato de potássio não alterou de forma significativa a distribuição de Zn, Cd e Pb nas diferentes formas químicas, em Latossolo vermelho-amarelo e Argissolo vermelho, tratados com lodo de esgoto.

Óxidos, hidróxidos e óxi-hidróxidos de Fe e Mn

São importantes adsorventes de metais nos solos. Alloway et al. (1985) mostraram que um solo alagado, freqüentemente com menores conteúdos de óxidos, hidróxidos, oxi-hidróxidos de Fe e Mn em relação a solos livremente drenados, apresenta menor capacidade adsortiva e concentrações mais elevadas de cádmio disponível. Brown et al, (1989) encontraram que um decréscimo no potencial redox, ocorrido em um curto período de tempo de alagamento, levou a um considerável aumento na disponibilidade de Ni e Cd em solos minerais enriquecidos naturalmente, mas tais aumentos não ocorreram no solo tratado com lodo, presumivelmente devido a complexação orgânica dos metais.

2.2.2 Biorremediação

Biorremediação é uma tecnologia que utiliza o potencial metabólico de microrganismos e plantas para limpar um ambiente contaminado. Uma importante característica da biorremediação é que esta é realizada em ambientes abertos, não estéreis, que contêm uma variedade de organismos.

Basicamente, são utilizadas quatro técnicas na biorremediação:

- Estimulação da atividade de microrganismos nativos do solo, por adição de nutrientes e regulação das condições de pH;
- Inoculação no solo de microrganismos de habilidade específica para biotransformação;
- Aplicação de enzimas; e
- Uso de plantas para remoção ou contenção dos poluentes.

Esta última técnica que envolve o uso de plantas é uma estratégia conhecida como fitorremediação. Conceitualmente, a fitorremediação é definida como o uso de plantas verdes para remover, conter ou tornar inofensivos os contaminantes ambientais. Esta definição se aplica a todos os processos biológicos, físicos e químicos influenciados pelas plantas que auxiliam na remediação de substratos contaminados (Cunningham & Berti, 1993).

Entre as técnicas de fitorremediação de solos contaminados com metais, a fitoestabilização e a fitoextração são as mais aplicadas.

A fitoestabilização consiste na utilização de plantas para reduzir a mobilidade dos contaminantes do solo através da revegetação. Nesse caso, a tolerância das espécies é importante para sua efetiva implantação em solos contaminados.

Na fitoextração pretende-se uma rápida transferência de metais para a parte aérea das plantas capazes de tolerar esse tipo de estresse e hiperacumular metais pesados, permitindo a eliminação dos metais do solo. O sucesso da fitoextração se baseia em três fatores principais: o grau de contaminação por metal do solo; o grau de biodisponibilidade dos metais (aspectos físicos, químicos); e a grande capacidade das plantas para acumular na parte aérea.

O termo hiperacumulador foi introduzido por Brooks et al. (1977) e originalmente se referia as plantas que absorviam altas concentrações de Ni (1000 mg kg^{-1}) em peso seco. Para outros elementos, o limite de acumulação foi de até 10000 mg kg^{-1} (1%) e para Cd o nível correspondente foi de 100 mg kg^{-1} .

Mais recentemente, Baker & Brooks (1989) definiram hiperacumuladoras como plantas que acumulam $>0,1\%$ do seu peso seco com elementos como Ni, Co ou Pb. Para Zn o limite é $>1\%$ e Cd $>0,01\%$ do seu peso seco. A maioria das plantas hiperacumuladoras já identificadas são para os metais Ni, Zn, Co, Cu e Se. Também existem quatro hiperacumuladoras conhecidas de Pb e uma para Cd e As já

identificadas. No entanto, aproximadamente 75% das hiperacumuladoras caracterizadas são para Ni.

Aproximadamente 400 plantas pertencentes a uma ampla variedade de espécies são classificadas como hiperacumuladoras (Baker & Brooks, 1989). Na Tabela 1, são apresentados as principais famílias e número de espécies conhecidas como hiperacumuladoras de metais pesados.

Tabela 1. Plantas hiperacumuladoras identificadas e as famílias onde são freqüentemente encontradas.

Elemento	Número de espécies	Famílias
Cd	1	Brassicaceae
Co	28	Lamiaceae, Scrophulariaceae
Cu	37	Cyperaceae, Lamiaceae, Poaceae, Scrophulariaceae
Mn	11	Apocynaceae, Cunoniaceae, Proteaceae
Ni	300	Brassicaceae, Cunoniaceae, Flacourtiaceae, Violaceae, Euphorbiaceae
Se	19	Fabaceae
Tl	2	Brassicaceae
Zn	16	Brassicaceae, Violaceae
As	1	Pteridaceae

Fontes: Robinson et al., 1998; Baker et al., 2000; Ma et al., 2001

A partir de 1993, se intensificaram os trabalhos em fitorremediação, quando foram identificadas, por McGrath, as plantas *Thlaspi caerulescens* e *Cardaminopsis halleri*. Ambas acumulam Zn, mas somente *Thlaspi caerulescens* acumula Cd. O cultivo destas plantas pode remover o Cd acumulado durante décadas em pastagens que receberam adubos fosfatados ricos em Cd (McGrath et al, 1993).

A fitorremediação para Pb foi estudada por Huang & Cunningham (1996), que usaram EDTA para formar quelatos com o Pb contido no solo e que poderia ser absorvido pelas plantas na forma de complexos. Por este mecanismo, plantas com alta biomassa, como o milho (*Zea mays*), podem ser usadas para remover o Pb do solo. As plantas crescem normalmente no solo sem extrair muito Pb, porém absorvem grandes concentrações do metal quando EDTA é adicionado. Após este estágio, as plantas começam a morrer mas são então colhidas para remover o poluente. Segundo estes autores, uma possível via de transporte de Pb para o interior das células da raiz seria através dos canais de íons, como os do Ca^{+2} . Foi observado também que as plantas monocotiledôneas acumulam menos Pb que as dicotiledôneas.

A remediação extensiva de íons metálicos no solo e água ao redor de áreas industriais ainda é considerada um desafio (Lovley & Coates, 1997) Embora a maioria das opções disponível se baseie em procedimentos físico-químicos, o uso dos microrganismos e plantas como agentes de biosorção está recebendo uma maior atenção devido ao baixo custo e a grande eficiência (Chaney, 1997; Gadd & White, 1993).

2.2.3 Respostas fisiológicas à contaminação com metais pesados

Os efeitos tóxicos de metais pesados em plantas, podem provocar danos oxidativos diretamente, produzindo as espécies reativas de oxigênio ou indiretamente, inativando o sistema antioxidante da célula (Mannazzu et al., 2000). No entanto, as

plantas podem apresentar diferentes mecanismos de tolerância a metais pesados, incluindo a compartimentalização do metal em estruturas subcelulares; redução do transporte através da membrana; formação de peptídeos ricos em cisteína, como fitoquelatinas e metalotioneínas; e a produção de um sistema antioxidante de defesa que inclui sistemas enzimáticos e não enzimáticos.

Fitoquelatinas

Um dos mecanismos de tolerância a metais pesados em plantas está relacionado com a síntese de peptídeos tiólicos chamados fitoquelatinas $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, onde $n=2-11$, presentes também em fungos e algas (Grill et al, 1989; Maitani et al., 1996; Rauser, 1995). Esses peptídeos são sintetizados enzimaticamente, usando glutationa (GSH) como substrato, através de uma reação catalizada pela enzima fitoquelatina sintase, que é ativada pela presença de metais pesados.

Além das fitoquelatinas, algumas plantas podem apresentar outros peptídeos, relacionados à fitoquelatina, na presença de metais pesados. As leguminosas produzem peptídeos com estrutura $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{Ala}$ (Grill et al., 1986), que são formados por homo-glutationa (h-GSH), que podem substituir parcial ou integralmente o GSH nessas plantas.

Algumas espécies da família Poaceae (Gramineae) produzem peptídeos contendo serina como aminoácido terminal, com estrutura $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, chamados hidroximetil-fitoquelatinas (Klapheck et al., 1994). Esses peptídeos são formados a partir da presença de hidroximetil-glutaciona em adição à glutaciona nessas plantas.

O Cd é o mais forte indutor de fitoquelatinas in vivo (Zenk, 1996), no entanto, a síntese de fitoquelatinas não está relacionada somente a esse elemento. Grill et al. (1987) estudando a síntese de fitoquelatinas em uma suspensão de cultura de células de *Rauvolfia serpentina* exposta a metais, concluiu que os metais induzem a síntese de fitoquelatinas na seguinte ordem decrescente: Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Sb^{3+} , Ag^+ , Hg^{2+} , As^{5-} , Cu^+ , Sn^{2+} , Au^{3+} , Bi^{3+} . Segundo esse mesmo autor, íons Ni, Te, W e Se não induziram a síntese de fitoquelatinas.

Sistemas antioxidantes

A cada ano o estresse ambiental causa perdas consideráveis na qualidade e produtividade dos cultivos. Um dos fatores que causa danos em condições ambientais adversas é a produção de excesso de espécies ativas de oxigênio (EAO) como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^\cdot), que são altamente destrutivas dos lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas da célula vegetal. O estresse oxidativo pode ocorrer em plantas devido a uma série de fatores como extremos de temperatura, radiação UV, estresse hídrico, metais pesados e herbicidas como o paraquat (Gratão, 2003).

As plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de proteção contra o estresse oxidativo, que inativam as EAO. Alguns dos mais importantes antioxidantes são a glutaciona reduzida (GSH), ascorbato (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) e os carotenóides, que são encontrados nas plantas em altas concentrações. Mecanismos enzimáticos também estão envolvidos no processo antioxidante como catalase, superóxido dismutase, glutaciona-reductase e ascorbato-peroxidase (Alscher & Hess, 1993).

A glutaciona é um tripeptídeo (Glu-Cys-Gly) que possui função antioxidante principalmente devido ao grupo sulfidril da cisteína (Zenk, 1996). É encontrado na maioria dos tecidos e compartimentos celulares e subcelulares de plantas superiores e podem ser degradados pela idade do tecido e por condições ambientais. Possui função

antioxidante por diferentes caminhos, podendo reagir quimicamente com íons oxigênio, superóxido e radicais hidroxila reduzindo o acúmulo de radicais livres, pode também estabilizar a estrutura da membrana removendo radicais peróxidos que causam reações de peroxidações de lipídeos de membrana, além de reduzir formas oxidadas de ascorbato. O GSH também é o precursor das fitoquelatinas. Sob exposição ao Cd, muitas espécies inicialmente mostram um decréscimo de GSH, provavelmente devido ao aumento na demanda de GSH para a detoxicação de Cd. Por outro lado, a menor produção de GSH pode ocasionar uma redução nos níveis de ascorbato e enzimas antioxidantes e significativo acúmulo de H₂O₂ (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

O ascorbato é uma importante vitamina na dieta humana e abundante no tecido de plantas. Pode atuar como redutor de muitos radicais livres reduzindo assim danos causados por estresse oxidativo, além de estarem relacionados a muitos processos fisiológicos como crescimento, diferenciação e metabolismo (Foyer, 1993). O ascorbato pode diretamente reduzir radicais livres de oxigênio com ou sem participação enzimática, ou indiretamente reciclar o tocoferol para a forma reduzida.

Os carotenóides estão localizados em plastídios nos tecidos de plantas fotossintéticos e não-fotossintéticos. Nos cloroplastos, os carotenóides têm função como pigmento acessório na absorção de luz, mas provavelmente, a maior função está na habilidade em detoxicar várias formas de oxigênio ativo que são produzidos como resultado da excitação dos sistemas fotossintéticos por um estresse ambiental. Há dois tipos de carotenóides, os carotenos que são hidrocarbonetos e as xantofilas que possuem um ou mais átomos de oxigênio (Demming Adams & Adams, 1993).

Pigmentos fotossintéticos

A luz representa um dos fatores mais heterogêneos utilizados pelas plantas. Enquanto uns pigmentos são responsáveis pela absorção energética (clorofilas) as plantas possuem outros pigmentos acessórios responsáveis pela dissipação do excesso de energia absorvida pela planta. A ação individual ou conjunta de diferentes fatores de estresse ambiental, entre eles os metais pesados, unidos à ação da luz solar, podem colocar a prova a capacidade de resistência e adaptação das plantas a um meio determinado.

Os pigmentos primários são os que têm como principal finalidade a captação de energia luminosa, como a clorofila *a*, sendo também acompanhado de outros pigmentos acessórios como os carotenóides, que incluem os carotenos e as xantofilas, cuja função é por uma parte ampliar o espectro de absorção dos pigmentos primários e por outro lado, servem de proteção diante da luz excessiva. O carotenóide mais importante nas plantas é o β-caroteno, enquanto a luteína é a principal xantofila, mas outras xantofilas, embora não estejam presentes em altas concentrações como as anteriores, possuem um papel decisivo na dissipação de energia excedente como a violaxantina, anteraxantina e zeaxantina. (Demming Adams & Adams, 1993).

O ciclo das xantofilas é um processo flexível que responde não só às condições luminosas (flutuações diurnas, insolações pontuais ou transições sol-sombra) mas também a outros fatores ambientais como metais pesados, temperaturas extremas, déficit hídrico ou disponibilidade de nutrientes (Demming-Adams & Adams, 1993).

3. CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO DA CONTENÇÃO QUÍMICA E FITORREMEDIÇÃO DE Zn E Cd PRESENTES EM UM RESÍDUO CLASSE I DE INDÚSTRIA DE PRODUÇÃO DE ZINCO.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a possibilidade de inertização do resíduo da INGÁ, Classe I, foi realizado inicialmente, um experimento em solução nutritiva para selecionar plantas tolerantes ao Zn e Cd. Foram utilizadas cinco espécies de gramíneas e cinco de leguminosas, as quais foram cultivadas em solução nutritiva contaminada com metais pesados. Após desenvolvimento e ao atingirem a máxima acumulação de matéria seca (60 dias após germinação), as plantas foram coletadas, secas e analisados os teores de Zn e Cd por espectrofotometria de absorção atômica. Para se avaliar a eficiência de resíduos industriais alcalino (silicato de cálcio) e orgânico (lodo do biodigestor de uma cervejaria) na inertização do resíduo da INGÁ, foi conduzido um experimento, em vaso, inteiramente casualizado, constituído de seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram: resíduo da Ingá (testemunha); Ingá + 20% lodo; Ingá + silicato de cálcio (2%; 3%); (Ingá + 20% lodo) + silicato de cálcio (2,5%; 4%). Após estabilização do pH, foram cultivados nos tratamentos as espécies *B. humidicola* e *B. decumbens*, visando avaliar o potencial de tolerância e extração de Zn e Cd presentes no resíduo INGÁ. No plantio e colheita das plantas foram retiradas amostras dos diferentes tratamentos para determinação do pH e extrações simples com água, nitrato de sódio, ácido acético e DTPA. A partir das concentrações de Zn e Cd obtidas nas extrações, foram estimadas, através das diferenças nas quantidades extraíveis, as concentrações de Zn e Cd nas prováveis formas químicas. A adição de resíduos industriais alcalino e orgânico provocou uma significativa redução nas percentagens de Zn e Cd nas frações solúvel e trocável e predominância dos mesmos em frações químicas mais estáveis como complexados e precipitados. A *B. decumbens* foi a planta mais promissora para a utilização na remediação do resíduo, devido à sua maior tolerância e maior capacidade de extração de Zn e Cd presente no resíduo INGÁ, quando comparada à *B. humidicola*. Apesar da redução na solubilidade de metais pesados, nenhum tratamento mudou a classificação do resíduo INGÁ quanto à sua periculosidade, permanecendo na Classe I – perigoso.

Palavras chave: Inertização, resíduos industriais, contaminação, metais pesados

ABSTRACT

To evaluate the possibility of inertization the Ingá residue, Class I, it was conducted initially an experiment in nutrient solution to select plants tolerant to Zn and Cd. It was studied five grasses and five leguminous, cultivated in nutrient solution contaminated with Zn and Cd. Another experiment was carried out to evaluate the efficiency of industrial residues: alkaline (calcium silicate) and an organic (sewage sludge) in the inertization of Ingá residue. The experiment had six treatments and four replicates arranged in a completely randomized design. The treatments were: Ingá residue (control); Ingá + 20% sewage sludge; Ingá + 2% calcium silicate; Ingá + 3% calcium silicate; (Ingá + 20% sewage sludge) + 2,5% calcium silicate; (Ingá + 20% sewage sludge) + 4,0 % calcium silicate. After pH stabilization, it was cultivated in the treatments *B. humidicola* and *B. decumbens* to evaluate the potential of tolerance and extraction of the Zn and Cd in the Ingá residue. Before planting and after harvesting time, residue samples were collected in the different treatments to determine the pH and accomplished simple extraction with water, sodium nitrate, acetic acid and DTPA. After the extraction were defined through the differences in the amounts extracted the chemical fractions of Zn and Cd in the residue. It was verified that addition of alkaline and organic residues provoked an accentuated reduction of Zn and Cd percentage in the soluble and exchangeable, having a predominance of the same ones, in fractions stableer, as specifically bound and precipitate with carbonate. *B. decumbens* demonstrated the promising potential to remediation of the residue, due its large tolerance and capacity of extraction of Zn and Cd in the Ingá residue. Although the reduction of the heavy metals solubility, any treatment change the classification of the Ingá residue, staying in the Class I- dangerous.

Key words: inertization, industrial residues, contamination, heavy metals

3.1 Introdução

A Cia Mercantil e Industrial INGÁ, atualmente em situação falimentar, tem em termos de passivo ambiental, um peso considerável sobre o ecossistema da região da Baía de Sepetiba, sendo considerada a maior poluidora da história da região. Seus estoques de resíduos, acumulados há mais de 30 anos no local de produção, estão estimados em 2 milhões de m³, ameaçando o equilíbrio ecológico da baía, sendo de responsabilidade da empresa a contaminação, por metais pesados, dos solos e plantas da região, além dos sedimentos marinhos, e milhares de peixes e mariscos, dizimando a pesca na região. Estudos realizados pelo Laboratório de Oceanografia Química da UERJ (dados ainda não publicados), mostraram que crustáceos e moluscos dessa região apresentaram índices de Zn muito acima do máximo permitido pela Divisão Nacional de Alimentos. As ostras continham quantidade de Zn 30 vezes superior ao limite tolerável.

Uma técnica promissora, para a remediação de áreas contaminadas é a fitorremediação, que já tem sido estudada e utilizada (Baker et al., 1994; Chaney, 1997; Raskin et al., 1997; Gleba et al., 1999; Kamnev, 2003). Essa técnica envolve o uso de plantas em várias estratégias de manejo de solos e possui uma série de vantagens por não agredir o meio ambiente, ser simples e de baixo custo.

A absorção de metais pelas plantas é dependente da biodisponibilidade relativa do metal na matriz contaminada. Mudanças na química do solo, como a diminuição de pH ou a limitação do *input* de ânions no sistema, podem aumentar a disponibilidade de muitos metais para a absorção pelas raízes. Mudanças no *status* microbiano da rizosfera (ex: presença de micorrizas) podem também ter profundos efeitos (positivos ou negativos) sobre a absorção de metais pelas raízes (Nogueira, 1996).

Grandes esforços têm sido feitos para integrar conhecimentos que facilitem a reabilitação de solos poluídos com metais pesados, e assim, possibilitar o retorno da funcionalidade e estabilidade do ecossistema formado (Vangronsveld & Cunningham, 1998). Para isto, procura-se amenizar o efeito da fitotoxicidade dos metais no solo, visando ao estabelecimento da vegetação. Estudos realizados em regiões temperadas com plantas tolerantes membros da família Poaceae (*Agrostis tenuis*, *Agrostis stolonifera* e *Festuca rubra*) e Brassicaceae (*Brassica rapus*, *Brassica juncea* e *Thlaspi* spp.) evidenciam as oportunidades para a remediação de solos contaminados, com estas espécies (Salt et al., 1998). No Brasil, apesar dos estudos nessa área ainda serem muito escassos, trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de avaliar o comportamento de espécies herbáceas na fitorremediação de áreas contaminadas com metais pesados (Carneiro et al., 2002).

Diferenças na tolerância, no ciclo biológico, na rusticidade e na facilidade de estabelecimento em áreas desprovidas de vegetação são características que podem contribuir para o sucesso da estabilização de plantas em áreas com solos poluídos por metais pesados.

Diante disso, o trabalho teve como objetivos:

- Avaliar a tolerância e acumulação, de diferentes espécies vegetais, a diferentes doses de Cd e Zn;
- Avaliar o comportamento químico do Cd e Zn presentes no resíduo INGÁ, após tratamentos com resíduos industriais alcalino e orgânico;
- Avaliar o potencial de fitorremediação do resíduo INGÁ, classificado como Classe I.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Seleção de plantas tolerantes a Zn e Cd em cultivo hidropônico

O experimento foi conduzido em condições de casa de vegetação, utilizando-se solução nutritiva em vasos de cinco litros, sendo avaliadas cinco espécies de gramíneas e cinco de leguminosas quanto ao potencial de absorção e tolerância a elevadas concentrações de Zn e Cd. As espécies utilizadas no experimento foram:

Gramíneas:

- *Brachiaria decumbens* – decumbens;
- *B. humidicola* – humidicola;
- *Oryza sativa* - Arroz cv. Caiapó;
- *O. sativa* - Arroz cv. Comum Branco;
- *Pennisetum glaucum* – Milheto BRS 1501.

Leguminosas:

- *Canavalia ensiformes* – feijão de porco;
- *Mucuna aterrima* – mucuna preta;
- *Crotalaria juncea* – crotalária;
- *Cajanus cajan* – guandu;
- *Vigna unguiculata* – caupi.

As sementes foram colocadas para germinar em areia autoclavada, sendo umedecidas com água destilada por aproximadamente quinze dias. Após esse período, essas plântulas foram transferidas para vasos contendo cinco litros de solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), a meia força iônica e enriquecida com Zn e Cd, separadamente. Para as gramíneas, foram testadas duas doses de Cd e Zn, estabelecidas a partir das concentrações obtidas no teste de solubilização do resíduo. Para Cd foram testadas as doses de 0, 10 e 20 ppm e para Zn 0, 250 e 500 ppm. Devido à redução drástica no desenvolvimento das gramíneas e considerando a menor tolerância das leguminosas à contaminação, as doses de Zn e Cd, para o experimento com as leguminosas, foram reduzidas e estabelecidas a partir dos níveis de Zn e Cd em solos contaminados segundo Alloway (1995), sendo para Cd, testadas as doses de 0; 1,5 e 3,0 ppm e para Zn 0; 25 e 50 ppm.

O pH da solução nutritiva foi mantido a 5,0 com ajustes de dois em dois dias e a solução foi trocada semanalmente. A aeração dos vasos foi feita a cada oito horas, durante uma hora contínua.

O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado, utilizando como fatores dose e planta, com 3 repetições para cada tratamento.

Após 60 dias, essas plantas foram coletadas, separadas em raízes e parte aérea, e feita digestão nitro-perclórica segundo Tedesco et al. (1995) e os extratos analisados por espectrofotometria de absorção atômica para os metais Cd e Zn.

3.2.2 Coleta e caracterização do resíduo da Ingá

A amostra de resíduo utilizada foi coletada em dezembro de 2002. A coleta consistiu em retirar amostras simples do topo, meio e base da pilha de resíduo mantida no pátio de armazenamento da indústria formando uma amostra composta de 100 kg (ABNT, 1987). No laboratório, a amostra do resíduo foi seca ao ar, destorroada e passada por peneira de 2 mm de malha.

Foram determinados os teores de macronutrientes, sódio, alumínio, carbono orgânico, pH em água. O carbono orgânico foi determinado pelo método proposto por Yeomans & Bremner (1988). Os macronutrientes, sódio, alumínio e pH_{H_2O} na proporção 1:2,5 (solo:água), foram determinados segundo metodologia da EMBRAPA (1997).

Foram determinados os teores totais, solúveis e lixiviáveis de alguns metais pesados neste resíduo. Os teores totais foram determinados por digestão nitro-perclórica 2:1 (Scott, 1978). Os teores solúveis e lixiviáveis foram determinados pelos testes de solubilização e lixiviação segundo as normas da ABNT (1987). Nos extratos obtidos na digestão e no teste de solubilidade foram determinados os teores de Zn, Cd, Cu, Fe, Mn e Pb por espectrofotometria de absorção atômica, empregando-se o equipamento VARIAN- AA600. Nos extratos obtidos no teste de lixiviação, no entanto, foram determinados somente Cd e Pb, pois entre os metais que estão presentes em elevadas concentrações no resíduo INGÁ, esses são os elementos que podem conferir periculosidade ao resíduo.

3.2.3 Inertização do resíduo Ingá

Para avaliar a possibilidade de inertização do resíduo da INGÁ foram usados, como redutores da solubilidade de Zn e Cd, o resíduo industrial alcalino de silicato de cálcio e o resíduo orgânico do biodigestor de uma cervejaria.

O resíduo silicato de cálcio é gerado na troca do revestimento das tubulações da Petrobrás. Esse resíduo foi coletado no pátio de armazenamento da Petrobrás, no município de Duque de Caxias - RJ.

O lodo do biodigestor da cervejaria Kaiser foi obtido na estação de tratamento da cidade de Queimados - RJ. O carbono orgânico neste lodo foi determinado pelo método de Yeomans & Bremner (1988), sendo encontrado um teor de matéria orgânica de 20%.

Esses resíduos foram coletados de acordo com as normas de coleta estabelecidas pela ABNT (1987), conforme descrito anteriormente. Em laboratório esses resíduos foram secos ao ar, destorroados, passados por peneira de 2 mm e caracterizados quanto aos teores totais de alguns metais pesados e pH em água (1:2,5).

A dose adicionada do lodo do biodigestor foi estimada de modo que a mistura final ficasse com teor de matéria orgânica de 2% do peso dos vasos, com o objetivo de avaliar o potencial da matéria orgânica na imobilização de metais pesados.

No resíduo silicato de cálcio, a proporção entre as misturas foi determinada mediante curva de neutralização visando um pH de equilíbrio nos valores de 6,5 e 7,0 na mistura.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em vasos de 30 litros, com os seguintes tratamentos:

- Resíduo Ingá (testemunha);
- Resíduo Ingá + 20% de resíduo do biodigestor de uma cervejaria;
- Resíduo Ingá + 2% de resíduo silicato de cálcio;
- Resíduo Ingá + 3% de resíduo silicato de cálcio;
- (Resíduo Ingá + 20% de resíduo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% de resíduo silicato de cálcio;
- (Resíduo Ingá + 20% de resíduo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% de resíduo silicato de cálcio.

Esses resíduos foram acondicionados em vasos de 30 litros, onde ficaram incubados até a estabilização do pH, determinado a partir da curva de neutralização, por um período de mais ou menos 30 dias, sendo cultivadas em seguida as plantas que melhor se desenvolveram no experimento em solução nutritiva. O modelo estatístico

utilizado foi o inteiramente casualizado, utilizando como fatores dose e planta, com 6 repetições para cada tratamento.

A irrigação foi feita manualmente, permanecendo os vasos a 80% da capacidade de campo.

Foram retiradas amostras de resíduo no plantio e colheita das plantas estudadas, para a determinação do pH em água (1:2,5); realização de extrações simples, utilizando-se os seguintes extratores: (i) água; (ii) nitrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (Keller & Védy, 1994); (iii) DTPA (Lindsay & Norvell, 1978); e (iv) ácido acético 0,043 mol L⁻¹ (Ure et al., 1993); e para teste de solubilização e lixiviação (ABNT, 1987), para classificação do resíduo. Nos extratos obtidos foram determinados os teores de Cd e Zn por espectrofotometria de absorção atômica.

As primeiras plantas cultivadas nesses tratamentos foram a *B. humidicola* e *B. decumbens*, sendo cultivadas por um período de mais ou menos 45 dias, por serem as plantas que melhores resultados apresentaram quanto à tolerância à Zn e Cd no experimento em solução nutritiva. Após o ciclo das braquiárias foi cultivada o caupi, pois entre as leguminosas, foi a planta que melhores resultados apresentou em tolerância ao Zn. No entanto, as plantas de caupi não apresentaram tolerância às condições físico-químicas do resíduo nos diferentes tratamentos e morreram na primeira semana de cultivo.

Após a colheita, as plantas foram separadas em raiz e parte aérea, secas em estufa com circulação de ar a 70^oC, feita digestão nitro-perclórica, segundo Tedesco et al. (1995), e os extratos lidos em espectrofotometria de absorção atômica para os metais Cd e Zn.

3.2.4 Determinação das possíveis frações químicas de metais pesados

Com os resultados obtidos por extrações simples, foram definidas pelas diferenças nas quantidades extraíveis, as prováveis frações químicas de Zn e Cd nos tratamentos. As frações químicas definidas foram:

F1: extração com água ⇒ fração solúvel em água

F2: extraído com NaNO₃ – extraído com água ⇒ corresponde aos metais ligados eletrostaticamente à superfície do resíduo.

F3: extraído com DTPA – extraído com NaNO₃ ⇒ fração associada predominantemente à superfície de óxidos de Fe e compostos orgânicos mais estáveis pela formação de complexos de esfera interna.

F4: extraído com ácido acético – extraído com NaNO₃ ⇒ fração associada predominantemente a precipitados de carbonatos.

F5: total – ∑ das frações (F1; F2; F3 e F4) ⇒ fração associada a compostos de Fe com alto grau de cristalinidade (Fração residual).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Experimento em solução nutritiva

Gramíneas

A produção de matéria seca nas gramíneas foi reduzida significativamente pela aplicação de doses crescentes de Zn e Cd, mostrando um efeito de toxicidade para essas plantas (Figura 2). Segundo Larsson et al., (1998) a exposição de plantas a níveis tóxicos de Cd e Zn durante períodos de tempo relativamente longos, acarreta quase sempre, em forte interferência sobre o crescimento das plantas, devido ao decréscimo da fotossíntese, redução na absorção e no transporte de nutrientes, podendo resultar em eventual morte das plantas.

As plantas sofreram clorose e redução drástica no desenvolvimento em todas as doses de Zn aplicadas e estes sintomas evoluíram com o tempo, sendo coletadas antes de completar o seu ciclo. Na dose de Cd mais elevada, foram observadas além da redução no crescimento, amarelecimento nas folhas.

O milho foi a planta menos tolerante ao Zn e Cd, apresentando morte das plantas na primeira semana de exposição aos metais.

Segundo Barceló & Poschenrieder (1992), o agravamento dos sintomas com o tempo de exposição à contaminação decorre do maior acúmulo dos metais com a absorção contínua, atingindo teores tóxicos nas plantas e causando aumento dos efeitos fitotóxicos dos metais e distúrbios fisiológicos na planta. Portanto, os sintomas de fitotoxidez observados nas plantas nas diferentes doses de Cd e Zn, devem ser decorrentes dos elevados teores desses elementos observados nos seus tecidos. Soares (1999) determinou, em solução nutritiva, níveis críticos de toxidez de Cd para *Eucalyptus maculata* ($14,5 \text{ mg kg}^{-1}$) e para *E. urophylla* ($10,8 \text{ mg kg}^{-1}$), que são próximos aos utilizados nesse experimento.

As plantas mostraram um comportamento distinto em relação à tolerância ao Zn e Cd. O arroz Caiapó e Comum Branco foram as plantas que mais reduziram a produção de matéria seca, principalmente na parte aérea (Figura 2), nas doses de Zn aplicadas, mostrando uma reduzida tolerância a essas concentrações de Zn. A redução na matéria seca das braquiárias foi menor quando comparada às cultivares de arroz, com destaque para a produção de matéria seca da raiz da *Brachiaria decumbens* na dose 2 (500 mg L^{-1}), que produziu uma quantidade significativamente maior quando comparada às outras espécies estudadas.

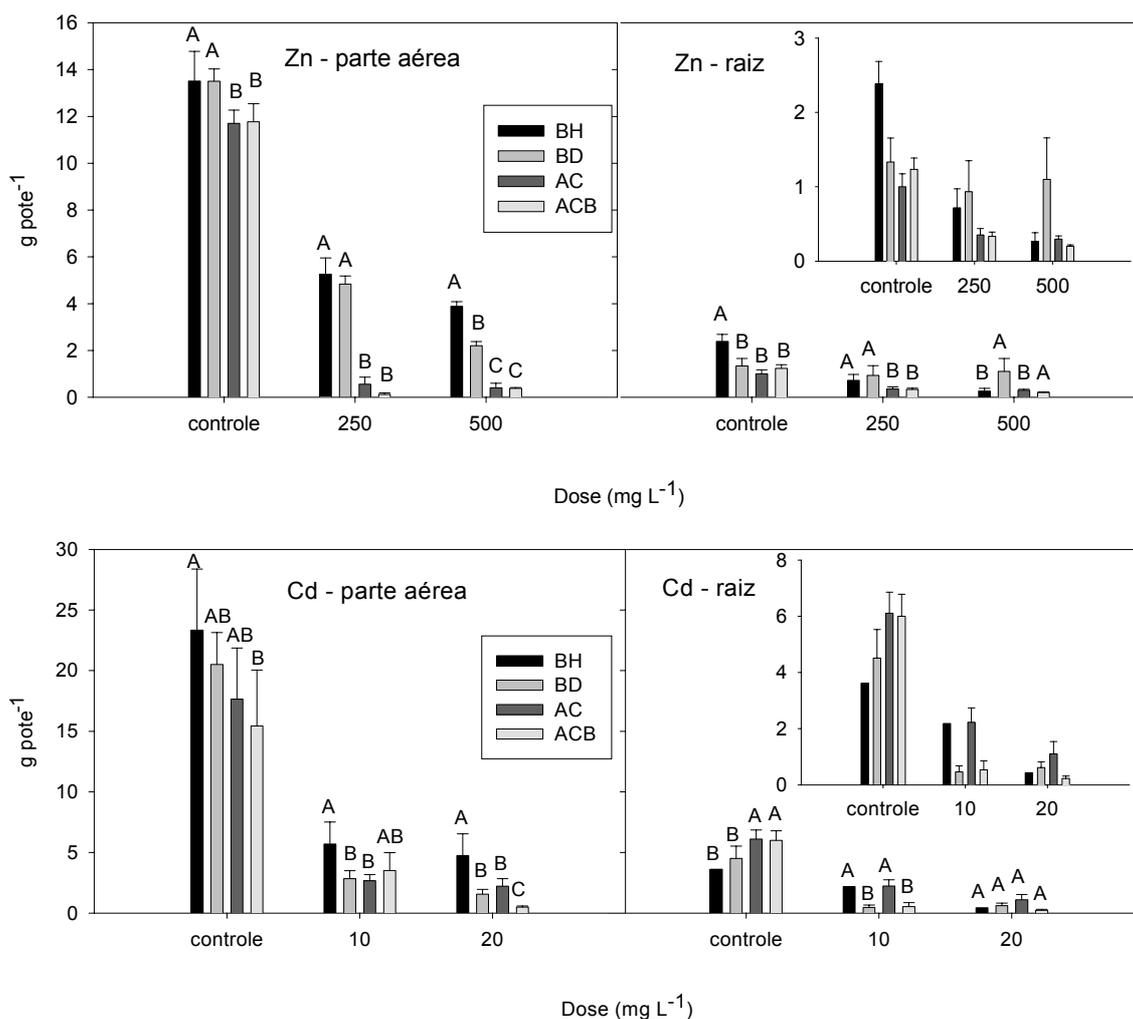


Figura 2. Matéria seca (g) da parte aérea e raiz de gramíneas cultivadas em solução nutritiva contendo Zn e Cd.

BH=*B. humidicola*; BD=*B. decumbens*; AC=arroz Caiapó; ACB=arroz Comum Branco

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% entre plantas.

Com relação ao Cd (Figura 2), as diferenças entre as espécies na produção de matéria seca na parte aérea, não foram tão pronunciadas como para o Zn, embora todas as plantas tenham apresentado redução no desenvolvimento quando comparadas à testemunha. Na raiz, a *Brachiaria humidicola* e o arroz Caiapó foram as plantas que mais se desenvolveram na dose 1 (10 mg L⁻¹), mostrando certa tolerância a essa dose estudada, com relação as demais espécies.

A extração de Zn e Cd nas gramíneas aumentou com as doses aplicadas (Figura 3), sendo maior na parte aérea do que nas raízes. Isso pode ser uma característica favorável para a fitorremediação, visto que o objetivo é o acúmulo de metais pesados na parte aérea e a posterior retirada da planta do sistema.

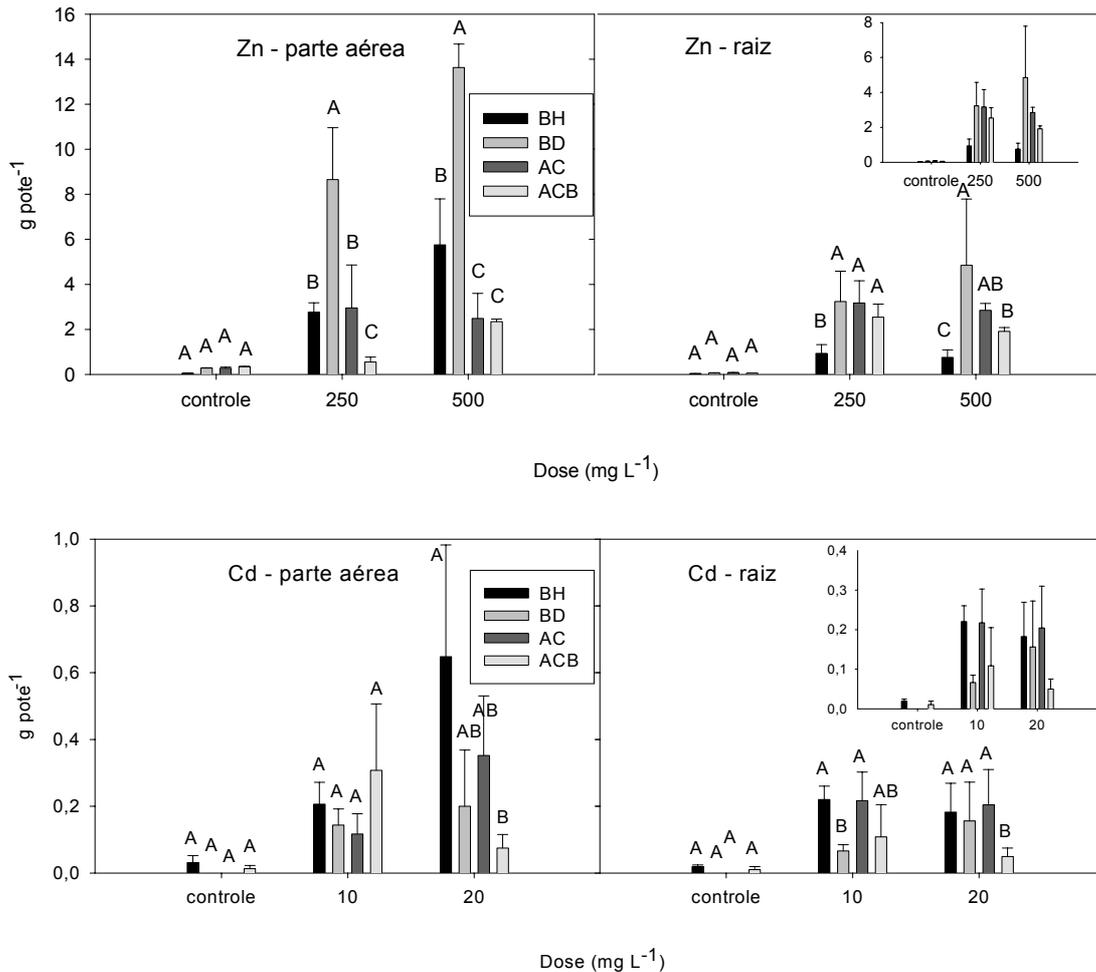


Figura 3. Acúmulo de Zn e Cd na parte aérea e raiz de gramíneas cultivadas em solução nutritiva contendo Zn e Cd.

BH=*B. humidicola*; BD=*B. decumbens*; AC=arroz Caiapó; ACB=arroz Comum Branco

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% entre plantas.

Com relação ao Zn, a planta que mais extraiu esse metal da solução nutritiva foi a *B. decumbens*, tanto na raiz como na parte aérea. No entanto, para o Cd, a *B. humidicola* e o arroz Caiapó foram as plantas com maior potencial de extração. O arroz Comum Branco extraiu maior quantidade de Cd na parte aérea na dose 1 (10 mg L⁻¹), no entanto, na dose 2, a quantidade extraída foi significativamente menor quando comparada às outras plantas, devido à redução drástica no peso seco dessa planta (Figura 2), mostrando uma menor tolerância a dose de 20 mg L⁻¹.

Leguminosas

As doses de Cd e Zn aplicadas em solução nutritiva (Figura 4), reduziram o desenvolvimento e, conseqüentemente, a produção de matéria seca nas raízes e parte aérea das plantas.

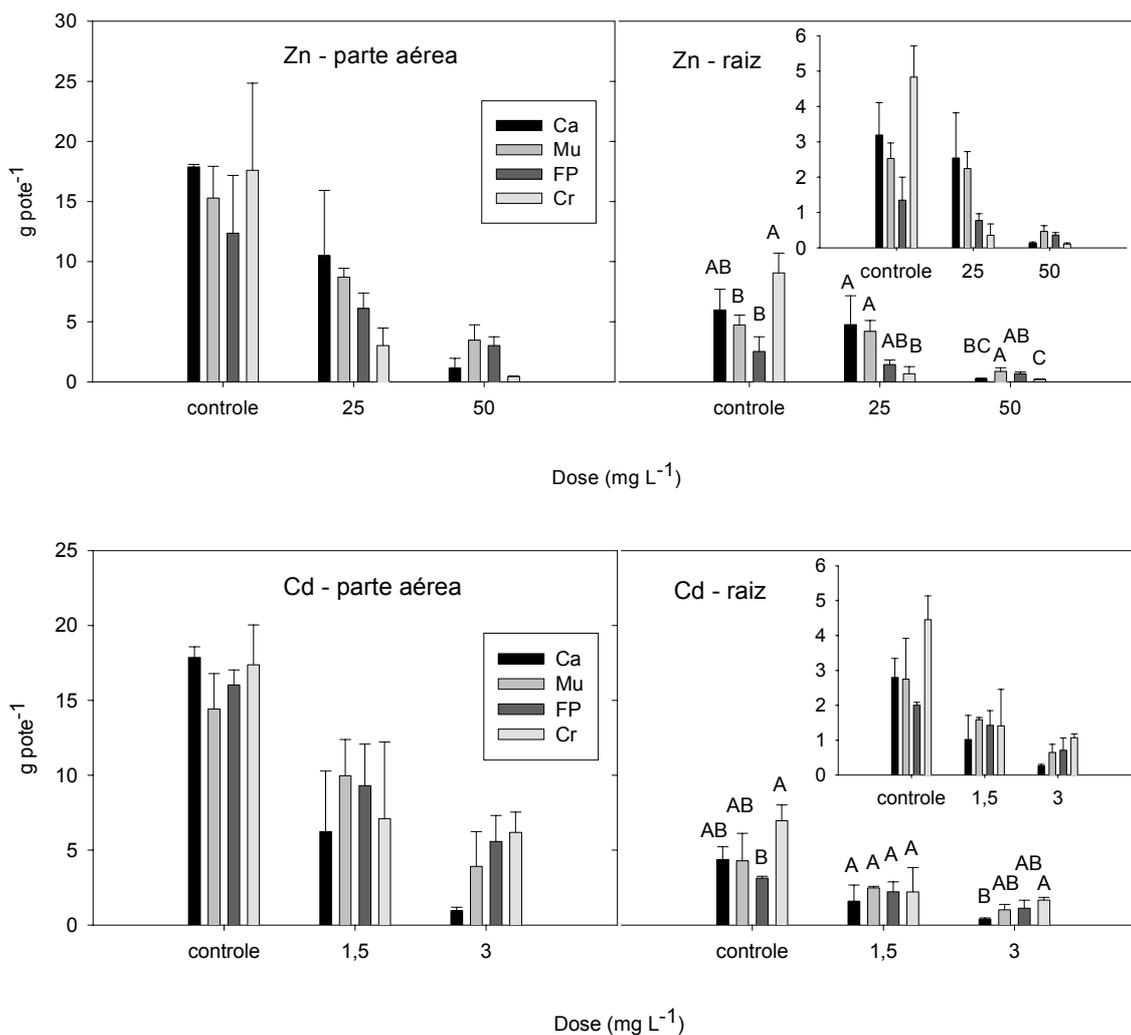


Figura 4. Matéria seca (g) da parte aérea e raiz de leguminosas cultivadas em solução nutritiva contendo Zn e Cd.

Ca=caupi; Mu=mucuna; FP=feijão de porco; Cr=crotalária

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% entre plantas.

Gráficos sem letras não houve diferença significativa entre plantas segundo análise de variância.

A crotalária foi a espécie menos tolerante às doses de Zn estudadas, devido à maior redução na produção de matéria seca da parte aérea e da raiz nas doses de Zn estudadas, quando comparadas às outras espécies. Quando se analisa a tolerância ao Cd, observa-se na Figura 4, que para o caupi houve redução drástica da produção de matéria seca na dose 2 (3,0 mg L⁻¹).

Além da redução no desenvolvimento, a contaminação provocou clorose nas plantas na dose mais elevada de Cd ao longo do período de cultivo. Para Breckle & Kahle (1992), a ocorrência de clorose pode estar relacionada com a deficiência múltipla de vários elementos que participam da formação, multiplicação e funcionamento de cloroplastos, ou na síntese de clorofila. Essa deficiência de nutrientes pode ser resultado da inibição competitiva que o Cd e o Zn podem exercer na absorção de outros íons (Malavolta, 1994).

O guandu não foi tolerante às doses de Zn e Cd aplicadas, apresentando morte na primeira semana de exposição ao Zn e Cd.

A extração de Zn, foi maior na dose 1 (25 mg L⁻¹) (Figura 5), sendo maior nas raízes do que na parte aérea, devido principalmente às maiores concentrações de Zn nas raízes das plantas. A maior acumulação de metais nas raízes, pode ser um indicativo de que a planta limitou a translocação de metais para a parte aérea. A capacidade da planta em imobilizar o metal nas raízes, limitando sua translocação para a parte aérea, é um dos mecanismos de tolerância de algumas espécies de plantas aos metais pesados (Baker, 1981). Esta acumulação pode estar conferindo certa tolerância a essas plantas nas condições estudadas.

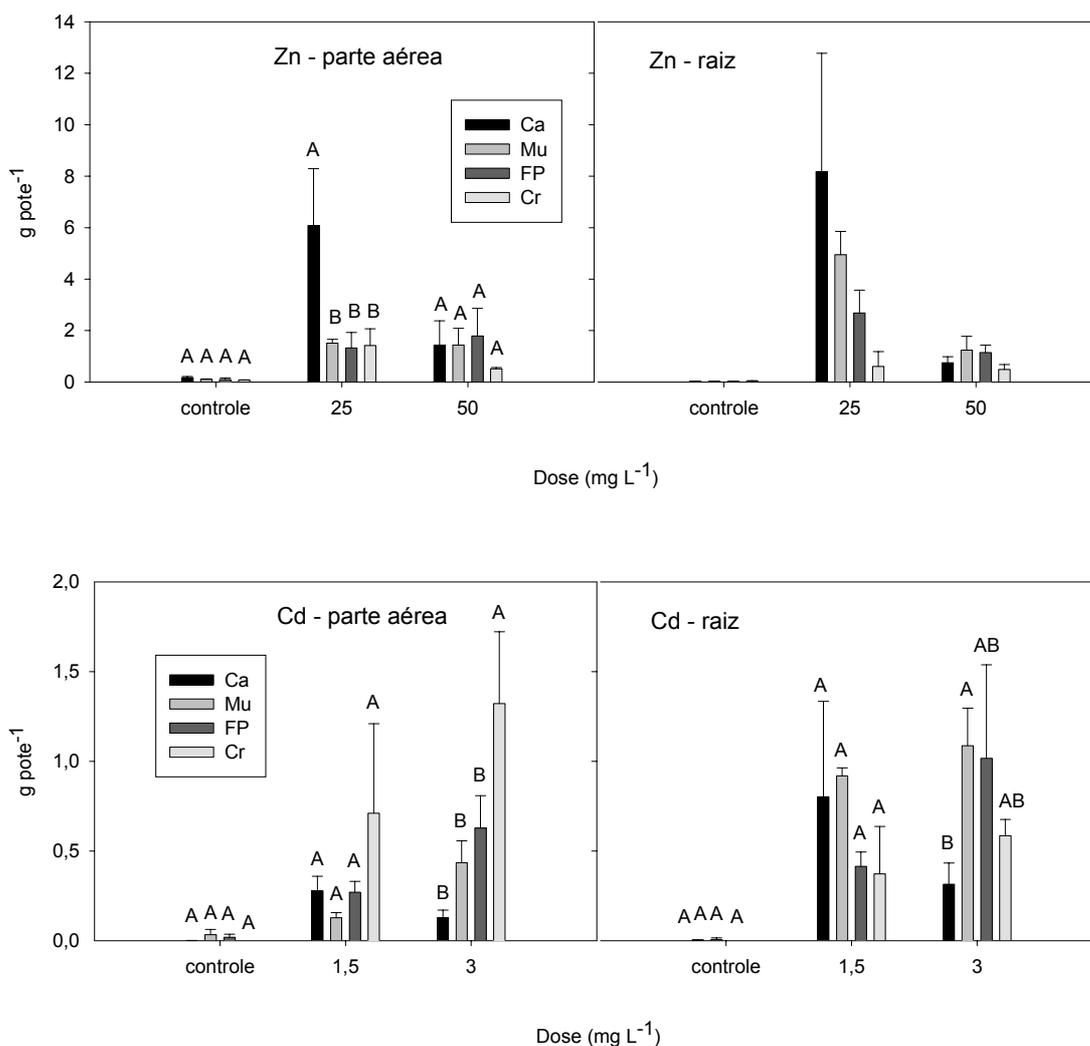


Figura 5. Acúmulo de Zn e Cd na parte aérea e raiz de leguminosas cultivadas em solução nutritiva contendo Zn e Cd.

Ca=caupi; Mu=mucuna; FP=feijao de porco; Cr=crotalária

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições ± erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% entre plantas.

Gráficos sem letras não houve diferença significativa entre plantas segundo análise de variância.

Na dose mais elevada de Zn aplicada (50 mg L⁻¹), o acúmulo de Zn reduziu, principalmente devido a redução drástica na matéria seca dessas plantas (Figura 4). Essa redução foi mais pronunciada para o caupi, que extraiu uma quantidade de Zn consideravelmente maior que as outras plantas na dose 1.

O caupi foi a leguminosa que mais acumulou Zn na parte aérea e na dose 1 (25 mg L⁻¹), devido à maior absorção e translocação desse elemento da raiz para a parte aérea. No entanto, na dose 2 (50 mg L⁻¹), a quantidade de Zn acumulado reduziu significativamente, devido principalmente à redução na produção de matéria seca dessa planta (Figura 4), reduzindo, assim, a capacidade extratora da planta o que demonstra baixa tolerância à contaminação por 50 mg L⁻¹ de Zn.

Apesar da maior concentração de Zn em todas as plantas na dose 2 (50 mg L⁻¹) quando comparada à dose 1 (25 mg L⁻¹), observa-se redução significativa na extração de Zn, o que poderá ser atribuída ao seu efeito tóxico, que deverá ter contribuído para com a drástica redução na produção de matéria seca das plantas (Figura 4).

O acúmulo de Cd pelas plantas de mucuna, feijão de porco e crotalária aumentou com as doses aplicadas (Figura 5), sendo que a crotalária acumulou uma quantidade de Cd expressiva na parte aérea, superior à das raízes. Esse resultado pode ser uma característica favorável para a fitorremediação, visto que o objetivo é o acúmulo de metais pesados na parte aérea e a retirada da planta do sistema.

Analisando o caupi na dose 2 (3,0 mg L⁻¹), pode-se observar que houve uma redução no acúmulo de Cd com relação à dose 1, devido provavelmente, à redução na produção de matéria seca nessa dose (Figura 4). De acordo com Turner (1973), em doses elevadas de Cd em solução, os mecanismos de absorção passam a ser afetados pela toxicidade do elemento acarretando menores taxas de absorção. A crotalária acumulou maiores quantidades de Cd na parte aérea quando comparado às outras espécies, devido principalmente a maior produção de matéria seca e a maior translocação para a parte aérea do Cd absorvido, indicando, possivelmente, uma maior tolerância a esse elemento.

3.3.2 Caracterização do resíduo Ingá

De acordo com a Tabela 2, podem ser observadas elevadas concentrações de Ca, Mg, P e K nesse resíduo, provavelmente devido aos elevados teores desses nutrientes presentes no minério de calamina.

Tabela 2. Análise de fertilidade de amostras do resíduo Ingá.

Resíduo	Ca	Mg	H+Al	Al	Na	C	P	K	pH
	----- mmol _c kg ⁻¹ -----					----- g kg ⁻¹ -----			
Ingá	2.500	410	46	0	9,80	1	0,174	0,094	5,6

Pode-se verificar elevadas concentrações totais de Zn, Cd, Fe, Mn e Pb no resíduo INGÁ (Tabela 3). Com relação às concentrações solúveis, verificam-se elevadas concentrações de Zn e Cd, elementos que são mais facilmente lixiviáveis aumentando os riscos de contaminação do lençol freático e de outras áreas da região.

Tabela 3. pH e concentrações médias totais e solúveis de metais pesados contidos no resíduo Ingá.

Resíduo	Zn	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	pH
	mg kg ⁻¹						
Ingá	22.294,4	175,2	123,2	79.986,7	5.525,6	2.486,8	5,6
Teste de solubilidade	1.755(7,9)	31,7(18)	0,10(0,08)	0,93(0,04)	34,1(0,6)	0,93(0,04)	
Teste de lixiviação		43,4				1,60	

Os números entre parênteses correspondem a percentagem em relação ao total.

Com relação ao teste de lixiviação, verificam-se elevadas concentrações de Cd com potencial de ser perdido por lixiviação. Segundo as normas da ABNT, entre os metais analisados, somente o Cd e o Pb classificam o resíduo como perigoso. Segundo essas normas, a concentração de Cd lixiviável deveria ser inferior a $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ para o resíduo não ser considerado perigoso. Portanto, segundo esses resultados, esse resíduo possui quase noventa vezes mais Cd que o valor permitido no teste de lixiviação, sendo classificado como resíduo Classe I - perigoso e deveria ser acondicionado em locais adequados, sendo necessária a utilização de técnicas de remediação para a redução da toxicidade desse resíduo.

Apesar dos elevados teores totais de Pb presentes nesse resíduo, as concentrações lixiviáveis estiveram abaixo dos níveis permitidos segundo ABNT (1987), que é 5 mg kg^{-1} .

De acordo com a Tabela 4, pode ser observado que o lodo e o silicato de cálcio que foram utilizados como inertizantes do resíduo Ingá, possuem baixas concentrações de metais pesados, não apresentando, portanto, a característica de periculosidade.

Tabela 4. Concentrações totais de metais pesados e pH dos resíduos utilizados como inertizantes.

Resíduos	Zn	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	pH
				mg kg^{-1}			
Lodo	279,5	1,7	376,2	18.844,6	203,8	92,7	5,8
Silicato de cálcio	29,7	1,5	1,0	0,0	94,7	23,0	9,6

3.3.3 Inertização do resíduo

Observa-se nas Figuras 6 e 7, uma significativa redução na percentagem de Zn nas frações de maior biodisponibilidade, F1 (solúvel em água) e F2 (trocável), em todos os tratamentos, quando comparados à testemunha. A redução foi mais significativa nos tratamentos com pH 7,0 (Tratamentos 4 e 6) (Tabela 5), principalmente no tratamento com matéria orgânica (Tratamento 6), demonstrando a importância do pH e da matéria orgânica na precipitação e complexação de Zn no resíduo.

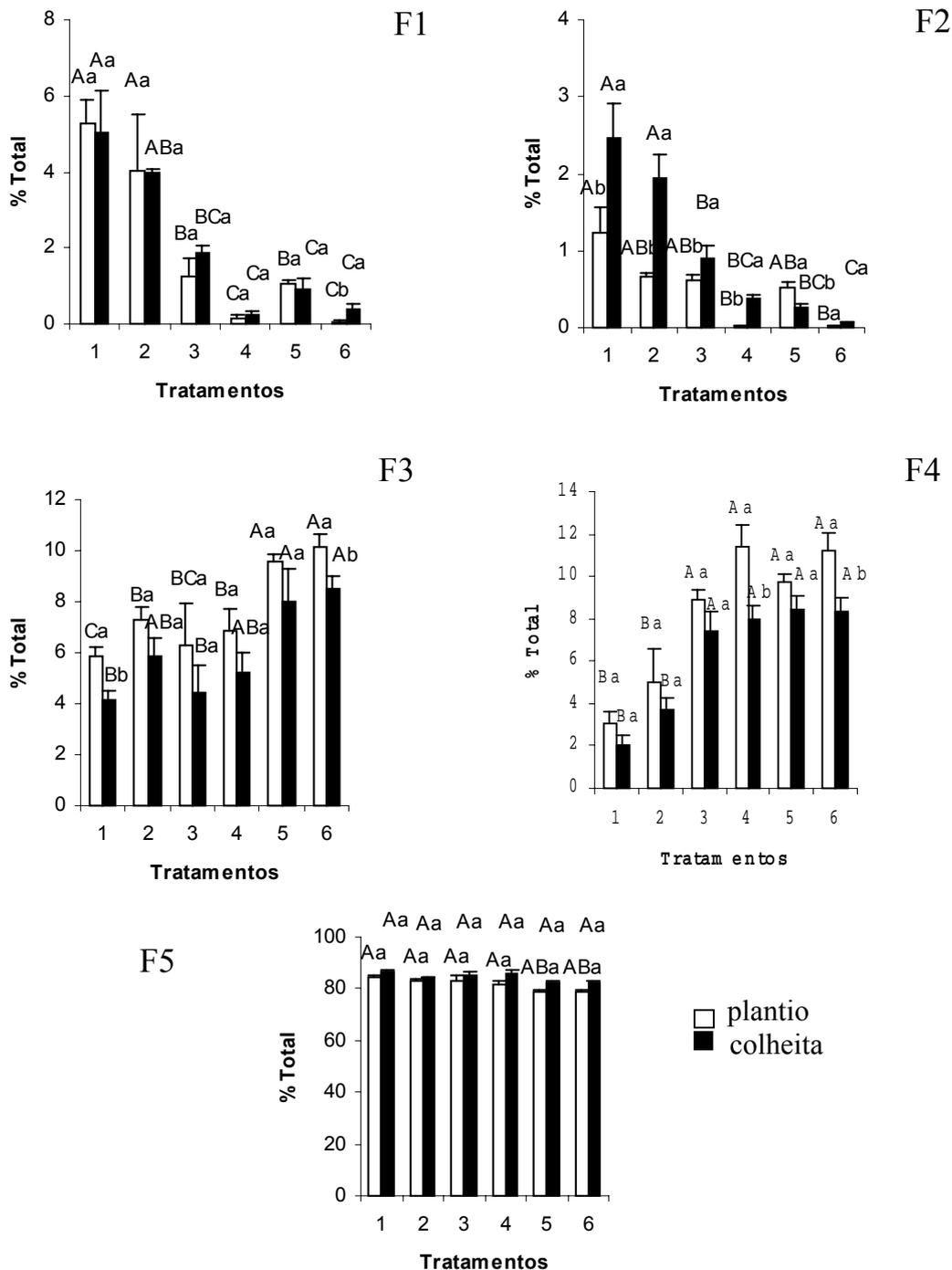


Figura 6. Porcentagem de Zn, em relação ao total, nos diferentes tratamentos e frações químicas no plantio e colheita da *B. humidicola*.

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições ± erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamento e minúscula para época não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

F1: extração com água; F2: extraído com NaNO₃-extraído com água; F3: extraído com DTPA – extraído com NaNO₃; F4: extraído com ácido acético-extraído com NaNO₃; F5: total-Σ das frações (F1, F2, F3 e F4).

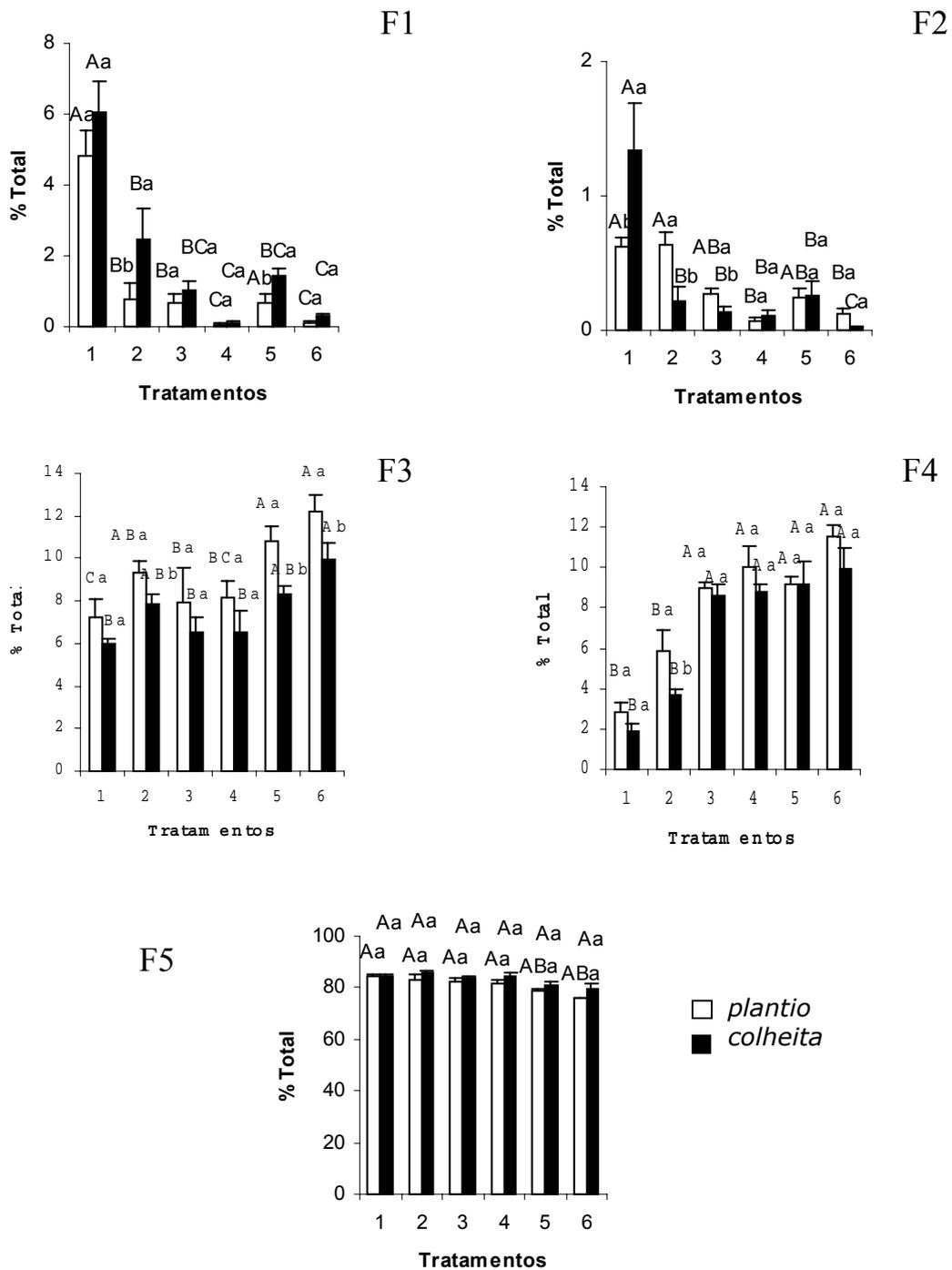


Figura 7. Porcentagem de Zn, em relação ao total, nos diferentes tratamentos e frações químicas no plantio e colheita da *B. decumbens*.

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamento e minúscula para época não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

F1: extração com água; F2: extraído com NaNO₃-extraído com água; F3: extraído com DTPA – extraído com NaNO₃; F4: extraído com ácido acético-extraído com NaNO₃; F5: total- Σ das frações (F1, F2, F3 e F4).

Tabela 5. Valores médios do pH nos diferentes tratamentos, no plantio e na colheita de *B. humidicola* e *B. decumbens*.

Tratamentos	<i>B. humidicola</i>		<i>B. decumbens</i>	
	plantio	colheita	plantio	colheita
1	5,94±0,06	5,70±0,02	6,05±0,03	5,70±0,10
2	6,33±0,11	6,18±0,07	6,23±0,06	6,04±0,14
3	6,37±0,04	6,16±0,31	6,33±0,12	6,22±0,13
4	7,06±0,13	6,42±0,34	7,03±0,11	6,83±0,28
5	6,38±0,13	6,06±0,12	6,42±0,18	6,18±0,13
6	7,30±0,23	6,96±0,22	7,10±0,10	7,13±0,21

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições ± erro padrão.

O pH tendeu a decrescer na colheita das plantas quando comparado ao plantio (Tabela 5), provavelmente pelo cultivo das plantas e exudação de compostos pelas raízes das braquiárias.

O decréscimo nas frações F1 e F2 foi acompanhado de um aumento nas frações de menor solubilidade, principalmente F3 e F4 (Figura 6 e 7). Como as reações de precipitação, complexação e adsorção de metais pesados são favorecidas pela elevação do pH e da presença de matéria orgânica (Sposito, 1989), a adição de produtos de reação alcalina e orgânica provavelmente favoreceu a transferência de Zn das frações mais solúveis para as de menor solubilidade. Essa transferência pode ser confirmada na Tabela 6, na qual se verifica que as frações F1 e F2 apresentaram uma correlação negativa e significativa com o pH, enquanto as frações F3 e F4 apresentaram uma correlação positiva e significativa.

Tabela 6. Coeficientes de correlação de Pearson, entre as diferentes frações químicas e o pH dos tratamentos.

	Zinco	Cádmio
	<i>Brachiaria humidicola</i>	
pH x F1	-0,5709**	-0,6823**
pH x F2	-0,5946**	-0,5100**
pH x F3	0,3488**	0,3601**
pH x F4	0,5399**	0,4741**
pH x F5	-0,0853 ^{n.s.}	0,0830 ^{n.s.}
	<i>Brachiaria decumbens</i>	
pH x F1	-0,6414**	-0,5911**
pH x F2	-0,5914**	-0,6277**
pH x F3	0,4083**	0,3849**
pH x F4	0,5727**	0,6554**
pH x F5	-0,0659 ^{n.s.}	0,0451 ^{n.s.}

** significativo ao nível de 1% ; * significativo ao nível de 5%; ^{n.s.} não significativo

Na fração F3, observam-se maiores porcentagens de Zn nos tratamentos com adição de matéria orgânica juntamente com resíduo alcalino (T 5 e 6), demonstrando o

papel da matéria orgânica na formação de complexos mais estáveis pela formação de complexos de esfera interna, e do pH no aumento da CTC do solo. Verifica-se que as porcentagens de Zn foram superiores na fração F3 quando comparadas com as frações F1 e F2, nos tratamentos com adição de produtos de reação alcalina e resíduo orgânico.

Grimm et al. (1991) estudando a complexação de Cu em substâncias húmicas, verificou que em baixo pH (2,5) a maior parte da superfície estava ocupada por prótons, entretanto, em pH mais elevado (4,5) a maior parte dos sítios ligantes estava ocupado por Cu por causa do decréscimo da competição com prótons. Yin et al. (1997), também mostrou que menos Hg^{2+} foi complexado a substâncias húmicas em valores baixos de pH devido à competição com H^+ .

As porcentagens de Zn nos tratamentos com aplicação de produto de reação alcalina (silicato de cálcio), com ou sem adição de matéria orgânica, determinou aumentos significativos de Zn na fração F4. Essa diferença não foi significativa quando comparado com os tratamentos onde se adicionou somente resíduo alcalino (T 3 e 4) com o que adicionou resíduo orgânico simultaneamente (T 5 e 6), demonstrando que o aumento do pH, pela adição de resíduo de reação alcalina, foi o principal responsável pelo aumento de Zn nessa fração, demonstrando a importância do pH na precipitação de Zn no resíduo.

A maior parte do Zn presente nesse resíduo está na fração F5. No entanto, não há diferença significativa entre os diferentes tratamentos quando comparados à testemunha. Isso demonstra que a formação de complexos mais estáveis, não foi a principal forma de retenção de Zn no resíduo.

Comparando os diferentes tempos de amostragem, verifica-se que a disponibilidade de Zn aumentou na colheita das braquiárias quando comparada ao plantio, principalmente na fração F2. Isso ocorreu principalmente devido à redução do pH na colheita (Tabela 5), que pode ter sido ocasionado pela exudação de compostos pelas raízes, acidificando a região da rizosfera. O aumento nas frações de maior disponibilidade, reduziu conseqüentemente as porcentagens nas frações de menor solubilidade, F3 e F4. A fração F5 não foi alterada por essa redução do pH, por se tratar de uma fração mais estabilizada.

Esse aumento na fração F2 foi mais significativo na *B. humidicola* (Figura 6) quando comparado à *B. decumbens* (Figura 7), devido a maior redução do pH nos tratamentos com essas plantas (Tabela 5).

Segundo Zaharieva & Römheld (2000), as raízes podem exudar moléculas capazes de quelatar o metal na rizosfera solubilizando o metal imobilizado no solo. Podem também solubilizar o metal por acidificação da rizosfera, liberando cátions metálicos para a solução do solo.

O Cd apresentou um comportamento semelhante ao Zn nas diferentes frações químicas (Figuras 8 e 9).

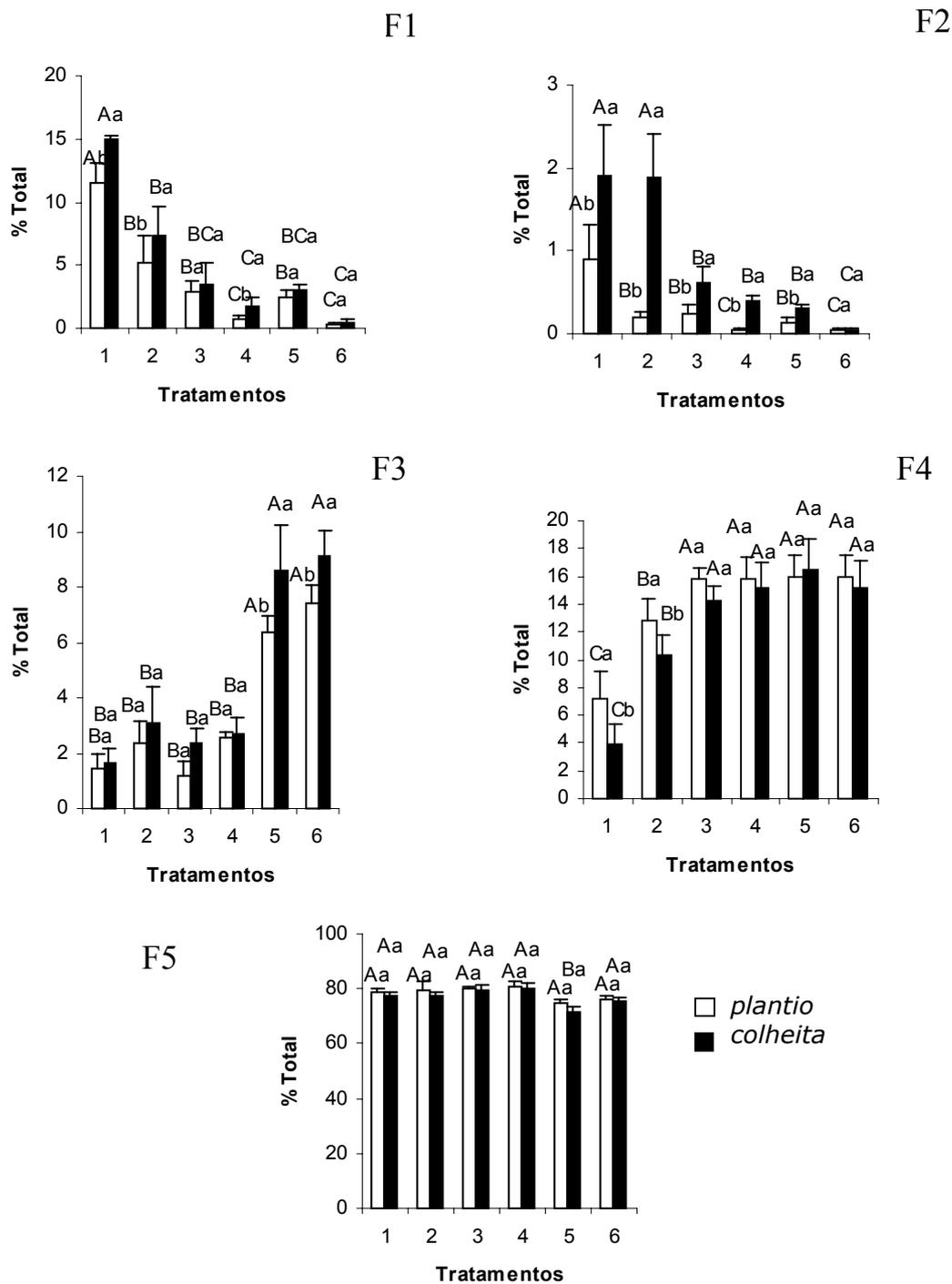


Figura 8. Porcentagem de Cd, em relação ao total, nos diferentes tratamentos e frações químicas no plantio e colheita da *B. humicicola*.

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamento e minúscula para época não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

F1: extração com água; F2: extraído com NaNO_3 -extraído com água; F3: extraído com DTPA – extraído com NaNO_3 ; F4: extraído com ácido acético-extraído com NaNO_3 ; F5: total- Σ das frações (F1, F2, F3 e F4).

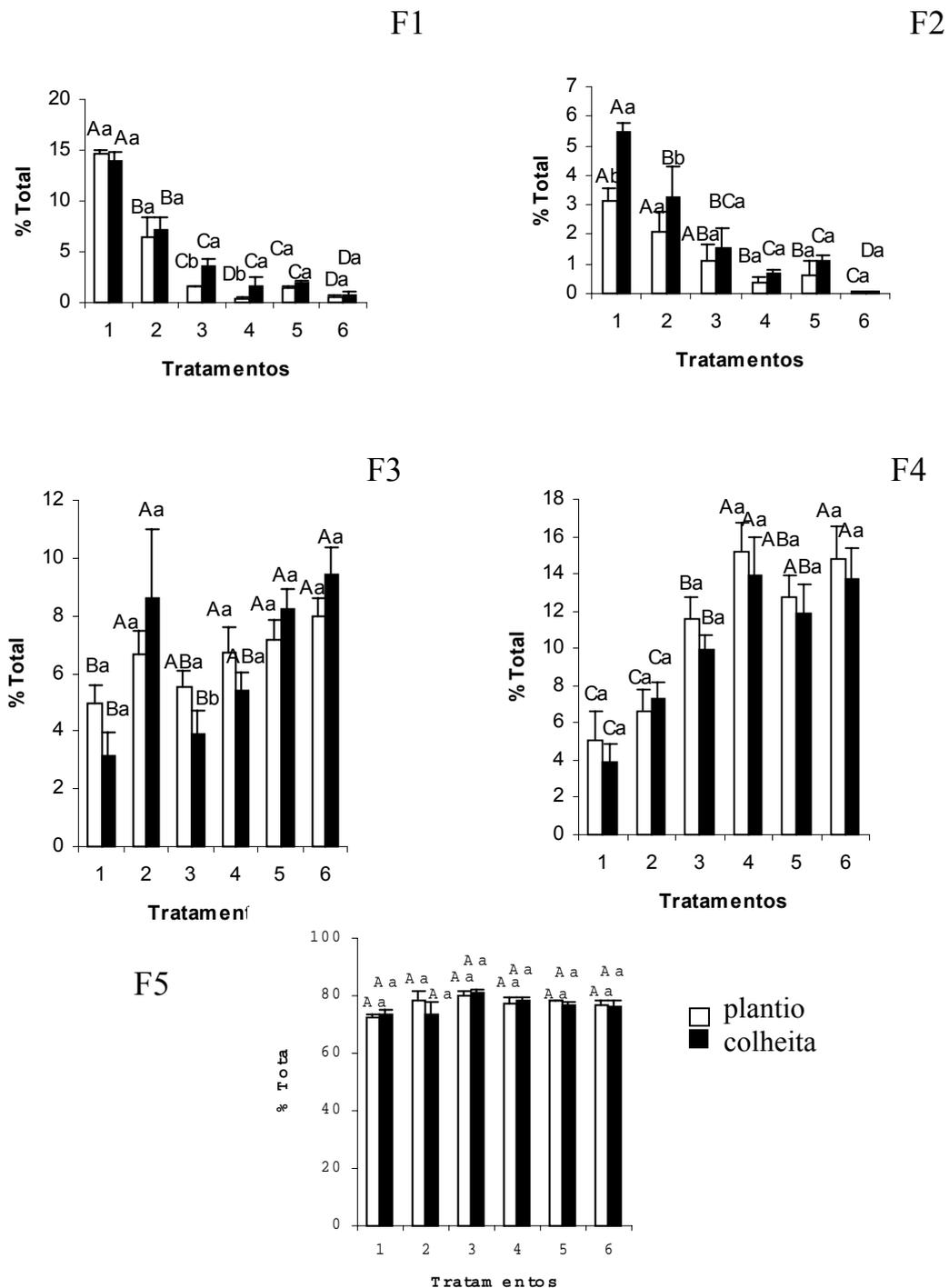


Figura 9. Porcentagem de Cd, em relação ao total, nos diferentes tratamentos e frações químicas no plantio e colheita da *B. decumbens*.

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula para tratamento e minúscula para época não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%.

F1: extração com água; F2: extraído com NaNO_3 -extraído com água; F3: extraído com DTPA – extraído com NaNO_3 ; F4: extraído com ácido acético-extraído com NaNO_3 ; F5: total- Σ das frações (F1, F2, F3 e F4).

Nos tratamentos com adição de matéria orgânica e resíduo de reação alcalina, as menores percentagens de Cd foram encontradas nas frações F1 e F2. Esses resultados foram similares aos obtidos para os tratamentos com Zn, o que confirma a importância desses produtos na redução da solubilidade de metais pesados no resíduo INGÁ.

Na fração F3 (Figura 8 e 9), as percentagens de Cd nos tratamentos com valores mais elevados de pH e com adição de matéria orgânica (lodo de biodigestor), foram superiores quando comparados com a testemunha, demonstrando que parte do Cd que encontrava-se na fração solúvel em água (F1) e ligado eletrostaticamente (F2), provavelmente passaram para as formas mais estáveis através do mecanismo de adsorção específica na superfície de óxidos e da matéria orgânica. No entanto, o aumento nessa fração foi maior nos tratamentos com adição de matéria orgânica simultaneamente ao aumento do pH (T5 e 6), demonstrando a importância da matéria orgânica e do pH no aumento de carga líquida negativa no solo, aumentando assim a CTC e a adsorção de metais pesados.

A presença da matéria orgânica no resíduo da Kaiser, contribuiu na redução da solubilidade de Cd, visto que a mesma proporcionou sítios de adsorção específica de compostos orgânicos mais estáveis presentes neste resíduo. A matéria orgânica também pode formar complexos solúveis (quelatos) com os metais pesados, que quando mantidos em solução a um pH elevado também poderiam precipitar. Yamada et al., (1984) e Mesquita (2002) também observaram a redução na solubilidade dos metais pesados, entre eles o Zn e o Cd, na adição de matéria orgânica.

Verifica-se também nas Figuras 8 e 9, maiores percentagens de Cd na fração F4 em todos os tratamentos, quando comparados com a testemunha. Ao contrário do ocorrido na fração F3, esses aumentos foram mais expressivos pela adição do resíduo alcalino silicato de cálcio, não havendo diferença significativa entre os tratamentos com ou sem adição de matéria orgânica (T 3 e 4; T5 e 6, respectivamente). As percentagens de Cd foram superiores nessa fração quando comparados com as frações F1, F2 e F3, com exceção da testemunha. Esses resultados demonstram que a elevação do pH por esses resíduos alcalinos causou, possivelmente, a precipitação do Cd na forma de hidróxidos e carbonatos.

Assim como ocorreu para o Zn, para o Cd também não houve diferença entre os tratamentos na fração F5. Apesar de ser a fração de maior estabilidade de metais pesados no solo, a adição de produtos de reação alcalina e resíduo orgânico não contribuiu para o aumento do elemento nessa fração.

Comparando as duas épocas de coleta de resíduos dos diferentes tratamentos, verificou-se, assim como para o Zn, um aumento nas frações de maior solubilidade (Figuras 8 e 9), principalmente na fração F2. No entanto, esse aumento provocou a redução somente na fração F4 e não na F3, como ocorreu para o Zn (Figuras 6 e 7), indicando que o Cd pode ter formado um complexo mais estável com a matéria orgânica e os óxidos de Fe presentes nos tratamentos, e a redução do pH com o cultivo das plantas, provavelmente, não foi suficiente para a liberação do metal presente na fração F3.

A redução de Zn e Cd nas frações F1 e F2 e o conseqüente aumento nas frações F3 e F4, em todos os tratamentos, quando comparados à testemunha, mostraram que o silicato de cálcio e o lodo de biodigestor contribuíram na elevação do pH e adição de matéria orgânica, respectivamente, atuando provavelmente na precipitação de metais pesados e no aumento de carga líquida negativa na superfície de óxidos de Fe, Mn e Al, e da matéria orgânica, fazendo com que esses elementos que estavam associados a frações químicas mais lábeis, passassem para frações de maior estabilidade.

A produção de matéria seca das plantas de *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* foi influenciada pela biodisponibilidade de Zn e Cd nos tratamentos, e pelo tipo e doses de inertizantes utilizados (Tabela 7).

Tabela 7. Peso seco médio (g) das plantas de *Brachiaria humidicola* e *Brachiaria decumbens* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	<i>B. humidicola</i>		<i>B. decumbens</i>	
	parte aérea	raiz	parte aérea	Raiz
1	x	x	x	x
2	1,69±0,3	0,29±0,10	0,92±0,01	0,05±0,04
3	3,65±1,24	1,52±0,67	x	x
4	5,31±0,90	3,38±0,97	5,84±0,97	2,90±0,7
5	x	x	2,54±1,19	0,51±0,33
6	3,71±1,91	0,90±0,71	8,25±1,88	3,52±0,45

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% lodo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições ± erro padrão.

Os sintomas de fitotoxicidade das plantas aumentaram com o tempo de cultivo nos diferentes tratamentos, conforme já descrito em literatura (Kabata-Pendias & Pendias, 1992), e apresentaram relação inversa com a adição de resíduos de reação alcalina e orgânico.

No tratamento testemunha, somente com resíduo INGÁ, as plantas morreram cinco dias após o transplante. No tratamento 3 de *B. decumbens* e tratamento 5 de *B. humidicola*, com o tempo de exposição aos metais, as plantas exibiram sintomas de toxicidade bastante acentuados, como encarquilhamento e manchas por toda a planta, que evoluíram, levando-as à morte.

As maiores produções de matéria seca nas plantas de *B. humidicola* e *B. decumbens* foram constatadas nos tratamentos com pH 7,0 (T4 e 6), demonstrando a importância do pH na redução da solubilidade de metais pesados, favorecendo o desenvolvimento das plantas.

A *B. decumbens* foi a planta que mais respondeu à mudança de pH no resíduo, apresentando correlação positiva e altamente significativa, tanto para produção de matéria seca como para acumulação de Zn e Cd (Tabela 8).

Tabela 8. Coeficientes de correlação de Pearson entre o peso seco e acumulação de Zn e Cd, e o pH dos tratamentos.

Correlação	<i>B. humidicola</i>	<i>B. decumbens</i>
pH x peso parte aérea	0,2259 ^{n.s.}	0,7636**
pH x peso raiz	0,2525 ^{n.s.}	0,7878**
pH x acúmulo Zn parte aérea	0,1238 ^{n.s.}	0,6157**
pH x acúmulo Zn raiz	0,2689 ^{n.s.}	0,7970**
pH x acúmulo Cd parte aérea	-0,085 ^{n.s.}	0,8391**
pH x acúmulo Cd raiz	-0,1627 ^{n.s.}	0,7084**

** significativo ao nível de 1% ; * significativo ao nível de 5%; ^{n.s.} não significativo

A *B. decumbens* foi a espécie mais tolerante aos diferentes tratamentos, apresentando maior produção de matéria seca nos tratamentos quando comparados à *B. humidicola*, com exceção do tratamento 2, no qual a *B. humidicola* apresentou uma maior produção. Essa menor produção no T2, pode ser devido ao menor pH nos vasos com *B. decumbens* (Tabela 5), o que favoreceu uma maior percentagem de Zn e Cd nos tratamentos dessa espécie nas frações com maior biodisponibilidade, F1 e F2 (Figuras 7 e 9).

As maiores produções de matéria seca na *B. decumbens* foi no T6, no qual foi adicionado matéria orgânica e resíduo de reação alcalina, simultaneamente. Isso demonstra a importância do pH e da matéria orgânica na redução da biodisponibilidade de metais pesados e também na melhoria das condições físicas do resíduo pela adição de matéria orgânica, como estrutura, porosidade, evitando a compactação, características essas que favorecem o melhor desenvolvimento das raízes e, conseqüentemente, maior produção vegetal. A Figura 10 mostra uma diferença visual no desenvolvimento das plantas de *B. decumbens*, nos tratamentos com matéria orgânica em próximos a pH 6,5 (Tratamento 5) e 7,0 (Tratamento 6).

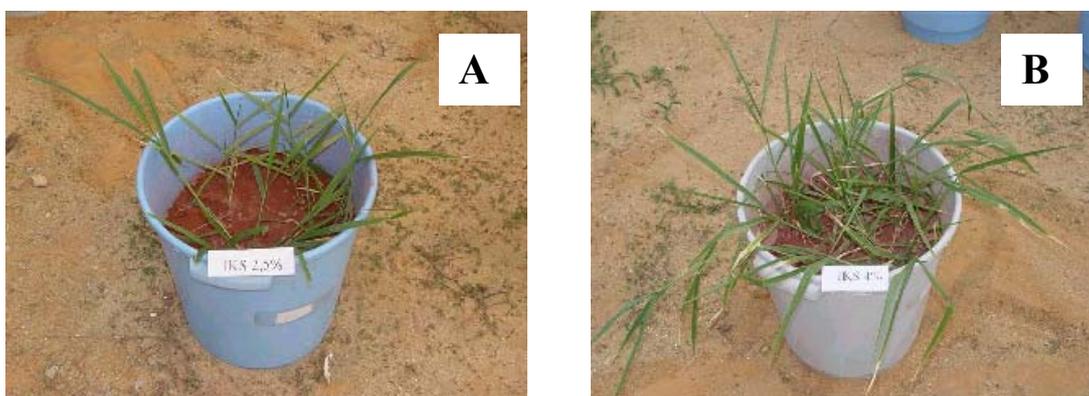


Figura 10. Diferenças no desenvolvimento da *B. decumbens* nos tratamentos: (A) Ingá + 20% de lodo Kaiser + 2,5% de resíduo silicato de cálcio; e (B) Ingá + 20% de lodo Kaiser + 4% de resíduo silicato de cálcio.

A extração de Zn e Cd pelas plantas foram influenciadas pelos diferentes tratamentos (Tabelas 9 e 10), apresentando resposta significativa à adição de inertizantes. O incremento de matéria seca das plantas no solo onde foi adicionado resíduo alcalino e orgânico simultaneamente (T6), apresentou relação direta com os teores de Zn e Cd nas plantas, corroborando o efeito amenizante do resíduo de reação alcalina (silicato de cálcio) e orgânico (lodo de biodigestor) sobre a fitotoxicidade dos metais, favorecendo o crescimento das plantas.

Apesar da menor solubilidade de Zn e Cd nos tratamentos com maior adição de resíduos alcalino e orgânico (Figuras 6, 7, 8 e 9), a acumulação desses elementos foi maior nos tratamentos 4 e 6 (Tabelas 9 e 10). Isso ocorreu provavelmente devido ao maior desenvolvimento das plantas nesses tratamentos, o que permitiu uma maior área de exploração do resíduo pelas raízes e, conseqüentemente, maior absorção de metais pesados.

Tabela 9. Acúmulo de Zn (mg planta⁻¹) pelas plantas de *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	<i>B. humidicola</i>		<i>B. decumbens</i>	
	parte aérea	raiz	parte aérea	raiz
1	x	x	x	x
2	2,16±0,11	1,64±0,66	1,69±0,16	0,36±0,29
3	5,74±2,41	6,49±3,08	x	x
4	5,40±0,75	16,76±4,4	14,02±3,99	28,05±8,64
5	x	x	7,69±3,6	3,16±1,75
6	11,14±7,31	6,87±5,72	21,85±6,68	21,45±1,89

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições ± erro padrão.

x = tratamentos cujas plantas não sobreviveram

Tabela 10. Acúmulo de Cd (mg planta⁻¹) pelas plantas de *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* nos diferentes tratamentos.

Tratamentos	<i>B. humidicola</i>		<i>B. decumbens</i>	
	parte aérea	raiz	parte aérea	raiz
1	x	x	x	x
2	0,07±0,02	0,02±0,01	0,05±0,01	0,005±0
3	0,20±0,07	0,45±0,05	x	x
4	0,20±0,03	0,22±0,06	0,38±0,06	0,44±0,10
5	x	x	0,09±0,04	0,06±0,04
6	0,13±0,09	0,1±0,08	0,55±0,10	0,34±0,14

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor de uma cervejaria; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio; 5: (Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor de uma cervejaria) + 2,5% resíduo silicato de cálcio; 6: (Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor de uma cervejaria) + 4% resíduo silicato de cálcio.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições ± erro padrão.

x = tratamentos cujas plantas não sobreviveram

Apesar da menor produção de raízes (Tabela 7), o acúmulo de Zn foi, em alguns tratamentos, mais elevado na raiz do que na parte aérea, devido principalmente às maiores concentrações de Zn na raiz.

No T3, a *B. humidicola* também absorveu quantidade significativa de Zn e Cd, provavelmente devido ao maior desenvolvimento das plantas nesse tratamento (Tabelas 9 e 10).

A *B. decumbens* acumulou quantidades significativamente maiores tanto de Zn como de Cd, quando comparada a *B. humidicola*, em todos os tratamentos, com exceção do T2. Isso demonstra a maior tolerância dessa planta e maior capacidade de absorção e translocação de metais pesados para a parte aérea.

Os resultados mostram que a aplicação de inertizantes ao resíduo contaminado favoreceu o crescimento das plantas por meio de diminuição dos teores de Cd e Zn

biodisponíveis no resíduo. O presente estudo evidencia a ação inertizante do silicato de cálcio e do lodo de biodigestor, em relação à toxidez de metais pesados no solo em *B. decumbens* e *B. humidicola*, apresentando grande potencial de uso em programas de fitoestabilização de áreas contaminadas com Zn e Cd.

3.3.4 Efeitos dos tratamentos na classificação do resíduo Ingá

Na Tabela 11, são apresentados os valores de Cd nos diferentes tratamentos, no teste de lixiviação, que tem por objetivo avaliar a probabilidade de lixiviação de metais pesados presentes em resíduos sólidos, por meio de lavagem ou percolação de água a pH 5,0. Segundo as normas da ABNT (1987), o Zn não confere característica de periculosidade ao resíduo, por isso não foi realizado o teste de lixiviação para esse elemento.

Tabela 11. Concentrações lixiviáveis de Cd (mg kg^{-1}) nos diferentes tratamentos, de acordo com o teste de lixiviação (ABNT, 1987), no plantio e colheita da *B. humidicola* e *B. decumbens*.

Tratamentos	<i>B. humidicola</i>		<i>B. decumbens</i>	
	plantio	colheita	plantio	colheita
1	30,25±4,29	27,96±4,32	31,74±4,32	29,78±3,75
2	16,67±3,27	17,02±2,57	26,90±7,52	24,08±7,64
3	21,29±5,90	19,27±4,76	18,64±5,43	16,88±4,98
4	17,44±6,34	13,77±6,79	17,53±3,81	14,22±3,64
5	20,66±2,45	14,83±1,98	22,45±5,66	18,54±5,15
6	8,37±0,99	7,10±1,0	11,82±3,12	11,78±2,74

1: Testemunha (Resíduo Ingá); 2: Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor da Cervejaria Kaiser; 3: Resíduo Ingá + 2% resíduo silicato de cálcio da Petrobrás; 4: Resíduo Ingá + 3% resíduo silicato de cálcio da Petrobrás; 5: (Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor da Cervejaria Kaiser) + 2,5% resíduo silicato de cálcio da Petrobrás; 6: (Resíduo Ingá + 20% resíduo do biodigestor da Cervejaria Kaiser) + 4% resíduo silicato de cálcio da Petrobrás.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Houve uma redução significativa nos teores de Cd lixiviáveis em todos os tratamentos comparados à testemunha (Tabela 11), principalmente no Tratamento 6, onde foi adicionado matéria orgânica e resíduo alcalino simultaneamente a pH 7,0. No entanto, a concentração de Cd em todos os tratamentos, estiveram acima dos limites estabelecidos pela Norma 10006, anexo H baseado no teste de lixiviação (ABNT, 1987), que confere a periculosidade do resíduo para esse elemento ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$). Considerando que uma das principais formas de redução da solubilidade desses resíduos foi pela precipitação de metais pesados ocorrida pelo aumento do pH, esses metais podem ter sido solubilizados nesse teste, já que se reduz o pH para 5,0.

Com isso, pode-se afirmar que, apesar da redução nas concentrações de Zn e Cd presentes no resíduo INGÁ nos diferentes tratamentos quando comparado à testemunha, reduzindo o seu potencial poluidor, nenhum tratamento utilizado foi suficiente para mudar a classificação do resíduo, permanecendo o resíduo INGÁ na Classe I - perigoso.

3.4 Conclusões

- No cultivo hidropônico, o Zn não reduziu a produção de matéria seca das raízes da *B. decumbens* nas duas doses estudadas;
- O aumento do pH e a adição de matéria orgânica causaram redução na biodisponibilidade de Zn e Cd pela associação desses elementos a frações químicas mais estáveis no resíduo estudado;
- Apesar da redução na solubilidade de metais pesados, nenhum tratamento mudou a classificação do resíduo INGÁ quanto à sua periculosidade, permanecendo na Classe I – perigoso;
- A *Brachiaria decumbens* foi a planta que mais tolerou e acumulou Cd e Zn, tendo um potencial promissor na utilização em projetos de recuperação área contaminadas com esses elementos.

4. CAPÍTULO II

OTIMIZAÇÃO DO POTENCIAL FITOEXTRATOR DE *Brachiaria decumbens* DESENVOLVIDA EM DOIS SOLOS CONTAMINADOS COM METAIS PESADOS, PELO USO DE QUELANTES.

RESUMO

A fitorremediação induzida tem sido proposta como um efetivo método para remoção de metais pesados de solos contaminados pelo uso de fitoextração com plantas de alta produção de biomassa. Em condições controladas, foram estudados os efeitos da aplicação de 10 mmol L⁻¹ de cada, EDTA e EDDS na solubilidade de Zn, Cd e Pb presentes em dois solos de uma mina de calamina desativada contaminados com esses elementos, além da absorção e translocação desses elementos por plantas de *Brachiaria decumbens*, comparado com a fitoextração natural pela hiperacumuladora de Cd e Zn *Thlaspi caerulescens*. Os resultados mostram que, apesar de o EDTA ter sido mais eficiente na solubilização de metais pesados no solo, o EDDS foi mais efetivo que o EDTA na absorção e translocação de metais pesados pelas plantas. A aplicação de 10 mM de EDDS no solo, aumentou significativamente a concentração de Zn e Cd na parte aérea das plantas. A aplicação de EDDS e EDTA também aumentou significativamente a relação na concentração de Zn, Cd e Pb parte aérea/raiz quando comparados ao controle, sem adição de quelantes. *Thlaspi caerulescens* foi mais eficiente que *B. decumbens* na fitoextração de Cd, Zn e Pb nos solos.

Palavras-chave: EDTA, EDDS, *Brachiaria decumbens*, metais pesados

ABSTRACT

Chemically enhanced phytoextraction has been proposed as an effective method to remove heavy metals from contaminated soils through the use of high biomass plants. In controlled conditions, it was studied the effects of application of 10 mmol L⁻¹ of each EDTA and EDDS in the solubility of Zn, Cd and Pb in two soils of a calamine mine contaminated with these elements, and the absorption and uptake of them by *B. decumbens*, comparing with the natural phytoextraction using the Zn and Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. The results showed that EDTA was more efficient in solubilizing heavy metals in the soil, but EDDS was more effective than EDTA in increasing the absorption and uptake of Cd, Zn and Pb by the *B. decumbens*. With the application of 10 mM EDDS in the soil, the concentration of Zn and Cd increased the concentration of Zn and Cd in the shoot of the plants. The application of EDDS and EDTA increased the shoot-to-root ratios compared to a control (without addition of chelants). *Thlaspi caerulescens* was far more efficient than *B. decumbens* in phytoextracting Cd, Zn and Pb from soils.

Key words: EDTA, EDDS, *Brachiaria decumbens*, heavy metals

4.1 Introdução

O solo pode ser contaminado com metais pesados por diversas atividades humanas incluindo mineração, operações de tratamento de metal, emissão de veículos automotores, deposição ou vazamento de resíduos industriais. Devido à sua elevada toxicidade e alta persistência no ambiente, a limpeza de solos contaminados é uma das mais difíceis tarefas da engenharia ambiental, e diversas técnicas *in situ* e *ex situ* têm sido desenvolvidas para remover metais pesados de solos contaminados.

A fitoextração de metais pesados é uma tecnologia desenvolvida com o objetivo de extrair metais pesados do solo e tem tido muita atenção ultimamente, por ser uma tecnologia limpa e barata (Mc Grath, 1998). Há duas estratégias de fitoextração, chamadas fitoextração natural ou contínua, e fitoextração induzida (Salt et al., 1998).

A primeira é baseada no uso natural de plantas hiperacumuladoras com grande capacidade de acumulação de metal na parte aérea, possuindo características particulares de acumular esses metais e apresentar elevada tolerância (Baker et al., 2000). No entanto, a maioria das hiperacumuladoras, como *Thlaspi*, *Urtica*, *Chenopodium*, *Polygonum sachalense* e *Alyssum* possuem lento desenvolvimento e baixa produção de biomassa, sendo necessários muitas vezes, anos ou décadas para limpar uma área contaminada (Mulligan et al., 2001). Além disso, alguns metais pesados, como o Pb, possuem pouca biodisponibilidade no solo e sua extração pela planta, é limitada pela solubilidade e difusão na superfície das raízes.

A fitoextração induzida tem sido desenvolvida para minimizar esses problemas (Blaylock, 2000). A fitoextração pode ser otimizada pela adição de compostos quelantes de metais pesados, visando aumentar a solubilidade, absorção e translocação de metais pelas plantas. Esse método faz com que plantas com elevada produção de biomassa, como milho (*Zea mays*), ervilha (*Pisum sativum*), aveia (*Avena sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*) e *Brassica juncea* absorvam grande quantidade de metais quando sua biodisponibilidade no solo é aumentada por tratamentos químicos.

Vários agentes quelantes, como ácido cítrico, EDTA, CDTA, DTPA, EDDS, EGTA, EDDHA e NTA, tem sido estudados com o objetivo de dessorver metais pesados do solo e facilitar a sua absorção pela planta e o transporte no xilema, aumentando a translocação de metais da raiz para a parte aérea (Lombi et al., 2001; Shen et al., 2002).

Uma das mais promissoras aplicações dessa tecnologia é para a remediação de solos contaminados com Pb usando *Brassica juncea* L. em combinação com EDTA (Blaylock, 2000).

O EDTA tem sido o agente quelante mais utilizado em fitoextração induzida em virtude da sua eficiência na mobilização de diversos íons metálicos. Huang et al. (1997) concluiu que a dessorção de Pb no solo foi favorecida por diferentes agentes quelantes na seguinte ordem decrescente: EDTA > HEDTA > DTPA > EGTA > EDDHA.

Apesar dessa eficiência, o EDTA bem como o complexo EDTA-metal formado, são tóxicos para plantas e microrganismos do solo e possuem baixa degradabilidade no solo, formando complexos de alta estabilidade com Cu, Fe, Zn e Pb (Satroutdinov et al., 2000), o que aumenta seu potencial de toxicidade, lixiviação e, conseqüentemente, danos ambientais. Com isso, há uma preocupação sobre a persistência de complexos solúveis quelante-metal no solo, com respeito a sua toxicidade e possível lixiviação ao lençol freático (Römken et al., 2002).

Recentemente, o uso de agentes quelantes de maior biodegradabilidade, como o EDDS (ácido etileno diamino disuccinato), tem sido proposto para aumentar a absorção de metais pesados pelas plantas (Kulli et al., 1999; Greman et al., 2003). Segundo Goodfellow et al. (1997), o EDDS pode ser produzido naturalmente por microrganismos e possui uma alta taxa de degradação no solo quando comparado ao EDTA.

O presente estudo teve como objetivos comparar o efeito da fitoextração natural, por meio da espécie *Thlaspi caerulescens*, hiperacumuladora de Zn e Cd, e o efeito de agentes quelantes como EDTA e EDDS, na fitoextração de Cd, Zn e Pb em *Brachiaria decumbens*, desenvolvidas em solos contaminados com esses elementos.

4.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado em câmara de crescimento, sob condições controladas, visando avaliar o potencial de *B. decumbens* na fitoextração de Cd, Zn e Pb com a adição de agentes quelantes EDTA e EDDS. Foi avaliada também a capacidade de fitoextração natural de metais pesados utilizando a hiperacumuladora de Cd e Zn *Thlaspi caerulescens*.

Foram utilizados amostras de um Luvisol Gléico (Eusko Jaularitza, 1991) com elevadas doses naturais de Cd, Zn e Pb, oriundos de uma mina de calamina desativada, situada na região do País Basco, norte da Espanha. Foram selecionadas duas áreas da região com diferentes graus de contaminação, sendo identificadas como A e B.

Amostras dos solos foram coletadas na profundidade de 0-20 cm, sendo secas ao ar, destorroadas e passadas por peneira de 2 mm de malha. Os teores totais de metais pesados foram analisados em espectrofotometria de absorção atômica após digestão nitro-perclórica 2:1 (Scott, 1978), e a extração seqüencial foi realizada segundo método de Tessier et al., (1979) modificado por Luo & Christie (1998), conforme descrito abaixo:

1ª etapa: 2 g de solo foram agitados a temperatura ambiente com 16 mL de $Mg(NO_3)_2$ 1 mol L⁻¹ a pH 7,0, durante 1 h e centrifugado a 3000 r.p.m. por 10 min. O sobrenadante foi filtrado e o tubo pesado. Essa etapa extraiu os metais correspondentes à fração trocável;

2ª etapa: o resíduo da 1ª etapa foi agitado à temperatura ambiente com 16 mL de CH_3COONa 1 mol L⁻¹, ajustado a pH 5,0 com CH_3COOH , durante 5 h, centrifugado como antes, filtrado e o peso anotado. Essa etapa correspondeu à fração de metais pesados associada a carbonatos;

3ª etapa: 30mL de $NH_2OH \cdot HCl$ 0,04 mol L⁻¹ em 25% (v/v) CH_3COOH foram adicionados ao resíduo da 2ª etapa e o peso verificado. Os tubos foram tapados e aquecidos em banho-maria a $96 \pm 3^{\circ}C$ com agitação ocasional durante 5 h, e posteriormente, centrifugados, filtrados e pesados como nas etapas anteriores. Essa etapa extraiu os metais pesados ligados aos óxidos de Fe e Mn;

4ª etapa: 6 mL de HNO_3 0,02 mol L⁻¹ e 4 mL de H_2O_2 30%, ajustado a pH 2 com HNO_3 , foram adicionados ao resíduo da 3ª etapa e a mistura foi aquecida em banho-maria a $85 \pm 2^{\circ}C$ por aproximadamente 45 min. Uma quantidade adicional de H_2O_2 30% ajustada a pH 2 com HNO_3 foi adicionada e a mistura permaneceu em banho-maria a $85 \pm 2^{\circ}C$ por mais 45 min. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes totalizando um período total de aproximadamente 5 h. Após esfriar, 8 mL de CH_3COONH_4 3,2 mol L⁻¹ em 20% (v/v) HNO_3 foi adicionado e a amostra foi diluída com água deionizada a 30 mL, agitada por 30 min, centrifugado e filtrado como nas etapas anteriores. Essa etapa extraiu metais pesados ligados à matéria orgânica;

5ª etapa: metais pesados na fração residual foram calculados como a diferença entre a concentração total de metais e o somatório das frações anteriores.

A fórmula seguinte foi usada para calcular as concentrações de metais pesados (mg kg⁻¹) em cada fração:

$$F_i = C_i * (V_i + R_j) - C_{i-1} * R_j / W$$

F_i = conteúdo de metais pesados na fração i na extração seqüencial (mg kg⁻¹);

C_i = concentração de metal na fração i (mg L⁻¹);

V_i = volume do extrator i (L);

R_j = volume do extrator anterior que permaneceu no resíduo (L);
 C_{i-1} = concentração de metais pesados na extração anterior (mg L^{-1});
 W = peso da amostra de solo usada (kg).

Foram pesados 300 g de cada solo seco ao ar, sendo colocados em vasos plásticos. Foi feita uma fertilização de 120 mg kg^{-1} de N, P e K, utilizando os produtos KNO_3 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, umedecidos a 70% da capacidade de campo com água deionizada e mantidos incubados por um período de 15 dias.

Após este período, dez sementes de *B. decumbens* foram semeadas, sendo deixadas quatro plântulas por vaso, que foram desenvolvidas por um período de 10 semanas, a 70% da capacidade de campo. Nos potes de *T. caerulea*, foram semeadas 15 sementes e deixadas duas plântulas por vaso.

As temperaturas do dia e noite foram mantidas em 20°C , com 12 h de luz ao dia, com intensidade de $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Após esse período, EDTA e EDDS foram aplicados somente nos solos cultivados com *B. decumbens* na concentração de 10 mmol L^{-1} , sendo as plantas coletadas 4 dias após o tratamento. O tratamento foi realizado dissolvendo os quelantes em água deionizada e aplicando a solução pela superfície dos vasos. Também foi incluído um tratamento controle, sem a adição de compostos quelantes.

O experimento foi inteiramente casualizado, com 4 repetições para cada tratamento.

No final do ciclo de cultivo das plantas, parte aérea e raízes da *B. decumbens* e *T. caerulea* foram coletadas, pesadas, lavadas com água deionizada e secas em estufa com circulação de ar a 70°C . Amostras foram passadas em peneira de 0,5 mm de malha, sendo digeridas em mistura nitro-perclórica 6:1 (Tedesco et al., 1995) e determinados os teores de Zn, Cd e Pb em espectrofotômetro de absorção atômica.

Para medir a concentração de metais solúveis nos solos, foram utilizadas cápsulas de nylon do tipo Rhizon-MOM (Rhizosphere Research Products, Eijkelkamp Agrisearch Equipment, Giesbeek, the Netherlands), que foram colocadas dentro de cada pote, antes da aplicação dos quelantes e após a coleta das plantas, visando coletar a água presente nos poros do solo, sendo utilizado método descrito por Knight et al., (1998) e posteriormente analisados os teores de metais pesados em espectrofotometria de absorção atômica.

4.3 Resultados e Discussão

Os solos das duas áreas estudadas possuem diferentes propriedades físico-químicas e graus de poluição (Tabela 12). O solo da área B possui um pH mais elevado e maiores teores de carbono que o da área A, provavelmente devido ao maior desenvolvimento de *Festuca rubra*, uma gramínea tolerante mais excludente de metais pesados, que é frequentemente encontrada na área onde foi realizada a amostragem desse solo.

Tabela 12. Propriedades físico-químicas das amostras de solos das áreas A e B.

Parâmetros	A	B
Textura	Franco arenosa	Franco arenosa
% Argila	14,0	12,9
pH	5,6	6,7
Total C (%)	3,54	4,75
Total N (%)	0,15	0,20
C.E. ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1960	1960
Total Cd (mg kg^{-1})	2,3	11,7
Total Zn (mg kg^{-1})	893,3	15.277,9
Total Pb (mg kg^{-1})	255,0	4.166,3

De acordo com a extração seqüencial (Figura 10), nota-se que apesar das menores concentrações totais de Zn e Cd na área A (Tabela 12), mais de 50% do conteúdo total desses metais presentes, estão na fração de maior solubilidade F1, o que aumenta a sua fitotoxicidade. Essa maior solubilidade de metais pesados na área A, pode estar relacionada ao menor valor de pH nesse solo (Tabela 12), fatores importantes na complexação de metais pesados no solo.

Quanto à área B (Figura 10), apesar das elevadas concentrações totais de Zn, Cd e Pb no solo, a maior parte desses elementos estão em frações de menor biodisponibilidade, como fração residual e ligados a óxidos de Fe e Mn e a carbonatos.

A contaminação moderada da área A, associada à elevada solubilidade de Zn e Cd são fatores favoráveis para a efetiva recuperação desse solo utilizando a técnica de fitoextração.

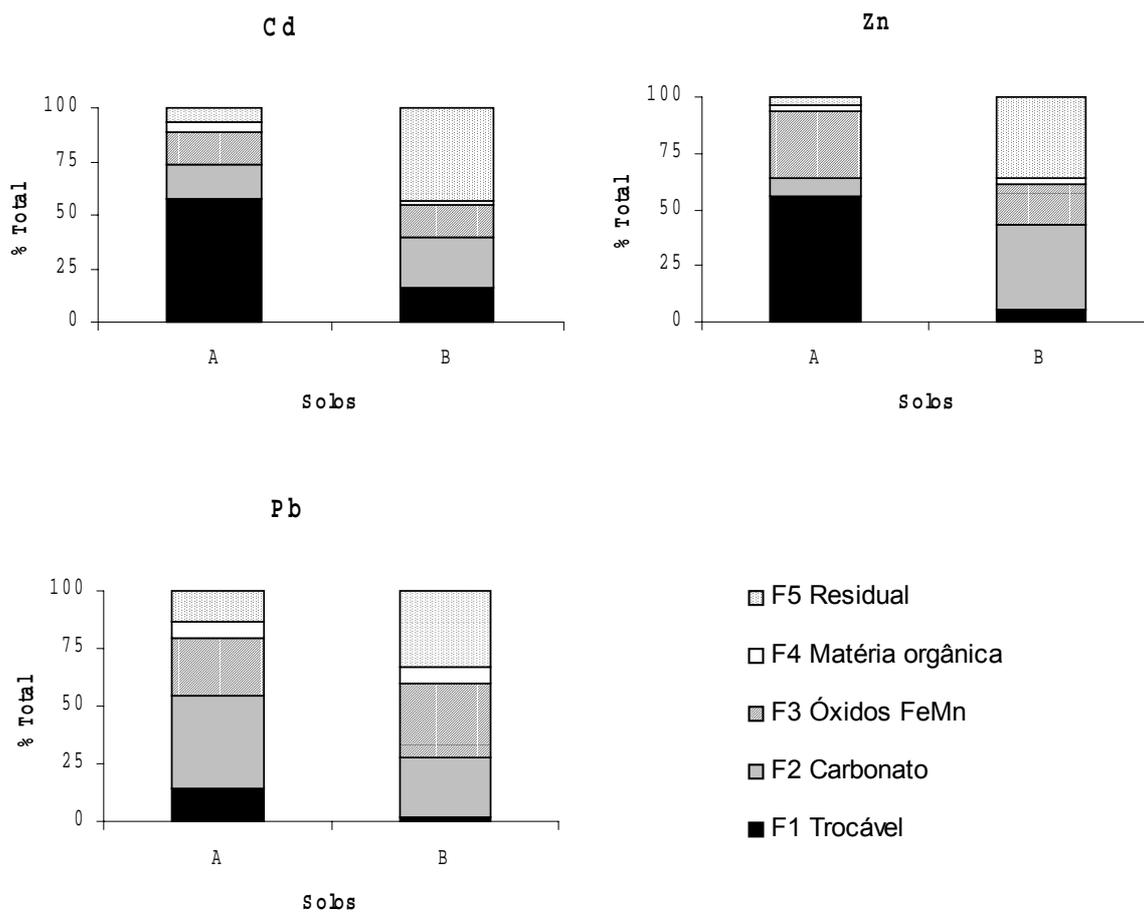


Figura 10. Extração sequencial de Zinco, Cádmio e Chumbo nos solos das áreas A e B.

As concentrações de Cd, Zn e Pb solúveis no solo foram determinadas após o cultivo dos solos com *B. decumbens* e *T. caerulescens* (Tabela 13).

Tabela 13. Concentrações de Cd, Zn e Pb na solução do solo após os cultivos de *T. caerulescens* (TC) e *B. decumbens* (BD) nos diferentes tratamentos.

Solos	Quelantes	Cd	Zn	Pb
			mg kg ⁻¹	
A	TC	2,8(±0,5)	217(±16)	1,6(±0,1)
	BD	1,5(±0,2)	10(±1)	0,2(±0,01)
	BD + EDTA	17,7(±4,8)	155(±14)	13,6(±1,11)
	BD + EDDS	7,6(±0,4)	429(±3)	2,9(±0,02)
B	TC	2,7(±0,4)	201(±12)	0,8(±0,01)
	BD	1,8(±0,1)	20(±9)	2,9(±0,02)
	BD + EDTA	42,2(±5,5)	337(±39)	53,9(±4,73)
	BD + EDDS	25,9(±0,4)	368(±40)	2,4(±0,02)

As concentrações de Cd, Zn, e Pb solúveis nos solos cultivados com *T. caerulescens* foram superiores às concentrações nos solos com *B. decumbens*. Essa

maior solubilidade pode ser devido à exudação de ácidos orgânicos por essas plantas, aumentando a solubilidade e conseqüente absorção pelas plantas.

As concentrações de Cd, Zn e Pb solúveis nos solos com *B. decumbens*, aumentaram significativamente com a adição de quelantes após 4 dias de tratamento. O EDTA foi o quelante mais eficiente na solubilização de metais pesados do solo, principalmente Cd e Pb, confirmando a sua maior especificidade em solubilizar e formar complexos com diversos metais pesados (Blaylock et al., 1997; Liphadzi et al., 2003).

No entanto, para o Zn, o EDDS teve uma maior afinidade com esse elemento, principalmente no solo A, no qual esse elemento está disposto em frações químicas de menor estabilidade quando comparado ao solo B (Figura 10).

A produção de biomassa pelas plantas está apresentada na Tabela 14. Quando não se adicionam quelantes no solo (tratamento controle), as plantas de *B. decumbens* apesar de terem apresentado um menor desenvolvimento quando comparado a cultivos em solos não contaminados, não apresentaram sintomas visíveis de toxicidade como clorose e necrose. No entanto, os quatro dias de tratamento com os quelantes, foram suficientes para produzir redução no desenvolvimento tanto da parte aérea como das raízes das plantas, além de clorose nas folhas.

Tabela 14. Biomassa e concentração de Cd, Zn e Pb na parte aérea e raiz de *Brachiaria decumbens* (BD) e *Thlaspi caerulescens* (TC) desenvolvidas nos solos V e D.

Solos	Tratamentos	Biomassa	Cd	Zn	Pb
		----- g -----	----- mg kg ⁻¹ -----	----- mg kg ⁻¹ -----	----- mg kg ⁻¹ -----
Parte aérea					
A	TC	0,403 (±0,06)	17,3 (±1,9)	12.575 (±1098)	68 (±5)
	BD	1,87 (±0,29)	1,3 (±0,5)	641 (±47)	11,8 (±2,6)
	BD + EDTA	1,23 (±0,11)	2,3 (±1,1)	713 (±95)	22,1 (±7,1)
	BD + EDDS	1,27 (±0,14)	3,3 (±1,1)	1.759 (±422)	50,7 (±18,4)
B	TC	0,440(±0,1)	29,1(±2,5)	21.512(±1992)	339(±32)
	BD	1,89 (±0,04)	1,5 (±0,2)	862 (±46)	7,6 (±5,8)
	BD + EDTA	1,60 (±0,13)	2,2 (±0,9)	1127 (±53)	27,9 (±9,8)
	BD + EDDS	1,67 (±0,11)	3,0 (±1,0)	2.122 (±190)	33,3 (±10,6)
Raiz					
A	TC	0,21 (±0,02)	8,1 (±1,7)	2.087 (±200)	368 (±65)
	BD	0,94 (±0,17)	26,4 (±1,2)	5.481 (±295)	68,6 (±4,0)
	BD + EDTA	0,77 (±0,06)	15,8 (±3,3)	3.296 (±786)	59,1 (±15,3)
	BD + EDDS	0,81 (±0,06)	10,1 (±1,1)	2.482 (±380)	48,1 (±2,7)
B	TC	0,16 (±0,01)	14,4 (±2,8)	24.775 (±1567)	2522 (±726)
	BD	0,77 (±0,02)	42,3 (±4,0)	13.296 (±1150)	368,6 (±46,8)
	BD + EDTA	0,63 (±0,05)	22,6 (±3,8)	5.482 (±1049)	236,3 (±42,3)
	BD + EDDS	0,69 (±0,01)	27,3 (±1,2)	9.633 (±744)	383,3 (±83,4)

A produção de raízes foi mais reduzida no solo da área B quando comparado a da área A, provavelmente devido as maiores concentrações totais de metais pesados nesse solo (Tabela 14), levando a uma maior absorção de metais pelas raízes, o que pode ter causado um efeito de fitotoxicidade e afetado o seu desenvolvimento.

As concentrações de metais pesados nas raízes das plantas de *B. decumbens* foram significativamente maiores que na parte aérea. No entanto, a distribuição de

metais na planta foi significativamente alterada pela adição de EDTA e EDDS (Tabela 14). Em ambos os solos, as aplicações de EDTA e EDDS reduziram as concentrações de Cd, Zn e Pb nas raízes das plantas e tiveram um efeito significativo no aumento das concentrações de metais na parte aérea das plantas.

Comparando com o controle, a aplicação de EDTA e EDDS nos solos aumentou significativamente as concentrações de Cd, Zn e Pb na parte aérea da *B. decumbens*. Em geral, o EDDS foi mais efetivo que o EDTA no aumento das concentrações de Cd, Zn e Pb na parte aérea, sendo esse aumento mais expressivo para o Zn.

Apesar de o EDTA ter aumentado as concentrações de metais solúveis no solo, a absorção e translocação pela *B. decumbens* foi pequena, indicando que esse composto apenas aumenta a solubilidade de metal no solo mas não estimula a absorção e translocação pela planta, o que pode aumentar os riscos de contaminação ambiental.

A translocação de metais pesados na planta foi mais significativa no solo A quando comparado ao B. Algumas características do solo como pH e concentrações totais de metal podem afetar a eficiência do quelante (Jones & Williams, 2001). Tandy et al. (2004) sugeriram que EDDS é mais efetivo extraíndo Cu e Zn do que EDTA em valores de pH acima de 6,0 podendo formar, no entanto, complexos pouco estáveis pela competição com o cálcio.

A maior eficiência na translocação de Zn por EDDS pode ser atribuída à menor biodegradação do EDDS quando complexado a esse metal. A biodegradabilidade de complexos quelante-metal depende do tipo de metal envolvido e não está relacionado com a constante de estabilidade do complexo (Van Devivere et al., 2001). Segundo esses autores, a biodegradabilidade do complexo EDDS-metal decresce na seguinte ordem Cd- > Pb- > Zn- > Cu-EDDS. Com isso, os complexos Pb-EDDS e Cd-EDDS são mais rapidamente biodegradados que os complexos Zn-EDDS, apesar dos complexos Pb- e Zn-EDDS possuírem constantes de estabilidade semelhantes. A maior estabilidade do complexo Zn-EDDS, provavelmente, favoreceu a maior translocação desse elemento para a parte aérea da planta.

Esses resultados não confirmam os dados já apresentados na literatura, principalmente para Pb. Luo et al., (2004) estudando os efeitos de EDTA e EDDS no aumento da fitoextração por milho e feijão, mostrou que a translocação de Pb da raiz para a parte aérea foi maior nos tratamentos com EDTA, devido à forte afinidade química desse quelante com o Pb ($\log K_s = 17,88$), quando comparado ao EDDS ($\log K_s = 12,7$).

Apesar do aumento nas concentrações de metais pesados na parte aérea das plantas de *B. decumbens* após tratamento com EDDS, as concentrações de metais Zn, Cd e Pb estiveram em torno de dez vezes menor que as concentrações encontradas na *T. caerulescens*. As concentrações de Zn na parte aérea das plantas da *T. caerulescens* foram maiores que os valores definidos para hiperacumuladoras de Zn (10000 mg kg^{-1} ; Baker et al., 2000), nos dois solos. No entanto, as concentrações de Cd não ultrapassaram os valores que definem a hiperacumulação (100 mg kg^{-1}). As concentrações de Cd, Zn e Pb em *T. caerulescens* foram consideravelmente maiores no solo B quando comparado ao solo A, refletindo um nível de contaminação muito alto nesse solo.

T. caerulescens tem sido mostrada ser tolerante e hiperacumular elevados níveis de Zn e Cd (Brown et al., 1994), além de possuir tolerância elevada a metais como Pb e Ni (Baker et al., 1994).

O fator de transferência (FT) é definido como a relação na concentração de metais pesados na biomassa da parte aérea e da raiz e é usado para avaliar a eficiência da planta na translocação de metais pesados da raiz para a parte aérea. A aplicação de

EDTA e EDDS aumentou significativamente a capacidade da *B. decumbens* em transportar Cd, Zn e Pb para a parte aérea, pelo aumento do FT, quando comparados ao controle (Tabela 15).

Tabela 15. Fator de transferência (Parte aérea/raiz) e extração de metais pesados pela parte aérea das plantas *Thlaspi caerulescens* (TC) e *Brachiaria decumbens* (BD).

	Solos	Tratamento	Cd	Zn	Pb
Fator de Transferência (FT)	A	TC	2,13	6,02	0,18
		BD	0,05	0,12	0,17
		BD + EDTA	0,15	0,22	0,37
		BD + EDDS	0,33	0,71	1,05
	B	TC	2,02	0,87	0,13
		BD	0,04	0,06	0,02
		BD + EDTA	0,10	0,21	0,12
		BD + EDDS	0,11	0,22	0,09
Extração (mg kg ⁻¹ solo)	A	TC	0,023	16,892	0,091
		BD	0,008	3,996	0,073
		BD + EDTA	0,009	2,923	0,091
		BD + EDDS	0,014	7,446	0,215
	B	TC	0,043	31,551	0,497
		BD	0,009	5,431	0,048
		BD + EDTA	0,012	6,011	0,149
		BD + EDDS	0,017	11,812	0,185

O EDDS foi mais efetivo que EDTA na translocação de metais pesados da raiz para a parte aérea, principalmente no solo A, onde o FT foi significativamente maior para os três metais pesados estudados. Isso pode ter ocorrido, devido, principalmente, à presença desses metais nesse solo em frações químicas menos estáveis quando comparado ao solo B (Figura 10), facilitando a formação de complexos com EDDS.

No solo B, apesar do maior FT nos tratamentos onde foram adicionados quelantes, quando comparados ao controle, não houve diferença significativa entre o EDTA e o EDDS, sendo essa relação significativamente menor que no solo A. Isso pode ter ocorrido em razão da maior absorção de metais pelas raízes nesse solo (Tabela 14), o que pode ter provocado um efeito de toxicidade nessas plantas e afetado a sua translocação para a parte aérea.

Apesar do aumento desse fator pela *B. decumbens* no tratamento com EDDS, a capacidade dessa planta em translocar Zn e Cd foi muito inferior aos valores de *T. caerulescens*, evidenciando a habilidade dessa planta hiperacumuladora na absorção e translocação de metais.

As quantidades de Zn, Cd e Pb removidos por *T. caerulescens* e *B. decumbens* são apresentados na Tabela 15. As diferenças mais expressivas na remoção de metais pesados nessas plantas foram com relação ao Zn. No solo A, a *T. caerulescens* removeu uma quantidade aproximadamente duas vezes maior que a *B. decumbens* + EDDS, que foi o tratamento mais eficiente na remoção de metais pesados pela *B. decumbens*. Com relação ao solo B, essa diferença na extração foi três vezes superior pra a *T. caerulescens*, mostrando que, apesar da menor produção de matéria seca pela *T.*

caerulescens a maior eficiência dessa planta em acumular Zn na parte aérea, favoreceu a maior eficiência na fitoextração desse elemento.

Visto que a eficiência da fitoextração é determinada pela habilidade da planta em concentrar metais pesados na sua biomassa, a adição de EDDS, principalmente no solo A, otimizou esse processo na *B. decumbens*, como refletido pelos maiores valores de FT, não superando, no entanto, a capacidade de fitoextração de Zn da hiperacumuladora *T. caerulescens*.

4.4 Conclusões

- O EDDS favoreceu a absorção de Cd, Zn e Pb pela *B. decumbens* e foi mais eficiente que o EDTA na translocação desses metais para a parte aérea;
- Apesar do aumento da fitoextração pelas plantas de *B. decumbens* após tratamento com EDDS, as concentrações de metais Zn, Cd e Pb foram muito menores quando comparado à hiperacumuladora *T. caerulescens*.

5. CAPÍTULO III

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FITOQUELATINAS E COMPOSTOS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS SUBMETIDAS À CONTAMINAÇÃO COM Zn E Cd.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a resposta antioxidante de *B. decumbens* à contaminação com Cd e Zn, foi conduzido um experimento em solução nutritiva enriquecida com 50 e 100 μM de Cd; e 500 e 2000 μM de Zn, na forma de nitrato. Raízes e folhas dessas plantas foram coletadas nos tempos 0; 1; 3; 6; 12, e 18 dias após aplicação dos metais, sendo congeladas em N líquido e armazenadas a -80°C até serem liofilizadas. Foram determinados os teores de metais pesados na raiz e parte aérea das plantas, como também a produção de compostos antioxidantes como: fitoquelatinas; glutatona; ascorbato, e tocoferol, bem como pigmentos fotoprotetores (violaxantina, anteraxantina, zeaxantina, clorofila *a* e *b*). As análises foram realizadas em HPLC (cromatografia líquida de alta resolução) e para ascorbato, em espectrofotômetro por um decréscimo na absorvância a 265 após adição de 10 unidades mL^{-1} de ascorbato oxidase, e a forma oxidada (desidroascorbato) pelo aumento na A265 após redução com ditiotreitól. Os resultados mostraram tolerância da *B. decumbens* às doses de Cd e Zn aplicadas, além de acumularem significativas concentrações desses metais na raiz e parte aérea. Essas plantas também responderam à contaminação pela estimulação de um sistema antioxidante de defesa, induzindo a produção de fitoquelatinas, ascorbato e tocoferol. As fitoquelatinas foram os antioxidantes mais produzidos em resposta ao estresse provocado pelos metais, demonstrando a importância desse composto na tolerância aos metais pesados nessa planta, sendo o Cd o mais forte indutor de fitoquelatinas.

Palavras-chave: fitoquelatinas, sistema antioxidante, metais pesados, VAZ

ABSTRACT

To evaluate the antioxidative response of *B. decumbens* induced for contamination of Cd and Zn was conducted an experiment in nutrition solution exposed to 50 and 100 μM Cd, and 500 and 2000 μM Zn, as nitrate. Roots and shoots were collected after 0, 1, 3, 6, 12 and 18 days of treatment, frozen in liquid nitrogen and stored in -80°C until lyophilization. Heavy metals were determinate in roots and shoots. Phytochelatins, glutathione, tocopherol and photoprotective systems (xanthophyll cycle pigments and chlorophyll a and b) were measured by reversed-phase HPLC. The reduced form of ascorbate was measure by the decrease in A_{265} after adding 10 units mL^{-1} ascorbate oxidase. The oxidased form (dehidroascorbate) bu the increase in A_{265} after reduction with dithiotreitol. The results showed the tolerance of *B. decumbens* for dosis of Cd and Zn studied. This plants accumulated a significant concentration of these heavy metals in the roots and shoots. These plants increased the defense of antioxidative systems, inducing the production of phytochelatin, ascorbate and tocopherol. The phytochelatins were the most effective antioxidant produced for these plants in response of the stress, showing the importance of this antioxidant in the tolerance of heavy metals. Cd was the most effective activator of phytochelatin.

Key words: phytochelatins, antioxidative system, heavy metals, VAZ

5.1 Introdução

As plantas diferem na sua habilidade em retirar, acumular e tolerar metais pesados. Diferenças marcantes podem ocorrer entre as espécies, entre variedades de uma mesma espécie e também nos tecidos da planta. Sendo assim, as plantas apresentam um grau de susceptibilidade variado aos metais pesados, e respondem a esses efeitos por diferentes vias, dependendo do tipo e concentração do íon, espécie e estágio do seu desenvolvimento.

Danos fisiológicos causados nas plantas por excesso de metais pesados, levam a uma série de distúrbios como redução no crescimento, inibição da fotossíntese e respiração, degeneração das principais organelas celulares e, em muitos casos, morte das plantas (Vangronsveld & Clijsters, 1994).

Estudos recentes demonstram que um dos principais mecanismos que elevadas concentrações de metais pesados podem causar danos no tecido das plantas é o estímulo na produção de radicais livres, levando ao estresse oxidativo (Foyer et al., 1997). Alguns metais, como Cu, Cd, Zn e Fe podem causar estresse oxidativo pela indução da produção de espécies ativas de oxigênio (EAO), provocando efeitos na fotossíntese e, conseqüentemente, sérios danos a macromoléculas.

O O_2 utilizado pelas plantas é pouco reativo devido à estrutura estável dos elétrons na sua camada externa. No entanto, principalmente quando as plantas são submetidas a um estresse, entre eles de metais pesados, podem gerar radicais livres e derivados como hidroxila (OH^\cdot), ânion superóxido ($O_2^\cdot^-$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que são altamente reativos e podem oxidar macromoléculas biológicas, levando a danos celulares como alteração no DNA, oxidação de proteínas e peroxidação de lipídeos (Dat et al., 2000). As plantas possuem um número de moléculas e enzimas antioxidantes que protegem as plantas do estresse oxidativo (Schützendübel et al., 2002).

Algumas plantas podem acumular metais pesados, dentro ou fora de seus tecidos em razão da sua grande habilidade em se adaptar às variadas propriedades físico-químicas do meio ambiente. Sendo assim, essas plantas podem ser consideradas reservatórios intermediários através dos quais os metais pesados se movem do solo, água e ar para o homem e animais.

As plantas podem apresentar diferentes mecanismos de tolerância em resposta ao excesso de metais pesados, incluindo a redução do transporte através da membrana, exclusão, formação de peptídeos ricos em grupos tiólicos (fitoquelatinas e metalotioneínas), quelação por ácidos orgânicos e aminoácidos, e compartimentalização de metal em estruturas subcelulares (Clemens, 2001).

5.1.1 Fitoquelatinas

Um dos mecanismos de tolerância a metais pesados em plantas está relacionado com a síntese de peptídeos tiólicos chamados fitoquelatinas, que formam complexos com metais pesados, especialmente o Cd, no enxofre livre presente na cisteína (Zenk, 1996).

As fitoquelatinas são formadas por três aminoácidos: glutamato (Glu), cisteína (Cys) e glicina (Gly), com Glu e Cys ligados através de uma γ -carboxilamida. A estrutura das fitoquelatinas se forma com um aumento nas repetições do dipeptídeo γ -Glu-Cys seguido por uma Gly terminal. Tem estrutura geral $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, onde $n=2$ a 11, mas geralmente são mais encontradas variando o n de 2 a 5. Fitoquelatinas

têm sido identificadas em uma ampla variedade de espécies de plantas e em alguns microrganismos (Grill et al, 1989; Maitani et al., 1996; Rauser, 1995).

Esses peptídeos são sintetizados enzimaticamente, usando glutathiona reduzida (GSH) como substrato, por meio de uma reação catalizada pela enzima γ -glutamilcisteína dipeptidil transpeptidase, conhecida como fitoquelatina sintase (Grill et al., 1989), que é ativada pela presença de metais pesados. Segundo Grill et al. (1989), a fitoquelatina sintase é ativada após alguns minutos de exposição a uma variedade de metais e metalóides. *In vitro*, a atividade da fitoquelatina sintase foi ativada somente na presença de íons metálicos e o melhor ativador estudado foi o Cd seguido por Ag, Bi, Pb, Zn, Cu, Hg e Au. Esses metais também induziram a síntese de fitoquelatinas *in vivo* em culturas de células de plantas (Grill et al., 1989).

As fitoquelatinas são estruturalmente relacionadas à glutathiona (GSH; γ -Glu-Cys-Gly) e numerosos estudos fisiológicos, bioquímicos e genéticos têm confirmado que o GSH (ou, em muitos casos, compostos relacionados) é o substrato para a biossíntese das fitoquelatinas (Rauser, 1995, 1999; Zenk, 1996). Estudos genéticos têm confirmado que mutantes, deficientes em fitoquelatina sintase, de *Schizosaccharomyces pombe* tão bem como *Arabidopsis*, são, conseqüentemente, deficientes em fitoquelatina e hipersensível a metais, principalmente Cd. Estudos com culturas de células demonstraram a indução de fitoquelatinas na presença de Cd coincidindo com um breve decréscimo nos níveis de GSH. Além disso, a exposição de culturas de células e plantas inteiras a um inibidor da síntese de GSH, butionina sulfoximina (BSO), conferiu inibição na biossíntese de fitoquelatina e aumento da sensibilidade ao Cd (Howden et al., 1995).

O uso de mutantes de *Arabidopsis thaliana* demonstra o papel fundamental das fitoquelatinas na detoxicação ao Cd (Howden & Cobbett, 1992; Howden et al., 1995). O mutante cad1, deficiente na atividade da fitoquelatina sintase, apesar de ter um nível de GSH comparável com outras plantas, foi mais sensível aos efeitos fitotóxicos do Cd.

Além das fitoquelatinas, algumas plantas podem apresentar outros peptídeos, relacionados à fitoquelatina, na presença de metais pesados. As leguminosas produzem peptídeos com estrutura $(\gamma$ -Glu-Cys)_n- β Ala (Grill et al., 1986), que são formados por homo-glutathiona (h-GSH), que podem substituir parcial ou integralmente o GSH nessas plantas.

Algumas espécies da família Poaceae (Gramineae) produzem peptídeos contendo serina como aminoácido terminal, com estrutura $(\gamma$ -Glu-Cys)_n-Ser, chamados hidroximetil-fitoquelatinas (Klapheck et al., 1994). Esses peptídeos são formados a partir da presença de hidroximetil-glutathiona em adição à glutathiona nessas plantas.

O Cd é o mais forte indutor de fitoquelatinas *in vivo* e é o elemento que forma complexos mais estáveis com as fitoquelatinas, devido à sua grande afinidade ao grupo tiol (Zenk, 1996). No entanto, a síntese de fitoquelatinas não está relacionada somente a esse elemento. Grill et al. (1987) estudando a síntese de fitoquelatinas em uma suspensão de cultura de células de *Rauvolfia serpentina* exposta a metais, concluíram que os metais induzem a síntese de desse composto na seguinte ordem decrescente: Cd²⁺; Pb²⁺; Zn²⁺; Sb³⁺; Ag⁺; Hg²⁺; As⁵⁻; Cu⁺; Sn²⁺; Au³⁺, e Bi³⁺. Segundo esses mesmos autores, íons Ni, Te, W e Se não induziram a síntese de fitoquelatinas.

Plantas e culturas de células expostas a uma faixa de 3 a 500 μ mol L⁻¹ de Cd causaram um rápido aumento nos níveis de fitoquelatinas dentro de 10-15 min, seguido por um aumento na cadeia com vários peptídeos γ -Glu-Cys (Grill et al., 1987; Klapheck et al., 1994; Meuwly et al., 1995). Em raízes de milho, o tripeptídeo γ -Glu-Cys-Glu foi induzido dentro de 2 h de exposição ao Cd, seguido pela formação de $(\gamma$ -Glu-Cys)₂₋₃-Glu (Meuwly et al., 1995).

Morelli & Scarano (2004), estudando os mecanismos de defesa celular da alga marinha *Phaeodactylum tricornutum* ao Cu, mostraram que a formação de complexo Cu-fitoquelatina foi detectado logo após 1 h de exposição ao metal, sugerindo que esse mecanismo forma a primeira defesa ao Cu contra a formação de espécies ativas de oxigênio (EAOs).

Apesar da importância das fitoquelatinas no processo de detoxicação de plantas a metais pesados estar bem documentada, permanece ainda obscura a principal função das fitoquelatinas em plantas. A formação do complexo metal-fitoquelatina *in vivo* parece ter um papel breve e passageiro no processo de detoxicação. Leopold et al. (1999), mostraram que os complexos Cd-fitoquelatina e Cu-fitoquelatina formados em *Silene vulgaris* desapareceram nas raízes 1 a 2 semanas após a exposição aos metais pesados.

5.1.2 Sistemas fotoprotetores e antioxidantes

Cada ano o estresse ambiental causa perdas consideráveis na qualidade e produtividade dos cultivos. Um dos fatores que causa danos em condições ambientais adversas é a produção de excesso de espécies ativas de oxigênio (EAO) como superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH^\cdot), que são altamente destrutivas dos lipídeos, ácidos nucléicos e proteínas da célula vegetal. O estresse oxidativo pode ocorrer em plantas em virtude de uma série de fatores como extremos de temperatura, radiação UV, estresse hídrico, metais pesados e herbicidas como o paraquat (Gratão, 2003).

As plantas possuem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos de proteção contra o estresse oxidativo, que inativam as EAO. Alguns dos mais importantes antioxidantes são a glutathiona reduzida (GSH), ascorbato (vitamina C), alfa-tocoferol (vitamina E) e os carotenóides, que são encontrados nas plantas em altas concentrações. Mecanismos enzimáticos também estão envolvidos no processo antioxidante como catalase, superóxido dismutase, glutathiona-redutase e ascorbato-peroxidase (Alscher & Hess, 1993).

A glutathiona é um tripeptídeo (Glu-Cys-Gly) que possui função antioxidante principalmente devido ao grupo sulfidríla da cisteína (Zenk, 1996). É encontrado na maioria dos tecidos e compartimentos celulares e subcelulares de plantas superiores e podem ser degradados pela idade do tecido e por condições ambientais. Possui função antioxidante em diferentes caminhos, podendo reagir quimicamente com íons oxigênio, superóxido e radicais hidroxila reduzindo o acúmulo de radicais livres. Pode também estabilizar a estrutura da membrana removendo radicais peróxidos que causam reações de peroxidações de lipídeos de membrana, além de reduzir formas oxidadas de ascorbato. O GSH também é o precursor das fitoquelatinas. Sob exposição ao Cd, muitas espécies inicialmente mostram um decréscimo de GSH, provavelmente por causa do aumento na demanda de GSH para a detoxicação de Cd. Por outro lado, a menor produção de GSH pode ocasionar uma redução nos níveis de ascorbato e enzimas antioxidantes e significativo acúmulo de H_2O_2 (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

O ascorbato é uma importante vitamina na dieta humana e abundante no tecido de plantas. Folhas verdes possuem a mesma quantidade de ascorbato como de clorofila. O ascorbato pode atuar como redutor de muitos radicais livres reduzindo assim danos causados por estresse oxidativo, além de estarem relacionados a muitos processos fisiológicos como crescimento, diferenciação e metabolismo (Foyer, 1993). O ascorbato pode diretamente reduzir radicais livres de oxigênio com ou sem participação enzimática, ou indiretamente reciclar o tocoferol para a forma reduzida.

5.1.3 Pigmentos fotossintéticos

A luz representa um dos fatores mais heterogêneos entre os que afetam as plantas. Enquanto uns pigmentos são responsáveis pela absorção energética (clorofilas) as plantas possuem outros pigmentos acessórios responsáveis pela dissipação do excesso de energia absorvida pela planta. A ação individual ou conjunta de diferentes fatores de estresse ambiental, entre eles os metais pesados, unidos à ação da luz solar, podem colocar a prova a capacidade de resistência e adaptação das plantas a um meio determinado.

Os pigmentos primários são os que têm como principal finalidade a captação de energia luminosa, como a clorofila *a*, sendo também acompanhado de outros pigmentos acessórios como os carotenóides, que incluem os carotenos e as xantofilas, cuja função é por uma parte ampliar o espectro de absorção dos pigmentos primários e por outro lado, servem de proteção diante da luz excessiva. O carotenóide mais importante nas plantas é o β -caroteno, enquanto a luteína é a principal xantofila, mas outras xantofilas, embora não estejam presentes em altas concentrações como as anteriores, possuem um papel decisivo na dissipação de energia excedente como a violaxantina, anteraxantina e zeaxantina (Demming Adams & Adams, 1993).

O ciclo das xantofilas é um processo flexível que responde não só às condições luminosas (flutuações diurnas, insolações pontuais ou transições sol-sombra) mas também a outros fatores ambientais como metais pesados, temperaturas extremas, déficit hídrico ou disponibilidade de nutrientes (Demming-Adams & Adams, 1993).

Este trabalho teve como objetivo determinar a indução de fitoquelatinas (peptídeos ricos em cisteína), compostos antioxidantes e pigmentos fotoprotetores em plantas de *B. decumbens*, submetidas a diferentes concentrações de Zn e Cd.

5.2 Material e Métodos

Esse experimento foi desenvolvido no Laboratório de Agrossistemas do Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER) e no Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidad del País Vasco (UPV), Espanha.

A *Brachiaria decumbens* foi utilizada, por apresentar os melhores resultados de tolerância e absorção de Zn e Cd, no experimento em solução nutritiva e no resíduo da INGÁ, nos experimentos realizados na UFRRJ.

Sementes de *B. decumbens* foram colocadas para germinar em mistura de perliuta e vermiculita. Sessenta dias após a germinação, as plantas foram desenvolvidas hidroponicamente em solução de Hoagland & Arnon (1950), a metade da força iônica, a pH 5,5 enriquecida com 50 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd; e 500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn, na forma de nitrato. A solução foi trocada após 7 dias e os níveis de metais e pH da solução foram determinados após cada colheita.

Raízes e folhas dessas plantas foram coletadas 0, 1, 3, 6, 12 e 18 dias após aplicação dos metais, com exceção do tratamento de Cd 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ que só foram coletadas plantas até o 6^o dia de aplicação desse elemento.

Após a colheita, raiz e parte aérea foram pesadas e separadas. As raízes foram colocadas em CaCl_2 10 mM por 10 min e posteriormente lavadas com água deionizada. Parte do material foi separado para determinação de metais e o restante foi congelado em N líquido, sendo posteriormente armazenados a -80°C até serem liofilizados.

5.2.1 Determinação dos teores de metais pesados nos tecidos

O material separado para determinação de metais foi levado à estufa a 70°C até peso constante e foi feita digestão nitro-perclórica 6:1 (Tedesco et al., 1995). As concentrações de Cd e Zn foram medidas em espectrofotômetro de absorção atômica, modelo Varian SpectrAA-250 Plus.

5.2.2 Análise de compostos tiólicos por HPLC

A extração e quantificação dos compostos tiólicos foi baseada na técnica de Schupp & Rennenberg (1988). Entre 20 e 30 mg de material liofilizado foram macerados em 1 mL de DTPA/HCl 5 mmol L^{-1} , sendo neutralizado com Ches 200 mmol L^{-1} e DTPA 5 mmol L^{-1} e derivatizado com monobromobimano.

Fitoquelatinas e tioles de baixo peso molecular como cisteína e glutatona reduzida (GSH) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo separados por uma coluna Nova-Pac C18 (3,9 x 150 mm) e eluído um gradiente linear de soluções de metanol filtrado e uma mistura metanol, água e ácido acético, em fluxo de 1,5 mL/min, durante 36 min.

O conteúdo total de fitoquelatinas foi estimado como um total dos picos individuais de cada fitoquelatina e expressado em nmol GSH g^{-1}PS , baseado na área do padrão de glutatona reduzida.

5.2.3 Ascorbato

A extração e análise do ascorbato reduzido e dehidroascorbato foi realizada como descrito por García-Plazaola et al. (1999), com algumas modificações. 0,4 mL de material vegetal extraído com HCl 3% + EDTA 1 mmol L^{-1} foram misturados com 1,2 mL de água deionizada e 0,4 mL de tampão succinato (succinato 1 mol L^{-1} + KOH 0,5

mol L⁻¹). A forma reduzida do ascorbato foi medida em espectrofotômetro por um decréscimo na absorvância a 265 nm após adição de 10 unidades mL⁻¹ de ascorbato oxidase, e a forma oxidada (desidroascorbato) pelo aumento na absorvância em 265nm após redução com 20 µL de ditioneitol 100 mmol L⁻¹.

5.2.4 Pigmentos fotoprotetores

Para análise de pigmentos fotossintéticos e tocoferol foram coletadas amostras de folha em discos de 5 mm de diâmetro, antes de amanhecer o dia, sendo congeladas em N líquido e armazenadas a -80⁰C para análise.

A extração e quantificação foram baseadas na técnica descrita por García-Plazaola & Becerril (1999). Quatro discos de 5 mm de diâmetro foram macerados com 2 mL de etanol 95% e filtrado. A quantificação de pigmentos fotossintéticos e do tocoferol foi feita por fase reversa em HPLC, eluindo em gradiente linear de soluções A: acetonitrilo 84% + metanol 2% + tampão Tris-HCl 0,1 mol L⁻¹ 14%; e B: metanol 68% + etilacetato 32%; em fluxo de 1,2 mL min⁻¹, durante 30 minutos.

5.3 Resultados e Discussão

A produção de biomassa das plantas de *B. decumbens* foi afetada pelas doses de metal aplicadas, apresentado um menor crescimento quando comparado ao controle (Figura 11). O tratamento Zn 500 μM foi o que apresentou maior crescimento das plantas.

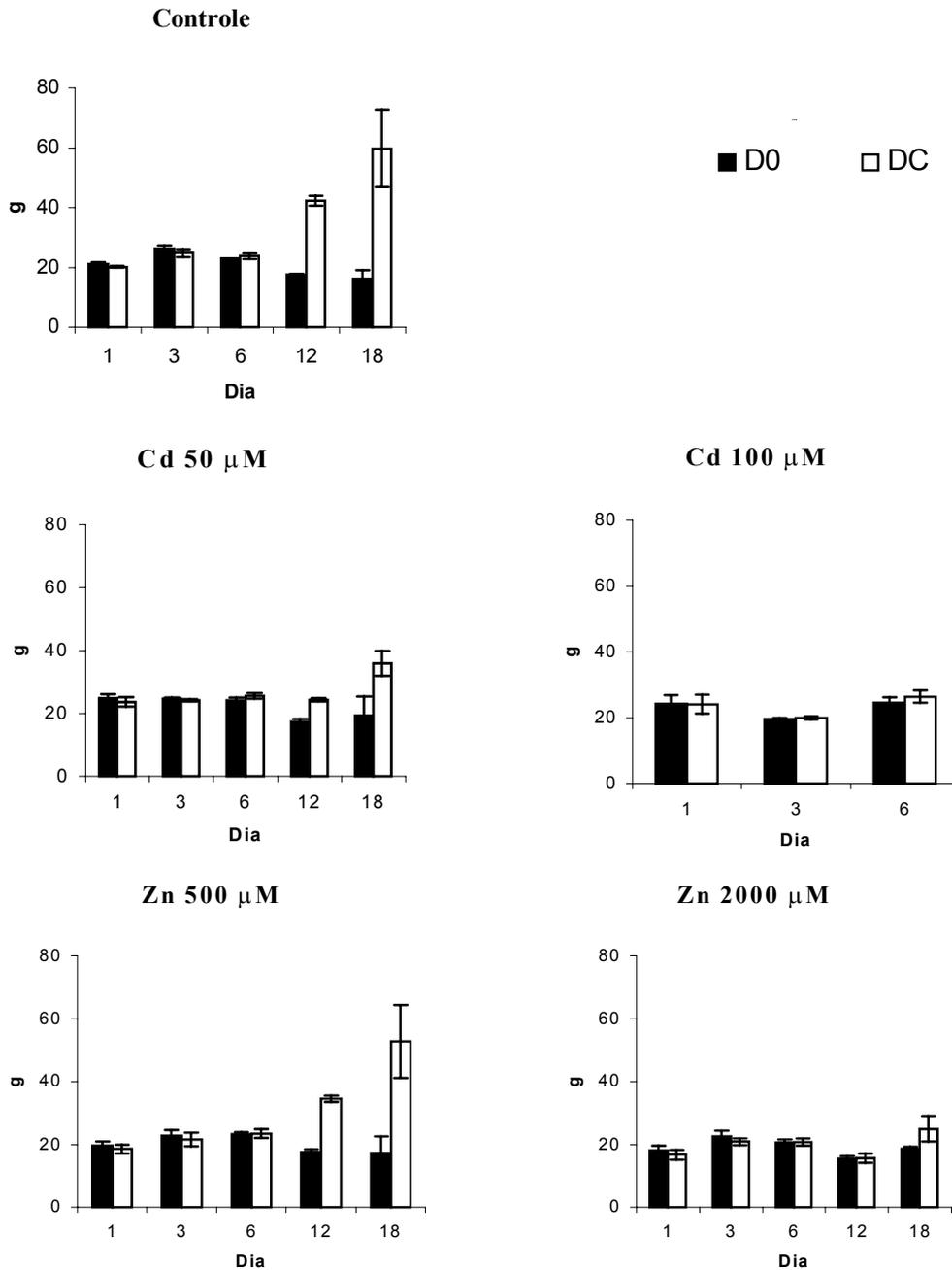


Figura 11. Produção de biomassa pelas plantas de *B. decumbens* (g) antes da aplicação de Cd e Zn – dia zero (D0) e nos diferentes dias de colheita (DC). Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Considerando a biomassa das plantas, a maior inibição no desenvolvimento foi visível na concentração de 2000 μM de Zn, apresentando além dessa redução, clorose nas folhas. Para Breckle & Kahle (1992), a ocorrência de clorose pode estar relacionada com a deficiência múltipla de vários elementos que participam da formação, multiplicação e funcionamento de cloroplastos, ou na síntese de clorofila. Essa deficiência de nutrientes pode ser resultado da inibição competitiva que o Zn pode exercer na absorção de outros íons (Malavolta, 1994).

As raízes foram o principal local de acumulação de metais pesados na planta (Figura 12), a partir do primeiro dia de exposição ao metal. Com relação ao Cd, os resultados mostraram que as raízes acumularam dez vezes mais metal que a parte aérea nas doses estudadas, enquanto que para o Zn, cinco vezes mais. Por serem pelas raízes a entrada de metais pesados, as plantas podem acumular de três a cinquenta vezes mais do que a parte aérea (Wozny, 1995). Estudando um número de espécies da família Brassicaceae e outras plantas, Kumar et al., (1995) também demonstraram que aproximadamente 90% do Pb acumulado estava na raiz.

Os níveis de metais pesados aumentaram com o tempo de exposição ao metal, em todas as doses estudadas e diferentes partes da planta.

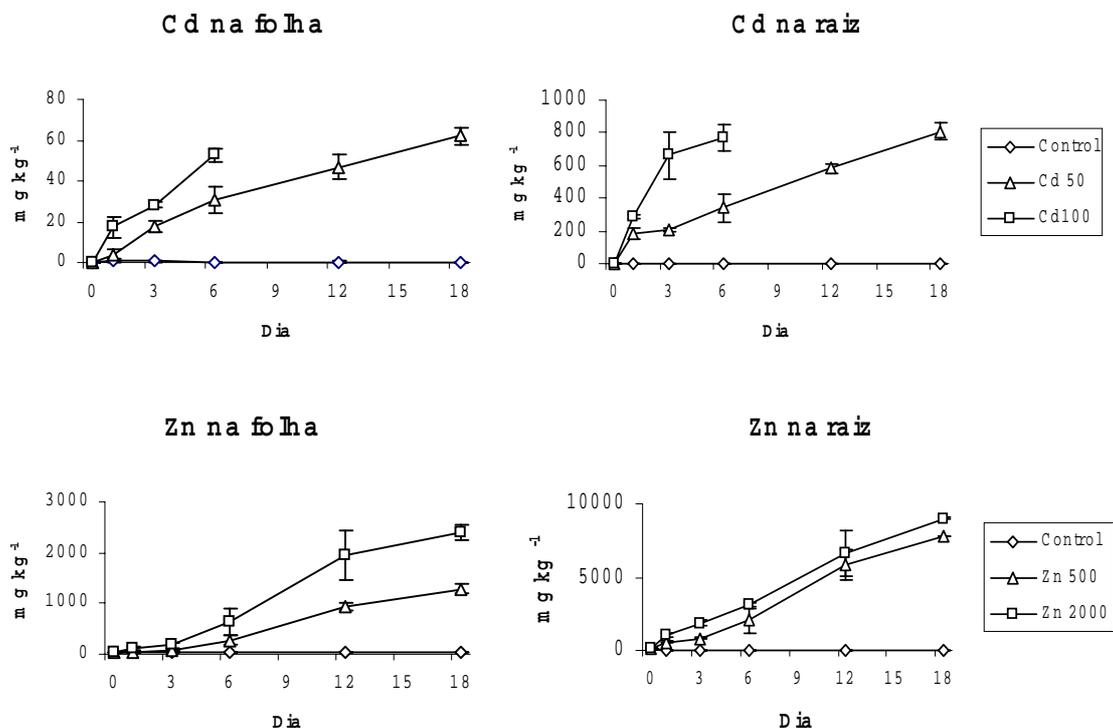


Figura 12. Concentrações de Cd e Zn nas plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses de Zn e Cd em solução nutritiva.

As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em μM . Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

Embora a *B. decumbens* tenha acumulado uma quantidade expressiva de Zn (Figura 12), essa planta foi sensível à dose de 2000 μM , devido ao seu reduzido crescimento durante os dias de cultivo (Figura 11).

Tanto na raiz como na parte aérea das plantas foi encontrada, além da glutatona, a homóloga hidroximetil-glutatona (hm-GSH), presente em algumas plantas da família

Poaceae, como descrito anteriormente por Klapheck et al. (1994) em plantas de arroz (Figura 13 e 14). Segundo esse autor, há claros resultados que plantas da família *Poaceae* apresentam uma série de peptídeos γ EC com 2 a 4 unidades e um C-terminal Serina, como h mologo das fitoquelatinas. Assim como as fitoquelatinas, esses compostos também formam complexos com metais pesados livres na célula. Com isso, a presença de hm-GSH além do GSH nessas plantas, sugere que parte dos compostos tiólicos induzidos pela presença de Cd e Zn são ricos em aminoácidos serina na região C-terminal.

Foi observada uma pequena indu o na síntese de hm-GSH nas folhas (Figura 13), até o terceiro dia de exposi o aos metais nos diferentes tratamentos, comparados ao controle, e um acentuado decréscimo a partir desse dia. Quanto ao GSH, esses níveis reduziram a partir do primeiro dia de exposi o ao metal, tanto na parte aérea como nas raízes (Figuras 13 e 14), com exce o do tratamento Zn 500 μ M, que houve uma indu o nesses níveis, nas folhas, nas primeiras 24 horas de exposi o ao metal, reduzindo os níveis após esse período (Figura 13). Esse decréscimo provavelmente ocorreu devido ao uso desses compostos na forma o de fitoquelatinas. Tem sido relatado que a gera o de estresse oxidativo por metais pesados pode ser explicado pela redu o na capacidade antioxidante da planta, em virtude da redu o nos níveis de GSH para a biossíntese de fitoquelatinas (Dixit et al., 2001; Piqueras et al. 1999; Kubota et al., 1995).

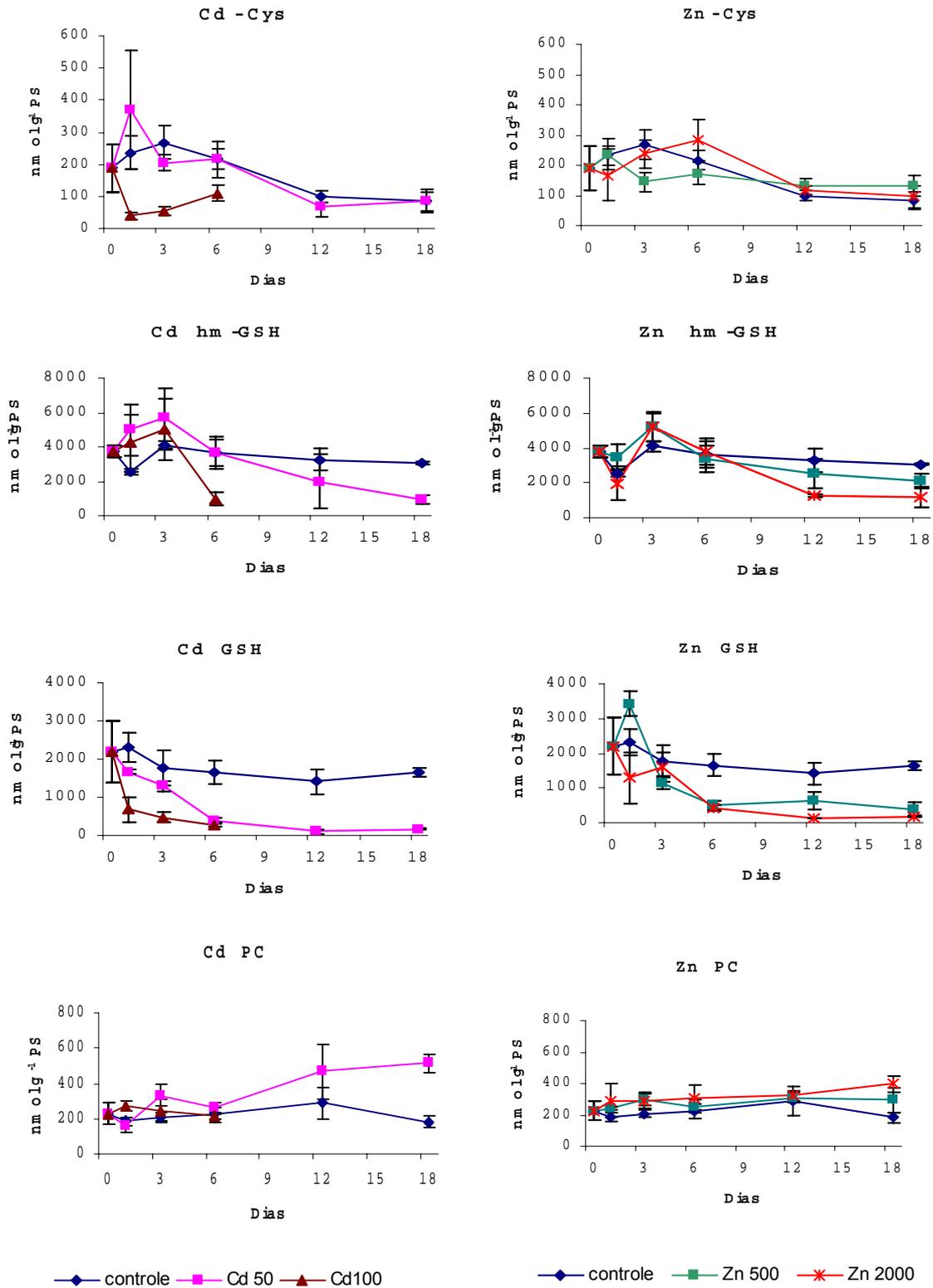


Figura 13. Produção de compostos tiólicos na parte aérea das plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes tratamentos com Cd e Zn.

As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

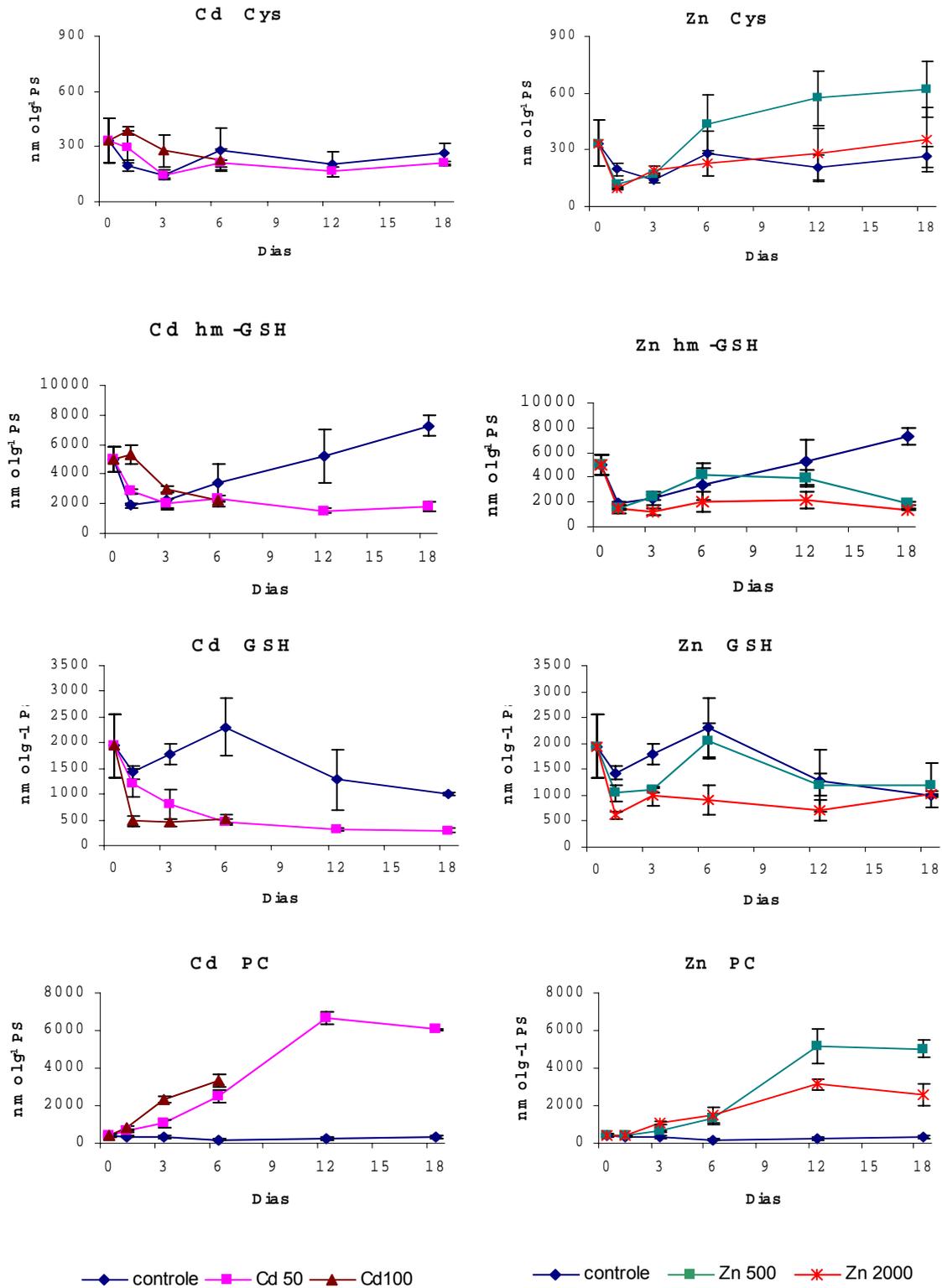


Figura 14. Produção de compostos tiólicos na raízes das plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes tratamentos com Cd e Zn.

As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

A Figura 15, confirma esses resultados, mostrando a indução de fitoquelatinas na presença de Cd nas plantas, e a conseqüente redução nos níveis de seus precursores como cisteína (Cys), glutathiona (GSH) e hidroximetil glutathiona (hm-GSH).

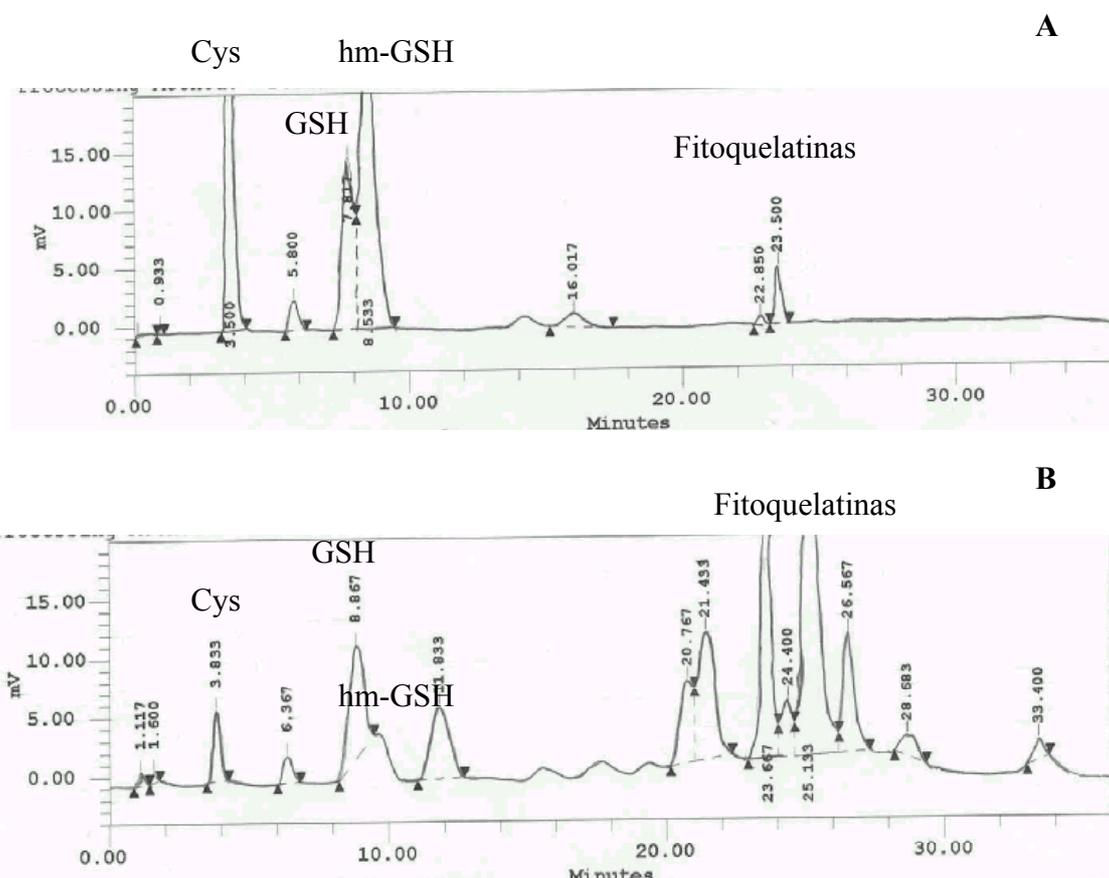


Figura 15. Esquema da análise de compostos tiólicos em HPLC em plantas de *B. decumbens*, desenvolvidas em solução nutritiva sem contaminação (A) e com $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd (B).

Tanto nas raízes como nas folhas, a quantidade de hm-GSH foi maior que GSH (Figura 13 e 14). Com a adição de metais pesados na solução, observa-se uma queda mais acentuada nos níveis de GSH que em hm-GSH, principalmente nas folhas. Considerando que esses compostos podem ser translocados pelos vasos condutores, pode-se considerar que parte desses antioxidantes formados nas folhas pode ter sido translocado para as raízes para a formação de fitoquelatinas.

A síntese de fitoquelatinas foi influenciada pelo tipo e tempo de exposição ao metal. A maior resposta à contaminação relacionada à síntese de fitoquelatinas foi com o Cd, cujas plantas desses tratamentos formaram uma maior quantidade de fitoquelatinas em relação aos metais tanto na raiz como na parte aérea. Segundo Tsuji et al. (2003), o Cd é considerado o mais forte indutor na síntese de fitoquelatinas em muitas plantas. Tem sido também mostrado que o Cd é o mais efetivo ativador da fitoquelatina sintase (Zenk, 1996).

A produção de fitoquelatinas respondeu à concentração de metal presente na solução. A dose mais alta de Cd ($100 \mu\text{M}$) acumulou uma maior quantidade de fitoquelatinas nas raízes quando comparada a dose $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que para Zn a dose mais alta ($2000 \mu\text{mol L}^{-1}$) produziu menor quantidade de fitoquelatinas. Isso

ocorreu, provavelmente, pela maior toxicidade dessa dose de Zn nessas plantas, que pode ser confirmado pelo menor desenvolvimento dessas plantas (Figura 11).

Nas folhas das plantas de braquiária, fitoquelatinas foram induzidas pela exposição aos metais em uma quantidade muito menor que nas raízes, devido provavelmente à maior quantidade de metal acumulado nas raízes (Figura 12). Segundo Cobbett & Goldsbrough (2002), as fitoquelatinas são peptídeos sintetizados enzimaticamente, sendo essa enzima estimulada pela concentração de metal livre presente na célula.

Foi observada produção de fitoquelatinas a partir do primeiro dia para todos os metais, no entanto, a maior produção ocorreu entre o 6^o e o 12^o dia. Após um período maior de exposição ao metal (18 dias) foi observado um decréscimo no nível de fitoquelatinas. A alta persistência de fitoquelatinas nessa planta sugere que esses compostos podem ter um papel importante no processo de detoxicação de íons metálicos nessas plantas. No entanto, os altos níveis de metal acumulados na raiz em relação com a capacidade quelante das fitoquelatinas produzidas, indica que esses compostos não seriam suficientes para justificar a quelação de metal nesse órgão.

Apesar da elevada concentração de fitoquelatinas em todos os tratamentos, pode ser vista uma redução na síntese desse composto no tratamento 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn quando comparado ao de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Isso pode ter ocorrido, pelo dano fisiológico que provavelmente, essa dose de Zn causou nessas plantas.

Barrutia et al (2003), estudando a produção de fitoquelatinas pela hiperacumuladora *Thlaspi caerulescens* em solução nutritiva contaminada com diferentes doses de Cd, encontraram níveis de fitoquelatinas semelhantes aos encontrados em *B. decumbens*, isso demonstra que o papel das fitoquelatinas pode estar mais relacionado com a tolerância a metais do que com a capacidade hiperacumuladora.

Com relação aos níveis de ascorbato nas plantas (Figura 16), observa-se que Cd e Zn induziram a resposta antioxidante dessas plantas pelo aumento de ascorbato reduzido até o terceiro dia de tratamento com os metais, reduzindo os níveis a partir desse dia provavelmente devido à redução nos níveis de GSH. O GSH é o responsável pela reciclagem de ascorbato da forma oxidada para a reduzida pela enzima dehidroascorbato redutase (Loewus, 1988). Assim, os teores de ascorbato oxidado (DHA) foram maiores nos tratamentos com metais quando comparado ao controle, provavelmente, devido ao uso do ascorbato reduzido nos processos antioxidantes, transformando o ascorbato reduzido em monodehidroascorbato, que irá dismutar para dehidroascorbato (DHA) e ascorbato. Segundo Sandalio et al. (2001), a geração do estresse oxidativo por metais pesados pode explicar a redução da capacidade antioxidante da planta devido à redução nos níveis de glutatona para a síntese de fitoquelatinas.

No entanto, a depleção de ascorbato reduzido, a partir do 5^o dia de exposição ao Zn e Cd, não foi proporcional ao aumento nos níveis de DHA. A depleção de ascorbato reduzido sem mudança no estado redox pelo excesso de metais pesados também já foi observado em plantas de feijão (González et al., 1998) e cevada (Demirevska-Kepova et al., 2004).

Tem sido reportado que o ascorbato é a principal fonte de ácido oxálico em muitas espécies (Smirnoff, 2000) e a imobilização do excesso de metais pesados por oxalato tem sido sugerido como um mecanismo de detoxicação a metais pesados (González & Lynch, 1999). Dessa forma, uma possível explicação para a redução nos níveis de ascorbato poderia ser um aumento na síntese de oxalato à custa de ácido ascórbico.

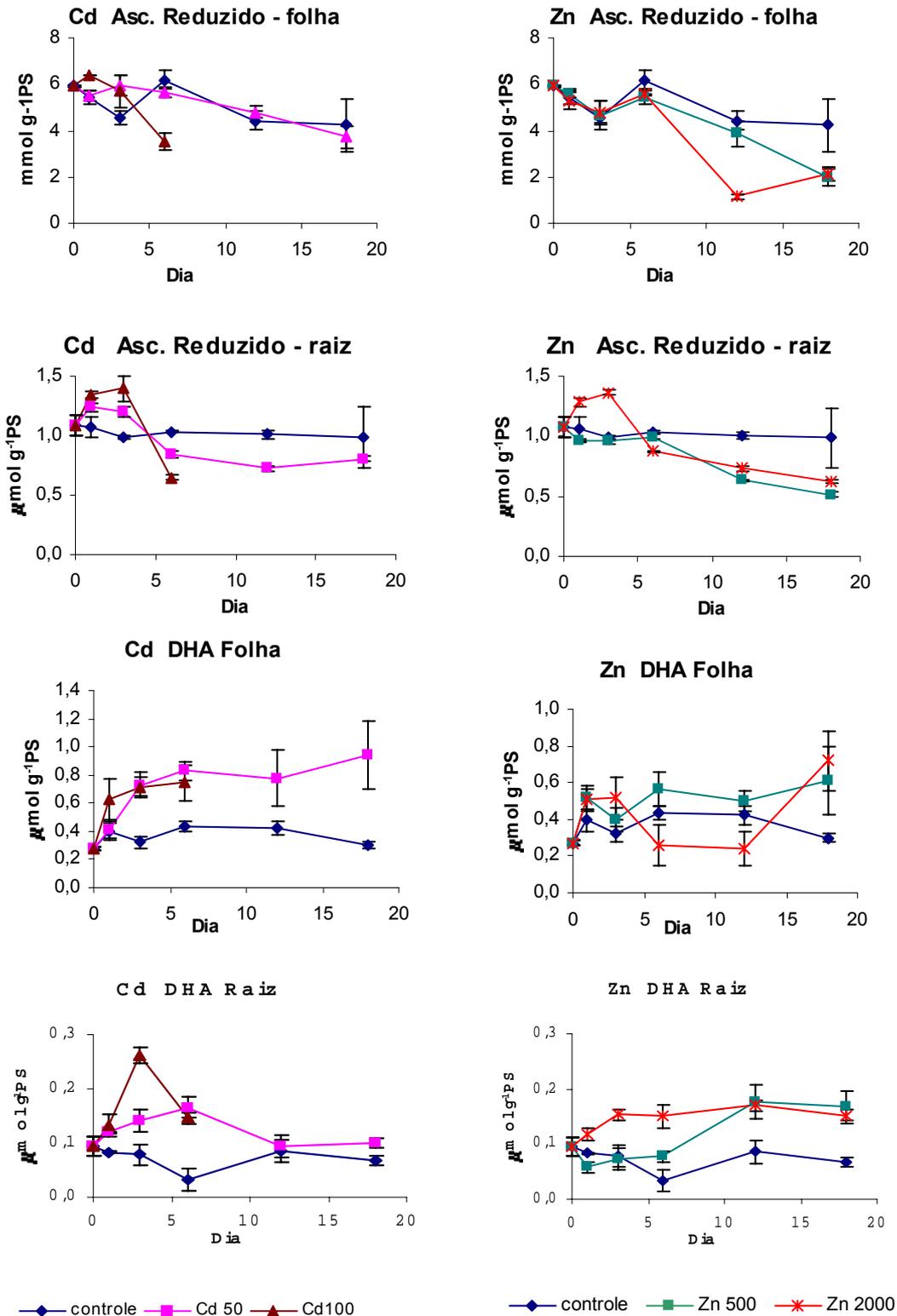


Figura 16. Teores de ascorbato reduzido e dehidroascorbato (DHA) nas plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses de Cd e Zn.

As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

A contaminação com Zn e Cd também estimulou a produção de tocoferol (Figura 17), principalmente α -tocoferol nos diferentes tratamentos quando comparados

ao controle, com exceção do tratamento Cd 100 μM , devido provavelmente à sua grande toxicidade.

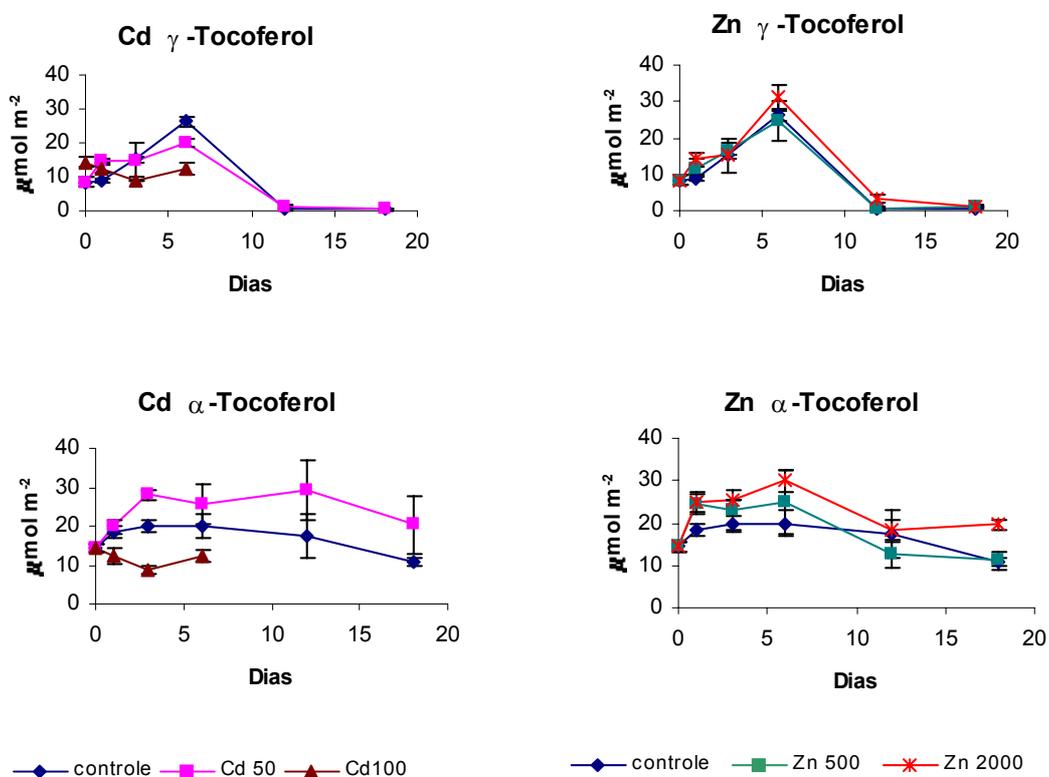


Figura 17. Produção de tocoferol em folhas de *B. decumbens* submetidas a diferentes tratamentos com Cd e Zn.

As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

O α -tocoferol é considerado a forma mais ativa de tocoferol e é um importante agente estabilizador de membranas (Hess, 1993). A concentração desse composto aumentou nos tratamentos com metais pesados até o sexto dia de exposição ao metal, com posterior decréscimo desse antioxidante nos tratamentos, com exceção do tratamento Cd 50 μM , cujos níveis foram elevados até o 12º dia de exposição ao metal. Resultados semelhantes foram encontrados por Artetxe et al. (2002), estudando plantas de *Lemna minor* exposta a Cd e Zn por nove dias, cujos níveis de α -tocoferol aumentaram gradualmente até o sexto dia de exposição aos metais.

O tocoferol é capaz de eliminar peróxidos formando radicais tocoferoxil (Hess, 1993). Os radicais tocoferoxil podem ser reciclados em tocoferol mediante ascorbato e GSH, dessa forma a redução nos níveis de α -tocoferol observada no tratamento Cd 100 μM possivelmente deveu-se à rápida e grande redução de GSH nesse tratamento.

Danos no sistema fotossintético estão refletidos na redução nos níveis de clorofila e carotenóides, como o β -caroteno e os pigmentos do ciclo da xantofila (VAZ), pela contaminação com Cd e Zn (Figuras 18 e 19).

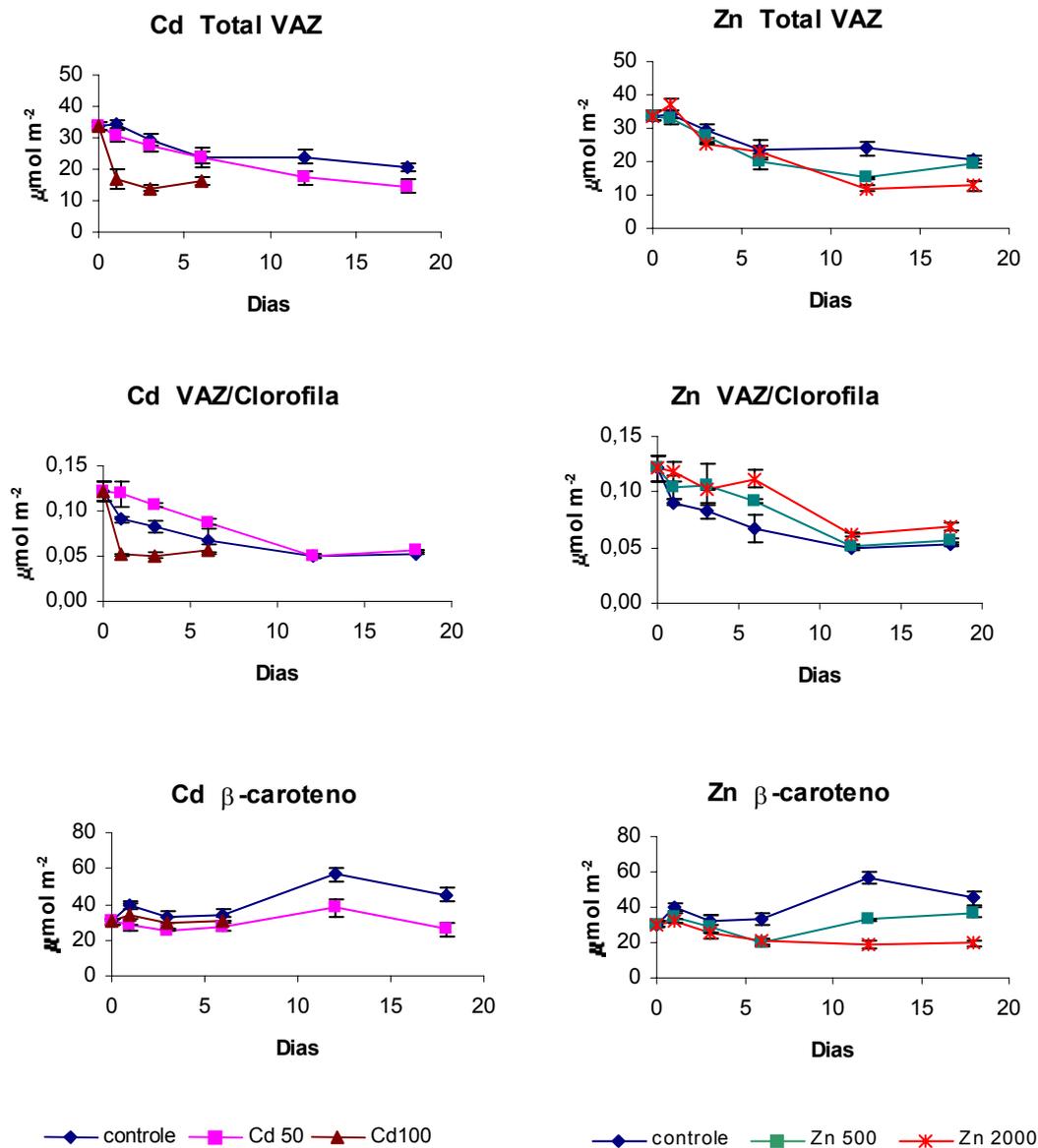


Figura 18. Produção de pigmentos do ciclo das xantofilas e β -caroteno nas plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses com Cd e Zn.

VAZ: pigmentos do ciclo da xantofila (violaxantina, anteraxantina e zeaxantina)

As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

O total de VAZ (pigmentos do ciclo da xantofila) foi menor ou igual nos tratamentos com Cd e Zn quando comparados ao controle. Esses valores aumentaram em relação ao controle quando expressos por clorofila, considerando a degradação desse composto nas plantas submetidas à contaminação com metais pesados (Figura 18). O tratamento Cd $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ apresentou níveis muito baixos desses compostos fotoprotetores, devido provavelmente à toxicidade dessa dose aplicada.

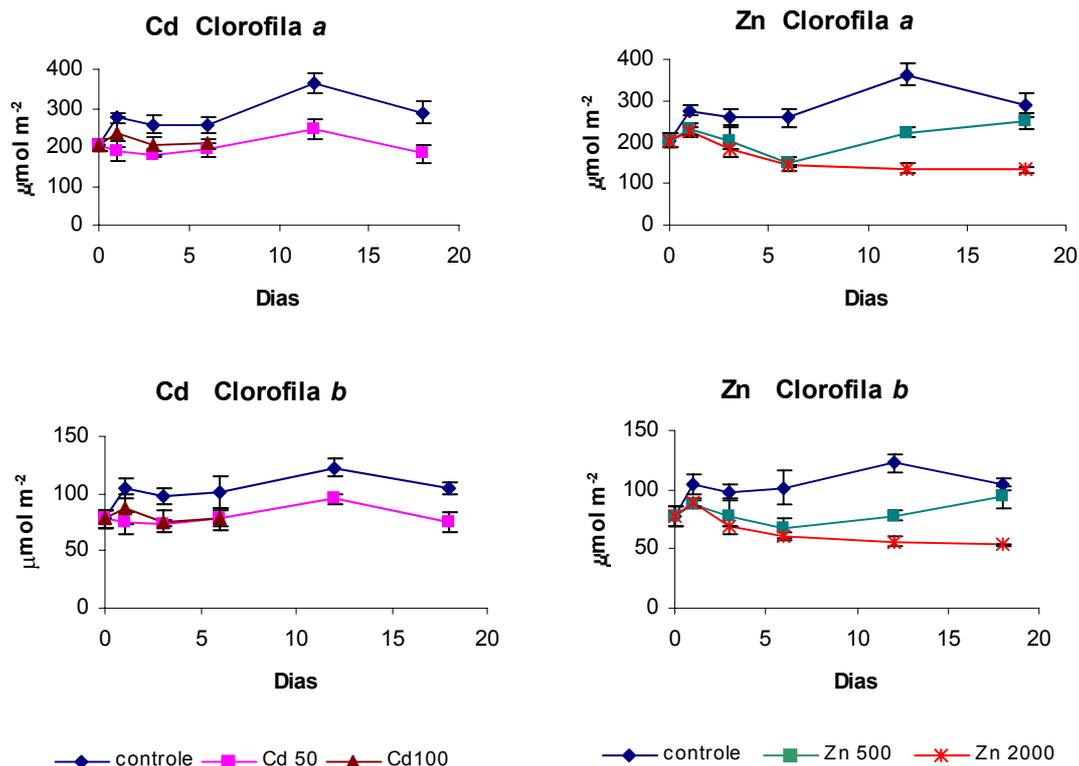


Figura 19. Produção de clorofila *a* e *b* nas plantas de *B. decumbens* submetidas a diferentes doses com Cd e Zn.

As doses dos diferentes tratamentos de metais estão expressas em $\mu\text{mol L}^{-1}$. Cada valor corresponde a uma média de 3 repetições \pm erro padrão.

A expressão de sintoma de clorose, principalmente no tratamento Zn 2000 μM , foi relacionado com o elevado conteúdo de metal nas folhas (Figura 12) e correspondeu a um decréscimo em ambas as concentrações de clorofila *a* e *b* (Figura 19), confirmando que o Zn e o Cd foram danosos ao aparato fotossintético da planta.

A concentração de β -caroteno também foi menor em todos os tratamentos quando comparados ao controle, principalmente nas dose de 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. O β -caroteno é um eficiente agente de detoxificação de O_2 . Os carotenóides participam do sistema de antenas dos cloroplastos, na absorção de luz e transferência de energia para os centros das reações. Entretanto, os carotenóides também podem dissipar energia durante o estresse fotoxidativo (Baker & Orlandi, 1999).

5.4 Conclusões

- A produção de fitoquelatinas e compostos antioxidantes foram superiores nos tratamentos com metais pesados quando comparados ao controle, mostrando uma resposta antioxidante dessas plantas quando submetidas à contaminação com metais pesados;
- A *Brachiaria decumbens* foi uma espécie vegetal tolerante aos metais Cd e Zn, acumulando concentrações moderadas dos mesmos em seus tecidos foliares;
- O Cd foi o mais forte indutor de fitoquelatinas pela *B. decumbens*.

6. CONCLUSÕES GERAIS

- A contenção química e a fitorremediação se mostraram alternativas promissoras para a revegetação e minimização dos impactos causados por áreas contaminadas com Zn e Cd;
- A *B. decumbens* apresentou tolerância e capacidade de acumulação de Zn e Cd, sendo entre as espécies estudadas, a planta mais promissora para o uso na remediação de áreas contaminadas com Zn e Cd;
- O EDDS favoreceu a absorção de Cd, Zn e Pb em *B. decumbens* e foi mais eficiente que o EDTA na translocação desses metais para a parte aérea, no entanto, as concentrações de metais Zn, Cd e Pb foram muito menores quando comparado à hiperacumuladora *T. caerulescens*;
- A presença de Cd e Zn induziu uma resposta antioxidante nas plantas de *B. decumbens*, com o aumento nos níveis de fitoquelatinas, ascorbato e α -tocoferol. Entretanto, somente nos tratamentos severos, como o com Cd 100 μ M, as substâncias relacionadas aos sistemas fotoprotetores sofreram drástica redução.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Setembro de 1987.
- ALLOWAY, B. J. Soil process and the behavior of metals. in: ALLOWAY, B. J. ed. **Heavy Metals in Soils**. Glasgow: Blackie Academic & Professional, p.11-37, 1995.
- ALLOWAY, B. J.; TILLS, A. R.; MORGAN, H. Trace substancers in environmental health. **Sci. Total Environ.** v.18, p. 187-201, 1985.
- ALSCHER, R.G.; HESS, J.L. **Antioxidants in Higher Plants**. CRC Press, Boca Ranton, 1993.
- AMARAL SOBRINHO, N. M. B. **Interação dos metais pesados de resíduos siderúrgicos com um solo podzólico vermelho- amarelo**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1993, 163p. (Tese de Doutorado)
- ANDERSON, P. R.; CHRISTENSEN, T. H. Distribution coefficients of Cd, Co, Ni and Zn in soils. **Journal of Soil Science**, v.39, p.15-21, 1988.
- ANDREWS, R. D. et al. Using clinoptilolite for the removal of toxic heavy metals from contaminated mine drainage. **Memorias de la 3^{ra} Conferencia Internacional de Zeolitas Naturales**, p. 227 –232. 1991.
- ARTETXE, U.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; HERNÁNDEZ, A.; BECERRIL, J. M. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.859-863, 2002.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders: – strategies in the response of plants to heavy metals. **J. Plant Nutr.**, 3:643-654, 1981.
- BAKER, A.J.M.; BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v.1, p.81-126, 1989.
- BAKER, A. J. M. ; McGRATH, S. P. ; REEVES, R. D ; SMITH, J. A. C. Metal hyperaccumulator plants : a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. – In : Terry, N., Banuelos, G. (Eds.), **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Lewis Publishers, Boca Ranton, FL, USA. Chapter 5, pp85-107, 2000.
- BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen and pathogenesis in plants. In: Stacey, G. & Keen, N.T. (Eds.). **Plant Microbe Interactions**, St. Paul, Minnesota. APD Press, p.81-119, 1999.
- BAKER, A. J. M., McGRATH, S. P., SIDOLI, C. M. D., REEVES, R. D. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal-accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, v.11, p.41-49, 1994.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. H. Respuestas de las plantas a la contaminacion por metales pesados. **Suelo Planta**, 2:345-361, 1992.

- BAKER, A. J. M.; McGRATH, S. P.; REEVES, R. D.; SMITH, J. A. C. Metal hyperaccumulator plants: A review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: Terry, N.; Banuelos, G. (ed.) **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Lewis Publ., Boca Raton, FL, p.85-107, 2000.
- BAKER, A. J. M.; REEVES, R. D.; HAJAR, A. S. M. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). **New Phytol.**, v.127, p.61-68, 1994.
- BAKER, A. J. M.; BROOKS, R. R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, v.1, p.81-126, 1989.
- BARRUTIA, O.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; McGRATH, S. P.; ZHAO, F. J.; GARBISU, C.; BEERRIL, J. M. Inducción de tioles en ecotipos de *Thlaspi caerulescens* (J. & Presl.) con diferente tolerancia al Cd. **VIII Congreso Hispano-Luso de Fisiología Vegetal**. Espanha, 2003.
- BLAYLOCK, M. J. Field demonstrations of phytoremediation of lead contaminated soils. In: Terry, N. & Banuelos, G. (Eds.) **Phytoremediation of contaminated soil and water** (p.1-12). Lewis Publ., Boca Raton, Florida, USA. 2000.
- BLAYLOCK, M. J.; SALT, D. E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHAROVA, O.; GUSSMAN, C.; KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B. D.; RASKIN, I. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. **Environ. Sci. Technol.**, v.31, p.860-865, 1997.
- BRECKLE, S. W.; KAHLE, H. Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). **Vegetation**, Dordrecht, v.101, p. 43-53, 1992.
- BROOKS, R. R., LEE, J., REEVES, R. D. JAFREÉ, T. Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. **Journal Geochemical Explorer**, v.7, p.49-57, 1977.
- BROWN, S. L.; CHANEY, R. L.; ANGLE, J. S.; BAKER, A. J. M. Phytoremediation potential of *Thlaspi caerulescens* and bladder campion for zinc and cadmium contaminated soil. **J. Environ. Qual.**, v.23, p.1151-1157, 1994.
- BROWN, P. H.; DUNEMANN, L.; SCHULZ, R.; MARSCHNER, H. Influence of redox potential and plant species on the uptake of nickel and cadmium from soils. **Soils and Fertilisers**, v.151, p.85-91, 1989.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.37, p.1629-1638, 2002.
- CHANEY, R. L. Phytoremediation of soil metals. **Curr. Opin. Biotechnol.** v.8, p.279-284, 1997.
- COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: Role in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annu. Rev. Plant. Biol.**, v.53, p.159-182, 2002.
- CORRÊA, R. S. Degradação e recuperação de áreas no Distrito Federal. In: **Ecologia e recuperação de áreas degradadas no cerrado**. Brasília: Paralelo 15, 1998.

- COSTA, C. Metais pesados contaminam os principais rios do Estado. **O Globo**, Rio de Janeiro, 02 dez. 2001. Primeiro caderno, p.17
- CUNNINGHAM, S., BERTI, W. R. The remediation of contaminated soils with green plants; an overview. **In vitro cellular and development biology-plant**, v.29, p.207-212, 1993.
- CUNNINGHAM, S. D., LEE, C. R. Phytoremediation: plant-based remediation of contaminated soils and sediments. In: SKIPPER, H. D. & TURCO, R. F. ed. **Bioremediation: science and applications**. Madison: Soil Science Society of America, 1995. p.145-156 (SSSA special publication number 43).
- CUNNINGHAM, S. D., OW, D. W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, v.100, p.715-719, 1996.
- DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVAÁ, E.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.57, p.779-795, 2000.
- DEMIREVSKA-KEPOVA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L.; STOYANOVA, Z.; HÖLZER, R.; FELLER, U. Biochemical changes in barley plants after excessive supply of copper and manganese. **Environmental and Experimental Botany**, v.52, p.253-266, 2004.
- DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. The xanthophyll cycle. In: R.G. Alscher and J.L. Hess eds. **Antioxidants in Higher Plants**. CRC Press, Boca Raton, p.59-90, 1993.
- DIAS, A. E. X. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. In Sissino, C. L. S., RJ (eds), **Resíduos sólidos, ambiente e saúde: uma visão multidisciplinar**, 1 ed., Rio de Janeiro, Editora FIOCRUZ, 2000.
- DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad), **J. Exp. Bot.**, v.52, p.1101-1109, 2001.
- EMBRAPA/CNPS. **Manual de métodos de análise de solo**. 2ª edição, Rio de Janeiro, 1997. 212p.
- ERDEM, E.; KARAPINAR, N.; DONAT, R. The removal of heavy metal cations by natural zeolites. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.280, p.309-314, 2004.
- EUSKO JAULARITZA. Viceconsejería de Medio Ambiente. Mapa de suelos y capacidad de usos de la Comunidad Autónoma del País Vasco. Escala (1:25000). 1991.
- FOYER, C. H.; LOPEZ-DELGADO, H.; DAT, J. F.; SCOTT, I. M. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, v.100, p.241-254, 1997.
- FOYER, C. Ascorbic acid. In: **Antioxidants in Higher Plants** In: R. G. Alscher and J. L. Hess (eds) CRC Press, Boca Raton, p.31-58, 1993.
- GADD, G. M. & WHITE, C. Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology? **Trends in Biotechnology**, v.11, p.353-359, 1993.
- GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; ARTETXE, U.; BECERRIL, J. M. Diurnal changes in antioxidant and carotenoid composition in the Mediterranean sclerophyll tree *Quercus ilex* (L.) during winter. **Plant Sci.**, v.143, p.125-133, 1999.

- GARCÍA-PLAZAOLA, J. I.; BECERRIL, J. M. A rapid HPLC method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. **Phytochem. Anal.**, v.10, p.1-7, 1999.
- GARCÍA- SANCHEZ, A.; ALASTUEY, A.; QUEROL, X. Heavy metal adsorption by different minerals: application to the remediation of polluted soils. **The Science of the Total Environment**. v.242, p.179- 188, 1999.
- GLEBA, D.; BORISJUK, N. V.; BORISJUK, L. G.; KNEER, R.; POULEV, A.; SKARZHINSKAYA, M.; DUSHENKOV, S.; LOGENDRA, S.; GLEBA, Y. Y.; RASKIN, I. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.5973-5977, 1999.
- GONZÁLEZ, A.; LYNCH, J. Subcellular and tissue Mn compartmentation in bean leaves under Mn toxicity stress. **Aust. J. Plant Physiol.**, v.26, p.811-822, 1999.
- GONZÁLEZ, A.; STEFFEN, K. L.; LYNCH, J. Light and excess manganese. Implications for oxidative stress in common bean. **Plant Physiol.**, v.118, p.493-504, 1998.
- GOODFELLOW, M.; BROWN, A. M.; CAI, J.; CHU, J.; COLLINS, M. D. *Amycolatopsis japonicum* sp. nov., an actinomycete producing (S,S)-N,N'-ethylenedisuccinic acid. **Syst. Appl. Microbiol.**, v.20, p.78-84, 1997.
- GRATÃO, P. L. Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas ao cádmio. Piracicaba, Escola superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2003. 109p. (Tese de doutorado).
- GREMAN, H.; VODNIK, D.; VELIKINJA-BOLTA, S.; LESTAN, D. Ethylenediaminedissuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. **J. Environ.Qual.** v.32, p.500-506, 2003.
- GRILL, E.; LOFFLER, S.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.86, p.6838-6842, 1989.
- GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.84, p.439-443, 1987.
- GRILL, E.; GEKELER, W.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M. H. Homo-phytochelatins are heavy metal-binding peptides of homo-GSH containing Fabales. **FEBS Lett.**, v.205, p.47-50, 1986.
- GRIMM, D. M.; AZARRAGA, L. V.; CARREIRA, L. A.; SUSETYO, W. Continuous multiligand distribution model used to predict the stability constant of Cu (II) metal complexation with humic material from fluorescence quenching data. **Environmental Science & Technology**, v.25, p.1427-1431, 1991.
- HESS, J. L. Vitamin E, α -tocopherol. In: **Antioxidants in Higher Plants**. R.G. Alscher and J.L. Hess (eds) CRC Press. Boca Ranton, p.111-134, 1993.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley, Cal. Agric. Exp. Station, 1950. 347p. (Cal. Agric. Exp. Station, Cir.).

- HOWDEN, R.; GOLDSBROUGH, P. B.; ANDERSEN, C. S.; COBBETT, C. S. Cadmium-sensitive, cad1 mutants of *Arabidopsis thaliana* are phytochelatin deficient. **Plant Physiol.**, v.107, p.1059-1066, 1995.
- HOWDEN, R.; COBBETT, C. S. Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v.99, p.100-107, 1992.
- HUANG, J. W.; CHEN, J.; BERTI, W. R. Phytoremediation of Pb-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. **Environ. Sci. Technol.**, v.31, p.800-805, 1997.
- HUANG, J., CUNNINGHAM, S. D. Lead phytoextraction : species variation in lead uptake and translocation. **New Phytologist**, v.134, p.75-84, 1996.
- JACKSON, A. P., ALLOWAY, B. J. Transfer of cadmium from soils to the human food chain. In: Adriano, D.C., **Biogeochemistry of Trace Metals**, Lewis Publisher, Baton Rouge, Fla. p.109-158. 1992.
- JONES, P. W.; WILLIAMS, D. R. Chemical speciation used to assess [S,S']-ethylenediaminedisuccinic acid (EDDS) as a readily-biodegradable replacement for EDTA in radiochemical decontamination formulations. **Appl. Radiat. Isot.** v.54, p.587-593, 2001.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Ranton, Florida: CRC Press, 1992. 315p.
- KAMNEV, A. A. Phytoremediation of heavy metals: an overview. **Recent Advances in Marine Biotechnology**, v.8, p.269-317, 2003.
- KELLER, C.; VÉDY, J. C. Distribution of cadmium fractions in two forest soils. **Journal Environmental Quality**, v.23, p.987-999, 1994.
- KLAPHECK, S.; FLIEGNER, W.; ZIMMER, I. Hydroxymethyl-phytochelatin [(γ -glutamylcysteine)_n-serine] are metal-induced peptides of the Poaceae. **Plant Physiol.**, v.104, p.1325-1332, 1994.
- KNIGHT, B. P.; CHAUDRI, A. M.; McGRATH, S. P.; GILLER, K. E. Determination of chemical availability of cadmium and zinc using inert soil moisture samplers. **Environ. Pollut.**, v.99, p.293-298, 1998.
- KUBOTA, H.; SATO, K.; YAMADA, T.; MAITANI, T. Phytochelatin (class III metallothioneins) and their desglycyl peptides induced by cadmium in normal root cultures of *Rubia tinctorum* L. **Plant Sci.**, v.106, p.157-166, 1995.
- KULLI, B.; BALMER, M.; KREBS, R.; LOTHENBACH, B.; GEIGER, G.; SCHULIN, R. The influence of nitrilotriacetate on heavy metal uptake of lettuce and ryegrass. **J. Environ. Qual.**, v.28, p.1699-1705, 1999.
- KUMAR, P. B. A. N.; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H.; RASKIN, I. **Environ. Sci. Technol.** v.29, p.1232-1238, 1995.
- LARSSON, E.L.; BORNMAN, J.F. & ASP, H. Influence of UV-B radiation and Cd 2+ on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. **Journal of Experimental Botany**, v.49, p.1031-1039, 1998.
- LEITE, W.C.A. Resíduos sólidos urbanos: contribuição para o gerenciamento. In: TAUK-TORNISIELO, S.M. et al. (Orgs.) **Análise Ambiental: estratégias e ações**. São Paulo: T.A. Queiroz Editora Ltda, 1995.

- LEOPOLD, I.; GÜNTHER, D.; SCHMIDT, J.; NEUMANN, D. Phytochelatins and heavy metal tolerance, **Phytochemistry**, v.50, p.1323-1328, 1999.
- LINDSAY, W.L., NORWELL, W. A. Development of a DTPA test zinc, iron, manganese and copper. **Soil Sci. Soc. Am. Proc.**, v.42, p.421-428, 1978.
- LIPHADZI, M.S.; KIRKAHAM, M.B.; MANKIN, K.R.; PAULSEN, G.M. EDTA-assisted heavy metal uptake by poplar and sunflower grown at a long-term sewage-sludge farm. **Plant Soil**, v.257, p.171-182, 2003.
- LOEWUS, F.A. Ascorbic acid and its metabolic products. In: **The Biochemistry of Plants**, vol.14, Preiss, J. (ed.) Academic Press, New York, p.85-107, 1988.
- LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; DUNHAM, S.J.; McGRATH, S.P. Phytoremediation of heavy-metal contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. **J. Environ. Qual.**, v.30, p.1919-1926, 2001.
- LOVLEY, D.R.; COATES, J.D. Bioremediation of metal contamination. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p.285-289, 1997.
- LUO, C.; ZHENGUO, S.; XIANGDONG, L. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. **Chemosphere**, 2004. (no prelo)
- LUO, Y.M.; CHRISTIE, P. Bioavailability of copper and zinc in soils treated with alkaline stabilized sewage sludges. **J. Environ. Qual.**, v.27, p.335-342, 1998.
- MA, L.Q.; KOMAR, K.M.; TU, C.; ZHANG, W.H. ; CAI, Y. ; KENNELLEY, E.D. A fern that hyperaccumulates arsenic – a hardy, versatile, fast growing plant helps to remove arsenic from contaminated soils. **Nature**, p.409-579, 2001.
- MA, Q.Y.; TRAINA, S.J.; LOGAN, T.J.; RYAN, J.A. *In situ* lead immobilization by apatite. **Environ. Sci. Technol**, v.27, p.1803 – 1810, 1993.
- MAITANI, T.; KUBOTA, H.; SATO, K.; YAMADA, T. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorium*. **Plant Physiol.**, v.110, p.1145-1150, 1996.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos. São Paulo, Produquímica, 1994. 153p.
- MANNAZZU, I.; GUERRA, E.; FERRETTI, R.; PEDICONI, D.; FATICHENTI, F. Vanadate and copper induce overlapping oxidative stress responses in the vanadate-tolerant yeast *Hansenula polymorpha*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1475, p.151-156, 2000.
- McGRATH, S.P. Phytoextraction for soil remediation. In: R.R. Brooks (Ed.) **Plants that hyperaccumulate heavy metals** (p.261-288). CAB International, Oxon, UK. 1998.
- MCGRATH, S. P.; SIDOLI, C. M. D.; BAKER, A. J. M.; REEVES, R. D. The potential for the use of metal-accumulating plants for the in situ decontamination of metal-polluted soils. In: EIJSACKERS, H. J. P.; HAMERS, T., eds., **Integrated Soil and Sediment Research: A Basis for Proper Protection**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 673-677, 1993.
- MESQUITA, A.A. **Remediação de áreas contaminadas por metais pesados provenientes de lodo de esgoto**. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2002. 68p (Dissertação de mestrado).

- MEUWLY, P.; THIBAUT, P.; SCHWAN, A.L.; RAUSER, W.E. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize. **Plant J.**, v.7, p.391-400, 1995.
- MORELLI, E.; SCARANO, G. Copper-induced changes of non-protein thiols and antioxidant enzymes in the marine microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Plant Science**, v.167, p.289-296, 2004.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N.; GIBBS, B.F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Eng. Geol.**, v.60, p.193-207, 2001.
- NEAL, R.H.; SPOSITO, G. Effects of soluble organic matter and sewage sludge amendments on cadmium sorption by soils at low cadmium concentrations. **Soil Sci.**, 142:164-172, 1986.
- NOGUEIRA.A.V. As micorrizas e o excesso de metais. In: SIQUEIRA, J.O. ed. **Avanços em fundamentos e aplicações de micorrizas**. Lavras; Universidade Federal de Lavras, 1996. p. 135-174.
- OLIVEIRA, C. **Avaliação do potencial de contaminação de dois solos agrícolas com lodo de esgoto enriquecido com cádmio, chumbo e zinco**. Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1998. 191p. (Tese de doutorado).
- PAPADOPOULOS, P.; ROWELL, D.L. The reactions of cadmium with calcium carbonate surfaces. **Journal of Soil Science**. v.39, p.23-36, 1988.
- PEARSON, K.M. On the remediation of polluted land – ex-site treatment. In: GOMES, M.M.; HOGLAND, W. (Eds.) **Proceedings of the Latin American**. Swedish Seminar on Solid Waste Management and Round Table on Landfill Technology and Contaminated Site Remediation, p.195-196, Sweden: Lund University, 1995.
- PIERZYNSKI, G. M., HETTIARACHCHI, G.M., LAMBERT, M. L., ERICKSON, L. E., SWEENEY, D. W., HETRICK, B. A. D. Remediation of metal -contaminated sites in Tri-State mining region, USA. In: **World Congress of Soil Science**, 16th, Montpellier(FR), 1998. (Cdrom /Workshop: 38)
- PIQUERAS, A.; OLMOS, E.; MARTÍNEZ-SOLANO, J.R.; HELLÍN, E. Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. **Free Rad. Res**. v.31, p.33-38, 1999.
- RASKIN, I.; SMITH, R.D.; SALT, D.E. Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.8, p.221-226, 1997.
- RAUSER, WE. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. **Cell. Biochem. Biophys**, v.31, p.19-48, 1999.
- RAUSER, W.E. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis, and functions. **Plant Physiol.**, v.109, p.1141-1149, 1995.
- RESENDE, M.; KER, J.C.; BAHIA FILHO, A.F.C. Desenvolvimento sustentado do Cerrado. In: ALVAREZ, V.H.; FONTES, L.E.F.; FONTES, M.P.F. (eds.) **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, MG: SBCS; UFV, DPS, p.169-200, 1996.

- ROBINSON, B. H., LEBLANC, M., PETIT, D., BROOKS, R., KIRKMAN, J., GREGG, P. The potential of some plant hyperaccumulators for phytoremediation of contaminated soils. In: **World Congress of Soil Science**, 16th, Montpellier (FR), 1998. (Cdrom /Workshop: 38)
- RÖMKENS, P.; BOUWMAN, L.; JAPENGA, J.; DRAAISMA, C. Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. **Environ. Pollut.**, v.116, p.109-121, 2002.
- SALT, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.49, p.643-668, 1998.
- SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; del RÍO, L.A. Cadmium induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **J. Exp. Bot.**, v.52, p.2115-2126, 2001.
- SATROUTDINOV, A.D.; DEDYUKHINA, E.G.; CHISTYAKOVA, T.I.; WITSCHER, M.; MINKEVICH, I.G.; EROSHIN, V.K.; EGLI, T. Degradation of metal-EDTA complexes by resting cells of the bacterial strain DSM 9103. **Environ. Sci. Technol.** v.34, p.1715-1720, 2000.
- SCHALSCHA, E.B. Contaminación de aguas y suelos com metales pesados. In: **Congresso Latinoamericano de Ciência do Solo**, Águas de Lindóia, 1996. SBCS, ESALQ, 1996. CD-ROM
- SCHUPP, R.; RENNENBERG, H. Diurnal changes in the glutathione content of spruce needles (*Picea abies* L.). **Plant Sci.**, v.57, p.113-117, 1988.
- SCHÜTZENDÜBEL, A.; NIKOLOVA, P.; RUDOLF, C.; POLLE, A. Cadmium and H₂O₂-induced stress in *Populus x canescens* roots. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.577-584, 2002.
- SCOTT, K. Cause and control of losses of chromium during nitric-perchloric acid oxidation of aquatic sediments. **Analyst**, v.103, p.754-758, 1978.
- SHEN, Z.G.; LI, X.D.; WANG, C.C.; CHEN, H.M.; CHUA, H. Lead phytoextraction from contaminated soil with high biomass plant species. **J. Environ. Qual.**, v.31, p.1893-1900, 2002.
- SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.229-235, 2000.
- SOARES, C.R.F.S. **Toxidez de zinco, cobre, cádmio e chumbo para o eucalipto em solução nutritiva**. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 1999. 132p. (Tese de Mestrado)
- SPOSITO, G. **The chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 234p.
- TANDY, S.; BOSSART, K.; MUELLER, R.; RITSCHER, J.; HAUSER, L.; SCHULIN, R.; NOWACK, B. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. **Environ. Sci. Technol.**, v.38, p.937-944, 2004.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Boletim técnico n^o5, 2^a edição, Departamento de Solos, UFRGS, Porto Alegre, 1995. 174p.

TSUJI, N.; HIRAYANAGI, N.; IWABE, O.; NAMBA, T.; TAGAWA, M.; MIYAMOTO, S.; MIYASAKA, H.; TAKAGI, M.; HIRATA, K.; MIYAMOTO, K. Regulation of phytochelatin synthesis by zinc and cadmium in marine green alga, *Dunaliella tertiolecta*. **Phytochemistry**, v.62, p.453-459, 2003.

TURNER, M.A. Effect of cadmium treatment on cadmium and zinc uptake by selected vegetable species. **Journal of Environmental Quality**, v.2, p.118-119, 1973.

URE, A.; QUEVAUVILLER, P.M.; MUNTAU, H.; GRIEPINK, B. Speciation of heavy metals in soils and sediments, an account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v.51, p.135-151, 1993.

VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. Toxic effect of metals. In: Farago, M.G.; Weinheim, V.C.H. (Eds.), **Plant and the Chemical Elements**, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, p.149-177, 1994.

VANGRONSVELD, J.; CUNNINGHAM, S.D. **Metal-contaminated soils: in situ** inactivation and phytoremediation. Berlin: Springer, 1998. 265p.

WADE, M.J.; DAVIS, B.K.; CARLISLE, J.S.; KLEIN, A.K.; VALOPPI, L.M. Environmental transformation of toxic metals. **Occup. Med.**, v.8, p.575-601, 1993.

WOZNY, A. **Lead in Plant Cells**, Sorus, Poland, 1995.

www.anbio.org.br/bio/biodiver_art103.htm

YAMADA, R.; IMAIUMI, M. & SANO, K. Behaviour of heavy metals in soil treated successively with sewage sludge. **Ken Agric. Res. Centre**, v.16, p.228-238, 1984.

YEOMANS, J. C.; BREMNER, J. M. A rapid and precise method for routine determination of organic carbon in soil. **Soil Sci. Plant Anal.**, v.19, p.1467-1476, 1988.

YIN, Y.; ALLEN, H.E.; HUANG, C.P. Kinetics of mercury (II) adsorption and desorption on soil. **Environ. Sci. Technol.**, v.31, p.496-503, 1997.

ZAHARIEVA, t.; RÖMHELD, V. Specific Fe (II) uptake system in strategy plants inducible under Fe deficiency. **J. Plant Nutr.**, v.23, p.1733-1744, 2000.

ZENK, M.H. Heavy metal detoxification in higher plants – a review. **Gene**, v.179, p.21-30, 1996.

8. ANEXOS

ABNT NBR 10004:2004

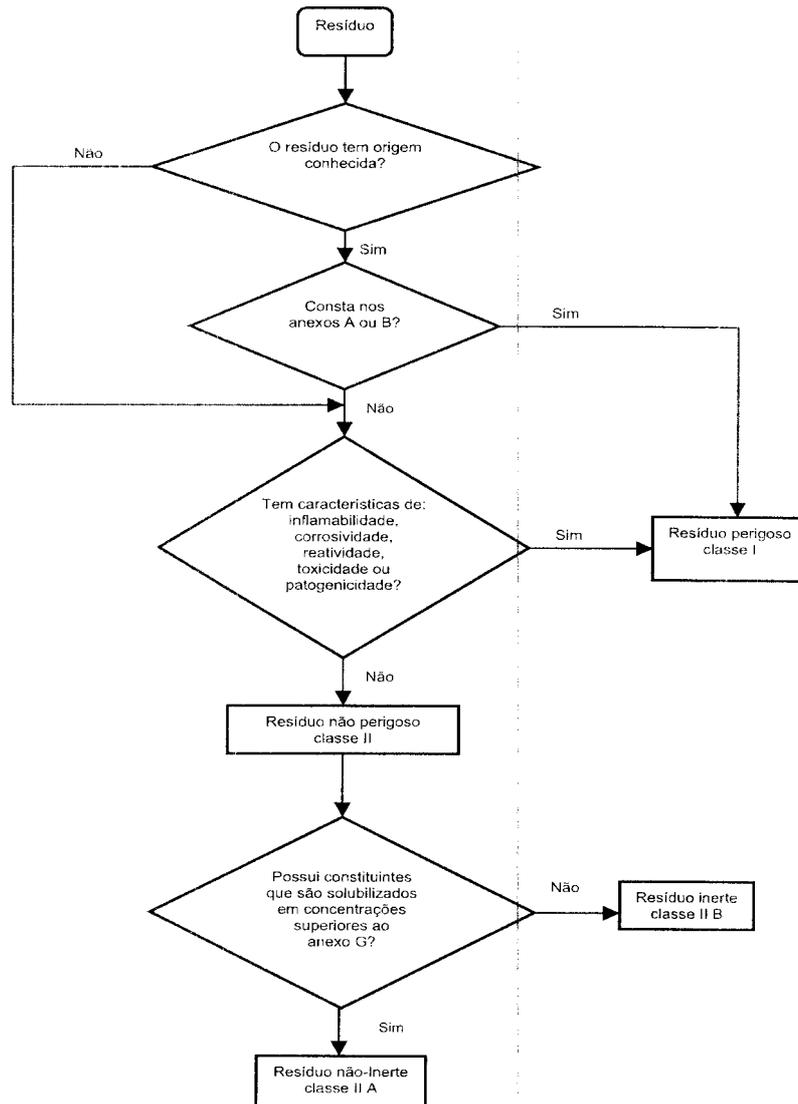


Figura 1 – Caracterização e classificação de resíduos resíduos

Tabela 1. Análise de variância dos dados provenientes da matéria seca da parte aérea e raiz de gramíneas cultivadas em solução nutritiva contaminada com Zn e Cd.

FV	GL	QM			
		Zn – parte aérea	Zn - raiz	Cd – parte aérea	Cd - raiz
Dose	2	436,6811**	3,7476**	1064,726**	68,4567**
Planta	3	28,51158**	0,9189**	38,0551**	2,8538**
Dose*Planta	6	2,690425**	0,5032**	6,5040 ^{n.s.}	2,4209**
CV		9,6932	30,956	30,981	22,637

^{n.s.} não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância

Tabela 2. Análise de variância dos dados provenientes da extração de Zn e Cd na parte aérea e raiz de gramíneas cultivadas em solução nutritiva contaminada com Zn e Cd.

FV	GL	QM			
		Zn – parte aérea	Zn - raiz	Cd – parte aérea	Cd - raiz
Dose	2	102,9663**	24,6407**	0,2869**	0,0820**
Planta	3	74,6646**	7,3221**	0,0608*	0,0175*
Dose*Planta	6	22,6364**	2,5538*	0,0720**	0,0074 ^{n.s.}
CV		26,309	37,266	11,639	5,9373

^{n.s.} não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância

Tabela 3. Análise de variância dos dados provenientes da matéria seca (g) da parte aérea e raiz de leguminosas cultivadas em solução nutritiva contaminada com Zn e Cd.

FV	GL	QM			
		Zn – parte aérea	Zn - raiz	Cd – parte aérea	Cd - raiz
Dose	2	580,8662**	22,0855**	469,2811**	17,1722**
Planta	3	18,1780 ^{n.s.}	2,3031**	7,4009 ^{n.s.}	1,7735**
Dose*Planta	6	19,8035 ^{n.s.}	3,7975**	12,7773 ^{n.s.}	0,9753*
CV		38,035	38,033	27,027	34,755

^{n.s.} não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância

Tabela 4. Análise de variância dos dados provenientes da extração de Zn e Cd na parte aérea e raiz de leguminosas cultivadas em solução nutritiva contaminada com Zn e Cd.

FV	GL	QM			
		Zn – parte aérea	Zn - raiz	Cd – parte aérea	Cd - raiz
Dose	2	18,3393**	55,2276**	1,1364**	1,9291**
Planta	3	6,4094**	11,1296**	0,5297**	0,2155*
Dose*Planta	6	5,4356**	10,4120*	0,2157**	0,2056*
CV		62,026	83,463	60,183	52,555

^{n.s.} não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância

Tabela 5. Análise de variância dos dados provenientes das percentagens de Zn, em relação ao total, nos diferentes tratamentos e frações químicas no plantio e colheita das plantas.

FV	GL	QM				
		F1	F2	F3	F4	F5
<i>B. humidicola</i>						
Época	1	0,1612 ^{n.s.}	2,8637**	32,1826**	43,0063**	102,7605**
Tratamento	5	34,4973**	3,9074**	25,8341**	75,6206**	3,2317 ^{n.s.}
Ép. * Trat.	5	0,2106 ^{n.s.}	0,8078**	0,0382 ^{n.s.}	2,0077 ^{n.s.}	3,3117 ^{n.s.}
CV		58,674	49,985	24,491	21,387	2,6564
<i>B. decumbens</i>						
Época	1	5,8652*	0,0038 ^{n.s.}	35,9450**	13,4862*	51,6044**
Tratamento	5	31,7595**	0,9349**	22,7783**	84,1027**	5,7719 ^{n.s.}
Ép. * Trat.	5	0,8185 ^{n.s.}	0,2920**	0,5050 ^{n.s.}	1,2383 ^{n.s.}	3,0430 ^{n.s.}
CV		58,953	69,732	19,833	19,025	2,9865

n.s. não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância

Tabela 6. Análise de variância dos dados provenientes dos valores médios do pH nos diferentes tratamentos, no plantio e na colheita de *B. humidicola* e *B. decumbens*.

FV	GL	QM	
		<i>B. humidicola</i>	<i>B. decumbens</i>
Época	1	1,0413**	0,6256*
Tratamento	5	1,7493**	1,8673**
Ep.*Trat.	5	0,111 ^{n.s.}	0,0553 ^{n.s.}
CV		5,6499	4,5406

n.s. não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância

Tabela 7. Análise de variância dos dados provenientes das percentagens de Cd, em relação ao total, nos diferentes tratamentos e frações químicas no plantio e colheita das plantas.

FV	GL	QM				
		F1	F2	F3	F4	F5
<i>B. humidicola</i>						
Época	1	21,2801 ^{n.s.}	4,2424**	12,4522*	21,8253 ^{n.s.}	30,5783 ^{n.s.}
Tratamento	5	180,3799**	2,2931**	71,6635**	136,2881**	6,1453 ^{n.s.}
Ép. * Trat.	5	3,1783 ^{n.s.}	0,8167*	1,3851 ^{n.s.}	3,7037 ^{n.s.}	2,3247 ^{n.s.}
CV		52,009	98,858	40,754	24,393	4,4608
<i>B. decumbens</i>						
Época	1	5,3472 ^{n.s.}	7,4521**	0,0305 ^{n.s.}	10,2582 ^{n.s.}	2,7718 ^{n.s.}
Tratamento	5	224,0108**	20,3466**	27,2505**	132,7909**	2,3715 ^{n.s.}
Ép. * Trat.	5	1,5282 ^{n.s.}	1,5147 ^{n.s.}	5,8149 ^{n.s.}	1,3611 ^{n.s.}	9,6573 ^{n.s.}
CV		35,705	60,507	30,842	26,313	5,2731

n.s. não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância

Tabela 8. Análise de variância dos dados provenientes do peso seco médio (g) das plantas de *Brachiaria humidicola* e *B. decumbens* nos diferentes tratamentos.

FV	GL	QM	
		parte aérea	raiz
Planta	1	25,3383 **	3,0032 *
Tratamento	4	38,4382**	9,4622**
Pl.*Trat.	4	17,9863**	2,3623*
CV		57,279	

n.s. não significativo; * 5% de significância; ** 1% de significância