

**UFRRJ**

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**TESE**

**Potencial da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) para  
Descontaminação de Águas Contaminadas por  
Zn e Cd**

**Ana Carolina Dornelas Rodrigues**

**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E  
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**POTENCIAL DA ALFACE-D'ÁGUA (*Pistia stratiotes*) PARA  
DESCONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS CONTAMINADAS POR Zn E Cd**

**ANA CAROLINA DORNELAS RODRIGUES**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho**

*e Co-orientação dos Professores*  
**Fabiana Soares dos Santos**  
*e*  
**André Marques dos Santos**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutora**, no  
Programa de Pós-Graduação em Ciência,  
Tecnologia e Inovação em Agropecuária,  
Área de Concentração em Recursos  
Naturais e Proteção Ambiental

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2016

628.5  
R696p  
T

Rodrigues, Ana Carolina Dornelas, 1985-  
Potencial da alface-d'água (*Pistia stratiotes*) para  
descontaminação de águas contaminadas por Zn e Cd /  
Ana Carolina Dornelas Rodrigues. – 2016.  
108 f.: il.

Orientador: Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e  
Inovação Agropecuária, 2016.  
Bibliografia: f. 97-107.

1. Fitorremediação - Teses. 2. Água - Poluição - Teses. 3.  
Metais pesados – Absorção e adsorção – Teses. 4. Alface-  
d'água - Teses. I. Amaral Sobrinho, Nelson Moura Brasil  
do, 1956- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e  
Inovação Agropecuária. III. Título.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA TECNOLOGIA E INOVAÇÃO  
EM AGROPECUÁRIA**

**ANA CAROLINA DORNELAS RODRIGUES**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de Concentração em Recursos Ambientais e Proteção Ambiental.

TESE APROVADA EM **23/02/2016**

---

Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho. Dr. UFRRJ  
Orientador

---

Camila Ferreira de Pinho. Dra. UFRRJ

---

Leonardo Duarte Batista da Silva. Dr. UFRRJ

---

Ana Carolina Callegario Pereira. Dra. UniFOA

---

Sílvio Roberto de Lucena Tavares. Dr. Embrapa Solos - CNPS

## DEDICATÓRIA

A Deus, por me amar infinitamente mesmo com tanta imperfeição. Aos meus pais João e Maria José e minha irmã Thamara. Minha família, maior manifestação desse imenso amor!

## AGRADECIMENTOS

“Que poderei retribuir ao meu Senhor, por Tudo aquilo que Ele me fez?” Agradeço ao Pai do céu pela minha vida. Por ter se feito presente durante todo caminho e por ter me trazido até aqui, superando todos os obstáculos.

Agradeço a minha família, meus amados pais, minha melhor irmã, meu cunhado e aos sobrinhos mais lindos desse mundo, por todo apoio, amor, força, carinho e compreensão nos muitos momentos de ausência durante esse tempo. Eu não conseguiria sem vocês, aguentaram meu choro e minha alegria, apoiaram e me ajudaram a tomar decisões, me deram força quando eu desanimava e sempre disseram que eu chegaria até o fim... mas a verdade é que foram eles que me trouxeram. Amo vocês mais que tudo nessa vida!

Agradeço ao meu namorado Marcus e toda sua família, que sempre me apoiaram e torceram por mim. Pelos finais de semana e férias no laboratório, pela companhia e cuidado nas muitas idas a UFRRJ e quando estava escrevendo. Meu amor, sua parceria e companheirismo foram fundamentais nessa conquista, você é o melhor do mundo! Te amo!

A toda minha família, aos de longe e os de perto que sempre torceram e vibraram muito com cada conquista! Vocês são fundamentais na minha vida e com certeza fazem parte dessa vitória! Amo vocês demais!

A minha querida amiga / tia/ anjo Dra. Rosy Melo, por cuidar de mim quando mais precisei. Meu resgatou do medo, da ansiedade e da angústia. Por ter me apresentado a Maria Augusta, outro anjo, que muito me ensina e me dá força para realizar esse e outros sonhos.

Agradeço ao orientador professor Nelson Moura, por ter possibilitado a realização desse trabalho na UFF em Volta Redonda sob o olhar atento dos meus co-orientadores, por ter confiado em mim e possibilitado que eu conseguisse continuar. Por todo apoio durante esses quatro anos, eu te agradeço de coração.

Aos melhores co-orientadores, professora Fabiana Soares e André Marques, vocês foram sensacionais! Eu nunca vou poder agradecer o total apoio e dedicação disponibilizados para realização desse trabalho. É muito mais que orientação, é amizade de verdade! Deus abençoe vocês e suas famílias!

Aos membros da banca: Professores Leonardo Duarte, Camila Pinho, Ana Carolina Callegario e ao Pesquisador Silvio Tavares, por disponibilizarem seu tempo para colaborar com o engrandecimento desse trabalho. Em especial as professoras Camila e Ana Carolina por terem auxiliado durante algumas análises.

Ao professor Célio Chagas pela recepção e acolhida em Buenos Aires e todos os professores da FAUBA em especial as professoras Alicia Iorio e Alicia Rendina.

A querida amiga Sandra Lima, que desde o mestrado vem me brindando com sua amizade, carinho e sabedoria. Hoje especialmente pela ajuda maravilhosa com a apresentação.

As colegas: Érica Abreu, por toda ajuda e ensinamentos com o ISOFIT, com as viagens para Argentina e Peru, e, Luiziene Alves por toda paciência e ajuda com o Cinética Win. Muito obrigada meninas!

A UFRRJ que por dez anos vem me proporcionado a oportunidade de crescer profissional e pessoalmente. Hoje em especial ao PPGCTIA, por todo apoio durante esses quatro anos, principalmente a secretária Renata que sempre esteve disposta a auxiliar e facilitar o meu caminho.

A UFF pelo apoio logístico e infraestrutura concedida, fundamental para que eu conseguisse realizar esse trabalho.

A todos os colegas de curso e dos laboratórios de “Química e Poluição do Solo”, da UFRRJ e de “Solos e Águas”, da UFF, pelas ajudas, conversas e parceria.

Ao Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA, que me deu todo apoio e suporte necessário para conclusão desse trabalho. Em especial quero agradecer a amiga e

secretaria Fernanda Manso que sempre esteve presente e facilitando o caminho em tudo que foi possível.

A FAPERJ pelo auxílio financeiro.

Nenhum trabalho, por mais simples que pareça se realiza sozinho. Eu agradeço do fundo do meu coração, todos os anjos que passaram por meu caminho e tornaram essa caminhada de quatro anos, mais simples e mais feliz. A todos minha sincera e eterna gratidão!

“Sonho que se sonha só, é só um sonho que se sonha só. Mas sonho que se sonha junto, é realidade!”

## BIOGRAFIA

Ana Carolina Dornelas Rodrigues, filha de João Batista Rodrigues e Maria José Dornelas Rodrigues, é natural da cidade de Volta Redonda – RJ, nascida em 01 de maio de 1985. É técnica em agropecuária, formada em 2002, pelo IFRJ Campus Nilo Peçanha em Pinheiral - RJ. Iniciou a graduação em Licenciatura em Ciências Agrícolas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em 2003, diplomando-se em 2007. Durante este tempo foi bolsista de Iniciação Científica no Departamento de Solos, área de Química e Poluição de Solos sob a orientação dos Professores: Dr. Nelson Mazur e Dr. Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho. Em março de 2008 ingressou no Mestrado no Curso de Pós-graduação em Agronomia – Ciência do Solo (CPGA-CS / UFRRJ), desenvolvendo pesquisa sobre fitorremediação de solos contaminados com metais pesados provenientes da destruição de munição, sob a mesma orientação, obtendo o título em fevereiro de 2010. Em Março de 2010 iniciou sua vida profissional como docente do Centro Universitário de Volta Redonda – UniFOA, onde permanece até os dias atuais. Retornou a UFRRJ em março de 2012 como estudante de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação e Agropecuária (PPGCTIA) na área de Recursos Naturais e Proteção ambiental, sob orientação dos professores Dr. Nelson Moura Brasil do Amaral Sobrinho, Dra. Fabiana Soares dos Santos e Dr. André Marques dos Santos. Em novembro de 2012 viajou para Buenos Aires – Argentina, através de doutorado sanduíche, onde permaneceu por três meses na Faculdade de Agronomia de Buenos Aires (FAUBA), realizando atividades do Programa de Centros Associados da Pós-Graduação Brasil-Argentina (CAPG-BA), intitulado “Impactos ambientais provenientes da produção agrícola: contaminação por metais pesados, degradação e emissão de gases de efeito estufa.” Em fevereiro de 2016 concluiu seu doutoramento no PPGCTIA, com a defesa do trabalho intitulado: “Avaliação do potencial da *Alface-d’água* (*Pistia stratiotes*) na descontaminação de soluções contaminadas por metais pesados.”



## RESUMO GERAL

RODRIGUES, Ana Carolina Dornelas. **Potencial da alface-d'água (*Pistia stratiotes*) para descontaminação de águas contaminadas por Zn e Cd.** 2016. 108f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Pró - reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Atualmente a contaminação da água por metais pesados é problema cada vez mais frequente, principalmente devido a intensidade das atividades antrópicas, como as industriais, que muitas vezes descartam nesses ambientes seus efluentes enriquecidos com esses elementos. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) na descontaminação de águas contaminadas pelos metais pesados zinco (Zn) e cádmio (Cd). A pesquisa foi dividida em 3 capítulos. No primeiro, foi avaliada a capacidade de bioabsorção de metais pesados pela matéria seca da Alface-d'água, onde foram realizadas isotermas de adsorção em laboratório, com cinco doses crescentes de contaminação por Zn (1,8; 18; 50; 79 e 105 mg L<sup>-1</sup>) e 4 doses de Cd (0,01, 0,1, 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>) em nove tempos de coleta (1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas). Os resultados mostraram que a biomassa seca da Alface-d'água possui capacidade de bioabsorção dos metais analisados, potencializada pelo aumento do tempo de contato com a solução. Tal conclusão também foi demonstrada pela determinação do modelo isotérmico linear, que indica alta afinidade do adsorvente pelo adsorbato. Alterações na morfologia da biomassa foram observadas na microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes e depois da bioabsorção. No segundo capítulo foi avaliado o potencial fitoextrator da Alface-d'água cultivada em doses crescentes de Zn e Cd (separadamente) e as respostas fisiológicas da planta a essa contaminação. O experimento avaliou 4 doses de contaminação de cada metal (Zn = 0; 1,8; 18 e 180 mg L<sup>-1</sup> e Cd = 0; 0,1; 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>) e 4 tempos de cultivo (24, 48, 72 e 168 horas). Em cada coleta foram analisados: teores de metais pesados na solução, raiz e parte aérea da planta; teores de pigmentos fotossintéticos por método direto e indireto e eficiência fotossintética através da fluorescência transiente da clorofila "a". Os resultados mostraram o elevado potencial da Alface-d'água em absorver os metais pesados e acumular em seus tecidos, preferencialmente nas raízes, o que favoreceu a manutenção da síntese de pigmentos e a eficiência fotossintética na maioria das doses testadas. Essa absorção foi potencializada com o tempo de cultivo, que aumentou a translocação dos metais para parte aérea e a síntese de carotenoides para proteção do aparato fotossintético. As maiores doses dos metais tiveram sua eficiência fotossintética diminuída. No terceiro capítulo foi avaliada a cinética de absorção dos metais pesados pela Alface-d'água, sendo instalados experimentos separados para Zn e Cd, com duas concentrações diferentes de cada metal (Zn = 1,8 e 18 e Cd 0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>), com 3 repetições cada, totalizando 12 unidades experimentais (6 por elemento). Alíquotas das soluções e aferição do pH foram realizadas em tempos determinados até a estabilização dos teores dos metais na solução. Ao final foram avaliados a produção de biomassa, os teores de metais e os parâmetros cinéticos de absorção ( $K_m$  e  $V_{max}$ ). Os resultados mostraram que o pH das soluções não foi afetado pelo cultivo da Alface-d'água e que as maiores velocidades de absorção de Zn e Cd foram encontradas nas maiores doses de contaminação da solução. A produção de biomassa foi afetada negativamente pela contaminação, porém esses resultados não interferiram na velocidade de absorção dos metais pela planta. Com base em todos os resultados pode-se concluir que a Alface-d'água apresenta potencial para remediação de corpos hídricos contaminados pelos metais pesados Zn e Cd, tanto com sua biomassa seca como pelo seu cultivo in vivo.

**Palavras-chave:** Remediação. Macrófita. Metais pesados.

## GENERAL ABSTRACT

RODRIGUES, Ana Carolina Dornelas. **Potential of water lettuce (*Pistia stratiotes*) for decontamination of water contaminated by Zn and Cd.** 2016. 108f. Thesis (Doctorate in Science, Technology and Innovation in Agriculture). Pró - reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Nowadays water contamination by heavy metals is an increasingly common problem, mainly due to the intensity of human activities, such as industrial, which often discard these environments their effluents enriched with these elements. In this scenario, this work was to evaluate the potential of water lettuce (*Pistia stratiotes*) in the decontamination of water contaminated by heavy metals zinc (Zn) and Cadmium (Cd). For that, this research was divided into three chapters. In the first chapter, it was evaluated the ability to biosorption of heavy metals by dry matter of water lettuce where laboratory adsorption isotherms were carried out with five increasing doses of Zn contamination (1.8; 18; 50; 79 and 105 mg L<sup>-1</sup>) and 4 doses of Cd (0.01, 0.1, 1 and 10 mg L<sup>-1</sup>) in nine sampling times (1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours). The results showed that the dry biomass of water lettuce has biosorption capacity of the metals analyzed, enhanced by increasing the contact time with the solution. This conclusion was also demonstrated by determining the isothermal linear model, which indicates a high affinity of the adsorbent for the adsorbate. Changes in the morphology of the biomass were demonstrated by scanning electron microscopy images (SEM) before and after biosorption. In the second chapter it was evaluated the potential fitoextrator of water lettuce grown in increasing doses of Zn and Cd (separately) and the physiological response of the plant to this contamination. The experiment evaluated 4 doses of contamination of each metal (Zn = 0, 1.8, 18 and 180 mg L<sup>-1</sup> and Cd = 0, 0.1, 1 and 10 mgL<sup>-1</sup>) and cultivation time 4 (24, 48, 72 and 168 hours). In each survey were analyzed: heavy metal content in the solution, root and aerial part of the plant; content of photosynthetic pigments by direct and indirect method and photosynthetic efficiency by transient fluorescence of chlorophyll a. The results showed that water lettuce has high potential to absorb and accumulate heavy metals in their tissues, preferably in the roots, thus promoting the maintenance of the pigment synthesis and photosynthetic efficiency in most doses tested. This absorption was enhanced with increasing time of cultivation, which increased the translocation of metals to shoot and carotenoid synthesis for the protection of the photosynthetic apparatus. Higher doses of the metals had their photosynthetic efficiency decreased. In the third section it was evaluated the kinetics of absorption of heavy metals by water lettuce to it have been installed to separate Zn and Cd experiments with two different concentrations of each metal (Zn = 18 and 1.8 and 0.1 Cd and 1.0 mg L<sup>-1</sup>), with three repetitions each, totaling 12 experimental units (6 units for each element). Aliquots of the solutions and measurement of pH were carried out at certain times until stabilization of the levels of metals in the solution. At the end, the biomass production, the levels of metals and the kinetic parameters of absorption ( $K_m$  and  $V_{max}$ ) were evaluated. The results showed that the pH of the solutions was not affected by the cultivation of water lettuce and the highest Zn and Cd absorption rates were found in larger doses contamination of the solution. Biomass production was negatively affected by contamination, but these results did not affect the rate of absorption of metals by plants. Based on all the results it can be concluded that the water lettuce has potential for remediation of water bodies contaminated by heavy metals Zn and Cd, both with its dry biomass as for its in vivo cultivation.

**Keywords:** Remediation. Macrophyte. Heavy metals.

## RESUMEN AMPLIADO

RODRIGUES, Ana Carolina Dornelas. **Potenciales de la lechuga de agua (*Pistia stratiotes*) para la descontaminación del agua contaminada por Zn y Cd.** 2016. 108p. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología y Innovación en la Agricultura). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação. Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, RJ, 2016.

### 1. Introducción

Cada vez más, la contaminación ambiental por metales pesados ha convertido en tema de debate y la investigación que buscan su control y remediación, ya que esta contaminación puede dañar la salud y el desarrollo de los seres vivos y el equilibrio del ecosistema en su conjunto. La contaminación del agua es uno de los más preocupantes por ser un elemento esencial no sólo para los organismos vivos, sino también la producción y el desarrollo social y que refuerza la necesidad de buscar métodos de prevención y descontaminación.

La fitorremediación y biosorción son técnicas que han sido ampliamente utilizados en proyectos de biorremediación de ambientes acuáticos contaminados por metales pesados. En estas técnicas se pueden utilizar plantas acuáticas (los macrófitos) para eliminar inertizar o contener contaminantes disueltos en ese ambiente (IOP et al., 2013).

Las características de los macrófitos como su fácil cultivo; alta tasa de crecimiento; la producción de biomasa y la tolerancia a las sustancias tóxicas, demuestran su potencial como fitoextractor de metales pesados cuando se cultivan in vivo en un ambiente contaminado (PIO et al., 2013), así como biosorbente cuando se utiliza su biomasa muerta para la adsorción contaminantes presentes en la solución (MÓDENES et al., 2013). Algunos estudios confirman estas características y ha demostrado el uso potencial de estas plantas en la remediación de ambientes acuáticos contaminados por metales pesados, tales como MISHRA & TRIPATHI, (2008) y LI et al., (2013) que cultivó macrófitos en ambientes contaminados por metales pesados y MÓDENES et al., (2009), VERMA et al., (2008) e MIRETZKY et a., (2006), usando la biomasa de macrófitos como biosorbentes estos elementos.

En este trabajo, se aborda las diferentes aplicaciones de macrófitos *Pistia stratiotes* en las estrategias de restauración de las masas de agua contaminadas con metales pesados. Ya sea a través del uso de su biomasa seca en biosorción o el uso de las estrategias de fitoextracción con uso de plantas vivas. El conocimiento del potencial de biosorción y el potencial de fitoextracción de *Pistia stratiotes* podrán acreditar para su uso en diferentes condiciones de remediación de ambientes acuáticos contaminados por metales pesados.

Como antes presentado, este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial de la macrófitos Lechuga de agua (*Pistia stratiotes*) en: descontaminación de soluciones acuosas contaminadas por los metales pesados: zinc y cadmio, por biosorción de su biomasa seca (Capítulo 1); Fitoextracción, con cultivo en soluciones contaminadas con dosis crecientes de estos elementos (Capítulo 2), y la evaluación de los parámetros cinéticos de la absorción de los metales Zn y Cd (Capítulo 3).

### 2. Material y Métodos

En el Capítulo I, se recogió la Lechuga de agua (*Pistia stratiotes*) en el depósito de Vigário, en Pirai - RJ. Después de la colecta, las macrófitas se lavaron con agua corriente y desionizada. Posteriormente fueran llevados a la estufa de circulación forzado de aire en a 65°C hasta peso constante. Estas plantas se molieron en un molino para aumentar el área de superficie específica y el consiguiente aumento de área de superficie expuesta a la solución contaminada por metales pesados.

El experimento se llevó a cabo en vasos de plástico con una capacidad de 100 ml se añade en cada vial 50 ml de solución contaminada a un pH de 5,5. Un gramo de biomasa seca y triturada de biomasa fue colocado en "saquitos" de tela de poliéster y colocado en contacto con la solución contaminada. Se realizaron por separado para los ensayos de zinc en forma de  $Zn(NO_3)_2$ , las pruebas de 5 dosis crecientes (2,1; 21; 51,9; 61,9 y 104,5  $mg\ L^{-1}$ ) y cadmio en la forma  $Cd(NO_3)_2$ , que se ensayaron 4 dosis crecientes (0,05, 0,1, 1 y 11  $mg\ L^{-1}$ ) más un control (sin Zn y cd). La primera dosis de cada metal es equivalente a aproximadamente diez veces el máximo permitido por la CONAMA en los cursos de agua Clase I - Aguas Dulces, de conformidad con la resolución 357 (CONAMA, 2005), simulando un ambiente contaminado. Las siguientes dosis mantuvieron una mayor contaminación diez veces.

En cada periodo de muestreo (1; 3; 6; 12; 24; 36; 48; 60 y 72 horas), la biomasa se elimina de la solución y se seca en una estufa con circulación forzada de aire durante 48 horas a 65° C para llevar a cabo nitropercloric de la digestión (6:1), segundo TEDESCO et al., (1995), y la determinación del contenido de metales pesados por espectrofotometría de absorción atómica. Conociendo el contenido de metal soluble (concentraciones iniciales y finales) se determinó como el porcentaje de eliminación con a Ecuación de MAGRO et al., (2013).

Las concentraciones de metales pesados en la solución de equilibrio (Cf) en el momento último muestreo (72h) para todas las dosis probadas, se insertaron en el programa ISOFIT para la obtención de los parámetros y el establecimiento de criterios para 10 modelos de isotermas de adsorción, que permite la identificación el mejor ajuste a los datos obtenidos, es decir, que la ecuación que describe mejor la relación matemática que la biomasa con la adsorción de metales evaluados (MATOTT et al., 2008).

El experimento se realizó en un esquema factorial en un diseño completamente al azar con cinco dosis de Zn y Cd cuatro dosis, nueve periodos de recopilación y tres repeticiones, por un total de 135 unidades experimentales de Zn y 108 para Cd. Las medias se compararon mediante la desviación estándar.

Los cambios morfológicos causados a la superficie de biomasa de Lechuga de agua por los niveles de contaminación más altas (105 y 10  $mg\ L^{-1}$  Zn y Cd, respectivamente) en comparación con el control (sin metales pesados) el uso de imágenes generado en un microscopio electrónico de barrido (MEB), que se celebró en el Centro Universitario de Volta Redonda - UniFOA. Con este fin, las muestras de biomasa se fijaron en pequeñas placas de metal y se recubrieron con oro para obtener mejores imágenes de visualización, ya que aumentan el nivel de emisión de electrones, emitiendo más de la muestra y facilitar la construcción de la imagen.

En el capítulo II, experimentos de zinc y cadmio se llevaron a cabo por separado, evaluando tres dosis de contaminación más control de la solución, determinados a partir de los estándares establecidos por la CONAMA (CONAMA, 2005). Para el zinc se evaluaron las siguientes dosis: 0; 1,8; 18 y 180  $mg.L^{-1}$ , como  $ZnSO_4.H_2O$  y cadmio: 0; 0,1; 1 y 10  $mg.L^{-1}$  como  $Cd(NO_3)_2.4H_2O$ , 4 periodos de cultivo (24, 48, 72 y 168 horas), con 3 repeticiones y un total de de 48 vasos cada experimento.

En cada colecta, las plantas se lavaron con agua del grifo y después con agua desionizada, se separó en raíces y brotes, y pesado. Se evaluaron: los pigmentos fotosintéticos extrajeron según HISCOX y ISRAELSTAM (1979) y se expresan de acuerdo con las ecuaciones propuestas por WELLBURN (1994), los niveles de metales pesados en la raíz y brote fueran para la digestión nitropercloric, según TEDESCO, (1995) para determinación no extracto e solución por espectrometría de absorción atómica y la eficiencia fotosintética por fluorescencia transitoria de la clorofila "a" con un fluorómetro portátil (HandyPEA, Hanstech, Lynn king 's, Norkfolk, Reino Unido).

Según los niveles de metales en los macrófitos y la solución se determinó el porcentaje de eliminación de los metales presentes en la solución contaminada inicial, por vaso y por área ( $1\text{m}^3$ ) de acuerdo con el área ocupada una planta. Considerando que las concentraciones de los metales que se encuentran en diferentes partes del Lechuga de agua el factor de bioconcentración (factor de bioacumulación) se calcularon (FBC), que enumera las concentraciones de relativa absorbido a su concentración en el medio (la solución), de acuerdo con LUO et al., (2005).

Los niveles de pigmentos fotosintéticos también se midieron indirectamente y de forma no destructiva usando ClorofiLOG (Falker Automation Agrícola - Porto Alegre), basándose en las características espectrales de las clorofilas, la generación de resultados proporcional a la absorbancia de radiación de estos pigmentos, conocidos como Índice clorofila Falker (ICF).

Para cada metal pesado se llevó a cabo un experimento independiente. Se evaluaron 3 dosis de solución de control más x 4 periodos de cultivo (24, 48, 72 y 168 horas), con tres repeticiones cada una, por un total de 48 unidades experimentales, cada experimento. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey al 5% de probabilidad, con la versión de software 4.0 Sisvar (FERREIRA, 2000).

En el capítulo III, macrófitos se recogieron en el lago de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro (UFRRJ) - campus Seropédica-RJ. Las plantas se lavaron con agua del grifo y se mantienen en agua destilada para la aclimatación de una semana. Antes del experimento, las plantas se pesaron seleccionado y un peso de aproximadamente 50 gramos cada uno.

El experimento se realizó en un invernadero, utilizando macetas de plástico con una capacidad de 5 litros, lleno con 3 litros de solución nutritiva de Hoagland a 10%, cuando se añadieron las dosis de contaminación. Se ensayaron en este experimento las dos dosis más bajas utilizadas en el capítulo anterior ( $\text{Zn} = 1,8$  y  $18 \text{ mg L}^{-1}$  y  $\text{Cd} = 0,1$  y  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), que corresponde a  $27,5$  y  $275 \mu\text{mols L}^{-1}$  Zn y  $0,89$  a  $8,9 \mu\text{mols L}^{-1}$  Cd respectivamente. El pH inicial de la solución se ajustó a 5,5 y se midió en cada tiempo de muestreo de la solución. La temperatura de conducción del experimento fue entorno 20 a  $25^\circ\text{C}$  y aproximadamente 60% de humedad relativa.

Las alícuotas de 1,5 ml se recogieron de cada vaso inicialmente de 15 a 15 minutos en la primera hora de experimento 30 y 30 minutos durante la segunda hora. Posteriormente, se tomaron alícuotas cada hora hasta que la concentración de estabilización de metal en la solución, como OLIVEIRA et al., (2001).

La concentración de Zn y Cd en las muestras recogidas se determinó por espectrofotometría de absorción atómica. Los parámetros cinéticos de absorción ( $V_{max}$  y  $K_m$ ) de Cd y Zn se determinaron a partir de la disminución en la concentración de estos iones en la solución de nutrientes (CLAASSEN et al., 1974). El agotamiento de estos nutrientes curvas y cálculo de los parámetros cinéticos se llevaron a cabo por medio de método gráfico matemático desarrollado por RUIZ (1985) y COMETTI et al., (2006), utilizando el CineticaWin 1,0 (UFV).

El diseño experimental fue completamente al azar con 2 dosis de contaminación analizados para cada metal (Zn y Cd), y 3 repeticiones cada una, por un total de 6 unidades experimentales para cada elemento.

### 3. Resultados y Discusión

El primer capítulo encontró que en todas las dosis probadas, hubo una disminución en la concentración de metales en solución contaminada mediante el aumento del tiempo de contacto con la biomasa. En consecuencia, el porcentaje de remoción de los metales presentes en la solución por la biomasa de Lechuga e agua fue mayor en los grandes tiempos evaluados.

Desde 36 horas de contacto, la eliminación de metales comenzó a estabilizarse, especialmente Zn, incluyendo el tener desorción en unas pocas dosis a lo largo de este tiempo. Los metales desorbidos fueron readsorbidos por biomasa en los últimos tiempos.

Los datos obtenidos en este experimento con zinc demuestran que la remoción fue más eficaz en dosis más baja ensayada ( $2,13 \text{ mg L}^{-1}$ ), la remoción de la solución 99,5% del metal en 72 horas de contacto de la solución con la biomasa. En consecuencia, la eliminación fue menos marcada a la dosis más alta ( $104,54 \text{ mg L}^{-1}$ ), alcanzando 71,4% de la concentración inicial de Zn en el último tiempo evaluado (72 horas). Es de destacar que estos datos demuestran la cantidad de "más limpia" estaba la solución, es decir, libre de metales evaluados. Este comportamiento no se observó para el cadmio, que tuvo su más alta eficiencia de remoción en dosis más altas. Los datos muestran que la biomasa seca de Lechuga de agua alcanza la máxima eliminación de 86% de Cd en el momento más alta puntuación (72 horas).

Hubo un aumento en los niveles de metales (Zn y Cd) asociados a la biomasa, impulsado por el aumento de tiempo de contacto con la solución contaminada. Estos datos están relacionados con los datos de la remoción de los metales de la solución, mencionados anteriormente y confirman la capacidad de la biomasa seca de la biomasa de Lechuga de agua para eliminar estos metales pesados de la solución. Los niveles de los metales estudiados en la biomasa de Lechuga de agua aumentó por las concentraciones de los metales en solución.

De acuerdo con los datos obtenidos con el programa ISOFIT el modelo que mejor se ajusta a la biosorción de metales pesados Zn y Cd por la biomasa de Lechuga de agua, fue el modelo de isoterma lineal, que tenía el menor valor de AIC y el valor AICW más cercano de uno, lo que indica un mayor peso / pruebas de este modelo. La selección de este modelo indica una alta afinidad biosorbente el adsorbato.

La biomasa de Lechuga de agua que se utilizó en soluciones contaminadas con metales pesados Zn y Cd, mostró cambios en su morfología de la superficie, con apariencia arrugada, doblada, que difieren biomasa testigo presentado apariencia suave y lineal. Se observó también pequeños trozos, pellets que no se observaron en la muestra sin contaminación (control). El aspecto de la superficie arrugada de la biomasa contaminada está relacionada con cambios en la composición de la misma, debido a las interacciones entre los grupos funcionales de la superficie de la biomasa con los elementos de diferente radio atómico, que conducen a cambios en su morfología. La formación de gránulos se ha correlacionado con complejante (quelante) el metal (YEH et al., 2011; PLAZA CAZÓN et al., 2013.) Una vez que las biomazas son de origen orgánico y tienen grupos funcionales en su superficie para formar enlaces de diferente naturaleza con metales y los inmoviliza en su estructura. Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) mostraron que los cambios observados en la superficie de la biomasa se refieren a los mecanismos implicados en biosorción de metales pesados evaluados y confirman sus características favorables para la remediación de soluciones contaminadas.

Los resultados del segundo capítulo mostró que Lechuga da agua tiene un alto potencial para absorber los metales pesados y se acumulan en sus tejidos, preferentemente en las raíces, lo que favoreció el mantenimiento de la síntesis del pigmento y la eficiencia fotosintética en la mayoría de las dosis probadas. Esta absorción se mejoró al aumentar el tiempo de cultivo, lo que aumentó la translocación de metales para disparar y síntesis de los carotenoides para la protección del aparato fotosintético. Las dosis más altas de los metales tenían su eficiencia fotosintética disminuyó debido a los efectos tóxicos de estos elementos en la captura y la transferencia de energía, durante la etapa fotoquímica en la fotosíntesis.

En el tercer capítulo los resultados mostraron que el pH de las soluciones no se vio afectada por el cultivo de Lechuga de agua, debido al transporte de tipo uniporte de estos elementos. Las mayores velocidades de absorción de Zn y Cd se encontraron en dosis contaminación más grande (mayores  $V_{max}$ ), lo que favorece la técnica fitoextracción con esta

planta. La producción de biomasa se vio afectada negativamente por la contaminación, pero estos resultados no afectaron a la tasa de absorción de metales por las plantas. Sobre la base de todos los resultados se puede concluir que la Lechuga de agua tiene un gran potencial para la restauración de las masas de agua contaminadas por metales pesados Zn y Cd, tanto con su biomasa seca como para su cultivo in vivo.

#### **4. Conclusiones**

Lechuga de agua (*Pistia stratiotes*) es una macrófita eficiente en la biosorción y la absorción de metales pesados Zn y Cd, puede ser utilizado en proyectos de remediación en los medios acuáticos contaminados por estos elementos. En los altos niveles de contaminación, la absorción de estos elementos es más rápida, lo que favorece el proceso de biorremediación.

Se sugiere realizar más investigaciones sobre este tema, especialmente si involucra la acción combinada de las técnicas de biorremediación y fitoextracción con este macrófitos con el fin de mejorar el saneamiento de la zona contaminada.

**Palabras clave:** Remediación. Metales pesados. Macrófitas,

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Tipos de isotermas de adsorção .....	5
<b>Figura 2.</b> Diferentes tecnologias de fitorremediação têm sido empregadas para a limpeza de águas poluídas.....	9
<b>Figura 3.</b> <i>Pistia stratiotes</i> (Alface d'água).....	9
<b>Figura 4.</b> Resumo dos mecanismos celulares com potencial para a detoxificação de metais pesados.....	14
<b>Figura 5.</b> Ilustração dos mecanismos extracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados.....	16
<b>Figura 6.</b> Ilustração dos mecanismos intracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados.....	17
<b>Figura 7.</b> Representação da quelação de Cd e dos processos envolvidos na síntese de fitoquelatinas.....	18
<b>Figura 8.</b> Ilustração dos mecanismos intracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados.....	19
<b>Figura 10.</b> Teores Zn (A) e Cd (B) na matéria seca da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ).....	29
<b>Figura 11.</b> Comportamento gráfico das Isotermas de adsorção Linear dos metais Zn e Cd. ...	33
<b>Figura 12.</b> Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em amostras de biomassa testemunha e cultivada por 72 horas na maior dose de Zn .....	34
<b>Figura 13:</b> Local de coleta das plantas. Lago do prédio de Química (PQ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).....	43
<b>Figura 14.</b> Teste JIP aplicado nas folhas da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) cultivada sob doses crescentes de Zn em diferentes tempos de cultivo.....	61
<b>Figura 15.</b> Teste JIP aplicado nas folhas da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) cultivada sob doses crescentes de Cd em diferentes tempos de cultivo.....	76
<b>Figura 16.</b> Efeito da absorção de Zn pela Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) no pH das soluções nutritivas com diferentes doses de contaminação.....	85
<b>Figura 17.</b> Depleção de Zn em soluções nutritivas com diferentes concentrações (A = 27,5 m $\mu\text{ols L}^{-1}$ e B = 275 m $\mu\text{ols L}^{-1}$ ) em função da absorção pela Alface-d'água ao longo do tempo de cultivo.....	86
<b>Figura 18.</b> Variação da biomassa da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) e razão raiz x parte aérea após 93 horas de cultivo em solução nutritiva contaminada com diferentes doses de zinco.....	89
<b>Figura 19.</b> Efeito da absorção de Cd pela Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) no pH das soluções nutritivas com diferentes doses de contaminação.....	90
<b>Figura 20.</b> Depleção de Cd em soluções nutritivas com diferentes concentrações em função da absorção pela Alface-d'água ao longo do tempo de cultivo. ....	91
<b>Figura 21.</b> Variação da biomassa da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) e razão raiz x parte aérea após 93 horas de cultivo em solução nutritiva contaminada com diferentes doses de cádmio.....	94



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração de zinco e cádmio em solução e percentual de remoção desses metais nos diferentes tempos de contato com a biomassa seca da Alface-d'água. ....	28
<b>Tabela 2.</b> Valores de $R^2$ , AICc, $\Delta AIC$ e AICw para dez modelos de isotermas de adsorção para Zn e Cd pela Alface-d'água. ....	32
<b>Tabela 3.</b> Principais parâmetros do Teste JIP .....	46
<b>Tabela 4.</b> Teores de Zn na solução de cultivo da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nos diferentes doses e tempos de cultivo.....	48
<b>Tabela 5.</b> Teores de Zn associados a raiz e parte aérea da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nos diferentes tratamentos e tempos de cultivo.....	49
<b>Tabela 6.</b> Percentual de remoção Zn pela biomassa seca de cada planta (g) de Alface-d'água cultivada em doses crescentes de contaminação e em diferentes tempos de cultivo.....	51
<b>Tabela 7.</b> Capacidade aproximada de remoção de Zn por metro cúbico de espelho d'água, nos diferentes doses e tempos de cultivo da Alface-d'água.....	52
<b>Tabela 8.</b> Fator de bioacumulação (FBC) na raiz e parte aérea e fator de translocação (FT) de Zn na Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nas diferentes doses e tempos de cultivo. ....	53
<b>Tabela 9.</b> Teores de Clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i> ), Clorofila <i>b</i> (Chl <i>b</i> ), Clorofila total (C total) e Carotenoides (Cx+c) nas folhas da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) cultivada em doses crescentes de zinco e diferentes tempos de cultivo.....	55
<b>Tabela 10.</b> Razão Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i> nas folhas da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nas diferentes doses e tempos de cultivo. ....	57
<b>Tabela 11.</b> Razão C total / Cx+c nas folhas da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nas diferentes doses e tempos de cultivo. ....	58
<b>Tabela 12.</b> Índice de clorofila Falker (ICF) dos tecidos foliares da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nas diferentes doses de contaminação por Zn e diferentes tempos de cultivo..	59
<b>Tabela 13.</b> Concentrações de Cd na solução de cultivo da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nos diferentes doses e tempos de cultivo. ....	64
<b>Tabela 14.</b> Teores de Cd associados a biomassa da raiz e parte aérea da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nas diferentes doses e tempos de coleta.....	65
<b>Tabela 15.</b> Percentual de remoção de Cd pela biomassa seca de cada planta (g) da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) cultivada em doses crescentes de contaminação e diferentes tempos de cultivo.....	66
<b>Tabela 16.</b> Capacidade aproximada de remoção de Cd por metro cúbico de espelho d'água, nas diferentes doses e tempos de cultivo da Alface-d'água.....	68
<b>Tabela 17.</b> Fator de bioacumulação (FBC) na raiz e parte aérea e fator de translocação (FT) de Cd na Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nas diferentes doses e tempos de cultivo. ....	68
<b>Tabela 18.</b> Teores de Clorofila <i>a</i> (Chl <i>a</i> ), Clorofila <i>b</i> (Chl <i>b</i> ), Clorofila total (Ctotal) e Carotenoides (Cx+c) na parte aérea da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) cultivada em doses crescentes de cádmio e diferentes tempos de cultivo.....	71
<b>Tabela 19.</b> Razão Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i> nos tecidos da parte aérea da Alface-d'água nas diferentes doses e tempos de cultivo. ....	72
<b>Tabela 20.</b> Razão C total / Cx+c nas folhas da Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) nas diferentes doses e tempos de cultivo. ....	73

<b>Tabela 21.</b> Índice de clorofila Falker (ICF) dos tecidos foliares da Alface-d'água nas diferentes doses de contaminação por Cd e diferentes tempos de cultivo.....	74
<b>Tabela 22.</b> Parâmetros cinéticos da absorção de Zn pela Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) cultivada em soluções nutritivas com diferentes concentrações do elemento. ....	88
<b>Tabela 23.</b> Parâmetros cinéticos da absorção de Cd pela Alface-d'água ( <i>Pistia stratiotes</i> ) cultivada em soluções nutritivas com diferentes concentrações do elemento. ....	92

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>2</b>
2.1	Metais Pesados.....	2
2.2	Biossorção de Metais Pesados .....	4
2.3	Fitorremediação de Metais Pesados.....	6
2.4	Alface-d'Água ( <i>Pistia stratiotes</i> ).....	9
2.5	Respostas das Plantas à Contaminação por Metais Pesados.....	10
2.5.1	Sensibilidade e sintomas de toxicidade de metais pesados nas plantas .....	10
2.5.2	Tolerância das plantas a metais pesados .....	13
2.5.3	Mecanismos extracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados.....	14
2.5.4	Mecanismos intracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados .....	16
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO I - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BISSORÇÃO DE METAIS PESADOS PELA BIOMASSA SECA DE ALFACE D' ÁGUA (<i>Pistia stratiotes</i>).....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	<b>RESUMO .....</b>	<b>21</b>
3.2	ABSTRACT.....	22
3.3	INTRODUÇÃO .....	23
3.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.4.1	Coleta das plantas.....	25
3.4.2	Instalação do experimento.....	25
3.4.3	Coleta da biomassa e análise dos metais pesados .....	26
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
3.6	CONCLUSÕES .....	38
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO II - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA ALFACE-D'ÁGUA (<i>Pistia stratiotes</i>) PARA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLUÇÕES AQUOSAS CONTENDO ZINCO E CÁDMIO: ACUMULAÇÃO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS.....</b>	<b>39</b>
4.1	RESUMO.....	40
4.2	ABSTRACT.....	41
4.3	INTRODUÇÃO .....	42
4.4	MATERIAL E MÉTODOS .....	43
4.4.1	Coleta das plantas.....	43
4.4.2	Instalação do experimento.....	44
4.4.3	Coleta das plantas e análise dos metais pesados .....	44
4.4.4	Análise de pigmentos fotossintéticos .....	45
4.4.5	Eficiência fotossintética .....	45
4.4.6	Análises estatísticas.....	47

4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.5.1	Resultados do experimento com zinco.....	48
4.5.2	Resultados do experimento com cádmio.....	64
4.6	CONCLUSÕES.....	79
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO III - CINÉTICA DE ABSORÇÃO DE ZINCO E CÁDMIO EM PLANTAS DEALFACE-D'ÁGUA (<i>Pistia stratiotes</i>).....</b>	<b>80</b>
5.1	RESUMO.....	81
5.2	ABSTRACT.....	82
5.3	INTRODUÇÃO.....	83
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	84
5.4.1	Coleta das plantas e preparação para o experimento:.....	84
5.4.2	Condução do experimento.....	84
5.4.3	Coleta do experimento e análise dos dados.....	84
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
5.5.1	Cinética de absorção de zinco.....	85
5.5.2	Cinética de absorção de cádmio.....	89
5.6	CONCLUSÕES.....	95
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Cada vez mais, a contaminação ambiental por metais pesados tem se tornado tema de debates e pesquisas que buscam o seu controle e remediação, pois essa contaminação pode prejudicar a saúde e desenvolvimento dos seres vivos, e o equilíbrio do ecossistema como um todo. A contaminação da água é uma das mais preocupantes por ser um insumo indispensável não só aos organismos vivos, mas também à produção e ao desenvolvimento social e que reforça a necessidade de busca por métodos de prevenção e descontaminação.

A fitorremediação e a biossorção são técnicas que vem sendo muito utilizadas em projetos de biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por metais pesados. Nessas técnicas podem ser utilizadas plantas aquáticas (macrófitas) para remover, inertizar ou conter os poluentes dissolvidos nesse ambiente (PIO et al., 2013).

As características das macrófitas como: seu fácil cultivo; elevada taxa de crescimento; produção de biomassa e tolerância a substâncias tóxicas mostram o seu potencial como fitoextrator de metais pesados, quando cultivada *in vivo* em ambiente contaminado (PIO et al., 2013), e também como biossorvente, quando sua biomassa morta é utilizada para adsorção de contaminantes presentes na solução (MÓDENES et al., 2013). Alguns estudos confirmam essas características e tem demonstrado o potencial de utilização dessas plantas na remediação de ambientes aquáticos contaminados por metais pesados, como: MISHRA & TRIPATHI, (2008) e LI et al., (2013) que cultivaram macrófitas em ambientes contaminados por metais pesados e MÓDENES et al., (2009), VERMA et al., (2008) e MIRETZKY et al., (2006) que utilizaram a biomassa de macrófitas como biossorventes desses elementos.

Neste trabalho, pretendeu-se abordar as diferentes aplicações da macrófita *Pistia stratiotes* em estratégias de remediação de corpos hídricos contaminados com metais pesados. Seja através do uso de sua biomassa seca na biossorção, ou utilizando-se a planta viva em estratégias de fitoextração do contaminante. O conhecimento do potencial de biossorção e do potencial fitoextrator da *Pistia stratiotes* poderá credenciá-la para a utilização em diferentes condições de remediação de ambientes aquáticos contaminados por metais pesados.

Diante do apresentado, este trabalho teve como objetivos: avaliar o potencial da macrófita Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) na descontaminação de soluções aquosas contaminadas pelos metais pesados zinco e cádmio, através da avaliação do potencial de biossorção da sua biomassa seca (Capítulo I); fitoextração com o cultivo em soluções contaminadas com doses crescentes desses elementos (Capítulo II), e avaliação dos parâmetros cinéticos de absorção dos metais Zn e Cd (Capítulo III).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Metais Pesados

Apesar do termo metal pesado ser bastante controverso e de uso atual, não existe ainda uma única definição que seja aceita mundialmente. Em geral esse termo é adotado para um grupo de metais e metalóides com densidade atômica maior que  $6 \text{ g cm}^{-3}$ , que geralmente, estão associados com a poluição e toxicidade aos seres vivos e à contaminação ambiental (AMARAL SOBRINHO et al., 1992). Alguns desses metais são essenciais ao crescimento dos vegetais (micronutrientes), pois fazem parte da constituição de enzimas e proteínas (zinco e cobre, por exemplo), e podem se tornar tóxicos às plantas quando em elevadas concentrações. Outros metais não possuem nenhuma função conhecida no metabolismo vegetal, geralmente provocando sintomas de toxicidade em concentrações mínimas (HALL, 2002).

Os metais pesados podem ocorrer naturalmente nos solos e nos sistemas aquáticos, oriundos de processos geoquímicos e intemperismo do material de origem, que vão determinar a maior ou menor presença desses elementos no ambiente, de acordo com sua composição (FADIGAS et al., 2002). O aumento da concentração desses elementos a níveis anormais, está, principalmente, relacionado as atividades antrópicas, devido ao crescimento populacional e industrial. COSTA et al., (2004) e ALLOWAY, (1990) citam que, nas áreas próximas de complexos industriais, urbanos e, também, nas rurais de agricultura altamente tecnificada, tem se verificado aumento nos teores de zinco (Zn), chumbo (Pb), níquel (Ni), cádmio (Cd), cobre (Cu), mercúrio (Hg), arsênio (As), entre outros.

Uma vez presente no solo, no ar e na água, seja por ocorrência natural ou por ação antrópica, o metal pesado pode ser introduzido na cadeia alimentar. Concentrações elevadas nas plantas e animais tem provocado toxicidade, diminuindo a produtividade. Nos seres humanos tem causando doenças, podendo levar a morte (MELO et al., 2007).

A toxicidade dos metais pesados depende do teor e da forma química sob a qual eles se apresentam, dependendo das diferentes interações existentes no meio. Os metais pesados têm comportamentos ambientais e toxicológicos extremamente diferenciados quando presentes nas diferentes formas químicas. Essa característica particular é atribuída à estrutura atômica desses elementos, que são caracterizados por apresentarem orbitais d livres, reagindo como aceptores de elétrons (MOLINA, 2004; GARCIA et al., 1990).

Devido à alta toxicidade e persistência dos metais pesados no meio ambiente, a recuperação de solos contaminados por esses elementos ainda é considerada um desafio (LOVLEY & COATES, 1997).

Os ambientes aquáticos há muito tempo vêm sendo utilizado em todo o mundo com distintas finalidades, das quais se destacam o abastecimento de água, a geração de energia, a irrigação, a navegação, a aquicultura e a harmonia paisagística (SPERLING, 1993). A água representa, sobretudo, o principal constituinte de todos os organismos vivos e é um dos fatores mais importantes e necessários para manutenção da vida. No entanto, nas últimas décadas, esse precioso recurso vem sendo ameaçado pelas ações indevidas do homem, o que acaba resultando em prejuízo para a própria humanidade. Os constantes despejos de rejeitos industriais, urbanos e outras atividades humanas tem contribuído para a escassez de água potável (OLIVEIRA et al., 2001).

A contaminação da água por metais pesados tem se destacado dentre as várias formas de contaminação existente, como a mais preocupante para os órgãos ambientais envolvidos no controle da poluição (PEREIRA et al., 2005).

Assim como acontece nos solos, a presença dos metais pesados nos sistemas aquáticos pode ser natural, através de processos geoquímicos e do intemperismo do material de origem, entretanto, a maior contribuição desses elementos é antrópica, principalmente associada a

atividade industrial (YABE et al., 1998). MELO et al., (2007) afirmam que as fontes antropogênicas contribuem com 11% a 96% das emissões de metais pesados, sendo responsáveis pela adição de 1,16 milhões de toneladas de chumbo por ano nos ecossistemas terrestres e aquáticos.

Em ambientes aquáticos, os metais pesados podem se encontrar na solução sob forma iônica, formando complexos solúveis orgânicos ou inorgânicos, ligados a superfícies minerais ou orgânicas de sedimentos em solução, associados aos sedimentos de fundo e a biota (WEIS et al., 2004; FEEMA, 1992). Estas diferentes formas podem se converter, dependendo principalmente do pH, força iônica da solução, presença de ligantes e atividade biológica. A elevação do pH favorece a precipitação dos metais e sua diminuição aumenta a solubilidade dos metais associados ao sedimento de fundo, possibilitando a absorção pelas plantas e animais e conseqüentemente entrar na cadeia alimentar (MEYNBURG, 1995). Estas alterações das formas dos metais pesados na água dificultam a análise real da sua qualidade, pois somente da concentração do metal solúvel, é insuficiente para avaliar a verdadeira dimensão da contaminação (ATANASSOVA, 1995).

A toxicidade dos metais pesados está diretamente ligada a sua concentração na fração solúvel e não a sua concentração total. Os metais nessa fração podem representar um risco ambiental, pois nela são passíveis de se movimentarem e serem absorvidos pelas plantas, podendo entrar na cadeia alimentar. (ZOCHE et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2001). Segundo CHANDRA et al., (2004) a absorção de cromo solúvel (Cr IV) é comprovadamente letal aos seres humanos. Os mesmos autores afirmam que esse elemento pode permanecer por longo tempo nas águas superficiais e subterrâneas, facilitando sua entrada e conseqüentemente os danos às membranas biológicas. MUDHOO et al., (2012) explicam que a absorção de níquel é dependente de sua forma físico-química, sendo a fração solúvel mais prontamente absorvida. Os mesmo autores ressaltam que algumas frações podem, ser revertidas com uma pequena alteração no pH por exemplo, e incrementar a fração solúvel desses elementos, aumentando sua toxicidade.

Mesmo em baixíssimas concentrações, os metais pesados após serem lançados em rios, lagos e mares, ao atingirem estuário sofrem um efeito denominado de “amplificação biológica”, em decorrência da não utilização destes elementos no metabolismo dos seres vivos (RUPP, 1996). Nesta forma são armazenados, levando ao aumento de sua concentração nos organismos e no ecossistema causando toxicidade a fauna e flora aquática (ALI et al., 2013; MISHRA et al., 2008), entretanto, algumas espécies são capazes de sobreviver em ambientes altamente contaminados (LASAT, 2002).

Os metais pesados podem reduzir a capacidade de auto depuração dos corpos hídricos, devido a toxicidade aos microrganismos responsáveis pela decomposição da matéria orgânica presente nesses ambientes, gerando um aumento na demanda bioquímica de oxigênio (DBO), levando a um processo de eutrofização (FELLENBERG, 1980). Esse processo pode originar diferentes problemas ambientais, como: odor forte do corpo hídrico devido a decomposição anaeróbia, alteração da cor, turbidez e teor de oxigênio dissolvido na água e conseqüentemente o comprometimento de toda biota ali existente, entre outros (MEYNBURG et al., 1995).

Há, portanto, grande interesse não somente em se detectar possíveis contaminações como, também, encontrar meios que possibilitem a descontaminação do meio ambiente. Várias plantas aquáticas têm sido estudadas e sugeridas como alternativas para solução destes problemas.

## 2.2 Bioissorção de Metais Pesados

Um dos métodos mais conhecidos e eficientes para remediar ambientes aquáticos contaminados por metais pesados é a sua remoção por adsorção, considerado por alguns autores uma das melhores tecnologias para tal fim (FLECK et al., 2013a).

A bioissorção, também chamada de “bioadsorção”, é uma proposta que vem se destacando pela eficiência na remoção dos metais pesados em solução, pelo seu baixo custo e pela reutilização da biomassa de bactérias, fungos, plantas e até cascas de frutos, sendo que após contaminada, também pode ser utilizada para fins não alimentares, como geração de energia (MÓDENES et al., 2013; FLECK et al., 2013).

Alguns autores explicam a eficiência dessa biomassa na bioissorção de metais pesados pela presença de diversos grupos funcionais na constituição desse tipo de material, como ligninas, celuloses, proteínas, que se ligam aos metais pesados, formando complexos que os imobilizam (PIETROBELLI et al., 2013; TAVARES, 2009; RODRIGUES et al., 2006). Vários fatores vão interferir nessa remoção dos metais da solução, onde se destaca: tipo, concentração e constituição da biomassa utilizada como bioissorvente, pH e força iônica da solução e tipo de cátion metálico a ser adsorvido.

Diferentes tipos de biomassa têm sido utilizados para remoção de metais pesados de soluções contaminadas, como casca de frutas (KELLY-VARGAS et al., 2012), fungos (MOHSENZADEH et al., 2014) e algas (LEE et al., 2011) e devido ao rápido crescimento e produção de biomassa das macrófitas aquáticas, muitos trabalhos tem sugerido a utilização da biomassa dessas plantas para bioissorção de metais pesados de corpos hídricos contaminados, além de ser uma forma útil de empregar essas plantas, que muitas vezes se destacam por causar prejuízos, sendo denominadas como plantas daninhas. YEH et al., (2011) verificaram que a biomassa de taboa e junco possui potencial para serem utilizadas como adsorvente dos metais Zn e Cu, demonstrando uma remoção desses elementos bastante rápida, na faixa de dez minutos. MÓDENES et al., (2009) constataram que a biomassa de Aguapé é um eficiente bioissorvente de zinco, em função do baixo tempo de equilíbrio, capacidade máxima de remoção similar ou superior a outros bioissorventes e elevada disponibilidade natural. MIRETZKY et al.,(2006) observaram que a biomassa das macrófitas *Lemna minor*, *Salvinia intermediaria* e *P. stratiotes* foram eficientes na remoção de chumbo e cádmio de soluções multielementares contaminadas, indicando a utilização dessas biomassas para o tratamento de efluentes industriais.

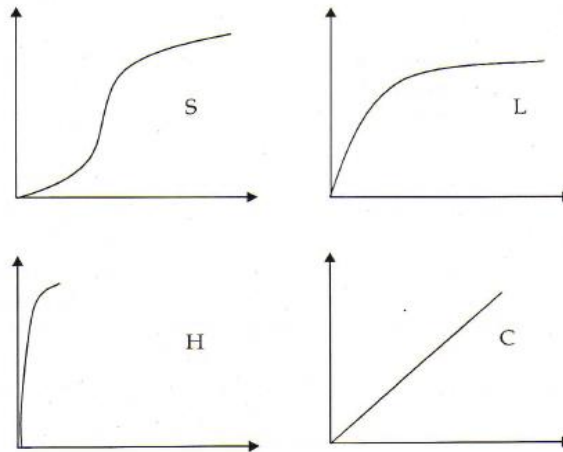
Um adsorvente qualquer em contato com fluido de constituição específica, após certo tempo atinge o equilíbrio. Neste cenário, a relação entre a quantidade adsorvida pelo adsorvente e a concentração do elemento no fluido em determinada temperatura, é conhecido como isoterma de adsorção. A isoterma pode estimar a quantidade máxima adsorvida pelo adsorvente, o modo de adsorção, a possibilidade de purificação da solução e a viabilidade do ponto de vista econômico para determinado caso em estudo (ALLEONI et al., 2009; VASQUES, 2008; SCHNEIDER, 1995).

A adsorção envolve três processos básicos: (i) reação do adsorvente com solução contendo adsorbato (composição conhecida) por algum tempo (temperatura e pressão constante); (ii) separação do adsorvente da fase fluida; e (iii) quantificação do adsorbato associado ao adsorvente e remanescente na solução (SPOSITO, 2008).

Os tipos de isotermas podem variar de acordo com o sólido adsorvente que vai determinar a relação entre o tamanho dos poros da superfície adsorvente com o diâmetro da molécula a ser adsorvida (adsorbato). Esses dados vão influenciar na saturação limite do adsorvente, que corresponde ao preenchimento máximo dos poros (VASQUES, 2008).

GILES et al., (1974) indicaram quatro tipos gerais de isotermas: tipo “S” (Sigmoidal), tipo “L” (Langmuir), tipo “H” (*High* = alta) e tipo “C” (partição constante), que foram esquematizados por ALLEONI et al., (2009) (Figura 1).





**Figura 1.** Tipos de isothermas de adsorção: S = sigmoidal; L = Langmuir; H = alta (*high*); C = partição constante. Fonte: Alleoni et al., (2009).

As isothermas Sigmoidais (“S”) resultam de no mínimo dois mecanismos opostos, como por exemplo, compostos orgânicos não polares que possuem baixa afinidade por argilas, mas à medida que sua superfície é encoberta por esses compostos, outras são adsorvidas mais facilmente, o que é conhecido por “adsorção cooperativa”. A isoterma do tipo Langmuir (“L”) apresentam uma progressiva saturação dos sítios de adsorção, atingindo um platô que representa a adsorção máxima do íon ou molécula pelo adsorvente. Isothermas *High* (= alta; tipo “H”) apresentam uma declividade acentuada no início da curva, indicando uma elevada afinidade entre adsorvente e o adsorbato. Finalmente, as isothermas do tipo partição constante (“C”) apresentam a relação entre a quantidade adsorvida do soluto e a quantidade remanescente na solução, após o equilíbrio, constante para qualquer concentração (ALLEONI et al., 2009).

A isoterma de adsorção é uma técnica útil para avaliar a retenção de metais, fornecendo dados importantes sobre o potencial de retenção e a força de ligação do adsorbato (MOREIRA et al., 2001). Geralmente, o equilíbrio de um íon entre a fase sólida e a líquida pode ser descrito em termos de um dos modelos convencionais (SCHNEIDER, 1995), dentre os dez modelos utilizados pelo software ISOFIT: Langmuir, Bet, Freundlich, Linear, Langmuir-Freundlich, Toth, Polany, Isothermas com particionamento linear (Langmuir, Freundlich e Polany) (MATOTT et al., 2008).

A isoterma de Langmuir admite que todos os sítios da superfície adsorvente possuem a mesma energia de adsorção, formando unicamente uma monocamada. A superfície adsorvente é considerada homogênea com energia de adsorção constante. As moléculas adsorvidas não interagem com outras, favorecendo o equilíbrio (ALLEONI et al., 2009; VASQUES, 2008; SCHNEIDER, 1995). BRAUNAUER et al., (1938), baseados na teoria de Langmuir, propuseram o modelo isotérmico BET (referente as iniciais dos autores), admitindo a hipótese que uma camada tenha habilidade de produzir sítios de adsorção, gerando deposição de uma camada sobre outra, sem limitações de quantidade, sendo que o número de sítios, assim como o tamanho da superfície é constante para cada camada (ERBIL, 2006). O modelo de isoterma proposto por Freundlich (1910) se baseia que a superfície do adsorvente é heterogênea, com sítios com energia de adsorção distintas, havendo possibilidade de formação de multicamadas sem previsão de saturação, porém com a diminuição da energia de adsorção à medida que a superfície vai sendo coberta pelo adsorbato (CARVALHO, 2015; SCHNEIDER, 1995).

O modelo Linear, ou Modelo do Coeficiente de Distribuição ( $K_d$ ) são obtidos quando as isotermas apresentam comportamento linear. Embora simples, por analisar somente uma variável ( $K_d$ ), este modelo permite estimar quantidades do metal dissolvida na solução e a previsão de sua mobilidade, assim como possíveis perdas por lixiviação (solo). Baixos valores de  $K_d$  indicam maior parte do adsorbato presente na solução, e os altos valores indicam grande afinidade do adsorvente pelo adsorbato (SOARES et al., 2006). O modelo de isoterma generalizado Langmuir-Freundlich une esses dois modelos na tentativa de representar melhor os dados obtidos. Permite variar a função de densidade para sistemas heterogêneos, utilizando um índice de heterogeneidade. Quando em baixas concentrações assume o comportamento do modelo Freundlich, considerando a adsorção em multicamadas, já em altas concentrações, se baseia no modelo de Langmuir, considerando um momento de saturação (DEBRASSI et al., 2011).

O modelo de Toth é proveniente do estudo de equilíbrio gás-sólido, porém tem sido estendido para o caso de equilíbrio sólido-líquido. É obtido por uma modificação da isoterma de Langmuir que pondera os efeitos da heterogeneidade do adsorvente (GALLON, 2011).

Outros modelos isotérmicos foram desenvolvidos e são propostos para melhor descrever as diferentes possíveis relações adsorbato x adsorvente. A biossorção de metais pesados por macrófitas aquáticas vem sendo demonstrada por alguns autores pela isoterma de Langmuir (VERMA et al., 2008; MIRETZKY et al., 2006), o que nos sugere uma alta afinidade dessa biomassa por esses elementos.

### 2.3 Fitorremediação de Metais Pesados

Os crescentes índices de contaminação do ambiente por metais pesados tem aumentado o interesse na busca por métodos de despoluir áreas contaminadas que sejam eficientes, simples e de baixo custo. Nesse sentido se destaca a biorremediação, por utilizar organismos vivos, como microrganismos e plantas com elevada habilidade para tal função (ANDREAZZA, 2013; COUTINHO et al., 2007; PIRES et al., 2003). Segundo os mesmos autores a fitorremediação tem sido a vertente mais estudada. Este termo combina duas palavras (“*fito*” de origem grega e “*remedium*” de origem latina) para significar “correção ou remoção de um mal” (ALI et al., 2013). Nessa técnica, são utilizadas plantas e sua microbiota e/ou amenizantes (matéria orgânica por exemplo), com finalidade de remover, imobilizar ou tornar os contaminantes menos tóxicos para o ambiente, além da possibilidade de empregar a biomassa contaminada em atividades rentáveis como produção de energia (PEUKE et al., 2005).

Algumas plantas são capazes de realizar a desintoxicação do meio onde são cultivadas, mantendo sua utilidade e fertilidade, além disso, podem melhorar a fertilidade do meio com o aporte de material orgânico. É considerada uma tecnologia relativamente recente, com as maiores pesquisas realizadas principalmente nas duas últimas décadas, com boa aceitação, pois pode ser aplicada em áreas de diferentes tamanhos onde outras técnicas de remediação são impraticáveis, apresenta baixo custo de instalação e manutenção, além de proteger contra erosão e lixiviação dos contaminantes (ALI et al., 2013). Vários estudos já comprovaram a eficiência de diferentes plantas nesse processo (PEREIRA et al., 2012; SANTOS et al., 2011; ROMEIRO et al., 2007; MOLINA, 2004; GRANT et al., 1998).

Segundo PILON-SMITS, (2005) a fitorremediação pode ocorrer de cinco diferentes maneiras, dependendo da planta utilizada e do mecanismo fisiológico desenvolvido por ela, podendo remediar ambientes contaminados através da fitoestabilização, fitodegradação, fitovolatilização, fitoestimulação e fitoextração.

Na fitoestabilização (ou também conhecido como fitoimobilização) as plantas desenvolvem mecanismos que tornam os contaminantes menos biodisponíveis no ambiente, através, por exemplo, de processos como a precipitação na rizosfera com a utilização de

agentes amenizantes (como a matéria orgânica) ou ligações covalentes irreversíveis, que evitam a dispersão dos poluentes por erosão ou lixiviação. A fitodegradação acontece, exclusivamente, com poluentes orgânicos, onde as plantas são capazes de degradar os contaminantes pela atuação de suas próprias enzimas que os mineraliza a compostos inorgânicos, como dióxido de carbono e água, que podem ser utilizados pela própria planta. Na fitovolatilização as plantas apresentam estratégias fisiológicas que permitem a absorção e incorporação do poluente e, posteriormente, sua eliminação por volatilização. Esse mecanismo pode ser utilizado para contaminantes orgânicos e alguns inorgânicos que também acontecem sob forma volátil, como mercúrio. O uso desse mecanismo é limitado e considerado o mais controverso por entender que ele não remove o contaminante completamente, mas somente transfere para outro segmento do ambiente. Na fitoestimulação, alguns microrganismos presentes na rizosfera da plantas conseguem degradar poluentes orgânicos. Esse processo se destaca pela habilidade em “decompor” compostos orgânicos hidrofóbicos que as plantas não podem absorver. Já na fitoextração (conhecida por alguns autores como fitoacumulação ou fitoabsorção), as plantas são capazes de extrair os contaminantes do ambiente onde são cultivadas por suas raízes, e acumular em seus tecidos (raiz e /ou parte aérea). As plantas que se destacam nesse processo são chamadas hiperacumuladoras, pois conseguem armazenar um ou mais elementos inorgânicos em quantidades cem vezes maiores que outras espécies cultivadas em mesmas condições (PILON-SMITS, 2005). Quando esse mecanismo de remediação acontece em ambiente aquático por plantas flutuantes (ou seja, não se fixam no sedimento de fundo), é denominado de rizofiltração, pois essas raízes conseguem impedir que os contaminantes dissolvidos atinjam águas subterrâneas e o sedimento (ALI et al., 2013).

A retirada total da planta (raiz + parte aérea) utilizada nesses processos em ambientes aquáticos contaminados representa a remoção do contaminante, sendo que a mesma pode ser utilizada para fins rentáveis, não alimentares, como utilização da biomassa para produção de energia, construção civil etc. As plantas com rápido desenvolvimento, elevada absorção de nutrientes e metais tóxicos e produção de biomassa se destacam nesse processo (ALI et al., 2013).

Para fitorremediação de corpos hídricos contaminados, são empregadas as macrófitas aquáticas, um grupo de vegetais que podem habitar desde brejos até áreas totalmente submersas. Em geral, essas plantas são originadas de ambientes terrestres, que ao longo de seu processo evolutivo colonizaram o ambiente aquático, o que a faz apresentar características vegetais dos dois ambientes e uma elevada capacidade de adaptação a diferentes características físicas e químicas, garantindo sua larga ocorrência (UFSCAR, 2010). Essas plantas desenvolvem um importante papel nos ecossistemas aquáticos, pois podem afetar as características químicas da água através da absorção de nutrientes e substâncias tóxicas, fornecem condições adequadas a alguns membros da fauna aquática, como artrópodes e moluscos, e funcionam também como a base alimentar desses organismos (BARRETO, 2011; AMARAL & BITTRICH, 2002).

Segundo BARRETO, (2011) as macrófitas se diferenciam quanto aos seus biótopos, podendo ser agrupadas em 5 diferentes grupos: Macrófitas aquáticas emersas – que vivem com suas raízes fixadas no sedimento de fundo, porém com as folhas fora da água. Ex.: gêneros: *Typha*, *Pontederia*, *Sagittaria*, *Polygonum*. Macrófitas aquáticas com folhas flutuantes – suas raízes são fixas no sedimento e folhas flutuando na superfície da água. Ex.: gêneros: *Nymphaea* e *Nymphoides*. Macrófitas aquáticas submersas enraizadas – enraizadas no sedimento com crescimento totalmente submerso na água. Ex.: gêneros: *Myriophyllum* e *Elodea*. Macrófitas aquáticas submersas livres – não se fixam no sedimento permanecendo submersa na água. Ex.: gênero: *Utricularia*. Macrófitas aquáticas flutuantes - flutuam na superfície da água, raízes livres, e na maioria das vezes submersas. Ex.: gêneros: *Eichhornia*,

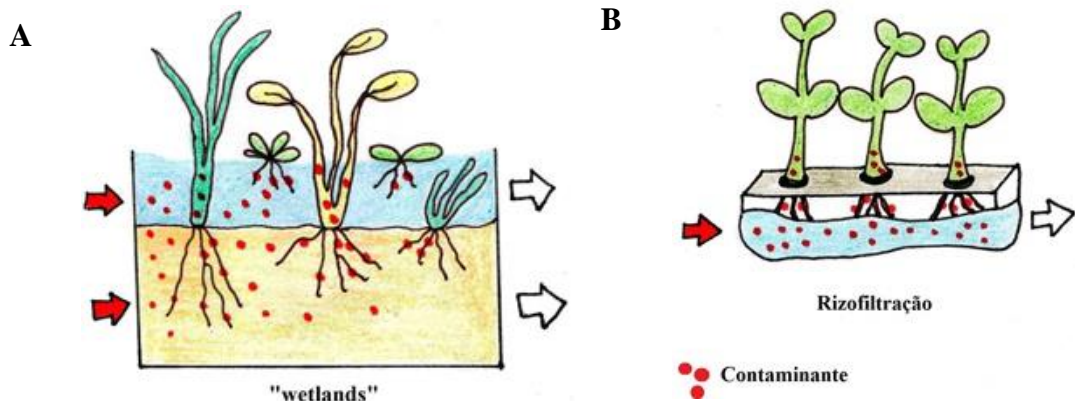
*Salvinia*, *Pistia*. Esses diferentes hábitos das macrófitas vão se relacionar com os locais de absorção do contaminante, uma vez que, a macrófita flutuante livre vai fazer a captação dos poluentes dissolvidos na água, enquanto as emergentes vão retirar do sedimento de fundo.

As macrófitas aquáticas têm sido apontadas por possuir certa tolerância aos metais pesados e capacidade de absorver e acumular quantidades várias vezes superior à quantidade do elemento na solução. Essa capacidade de absorção e a distribuição dos metais no corpo da planta são importantes pontos a serem considerados para o seu potencial uso na fitorremediação (BARRETO, 2011; RAI, 2008; ALVAREZ et al., 2002). Além dessas plantas apresentarem elevada taxa de crescimento, produção de biomassa e o fácil cultivo, a diversidade biológica que ocorre na rizosfera favorece os processos químicos e biológicos capazes de incrementar a remediação da água contaminada (HADAD et al., 2006). Várias pesquisas tem sido realizadas nessa área e muitas já comprovaram o potencial de diferentes macrófitas na remoção e acumulação de metais pesados, sugerindo a utilização dessas espécies na fitorremediação de ambientes aquáticos contaminados (JESUS et al., 2015; LADISLAS et al., 2013; BASILE et al., 2012; MISHRA & TRIPATHI, 2008).

As raízes das macrófitas, geralmente, constituem o principal órgão da planta envolvido na absorção, conseqüentemente, quase sempre, as maiores concentrações dos poluentes também são localizadas nesse órgão da planta. Porém, algumas plantas aquáticas, anatomicamente diferentes, são capazes de absorver elementos da solução pelas folhas e raízes (CAKMAK et al., 2000), facilitado pelo contato direto desse órgão com a solução contaminada em alguns grupos de macrófitas (como visto anteriormente), assim como já foi observado para *Salvinia auriculata* (OLIVEIRA et al., 2001).

Para fitorremediação de corpos hídricos tem sido sugerido a construção de “*wetlands*”, que se baseiam nas regiões alagadas, brejos e pântanos naturais, utilizando substrato como areia, cascalhos ou outro material inerte para receber efluentes e águas residuais contaminadas. Nessas construções, as águas são tratadas pelo cultivo de macrófitas com potencial para absorção e acumulação de elementos tóxicos, além de promover o desenvolvimento de microrganismos que favorecem esse processo e o sombreamento evitando a proliferação de algas (BARRETO, 2011). Diversos autores tem confirmado a eficiência, fácil operação e viabilidade econômica desse sistema para remediação de águas residuais contaminadas por metais pesados (LADISLAS et al., 2013; HADAD et al., 2006; WANG et al., 2002). Sistemas hidropônicos, ou rizofiltração, também vêm alcançando sucesso. Nesse sistema, as macrófitas são utilizadas como filtros que removem poluentes em zonas úmidas construídas ou em instalações e a remediação ocorrerá com a adsorção, absorção e acumulação ou precipitação dos contaminantes nas raízes, por processos bióticos ou abióticos. (GUIMARÃES, 2006).

Os sistemas de fitorremediação de ambientes aquáticos descritos anteriormente são esquematizados na Figura 2.



**Figura 2.** Diferentes tecnologias de fitorremediação têm sido empregadas para a limpeza de águas poluídas. Wetlands (A) e Rizofiltração (B). Fonte: CARVALHO, 2007.

#### 2.4 Alface-d'Água (*Pistia stratiotes*)

A *Pistia stratiotes*, é uma macrófita aquática flutuante, ou seja, independente do substrato, popularmente conhecida como Alface-d'água, Erva de Santa Luzia, golfo, Lentilha-da-água, Mururé-pajé” entre outros (Figura 3) (CORREA, 1931). É originária do continente Sul-Americano e rapidamente foi disseminada em diferentes lugares devido a aparência ornamental de sua folhagem (KISSMANN, 1997). Entretanto, tem se destacado pelos inúmeros problemas nos usos múltiplos dos cursos d'água, sendo considerada uma planta daninha por sua elevada taxa de crescimento, que muitas vezes causou o entupimento de tubulações e canais de irrigação, prejuízos a hidrelétricas, esportes náuticos, além da redução da biodiversidade (THOMAZ et al., 1999; ITAIPU BINACIONAL, 1997; MITCHELL et al., 1990).



**Figura 3.** *Pistia stratiotes* (Alface d'água). Fonte: GANNON, 2013

As plantas aquáticas tem se destacado pelo seu elevado potencial na fitorremediação de metais pesados, com alta capacidade de acumulação desses elementos devido a sua produção de biomassa e rápido crescimento (PRASAD, 2003). A Alface-d'água, além dessas características, apresenta uma rápida reprodução vegetativa através dos estolhos, o que favorece sua utilização para remediação de corpos hídricos contaminados.

Recentemente, alguns autores vêm comprovando a eficiência dessa planta tanto para bioissorção (VERMA et al., 2008; MIRETZKY et al., 2006), quanto na fitorremediação (DAS et al., 2014; LI et al., 2013; MUFARREGE et al., 2010; TEWARI et al., 2008) de metais pesados. POTT, (2002) cita a Alface-d'água como uma das macrófitas mais eficientes na depoluição de reservatórios aquáticos contaminados.

Estudos mais aprofundados sobre essa macrófita são requeridos, afim, não só, de confirmar o potencial bioissorção e a capacidade fitoextratora de metais pesados, mas entender o tempo gasto nesse processo, a capacidade de bioissorver e absorver cada elemento, as respostas fisiológicas desenvolvidas pela contaminação e mais, seguramente, poder indicá-la ou não para projetos de bioissorção e fitorremediação desses contaminantes.

A Alface-d'água é uma planta monocotiledônea da família Araceae, de porte herbáceo, sem caule aparente (acaule), que se reproduz sexuada e preferencialmente assexuadamente através de seus brotamentos laterais conhecido como estolhos, que soltam regularmente, de espaço a espaço, raízes para baixo e folhas para cima, aumentando rapidamente sua biomassa e área de ocupação (CÍCERO, 2007). Segundo o mesmo autor essa planta possui grande área de tecido fotossintético em relação ao seu tamanho, ocupando rapidamente os lugares com boa incidência de luz. Possui folhas grandes, organizadas em forma de roseta, que levam ao auto sombreamento, são sésseis, esponjosas, espatuladas-obtusas e coberta por pelos finos (pubescente). Emitem uma inflorescência pequena do tipo espádice que é cercada uma espata pilosa, conforme a família (OLIVEIRA, 2010). As raízes são longas e fibrosas (CRUZ, 2011).

GAINSBURY et al. (1975) comprovaram que a *Pistia stratiotes* tem um maior investimento em biomassa da parte aérea do que em raízes, o que proporciona uma elevada absorção e conversão da energia luminosa em química, proporcionando maior ganho de carbono e conseqüentemente maiores taxas de crescimento quando em comparado a espécies que tem maior investimento em tecidos não fotossintéticos como as raízes.

## **2.5 Respostas das Plantas à Contaminação por Metais Pesados**

As plantas desenvolvidas em um ambiente contaminado por metais pesados podem responder de diferentes formas a essa contaminação. Elas podem ser sensíveis, exibindo sintomas de toxicidade, ou tolerantes, desenvolvendo mecanismos que evitam os efeitos deletérios desses elementos e conseqüentemente permitindo o melhor desenvolvimento das plantas (LASAT, 2002).

### **2.5.1 Sensibilidade e sintomas de toxicidade de metais pesados nas plantas**

As plantas sensíveis à contaminação por metais pesados podem ser utilizadas como indicadores desse tipo de contaminação, uma vez que exibem sintomas de toxicidade, denunciando a presença desses elementos no ambiente.

A membrana plasmática é a primeira estrutura viva que pode ter sua função afetada pelos metais pesados, uma vez que é a primeira a estabelecer uma relação com esses contaminantes. Diversos estudos demonstraram aumento no extravasamento das células por danos causados à membrana plasmática pelos metais tóxicos (QUARTACCI et al., 2001). Esses danos podem ser conseqüência de diferentes processos, como as ligações com grupos sulfidríla das proteínas, peroxidação dos lipídeos, inativação de proteínas chave e mudanças

na composição e fluidez da membrana lipídica. Uma diminuição na fosforilação também pode ocorrer devido ao aumento da permeabilidade a prótons na membrana mitocondrial interna (GUIMARÃES et al., 2008).

Ao entrar na célula, um dos primeiros danos fisiológicos causados pelos metais pesados é a inativação de diversas enzimas citoplasmáticas (LASAT, 2002). Essa inativação pode resultar da ligação dos metais a grupos sulfidríla de proteínas, levando a inibição de suas funções normais, rompimento de sua estrutura ou deslocamento de um elemento essencial que acarretará em sintomas de deficiência (GUIMARÃES et al., 2008).

Outro importante efeito tóxico causado pelos metais pesados está relacionado ao estresse oxidativo. O excesso desses metais pode levar a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO), como hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), que em níveis elevados geram desequilíbrio e consequentemente o estresse (HALL, 2002). Vários estudos comprovam que esse estresse é capaz de causar alterações em proteínas nucleares e DNA, provocando a deterioração oxidativa das macromoléculas biológicas e a peroxidação de lipídeos das membranas (SOUZA et al., 2011). O estresse oxidativo também pode ser explicado pela redução da capacidade antioxidante, uma vez que os níveis de glutatona reduzida (GSH - um dos mais importantes antioxidantes dos vegetais) são diminuídos pela síntese de fitoquelatinas (induzida pelos altos níveis de metais pesados) e por sua ação quelante desses elementos (SANTOS et al., 2011).

A fotossíntese das plantas exposta a contaminação por metais pesados é também comprometida, uma vez que esses elementos podem reduzir os níveis de clorofila e carotenoides, pela inativação das enzimas responsáveis pela biossíntese desses pigmentos. Vários autores confirmaram a sensibilidade do aparato fotossintético aos metais pesados (SOUZA et al., 2009). Efeitos prejudiciais na cadeia transportadora de elétrons também são relatados, assim como inativação das enzimas do ciclo de Calvin e redução da condutância estomática (KÜPPER et al., 1999).

Alguns autores relataram também a interferência dos metais pesados no metabolismo de macro e micronutrientes, comprometendo, consequentemente, o crescimento das plantas (GOMES et al., 2011).

- **Pigmentos fotossintéticos**

Os pigmentos fotossintéticos se referem as clorofilas (“a” e “b”) e os carotenoides, localizados nos cloroplastos, mas especificamente na membrana dos tilacóides. Em geral, são responsáveis pela captação da energia luminosa utilizada na fotossíntese (CAMPOSTRINI, 1998).

As clorofilas são os pigmentos mais abundantes nos vegetais, são verdes e comuns a todas as células que realizam fotossíntese. A clorofila a (Chl a), conhecida como pigmento primário, atua na etapa fotoquímica da fotossíntese, absorvendo luz (fótons) e modificando temporariamente suas configurações eletrônicas, atingindo um estado mais alto de excitação energética, chamado de singlet 1. Essa excitação tem duração ultra breve, havendo a dissipação da energia de origem luminosa de três maneiras possíveis: dissipação fotoquímica, quando a energia é utilizada na etapa fotoquímica da fotossíntese; dissipação na forma de calor e fluorescência, comentada mais adiante (CAMPOSTRINI, 1998). A clorofila b (Chl b), assim como os carotenoides, são conhecidas como pigmentos acessórios e atua na ampliação do espectro de absorção dos pigmentos primários e também dissipam a energia excedente, fazendo fotoproteção do aparato fotossintético (DEMMIG-ADAMS et al., 1993). As clorofilas a e b segundo LICHTENTHALER et al., (1981) são sintetizadas na razão de aproximadamente 3 para 1 (clorofila a/clorofila b), o que pode variar de acordo com a maior ou menor exposição da planta a luminosidade (SEYBOLD et al., 1970).

Os carotenoides também são pigmentos naturais e podem ser encontrados em animais e microrganismos além das plantas. São altamente coloridos, variando do amarelo ao vermelho, responsáveis pela coloração de insetos, pássaros, peixes, crustáceos, além das folhas e flores (CARDOSO, 1997). Quando os carotenoides são constituídos somente por átomos de carbono e hidrogênio, são chamados carotenos, porém quando apresentam um heteroátomo, como por exemplo, o oxigênio, são conhecidos como xantofilas (IUPAC, 1975). A presença dos carotenoides nas células fotossintéticas tem sido relacionada com duas importantes funções: antenas auxiliares (ou pigmentos acessórios), que captam a energia luminosa em regiões do espectro, onde a clorofila não o faz eficientemente, e transferindo para pigmentos que a direcionam ao centro de reação, dando prosseguimento ao processo fotossintético. Os carotenoides atuam também como fotoprotetores do sistema fotossintético, relacionado a supressão dos estados “triplete” da clorofila, evitando a formação de oxigênio “singlete” e consequentemente a danificação, por reações de oxidação, do aparato fotossintético (CARDOSO, 1997).

A contaminação por metais pesados tem sido apontada por interferir diretamente no aparato fotossintético, principalmente na síntese dos pigmentos, que podem reduzir sua síntese devido a toxicidade ou ser tolerantes dependendo da espécie. Alguns autores relatam o incremento de clorofila b e carotenoides em ambientes contaminados por metais pesados, como uma resistência da plantas ao ambiente estressante (HOREMANS et al., 2015; SANTOS et al., 2011; TEWARI et al., 2008), de forma a incrementar a captação de energia luminosa e prevenir os danos pelas espécies reativas de oxigênio, no caso dos carotenoides.

- **Fluorescência transiente da clorofila a**

A fotossíntese é o principal processo fisiológico desenvolvido pelos vegetais. Sua importância se estende a todas as formas de vida, até a produção de fontes de energia como petróleo, gás e carvão natural são dependentes desse processo (KERBAUY, 2008). Nesse processo, as plantas convertem energia luminosa em energia química (ATP e NADPH), necessários para formação de compostos orgânicos ricos em energia, como os carboidratos, essenciais para manutenção e funcionamento do organismo como um todo (SOUSA, 2012; KERBAUY, 2008).

O processo fotossintético ocorre nos cloroplastos onde se localizam as clorofilas. Esse processo compreende duas etapas, a fotoquímica, responsável pela absorção e conversão de energia nas membranas dos tilacóides e a bioquímica, responsável pela carboxilação e formação dos carboidratos no estroma dos cloroplastos (SOUSA, 2012; STREIT et al., 2005).

Na fase fotoquímica, a energia luminosa é absorvida pelas clorofilas, que excitam seus elétrons e os transferem para os centros de reação (CR). São dois centros de reação, que absorvem a energia em faixas diferentes (680 e 700 nm), e se conectam pela ação dos transportadores de elétrons, que finalizam seu fluxo com a formação de energia química (SOUSA, 2012; KERBAUY, 2008; STREIT et al., 2005), que, posteriormente (fase bioquímica), serão utilizadas para formação dos carboidratos. Porém, em alguns momentos, como: excesso de radiação, danos a síntese de pigmentos ou outro tipo de estresse, a energia de excitação dos elétrons não é transferida para os centros de reação (não forma energia química - comprometimento do processo fotossintético), se dissipando na forma de calor ou de luz (fluorescência) (CAMPOSTRINI, 1998).

A fluorescência transiente da clorofila “a” é uma forma simples, rápida e não destrutiva, que permite analisar detalhadamente o funcionamento do aparato fotossintético, especialmente do fotossistema II (PSII) e consequentemente a eficiência fotoquímica e fotossintética da planta (STIRBET, 2011; GONÇALVES et al., 2010). O fluorômetro utilizado neste trabalho de tese induz a fluorescência por pulsos contínuos, e sua análise ao



longo do tempo permite o cálculo de parâmetros que vão caracterizar o desempenho do aparelho fotossintético. Nessa metodologia as plantas inicialmente, são expostas a um período de escuro e, posteriormente, submetidas a dois pulsos de luz saturante com espaços de tempo ultra curtos entre eles, que permite somente a reabertura dos centros de reação, redutores de  $Q_B$  (YUSUF et al., 2010; STRASSER et al., 2004), e o conhecimento do caminho percorrido pela radiação.

O Teste JIP, estabelecido por STRASSER et al., (1995), é uma forma quantitativa de se demonstrar as medidas da fluorescência transiente, de modo que permite quantificar a passagem de energia que atravessa os fotossistemas, analisando assim o desempenho fotossintético das plantas. Ele demonstra as possíveis alterações em cada ponto do aparato fotossintético (parâmetros – Tabela 3) (STIRBET, 2011; REDILLAS et al., 2011), possibilitando sua utilização para avaliar e identificar os efeitos causados pela contaminação por metais pesados.

Esse teste, comprovadamente, é uma ferramenta muito útil para verificar *in vivo* o desempenho do aparato fotossintético, em especial do fotossistema II (PSII), a vários fatores de estresse, pela conversão das alterações na cinética da fluorescência transiente em alterações quantitativas de vários parâmetros, como: densidade de centros de reação, oxidação e reoxidação da  $Q_A$  (plastoquinona), rendimento quântico fotoquímico e rendimento do transporte de elétrons, eficiência que éxciton move um elétron dentro da cadeia transportadora, entre outros (Tabela 3).

Essa análise, apesar de não ser conhecida sua utilização nessa área, pode favorecer o maior entendimento dos efeitos da contaminação por metais pesados nas plantas e auxiliar na indicação de espécies a serem utilizadas na fitorremediação de áreas contaminadas, uma vez que, é capaz de demonstrar efeitos tóxicos que comprometem o desenvolvimento da planta e não são percebidos visualmente.

## **2.5.2 Tolerância das plantas a metais pesados**

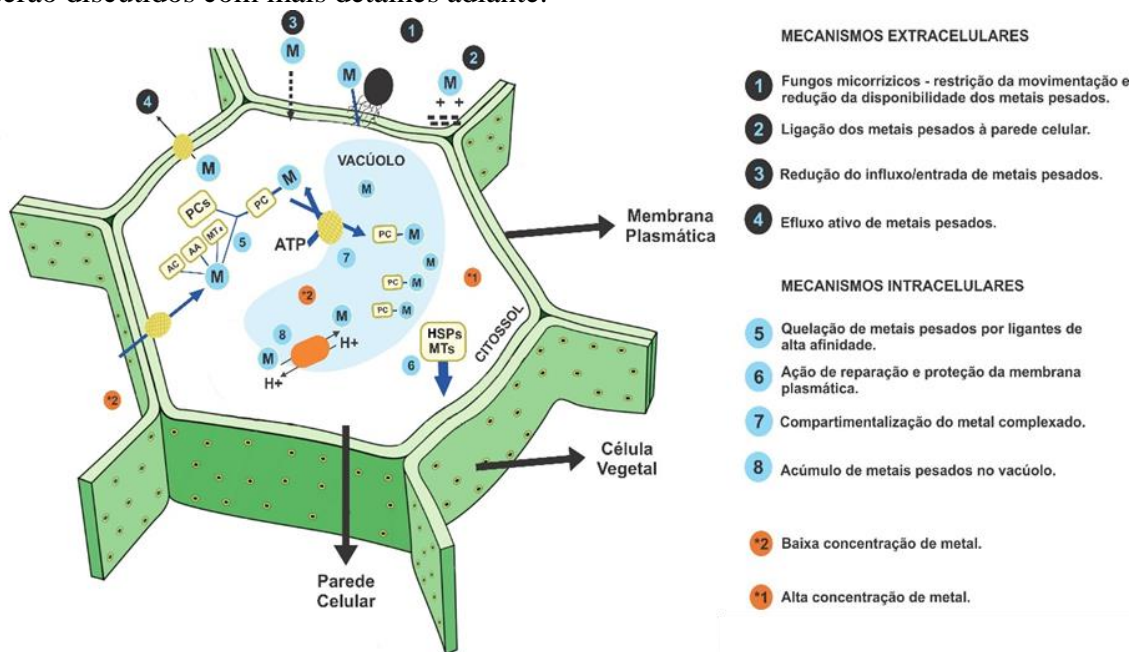
Como visto anteriormente, os metais pesados interferem, prejudicialmente, no crescimento, distribuição e no ciclo biológico das espécies vegetais, o que faz necessário a busca por plantas que apresentem mecanismos de tolerância para utilização em áreas contaminadas e sirvam de alternativa para remediação ambiental (SOUZA et al., 2011).

A tolerância a metais pesados é detectada quando uma planta é capaz de sobreviver em um ambiente com elevadas concentrações desses elementos, onde outras plantas não conseguiriam devido aos seus efeitos tóxicos (HALL, 2002). Essa capacidade pode ser adquirida ao longo do tempo, com o desenvolvimento de mecanismos de adaptação às condições estressantes do meio. Uma mesma planta pode apresentar diferentes formas de suportar a contaminação, sendo que as respostas podem variar de acordo com as características de cada espécie, com os elementos causadores do estresse e as condições específicas da área (SOUZA et al., 2011).

As plantas podem estabelecer estratégias intra ou extracelulares para inibirem os efeitos prejudiciais dos metais pesados em seus tecidos (Figura 4). Os mecanismos extracelulares (Figura 5) compreendem, entre outros, os exsudados radiculares, que alteram o pH da rizosfera e conseqüentemente a especiação dos metais, favorecendo a ligação dos íons nas paredes das células. Incluem também o papel das micorrizas na retenção dos metais no micélio, da parede celular e membrana plasmática que podem, além de reduzir a absorção (exclusão), estimular o bombeamento dos metais presentes no citossol (MIRZA et al., 2014; HALL, 2002).

Os mecanismos intracelulares (Figura 8) estão associados a mecanismos potenciais de reparação de proteínas comprometidas pelos efeitos da contaminação, quelação dos metais por ligantes de alta afinidade e o transporte e compartimentalização desses elementos no

vacúolo, que os distancia das atividades metabólicas das células (MIRZA et al., 2014; SOUZA et al., 2011). Esses diferentes processos estão apresentados resumidamente na Figura 4 e serão discutidos com mais detalhes adiante.



**Figura 4.** Resumo dos mecanismos celulares com potencial para a detoxificação de metais pesados. Fonte: (RODRIGUES et al., 2016).

### 2.5.3 Mecanismos extracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados

A Figura 5 mostra os principais mecanismos extracelulares que conferem às plantas tolerância aos metais pesados.

- **Mecanismos de imobilização de metais**

Os fungos micorrízicos, mesmo não sendo sempre considerados como um dos mecanismos de tolerância a metais pesados, contribuem para a redução da disponibilidade desses elementos e de seus efeitos tóxicos (SOUZA et al., 2011). Esses fungos favorecem a tolerância das plantas aos metais pesados, atuando como agentes de proteção das mesmas. As estratégias empregadas por eles para o aumento dessa tolerância ainda não foram suficientemente elucidadas, mas, alguns autores confirmaram o seu potencial de retenção dos metais no micélio e redução da disponibilidade para absorção, o que pode ser variável de acordo com o metal e as espécies fúngicas (CABRAL et al., 2010) (Figura 5). Alguns estudos também apontaram o aumento da absorção de metais pesados pelas plantas associadas aos fungos micorrízicos, favorecendo a fitorremediação, o que pode ocorrer pelas diferenças de espécies e do hospedeiro (ALEXANDRE et al., 2012). Os mecanismos usados pelos fungos para tolerar os metais pesados são similares aos utilizados pelos vegetais e incluem ligação a materiais extracelulares (como exsudados fúngicos) e compartimentalização no vacúolo (HALL, 2002).

A parede celular das células das raízes mantém um contato direto com os metais pesados e sua ligação com esses elementos tem sido estudada como uma das formas de tolerância a esse contaminante pelas plantas (HALL, 2002) (Figura 5). Essa ligação é explicada pela presença de microporos em sua estrutura, que são carregados negativamente devido à presença de grupos carboxílicos, e funcionam como locais de ligação e troca de cátions (forma de muitos metais pesados) (MIRZA et al., 2014). Um aumento na espessura

da parede das células dos tecidos radiculares foi observado como resposta à contaminação. Nesse caso, a planta aumenta sua capacidade de filtro, pois aumenta suas cargas negativas e protege os tecidos internos dos efeitos danosos dos metais pesados. Várias pesquisas apontam a endoderme e exoderme como as principais barreiras e locais de retenção dos metais pesados nas raízes das plantas, minimizando a translocação desses íons e favorecendo a tolerância a esse estresse (GOMES et al., 2011).

- **Influxo/entrada/absorção de metais pesados**

Algumas plantas cultivadas em ambientes contaminados por metais pesados, podem reduzir a síntese dos transportadores de membranas desses elementos nas células das raízes, afim de suprimir sua absorção e conseqüentemente seus efeitos tóxicos, porém, mantendo os níveis de contaminação do ambiente (exclusoras, comentado a seguir) (Figura 5). Outras, porém, podem incrementar a síntese desses transportadores com objetivo de potencializar sua capacidade de absorção, acumulação e armazenamento, demonstrando sua tolerância a esses elementos e favorecendo os processos de fitoextração do ambiente (SANTOS, 2012).

Nos últimos anos, com uso da genética molecular, uma variedade de genes de famílias de transportadores de metais pesados foram identificadas em plantas, incluindo ATPases, Nramps, os facilitadores de difusão de cátions (CDF) e a família ZIP. Porém, a confirmação de sua localização nas plantas ainda é deficiente. A necessidade dessa variedade de tipos de transportadores fica clara devido a necessidade de proporcionar sistemas de alta e baixa afinidade para os diferentes níveis de contaminação do meio, para cumprir os requisitos específicos no transporte nas membranas celulares e nas organelas, e para responder à variadas condições de estresse (HALL, 2003).

A família ZIP recebeu esse nome pelos primeiros membros a serem identificados, ZRT (transportador regulado por zinco) e IRT (transportador regulado por ferro). ZRT1 e ZRT2 foram identificados como transportadores de zinco de alta e baixa afinidade em leveduras (GUERINOT, 2000). Os transportadores da família ZIP tem sido apontados por intermediar a absorção de ferro (Fe) e zinco (Zn), sendo que alguns transportadores dessa família não são específicos para um único metal, podendo transportar metais diferentes, com diferentes afinidades, como por exemplo, AtIRT1 tem sido identificado como mediador de vários íons metálicos bivalentes, como: cádmio (Cd), Manganês (Mn), Cobalto (Co) e Zn (PLAZA et al., 2007; GUERINOT, 2000). PENCE et al., (2000), isolou o primeiro gene TcZNT1 a partir de *Thlaspi caerulescens*, sendo relacionado com o transporte de alta afinidade de Zn (disponível em baixas concentrações) e baixa afinidade de Cd (disponível em altas concentrações).

Plantas hiperacumuladoras de metais pesados têm sido relacionadas com a maior expressão dos transportadores da família ZIP, que influencia também na maior velocidade de absorção desses elementos ( $V_{max}$ ) por essas plantas. A diferença no  $K_m$  (constante de afinidade de Michaelis-Mentem) de plantas hiperacumuladoras e não hiperacumuladoras não foi significativa, evidenciando o maior efeito da expressão dos transportadores do que de sua afinidade pelo elemento, na acumulação de metais pesados (PENCE et al., 2000).

A maior expressão desses transportadores, levando a maior velocidade de absorção dos metais pesados, ou seja, influenciando na cinética de absorção desses elementos, favorece o potencial exibido pela planta em fitorremediar ambientes contaminados. Os dados da velocidade de absorção auxiliam na projeção e manutenção dessa técnica. Estudos nessa área são sugeridos para identificação e indicação de plantas para utilização na remediação de áreas contaminadas por metais pesados.

- **Mecanismos de exclusão de metais (prevenção)**

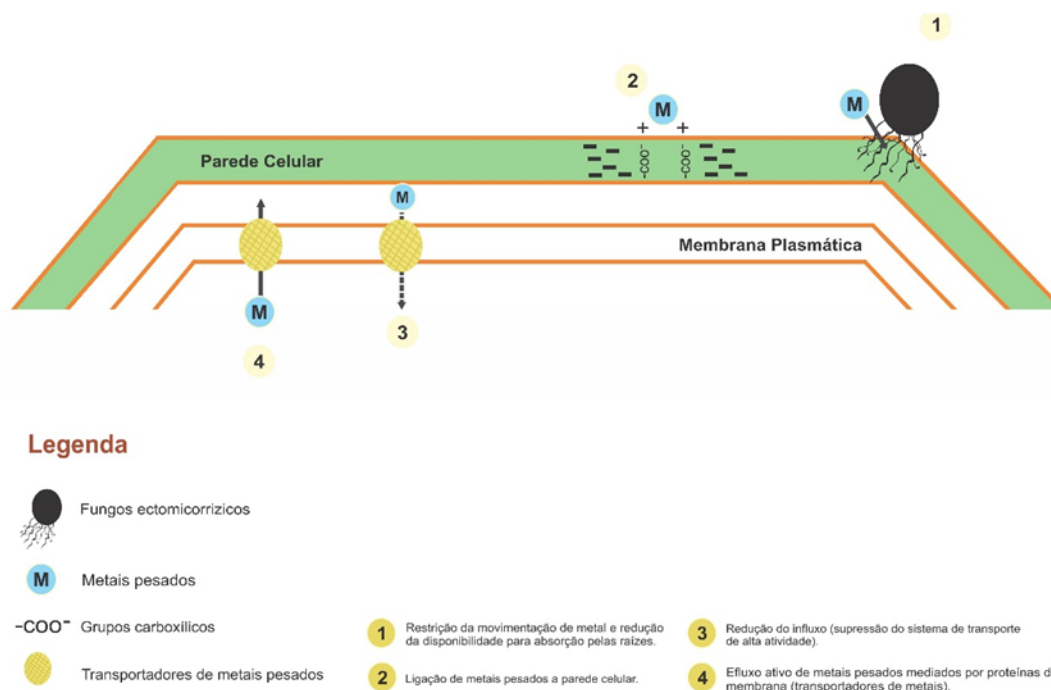
Nas plantas exclusoras, a absorção dos metais pesados é restringida devido a retenção pelas raízes, o que pode evitar a dispersão da contaminação no meio e prevenir o

aparecimento de seus efeitos tóxicos, principalmente, no aparato fotossintético na parte aérea das plantas (GOMES et al., 2011) (Figura 5).

Os exsudatos radiculares podem assumir uma variedade de papéis, uma vez que possuem uma gama de compostos em sua constituição, sendo os ácidos de baixo peso molecular os mais relatados para tolerância a metais. Eles podem complexar os cátions metálicos e diminuir a atividade extracelular desses elementos, reduzindo sua disponibilidade e aumentando a resistência das plantas a esses contaminantes (SOUZA et al., 2011).

A membrana plasmática pode ter suas funções rapidamente comprometidas pelos efeitos tóxicos dos metais pesados (explicado anteriormente). No entanto, membranas de plantas tolerantes são capazes de prevenir e reduzir sua entrada na célula ou excluir os metais que já foram absorvidos (LASAT, 2002). A entrada dos íons metálicos nas células é mediada por proteínas de membranas (transportadores) e a tolerância aos metais é explicada pela supressão do sistema de transporte de alta afinidade, reduzindo a absorção (HALL, 2002).

O efluxo ativo de metais pesados das células é a base da tolerância a esses contaminantes em bactérias. Muitos autores sugerem a existência desse mecanismo também nas plantas, devido às várias classes de transportadores de metais existentes, os quais podem estar envolvidos na homeostase em geral e conseqüentemente na tolerância aos metais pesados (WILLIAMS et al., 2000). Mais evidências sobre o funcionamento desse mecanismo em plantas ainda devem ser avaliadas.

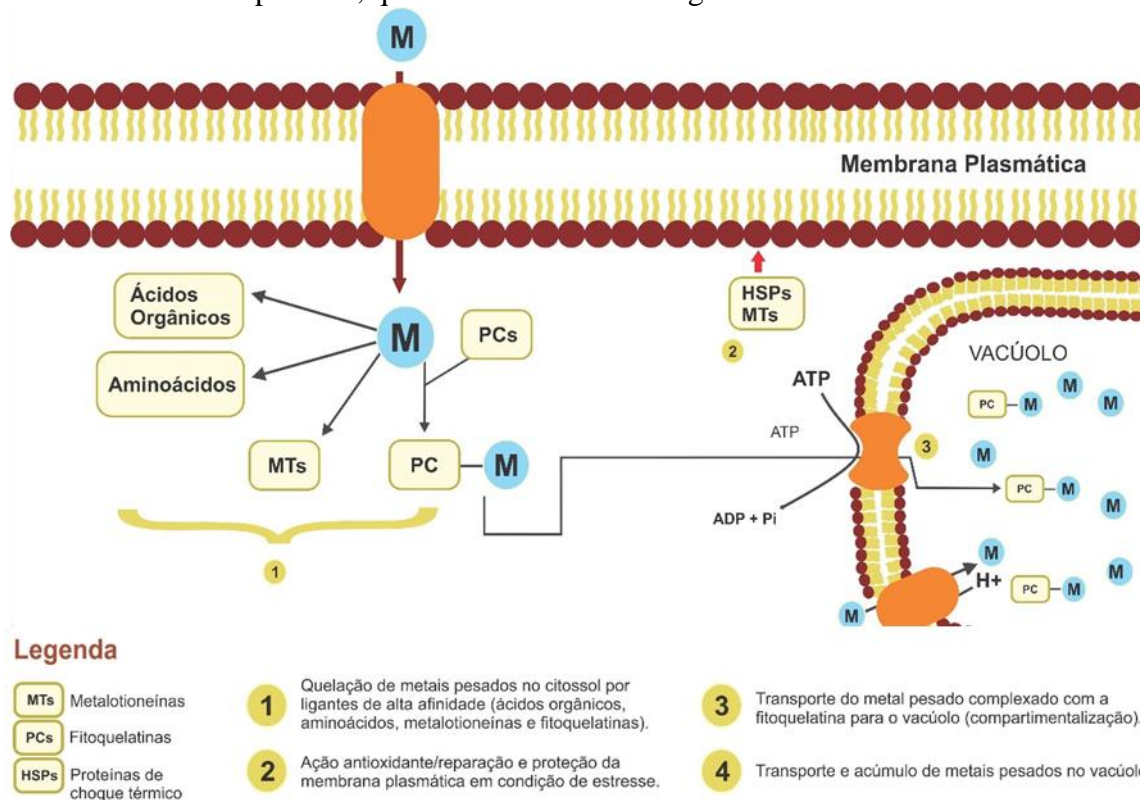


**Figura 5.** Ilustração dos mecanismos extracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados. Fonte: (RODRIGUES et al., 2016).

#### 2.5.4 Mecanismos intracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados

Na desintoxicação, os metais são absorvidos e armazenados nas plantas, porém, ocorrem processos fisiológicos que permitem essa acumulação sem o desenvolvimento de sintomas de toxicidade e comprometimento do crescimento e desenvolvimento do vegetal. Situações extremas ocorrem quando os níveis de absorção e acúmulo desses elementos são muito elevados, o que acontece nas plantas chamadas hiperacumuladoras (CASTRO et al.,

2013). A Figura 6 mostra, os principais mecanismos intracelulares que conferem às plantas tolerância aos metais pesados, que serão discutidos a seguir.



**Figura 6.** Ilustração dos mecanismos intracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados. Fonte: (RODRIGUES et al., 2016).

- **Mecanismo de reparação de danos**

As proteínas de choque térmico (HSPs - "*Heatshockproteins*") podem ser encontradas em todos os organismos vivos, como resposta, principalmente, ao estresse por temperatura. Contudo, sua expressão pode estar relacionada a outros estresses, como os causados por metais pesados, com papel na preservação da sobrevivência celular sob condições ambientais adversas (HALL, 2002). Vários relatos demonstraram também a atuação das proteínas de choque térmico na conservação e proteção das membranas plasmáticas contra os efeitos da contaminação, aumentando a tolerância das plantas a esses elementos (CASTRO et al., 2013).

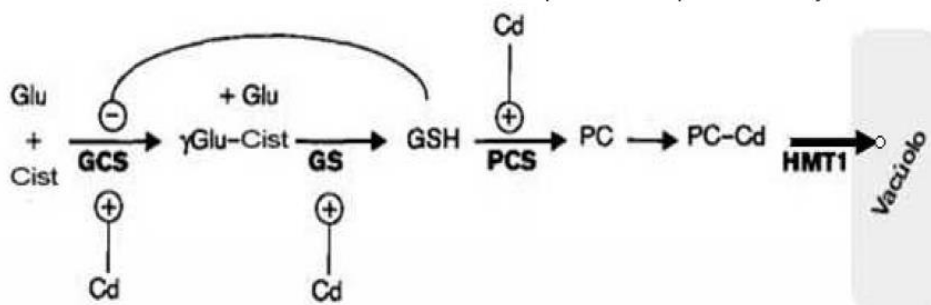
- **Mecanismos de quelação (complexação) de metais**

A quelação de metais pesados é um mecanismo muito importante de desintoxicação e tolerância a esses elementos, pois eles estão envolvidos por ligantes de alta afinidade como aminoácidos, ácidos orgânicos e peptídeos como as fitoquelatinas e metalotioneínas (SANTOS et al., 2011). A ligação dos metais com esses quelantes contribui para a redução desses elementos no citosol, reduzindo sua reatividade, solubilidade e consequentemente o aparecimento de seus efeitos tóxicos nas plantas (SOUZA et al., 2011).

As fitoquelatinas (Phytochelatin - PCs) são uma família de peptídeos tiólicos complexantes de metais, principalmente de cádmio (Cd), que têm um papel importante no processo de desintoxicação desses íons nas plantas. Sua síntese é ativada rapidamente na presença dos metais pesados, sendo enzimaticamente produzidas utilizando a glutathione (GSH) como substrato (SANTOS et al., 2011). Os metais quando complexados com as fitoquelatinas são incapazes de provocar danos às plantas, favorecendo assim sua tolerância

(MIRZA et al., 2014). Estes peptídeos também são relacionados com outras funções importantes, incluindo a homeostase essencial de metais, metabolismo do enxofre e até como antioxidantes, que igualmente podem favorecer o aumento da tolerância aos metais pesados (HALL, 2002). As fitoquelatinas formam seus complexos mais estáveis com Cd (Figura 7), pela sua elevada afinidade ao enxofre, porém não está relacionada somente com esse elemento. Estudos demonstram que os metais induzem a síntese de PC na seguinte ordem de afinidade  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Sb^{3+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $As^{5-}$ ,  $Cu^+$ ,  $Sn^{2+}$ ,  $Au^{3+}$ ,  $Bi^{3+}$  (SOUZA et al., 2011).

Após a complexação dos metais, o complexo fitoquelatina-metal é transportado ao vacúolo para ser armazenado e compartimentalizado (MIRZA et al., 2014).



**Figura 7.** Representação da quelação de Cd e dos processos envolvidos na síntese de fitoquelatinas. Sinais negativos e positivos indicam a inativação ou ativação da atividade enzimática respectivamente. Glu: glutamato; Cist: cisteína; GCS: sintetase da  $\gamma$ - glutamil-cisteína; GS: sintetase da glutatona; GSH: glutatona reduzida; Cd: cádmio; PCS: síntese da fitoquelatina; PC: fitoquelatina; PC-Cd: complexo fitoquelatina-cádmio; HMT1: transportador vacuolar. Fonte: Adaptado de GUIMARÃES et al. (2008)

As metalotioneínas (*metallothioneins* - MTs) são uma família de proteínas ricas em cisteína, produzidas com a finalidade de se ligar a metais pesados e prevenir assim seus sintomas prejudiciais. Elas constituem, assim como as fitoquelatinas, um importante mecanismo de resistência a essa contaminação (ANDREAZZA, 2013). As MTs podem ser encontradas em animais, microrganismos e nas plantas, sendo induzidas pela presença de metais pesados, principalmente cobre, zinco e cádmio (SILVA, 2014). Alternativamente, outros papéis podem estar relacionados com as metalotioneínas, como antioxidantes ou reparação de membranas (HALL, 2002).

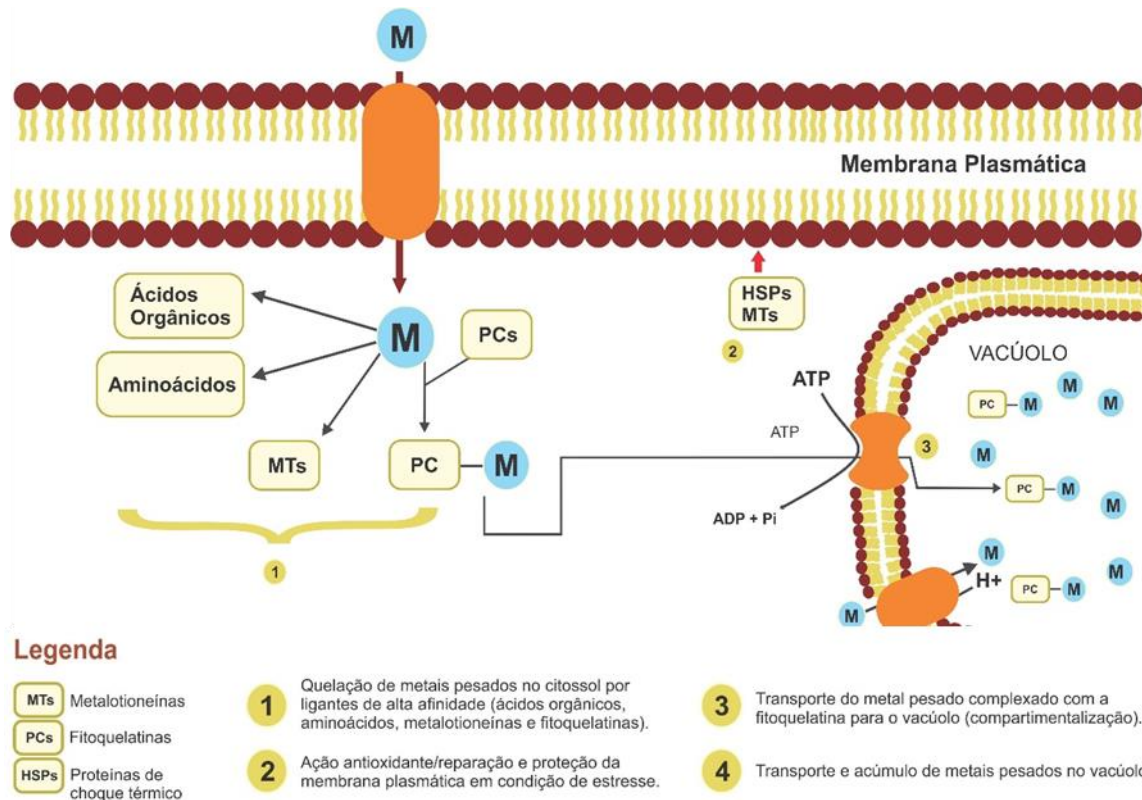
Ácidos orgânicos, como ácido cítrico e málico, e aminoácidos, como histidina, também são apontados como ligantes de metais pesados, reduzindo sua toxicidade e exercendo papel significativo na tolerância e desintoxicação desses elementos (SOUZA et al., 2011).

- **Mecanismo de compartimentalização de metais**

A compartimentalização de metais está associada ao mecanismo de quelação, de modo que, após eles serem ligados com os quelantes inibindo seus efeitos tóxicos, são transportados para estruturas subcelulares como o vacúolo, para sua acumulação e conseqüente redução desses contaminantes no citossol. Por esses motivos, a compartimentalização de metais pesados no vacúolo tem sido apontada por diversos autores como um dos mecanismos mais importantes para tolerância a esses elementos (HALL, 2002).

Vários relatos já comprovaram o acúmulo de Cd associado a PCs no vacúolo celular, através do sistema de transporte do tonoplasto, sugerindo que o tonoplasto exerça um papel importante nessa tolerância, com a superexpressão de transportadores nas membranas de plantas tolerantes. SANTOS et al., (2011), também relataram estudos que identificaram os

transportadores associados a esse mecanismo de tolerância em algumas plantas, assim como seus genes codificadores, e explica que o transporte pelo tonoplasto não está somente associado a presença dos quelantes, mas também do íon isolado.



**Figura 8.** Ilustração dos mecanismos intracelulares de tolerância das plantas aos metais pesados. Fonte: (RODRIGUES et al., 2016).

### **3 CAPÍTULO I**

## **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE BIOSSORÇÃO DE METAIS PESADOS PELA BIOMASSA SECA DE ALFACE D'ÁGUA (*Pistia stratiotes*)**



### 3.1 RESUMO

Com o objetivo de avaliar o potencial da biomassa seca da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) na biossorção de metais pesados presentes em soluções contaminadas, foram realizados ensaios de isotermas de adsorção em laboratório, onde um grama de biomassa seca dessa planta foi colocado em contato com 5 doses crescentes de zinco (Zn) (1,8; 18; 50; 79 e 105 mg L<sup>-1</sup>) e 4 doses de cádmio (Cd) (0,01; 0,1; 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>), em nove diferentes tempos (1,3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas). Em cada coleta, biomassa seca e solução contaminada foram separadas e determinados os teores de Zn e Cd por espectrofotometria de absorção atômica. A biomassa utilizada como testemunha e na maior dose e tempo de contato, foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) para observação das alterações provocadas pela contaminação na morfologia de superfície da mesma. Os dados obtidos no maior tempo de contato entre a solução contaminada e a biomassa da Alface d'água, foram utilizados como entrada no programa ISOFIT para identificação do modelo de isoterma que melhor se ajustava a biossorção de Zn e Cd. Os resultados demonstraram redução superior a 70% na concentração dos metais analisados na solução contaminada. O modelo de isoterma que mais se ajustou a biossorção dos metais pesados pela Alface-d'água, foi o linear, pois apresentou o menor valor de AICc e valor de AICw mais próximo de um. Apesar do modelo Langmuir Partition ser considerado igualmente semelhante pela avaliação de  $\Delta AIC$ , o modelo linear foi o selecionado por ser comparativamente o modelo mais simples, avaliando apenas uma variável. Este modelo indica uma alta afinidade do biossorvente pelos adsorbatos Zn e Cd, demonstrando assim, a alta eficiência da biomassa seca da Alface-d'água na biossorção dos metais estudados e conseqüentemente na remediação de soluções contaminadas. As imagens obtidas por MEV demonstraram alterações na morfologia da biomassa contaminada, evidenciando os mecanismos de biossorção, o que confirma o potencial da biomassa dessa planta para utilização na remediação de soluções contaminadas com Zn e Cd.

**Palavras chave:** Macrófita. Remediação. Contaminação. Isotermas de adsorção. MEV.

### 3.2 ABSTRACT

In order to evaluate the potential of dry biomass of Water Lettuce (*Pistia stratiotes*) in biosorption of heavy metals from contaminated solutions, adsorption isotherms tests were performed in the laboratory. Was used one gram of dry biomass of this plant was placed in contact with 5 increasing doses of zinc (Zn) (1.8; 18, 50, 79 and 105 mg L<sup>-1</sup>) and 4 doses cadmium (Cd) (0.01, 0.1, 1 and 10 mg L<sup>-1</sup>) in nine different times (1, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60 and 72 hours). In each collection, dry biomass and contaminated solution were separated and determined Zn and Cd content by atomic absorption spectrophotometry. The biomass used as a witness and at the highest dose and contact time, were taken by scanning electron microscope (SEM) to observe the changes caused by contamination in the surface morphology of the same. Data from the highest contact time between the contaminated solution and the biomass of water Lettuce were used as input in ISOFIT program to identify the isotherm model that best fit the biosorption of Zn and Cd. The results showed greater reduction 70% in the concentration of metals analyzed in the contaminated solution. The isotherm model that set the biosorption of heavy metals by Water Lettuce was linear, as it showed the lowest value of AIC and AICw value close to one. Despite the Langmuir Partition model is also considered similar by evaluating  $\Delta AIC$ , the linear model was selected because it is comparatively the simplest model, evaluating only one variable. This model indicates a high affinity of the biosorbent for the adsorbates Zn and Cd, thus demonstrating the high efficiency of the dry biomass of Water Lettuce in biosorption of metals studied and consequently the remediation of contaminated solutions. Images obtained by SEM showed changes in the morphology of the contaminated biomass, showing the biosorption mechanisms, which confirms the potential of this plant biomass for use in the remediation of contaminated solutions with Zn and Cd.

**Key words:** Macrophyte. Remediation. Contamination. Adsorption isotherms. SEM.

### 3.3 INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural essencial a todos os seres vivos. Ela é componente principal do organismo humano, é essencial para produção de alimentos, produção de energia e várias outras atividades. No entanto, o desenvolvimento e rápido crescimento da população mundial têm provocado efeitos nocivos na qualidade e na quantidade de água disponível em várias partes do mundo. O Brasil tem vivido uma importante crise no abastecimento de água, levando a grande preocupação do governo e da população em preservar e recuperar a qualidade dos corpos hídricos, visto que tanto a disponibilidade de água para consumo, como também a queda na produção de alimentos e o surgimento de doenças, são consequências da crise hídrica.

A contaminação de ambientes aquáticos por metais pesados é uma das mais ameaçadoras, uma vez que esses elementos, diferentes dos poluentes orgânicos, persistem por muitos anos em compartimentos aquáticos: sedimentos de fundo; em suspensão; em plantas, e peixes (PIO et al., 2013).

A biossorção, também chamada de “bioadsorção”, é uma técnica que utiliza a biomassa de bactérias, fungos, plantas e até cascas de frutos, para remoção de metais pesados de soluções contaminadas (MÓDENES et al., 2013). Esse processo vem se destacando pela eficiência na remoção de metais por possuir baixo custo e ter a possibilidade de reutilização da biomassa para fins não alimentares, como geração de energia (FLECK et al., 2013).

Alguns autores já testaram e comprovaram a eficiência dessa técnica na remoção de metais pesados, utilizando diferentes materiais como biossorvente. LEE et al., (2011) encontraram elevado potencial biossorvente de chumbo (Pb) e cobre (Cu) em algas *Spirogyra spp.*, e *Cladophora spp.* YEH et al., (2011) avaliam a biomassa colhida do cultivo de girassol, couve chinesa, taboa e junco e comprovaram o potencial dessas biomassas para ser utilizado como biossorbentes dos metais Cu e Zn de soluções contaminadas. Os autores também observaram que a capacidade de adsorção das quatro biomassas pode ser demonstrada pelo modelo de adsorção de Langmuir. KELLY-VARGAS et al., (2012) evidenciaram o potencial biossorvente de Pb, cádmio (Cd) e Cu por resíduos de frutas (banana, limão e laranja). MOHSENZADEH et al., (2014) verificaram elevada capacidade de biossorção de Cd presente em soluções aquosas contaminadas, por espécies de *Trichoderma*.

As macrófitas também têm sido estudadas e sugeridas como alternativa para utilização nesse processo. Elas se destacam devido ao seu rápido crescimento e elevada produção de biomassa. VERMA et al., (2008) observaram que a biomassa da macrófita *V. spiralis* possui capacidade de sorção dos metais Cd, Pb e Zn de soluções aquosas, sendo que para Cd a capacidade de remoção ultrapassa a 98%. Os autores afirmam que esse potencial é o maior já relatado na literatura e que a troca iônica é o principal mecanismo envolvido nesse processo. MIRETZKY et al., (2006), avaliaram o processo de remoção simultânea dos metais Pb, Níquel (Ni), Cd, Cu e Zn pelas macrófitas *Spirodela intermedia*, *Lemna minor* e *Pistia stratiotes* e observaram que Pb e Cd foram, eficientemente, removidos da solução contaminada pela biomassa das três espécies testadas, apesar da presença de outros metais na solução que competiram pelo número limitado de sítios de ligação na superfície da biomassa. MÓDENES et al. (2013) confirmam o potencial de biossorção de metais pesados e indicam a utilização da macrófita *E. crassipes* em processos de tratamento de águas residuárias contaminadas.

A Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) é considerada como “planta daninha” por diversos autores devido ao seu rápido crescimento vegetativo, podendo acarretar prejuízos aos múltiplos usos dos recursos hídricos, tais como: obstrução de canais de irrigação e drenagem; prejuízo à navegação e atividades aquáticas de recreação; redução da capacidade de geração de energia; comprometimento da atividade pesqueira, e a proliferação de vetores de doenças

(POTT, 2002). A utilização da sua biomassa na remoção de metais pesados de ambientes aquáticos contaminados pode ser considerada como uma forma benéfica de utilização dessa planta e a solução para os problemas descritos anteriormente.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da biomassa seca da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) na bioabsorção dos metais pesados zinco e cádmio, presentes em soluções contaminadas.

### 3.4 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.4.1 Coleta das plantas

A Alface d'água (*Pistia stratiotes*) foi coletada no reservatório de Vigário, dentro de uma propriedade particular pertencente à LIGHT, no município de Pirai – RJ (22°38'58.65"S de Latitude e 43°53'33.39" O de Longitude) (Figura 9). O ponto de coleta estava distante do canal principal do fluxo d'água, onde se formava um remanso, facilitando o acúmulo deste tipo de vegetação.



**Figura 9.** Local de coleta da Alface d'água. Fonte: Google Maps

Após a coleta as macrófitas foram lavadas em água comum e em seguida com água deionizada. Posteriormente foram secas em temperatura ambiente, para retirada do excesso de umidade e depois levadas à estufa de circulação forçada de ar a 65°C até atingirem peso constante. Essas plantas foram trituradas em moinho para aumento da superfície específica e consequente aumento da área exposta à solução contaminada por metais pesados.

#### 3.4.2 Instalação do experimento:

O experimento foi realizado em potes plásticos com capacidade de 100 mL, sendo adicionados em cada frasco 50 mL da solução contaminada, a pH 5,5. Um grama de biomassa seca e triturada de Alface d'água foi acondicionado em “sachês” confeccionados com tecido de poliéster e colocados em contato com a solução contaminada. As amostras foram submetidas a agitação durante todo o período avaliado, garantindo que toda solução entrasse em contato com a biomassa da planta, em temperatura ambiente.

Foram realizados, separadamente, ensaios para zinco, na forma de  $Zn(NO_3)_2$ , testando 5 doses crescentes (2,1; 21; 51,9; 61,9 e 104,5  $mg L^{-1}$ ) e cádmio, na forma de  $Cd(NO_3)_2$ , onde foram testadas 4 doses crescentes (0,05; 0,1; 1 e 11  $mg L^{-1}$ ), mais testemunha (sem Zn e Cd). A primeira dose de cada metal é equivalente aproximadamente a dez vezes o teor máximo permitido pelo CONAMA em cursos hídricos Classe I – Águas doces, de acordo com a resolução 357 (CONAMA, 2005), simulando um ambiente contaminado. As doses seguintes mantiveram um incremento da contaminação em dez vezes.

### 3.4.3 Coleta da biomassa e análise dos metais pesados:

A cada período de coleta (1; 3; 6; 12; 24; 36; 48; 60 e 72 horas), a biomassa foi retirada da solução e seca em estufa com circulação forçada de ar por 48 horas a 65°C para realização da digestão nitroperclórica (6:1) segundo Tedesco et al. (1995), e determinação no extrato dos teores de metais pesados por espectrofotometria de absorção atômica. Conhecendo-se os teores de metais solúveis (concentração inicial e final), determinou-se o percentual de remoção conforme a Equação 1 (MAGRO et al., 2013).

**Equação 1.** Determinação do percentual de remoção de metal pesado da solução contaminada

$$\% \text{ remoção} = (1 - C_f / C_0) \times 100$$

Sendo  $C_f$  = concentração final da solução ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $C_0$  = concentração inicial da solução ( $\text{mg L}^{-1}$ );

As concentrações dos metais pesados na solução de equilíbrio ( $C_f$ ) no último tempo de coleta (72h) de todas as doses testadas foram inseridas no programa ISOFIT para obtenção dos parâmetros e critérios de ajuste para 10 modelos de isotermas de adsorção, possibilitando a identificação do melhor ajuste aos dados obtidos, ou seja, qual equação matemática que melhor descreve a relação dessa biomassa com a adsorção dos metais avaliados (MATOTT et al., 2008).

O experimento foi conduzido em esquema fatorial em delineamento inteiramente casualizado, com cinco doses de Zn e quatro doses de Cd, nove períodos de coleta e três repetições, totalizando 135 unidades experimentais de Zn e 108 para Cd. As médias foram comparadas utilizando o desvio padrão.

As alterações morfológicas causadas à superfície da biomassa da Alface-d'água pelas maiores doses de contaminação (105 e 10  $\text{mg L}^{-1}$  de Zn e Cd, respectivamente) foram comparadas com a testemunha (ausência de metais pesados) com auxílio das imagens geradas em microscópio eletrônico de varredura (MEV), realizado no Centro Universitário de Volta Redonda - UniFOA. Para tal, amostras da biomassa seca e moída foram fixadas em chapas pequenas de metal e revestidas com ouro para melhor visualização das imagens, uma vez que aumentam o nível de emissão de elétrons, emitindo mais do que a amostra, e facilitando a construção da imagem.

### 3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentadas os percentuais de remoção de Zn e Cd da solução nos diferentes tempos de coleta. Em todas as concentrações testadas, foi observada diminuição da concentração dos metais presentes na solução contaminada potencializada pelo aumento do tempo de contato com a biomassa (Anexo 1). Consequentemente, o percentual de remoção deste metal da solução pela biomassa da Alface-d'água foi maior nos maiores tempos avaliados (acima de 36 horas) (Tabela 1). Segundo FLECK et al., (2013), essa capacidade pode ser explicada pela presença de diversos grupos funcionais na superfície da biomassa da planta, como por exemplo, os grupos carboxílicos, proteínas, ligninas, que podem sofrer interações e formar complexos com íons metálicos, quando existe afinidade.

A partir de 36 horas de contato a remoção dos metais começou a se estabilizar, principalmente de Zn, inclusive havendo dessorção dos mesmos em algumas doses acima desse tempo. Os metais dessorvidos foram readsorvidos pela biomassa nos tempos finais (Tabela 1/Anexo 1). AHLUWALIA et al., (2007) explicam que quando os sítios da biomassa estão todos ocupados com metal a dessorção acontece, podendo ser preenchido novamente em seguida. Os mesmos autores afirmaram que a superfície da biomassa seca funciona como um adsorvente de íons, o que faz o processo ser muito rápido, acontecendo em alguns minutos ou poucas horas. A carga da superfície associada à biomassa pode ser muito elevada, o que torna esse processo muito eficiente (AHLUWALIA et al., 2007).

Os dados obtidos no experimento com zinco demonstram que a remoção foi mais eficiente na menor dose testada ( $2,13 \text{ mg L}^{-1}$ ), removendo-se 99,5% do metal da solução em 72 horas de contato da solução com a biomassa. Consequentemente, a remoção foi menos expressiva na maior dose ( $104,54 \text{ mg L}^{-1}$ ), atingindo 71,4% da concentração inicial de Zn no último tempo avaliado (72 horas) (Tabela 1). Vale ressaltar que esses dados demonstram o quanto “mais limpa” ficou a solução contaminada, ou seja, livre dos metais avaliados. Entretanto, a menor percentagem removida verificada na maior dose, representa uma massa maior de zinco removida da solução do que a observada na menor concentração, onde foi obtido o maior percentual.

MÓDENES et al. (2009) observaram que foi possível reduzir 70% da contaminação de uma solução contendo  $4 \text{ meq Zn L}^{-1}$  (aproximadamente  $130 \text{ mgL}^{-1}$ ) utilizando a biomassa seca da macrófita *Egeria densa*. Já em outro experimento utilizando *E. crassipes*, 62% desse elemento foi removido, sendo que 50% foi removido nas primeiras duas horas de contato (MÓDENES et al., 2013).

Durante todos os tempos avaliados, a remoção de zinco foi decrescente, i.e, da menor a maior dose utilizada, como por exemplo no tempo final onde os percentuais de remoção foram  $99,5\% > 88,8\% > 83,3\% > 73,3\% > 71,4\%$  nas seguintes doses  $2,13 < 21,04 < 51,98 < 61,91 < 104,54 \text{ mgL}^{-1}$  de Zn, respectivamente (Tabela 1). LUCENA et al., (2012) observaram resultados semelhantes na bioadsorção de cobre pela Erva-sal e Taioba-brava, as quais foram mais eficientes nas concentrações mais baixas ( $200\text{--}300 \text{ mg L}^{-1}$ ) do metal, onde os bioadsorventes mostraram percentuais de remoção superiores a 60%, apresentando um decaimento percentual quando tratadas em concentrações mais altas. MIRETZKY et al., (2006) observaram o mesmo comportamento em três espécies de macrófitas (*S. intermedia*, *L. minor* e *P. stratiotes*) sugerindo a saturação dos sítios de adsorção da biomassa pelas doses mais elevadas.

**Tabela 1.** Percentual de remoção de zinco e cádmio nos diferentes tempos de contato com a biomassa seca da Alfaca-d'água.

Metal	Conc. inicial (mg L <sup>-1</sup> )	% Remoção									
		1h	3h	6h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	
Zn	0,00										
	2,13	34,5	54,7	60,4	42,6	77,0	98,9	65,3	74,4	99,5	
	21,04	67,0	67,3	75,8	75,1	78,8	96,6	88,9	84,8	88,8	
	51,98	45,5	68,4	67,5	78,3	79,5	92,8	82,6	87,1	83,3	
	61,91	32,1	38,3	62,5	61,4	77,8	86,5	77,1	81,3	73,0	
	104,54	7,2	8,6	17,9	44,4	57,2	55,1	62,6	64,2	71,4	
Cd	0,00										
	0,05	12,2	13,6	21,1	51,7	67,3	66,7	76,9	59,9	53,1	
	0,13	7,4	16,1	21,7	49,2	71,2	78,0	76,7	87,8	86,5	
	1,21	22,7	26,6	30,7	54,8	73,0	79,9	80,9	64,1	76,8	
	11,45	27,2	35,4	44,1	54,9	68,1	77,9	80,9	78,1	81,4	

1h = 1 hora após início da agitação/ 3h = 3 horas / 6h = 6 horas/ 12h = 12 horas/ 24h = 24 horas/ 36h = 36 horas/ 48h = 48 horas/ 60h = 60 horas/ 72h = 72 horas;

Esse comportamento não foi observado para o cádmio, que teve sua maior eficiência de remoção nas maiores doses (Tabela 1). Os dados demonstram que a biomassa seca da Alfaca-d'água alcançou o máximo de remoção de 86% de Cd no maior tempo avaliado (72 horas). VERMA et al., (2008) observaram que a biomassa de *V. spiralis* removeu 98% de Cd de uma solução contaminada com 30mg L<sup>-1</sup> desse elemento. Segundo MIRETZKY et al., (2006) Cd e Pb foram os elementos mais removidos pela biomassa de três macrófitas estudadas em contato com uma solução contaminada com 10 mg L<sup>-1</sup> desses elementos individualmente.

Foi observado que já na primeira hora de contato da biomassa seca com a solução contaminada, acima de 30% do zinco foi removido em todas as doses testadas, exceto na maior dose (105 mg L<sup>-1</sup>) onde esse percentual alcançou somente 7,2%. O cádmio apresentou o menor percentual de remoção no primeiro tempo avaliado, alcançando o máximo de 27% de remoção nesse período (Tabela 1).

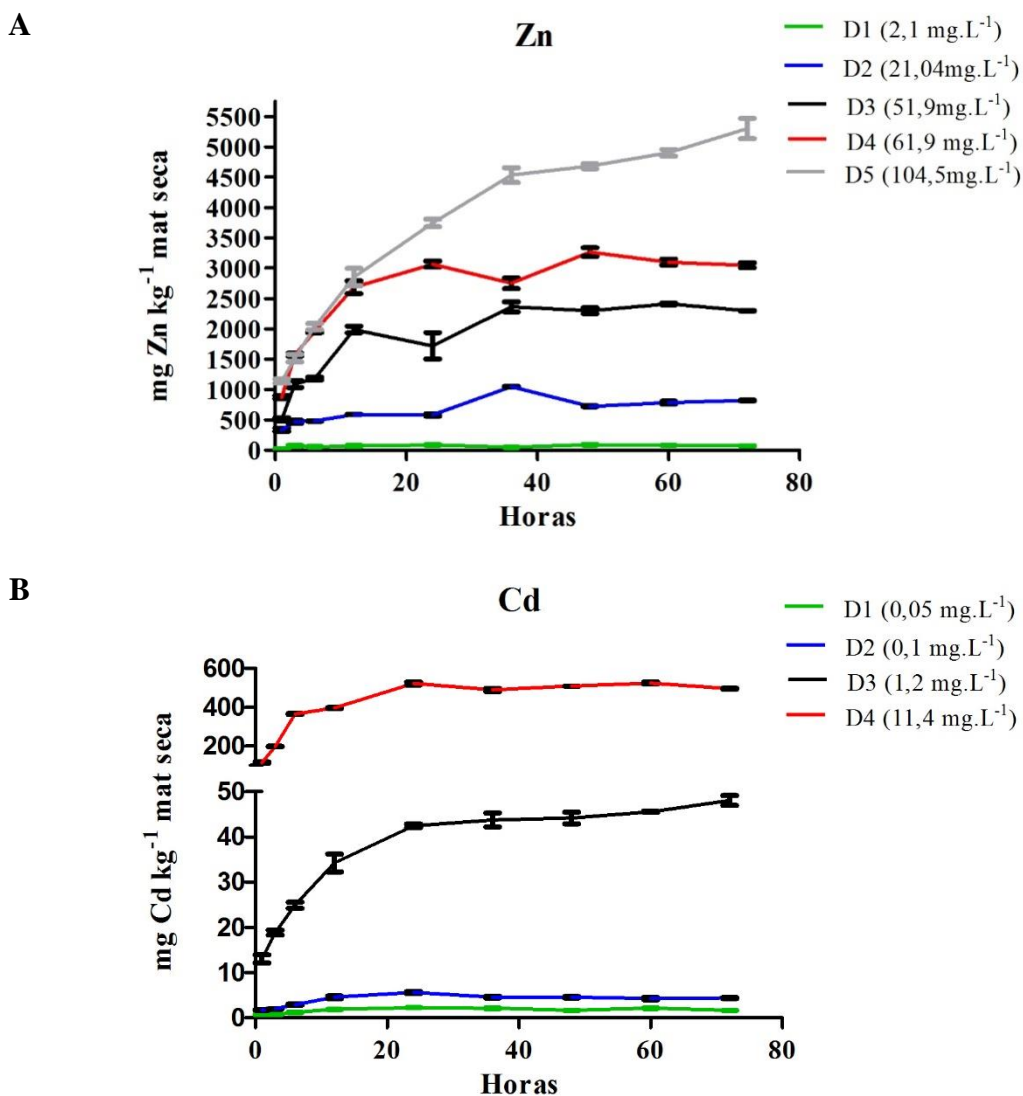
Ao final dos experimentos (72 horas) pode-se concluir que a biomassa seca da Alfaca-d'água foi eficiente em bio-sorver o Zn e Cd presentes nas soluções contaminadas, sendo capaz de remover até 99% de Zn e 86% do Cd, essas porcentagens variaram conforme a dose de contaminação testada (Tabela 1). Resultados contrários foram encontrados por VERMA; TEWARI; RAI, (2008) estudando *V. spiralis* pois observaram um maior potencial de remoção de Cd (98%) quando comparado a Pb e Zn em solução contaminada com 15 e 30 mg L<sup>-1</sup> desses metais. MIRETZKY et al., (2006) testaram três macrófitas (*S. intermedia*, *L. minore* e *P. stratiotes*) e constataram um maior potencial de remoção de Cd e Pb quando comparado ao Zn, em soluções contaminadas com 10 e 20 mgL<sup>-1</sup> desses elementos. Essa variação no percentual de remoção de cada metal e a variação de remoção conforme a biomassa utilizada é explicada pela maior ou menor presença e tipo de grupos funcionais, como o grupo carboxila (SCHNEIDER et al., 2001) em cada biomassa e a maior ou menor afinidade dos metais a esses grupos (YEH et al., 2011).

Os dados obtidos permitem a indicação da biomassa da Alfaca-d'água para utilização na remoção de Zn e Cd de corpos hídricos contaminados, sendo sua eficiência relacionada ao tempo de contato e ao teor desses elementos na solução. O tempo aproximado de 72 horas demonstrou ser eficiente neste processo, sendo que a partir daí pode-se recomendar a



substituição ou tratamento da biomassa utilizada, afim de dar continuidade ao processo de descontaminação da área.

A Figura 9 apresenta os teores de Zn e Cd associados a matéria seca da Alface-d'água nos diferentes tempos de coleta. Esses dados foram obtidos após a digestão nitroperclórica das amostras.



**Figura 9.** Teores Zn (A) e Cd (B) na matéria seca da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*).

Pode-se observar em todas as concentrações testadas um aumento nos teores dos metais (Zn e Cd) associados à biomassa, potencializado pelo aumento do tempo de contato com a solução contaminada (Figura 9). Esses dados estão relacionados aos dados de remoção dos metais da solução apresentados na Tabela 1 e confirmam a capacidade da biomassa seca da Alface-d'água em remover esses metais pesados da solução, assim como foi observado por MIRETZKY et al., (2006) para três outras macrófitas.

A Figura 9 também evidencia os pontos de dessorção e 're-adsorção' dos metais, ocorrido em alguns tratamentos a partir de 24 horas, confirmando, novamente, o que foi observado nos teores dos metais na solução (Anexo 1). Essa dessorção é apontada como a principal desvantagem do processo de bioadsorção, devido a saturação, onde todos os sítios

ativos da biomassa já estão ocupados, atingindo seu ponto máximo de sorção. Nesse ponto, se faz necessário a troca do biosorvente ou seu tratamento (AHLUWALIA & GOYAL, 2007; SCHNEIDER et al., 2001).

Os teores dos metais estudados na biomassa da Alface-d'água aumentaram com as maiores concentrações do metal na solução. JUNIOR et al., (2009) obtiveram resultados semelhantes quando testaram a biossorção do e chamou de “efeito linear positivo de adsorção,” quando há esse incremento de metais na biomassa à medida que as doses de contaminação na solução aumentam. As maiores concentrações de metais na solução podem influenciar a biossorção pela competição entre íons, altera a atividade do metal, e as propriedades da dupla camada elétrica, que podem ser solucionados com o incremento de biomassa, aumentando assim a superfície biossorvente e conseqüentemente os sítios de ligação (MUDHOO et al., 2012).

Os teores de Zn e Cd biossorvidos pela biomassa da Alface-d'água variaram entre si, indicando uma maior ou menor afinidade desses metais com os grupos funcionais presentes na superfície da biomassa avaliada. MUDHOO et al., (2012) explicam que alguns biossorventes tem capacidade de se ligar a vários metais pesados sem prioridade específica, enquanto outros são específicos para determinados tipos de metais, indicando a origem da biomassa como fator importante a ser considerado.

Resultados obtidos em outros trabalhos confirmam também o potencial das macrófitas aquáticas na biossorção de metais pesados, como *Eichhornia crassipes* (Aguapé) (JUNIOR et al., 2009; TAVARES, 2009), *Potamogeton lucense*, *Salvinia herzogii* (TAVARES, 2009; COSTA et al., 2000), *Egeria densa* (PIETROBELLI & CORRÊA, 2013; MÓDENES et al., 2009), *Typha domingensis* e *Acroceras zizanioides* (JESUS et al., 2015)

Os dados obtidos, em cada tratamento, no maior tempo de contato entre a solução contaminada e a biomassa da Alface d'água (72 horas), foram utilizados para entrada no programa ISOFIT para identificação do modelo de isoterma que melhor representa a biossorção dos contaminantes pela biomassa da Alface d'água. Na Tabela 2 são apresentados os valores de  $R^2$ , critério de informação de Akaike corrigido (AICc), valores de diferença de Akaike ( $\Delta AIC$ ) e peso de evidência ou peso de Akaike (AICw) para os dez modelos de isotermas de adsorção gerados pelo programa, para os metais Zn e Cd.

Os valores de  $R^2$  apresentaram variações muito pequenas em todos os modelos de isoterma dos metais avaliados, desta forma não foi possível a identificação do melhor modelo de adsorção através deste parâmetro. O critério de informação de Akaike (AIC) indica menor distância entre os dados obtidos (reais) e calculados, conseqüentemente maior aproximação do real (AKAIKE, 1974). Entretanto, devido ao pequeno número de amostras deste ensaio (< 40), foi utilizado o critério de informação de Akaike corrigido (AICc), derivado do AIC, como indicado por BURNHAM & ANDERSON, (2002). Utilizando-se esse parâmetro, foi selecionado o modelo que apresentou o menor valor de AICc dentre os demais para representar a adsorção. Os valores de diferença de Akaike ( $\Delta AIC$ ) e o peso de evidência ou peso de Akaike (AICw) foram calculados segundo suas equações e auxiliaram na seleção do modelo (Tabela 2).

Avaliando-se esses parâmetros, o modelo que melhor se ajustou a biossorção dos metais pesados pela biomassa da Alface-d'água, foi o modelo de isoterma linear, que apresentou o menor valor de AICc e valor de AICw mais próximo de um, indicando maior peso/evidência desse modelo (Tabela 2). Apesar do modelo Langmuir Partition ser considerado igualmente semelhante pela avaliação de  $\Delta AIC$ , o modelo linear foi o selecionado como o de melhor ajuste, por ser comparativamente o modelo mais simples, avaliando apenas uma variável.

O modelo linear ou modelo do coeficiente de distribuição ( $K_d$ ) é um caso particular do modelo de Freundlich e ocorre quando as isotermas de adsorção apresentam comportamento

linear, indicando uma alta afinidade do biosorvente pelo adsorbato. O  $K_d$  é a variável deste modelo que se baseia na fração do metal que realmente pode ser trocada com a solução e não no seu total (ALLEONI et al., 2009; STAUNTON, 2001). Baixos valores de  $K_d$  indicam que a maior parte do metal permanece em solução, portanto estão biodisponíveis. Por outro lado, altos valores de  $K_d$ , como os encontrados neste ensaio (Tabela 2), refletem grande afinidade de metais pelos constituintes (grupos funcionais) da superfície do adsorvente (SOARES, 2004). Portanto, esta variável pode ser utilizada em modelos de previsão de risco ambiental para cálculos de padrões de qualidade de solos e de águas superficiais e subterrâneas (STAUNTON, 2001), como adotado pela Holanda (BOCKTING et al., 1992; USEPA, 1996).

PIETROBELLI & CORRÊA, (2013) estudando a capacidade de remoção dos íons Cd e Zn pela macrófita *E. densa*, observaram que o modelo de Langmuir foi o que melhor se ajustou aos dados obtidos, utilizando o software Origin 8.0. O mesmo foi encontrado por MÓDENES et al., (2013), avaliando a biossorção de metais pesados pela macrófita *E. crassipes*. Outros biossorventes testados na biossorção de metais pesados também tiveram o melhor ajuste na isoterma de Langmuir (PLAZA CAZÓN et al., 2013). A isoterma de Langmuir prevê que há formação de monocamada, ou seja, cada sítio pode adsorver somente uma molécula, ocorrendo em sítios específicos e em número definido, não sendo influenciada pela presença de outros íons adsorvidos (ÖZCAN & ÖZCAN, 2004; WALKER & WEATHERLEY, 2001).

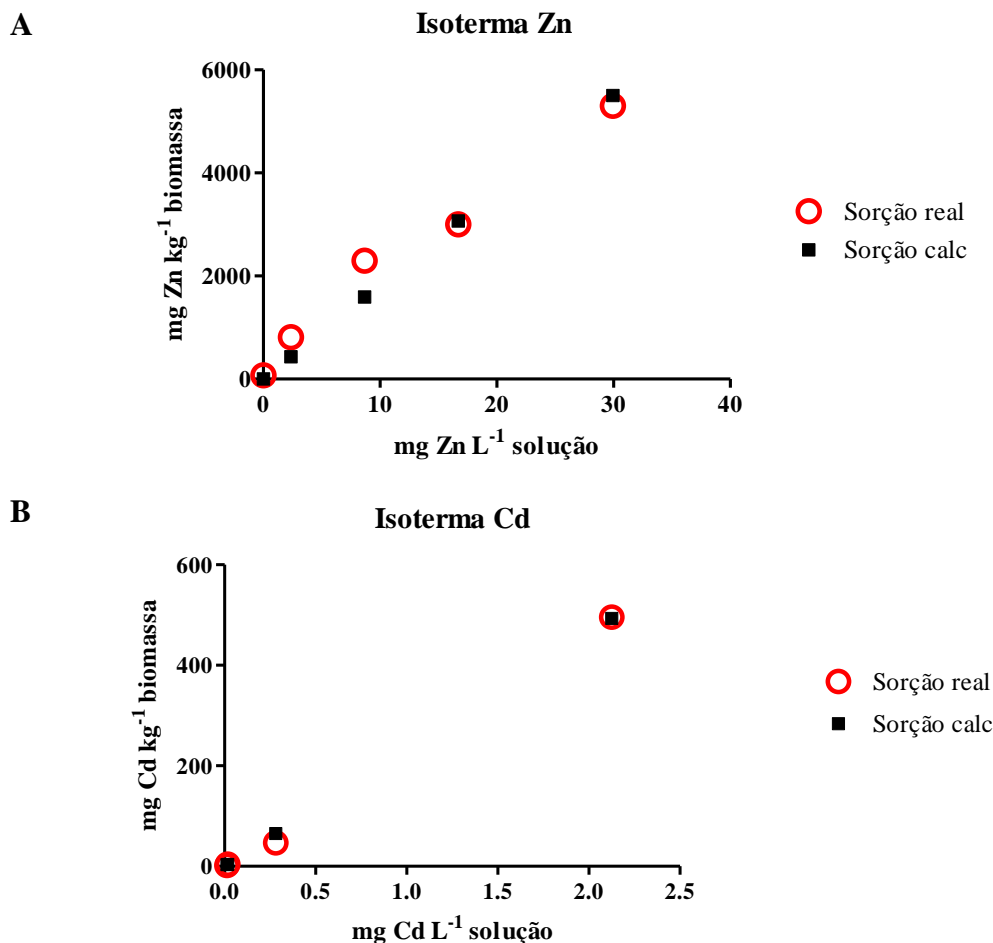
Já VERMA et al., (2008) estudando a biossorção de metais pela macrófita *Valisneria spiralis* encontraram o melhor ajuste dos dados a isoterma de Langmuir, na sorção de Cd, Ni e Cromo (Cr), e a isoterma de Freundlich para sorção de Pb, Cu e Zn. MIRETZKY et al., (2006) avaliaram a biossorção de metais (Pb, Ni, Cd, Cu, Zn) pelas macrófitas *Spirodela intermedia*, *Lemna minor* e *Pistia stratiotes* também obtiveram como melhor ajuste a isoterma de Freundlich. A isoterma de Freundlich descreve a adsorção na superfície de sítios heterogêneos, com afinidades distintas, onde os locais com maior afinidade são ocupados primeiro, com maior força de adsorção e diminuindo com o nível de ocupação dos sítios (MUDHOO et al., 2012). As isotermas de Langmuir e Freundlich são as mais descritas em processos de biossorção por diversos autores, o que é justificado por serem modelos simples, bem estabelecidos e com significados físico facilmente interpretável (VIJAYRAGHAVAN & YUN, 2008).

Neste trabalho, a seleção do modelo linear de melhor ajuste ao ensaio é diferente da maioria dos estudos de biossorção de metais pesados utilizando biomassa de macrófitas aquáticas que apontam na sua maioria o modelo de Langmuir, seguido pelo modelo Freundlich. Essa variação pode ocorrer de acordo com o programa utilizado, metal e as características da superfície (grupos funcionais) do biosorvente avaliado. O modelo linear ajustado aos dados obtidos neste trabalho se justifica pela elevada afinidade da biomassa da Alface-d'água pelos íons metálicos estudados. O modelo Linear se diferencia por não apresentar saturação rápida do adsorvente com o aumento do adsorbato, como é o caso do modelo Langmuir, que apresenta uma curva do tipo-L enquanto o modelo linear apresenta uma curva do tipo-C, com alta afinidade pelo adsorbato independente do aumento da concentração do mesmo.

**Tabela 2.** Valores de  $R^2$ , AICc,  $\Delta AIC$  e AICw para dez modelos de isotermas de adsorção para Zn e Cd pela Alface-d'água.

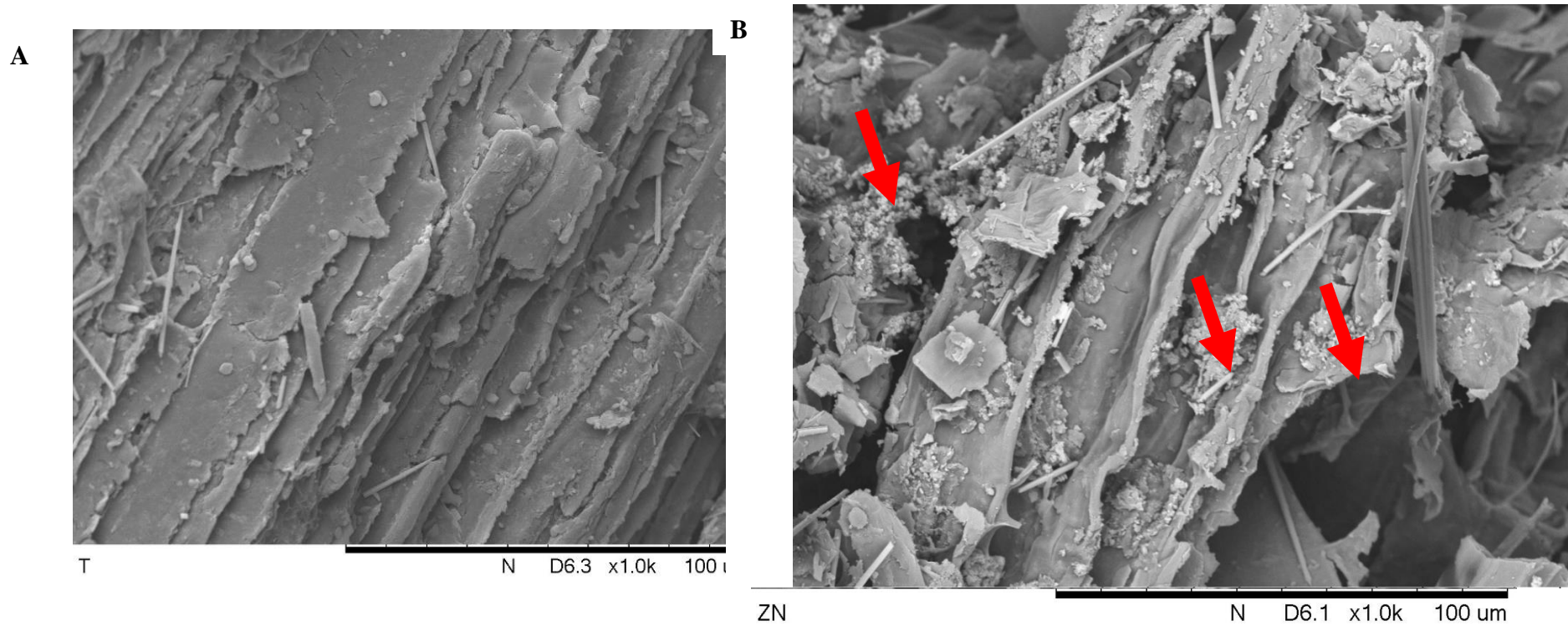
Metal		BET	Freundlich	Freundlich Partition	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Langmuir Partition	Linear	Polanyi	Polanyi Partition	Toth
<b>Zn</b>	$R^2$	0,979	0,988	0,99	0,983	0,985	0,979	<b>0,979</b>	0,979	0,979	0,985
	AICc	84,6753	62,927	82,166	65,409	84,137	62,500	<b>62,500</b>	85,100	76,427	84,459
	$\Delta AIC$	22,1752	0,427	19,666	2,909	21,637	0,000	<b>0,000</b>	22,600	13,927	21,959
	AICw	5,03E-06	3,62E-01	1,76E-05	8,31E-02	6,58E-06	0,49	<b>0,49</b>	4,07E-06	3,11E-04	5,60E-06
								<b>1,84E+08</b>			
<b>Cd</b>	$R^2$	0,999	0,999	0,999	0,999	1,000	0,999	<b>0,999</b>	0,999	0,999	0,999
	AICc	57,4540	33,9155	35,9156	34,1310	23,3091	21,9155	<b>21,9155</b>	58,6886	56,2842	35,9948
	$\Delta AIC$	35,5384	12,0000	14,0000	12,2155	1,3935	0,0000	<b>0,0000</b>	36,7731	34,3686	14,0792
	AICw	7,66E-09	9,91E-04	3,64E-04	8,89E-04	2,48E-01	0,66	<b>0,66</b>	4,13E-09	1,37E-08	3,50E-04
								<b>2,32E+08</b>			

O comportamento gráfico das isotermas de adsorção representativas do ensaio de adsorção dos metais Zn e Cd pela biomassa seca de Alface-d'água é mostrado na Figura 10. O comportamento gráfico das isotermas pode ser de várias formas, fornecendo informações importantes sobre o modelo matemático que o representa (TAGLIAFERRO et al., 2011). O modelo linear, selecionado como o representativo do ensaio realizado, é de isotermas do tipo-C (*constant partition*), caracterizada por uma inclinação inicial que permanece inalterada com aumento da concentração do adsorbato até que a adsorção máxima seja atingida (SPOSITO, 2008; ALLEONI et al., 2009; MEURER et al., 2010).

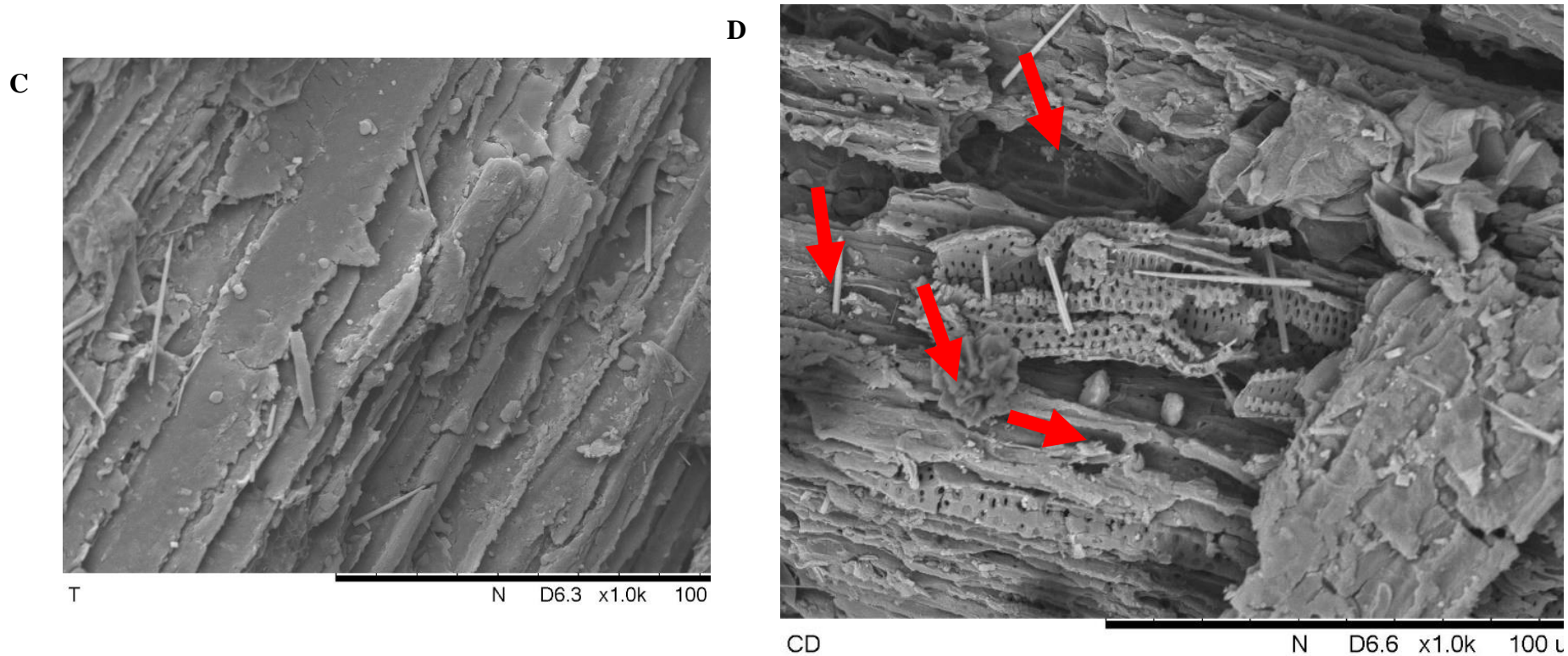


**Figura 10.** Comportamento gráfico das Isotermas de adsorção Linear dos metais Zn (A) e Cd (B).

A Figura 11 apresenta as diferenças na morfologia de superfície entre a biomassa de Alface-d'água na ausência de contaminação (testemunha) e nas maiores doses de contaminação por Zn e Cd (105 e 10mg L<sup>-1</sup> respectivamente), através de imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV).



**Figura 11.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em amostras de biomassa testemunha (A) e cultivada por 72 horas na maior dose de Zn (B) ( $105 \text{ mg L}^{-1}$ ). Ampliação 1000x. (continua)



**Figura 11.** Microscopia eletrônica de varredura (MEV) em amostras de biomassa testemunha (C) e cultivada por 72 horas na maior dose de Cd (D) ( $10 \text{ mgL}^{-1}$ ). Ampliação 1000x.

A biomassa da Alface-d'água que foi utilizada em soluções contaminadas com os metais pesados Zn e Cd, manifestou alterações em sua morfologia de superfície, apresentando aspecto enrugado, dobrado, se diferenciando da biomassa testemunha que apresentou aspecto liso e linear. Foram observadas também pequenas protuberâncias, grânulos (destacados na seta vermelha - Figura 11) que não foram observados na amostra sem contaminação (testemunha). A biomassa utilizada na biossorção de Cd apresentou pequenos orifícios em sua estrutura que também não foram observados na testemunha. Possivelmente, o aspecto enrugado da superfície da biomassa contaminada está relacionado a alterações na constituição da mesma, devido as interações entre os grupamentos funcionais da superfície da biomassa com os elementos de diferentes raios atômicos, que levam a modificações em sua morfologia.

A formação de grânulos tem sido relacionada com a complexação (quelação) dos metais (YEH et al., 2011; PLAZA CAZÓN et al., 2013) uma vez que as biomassas são de origem orgânica e possuem grupos funcionais em sua superfície que formam ligações de diferentes naturezas com os metais, imobilizando-os em sua estrutura. Os grupos funcionais são distribuídos heterogeneamente na superfície das biomassas e as quantidades são variáveis de espécie para espécie. Eles podem se localizar em pequenos poros, espaços vazios, orifícios, onde os metais podem ser “aprisionados”. SUÑE et al., (2007) corroboram esses resultados quando constataram que os principais processos envolvidos na biossorção de metais pela *Pistia stratiotes* são: adsorção, quelação e troca iônica.

YEH et al. (2011) também observaram pequenas protuberâncias em quatro diferentes biomassas utilizadas na biossorção de zinco e cobre. PLAZA CAZÓN et al., (2013) encontraram agregados brancos na biomassa da macroalga *Undaria pinnatifida* após a biossorção de Zn e Cd. Esses autores justificam a formação desses agregados pela ligação dos metais a grupos carboxílicos e a outros grupos presentes de forma não homogênea na parede celular, que levam a formação de complexos estáveis tipo quelantes. CHIENG et al., (2015) avaliaram a morfologia da turfa antes e depois da adsorção de substâncias tóxicas utilizando MEV e observaram que a estrutura contém poros que funcionam como sítios de adsorção para íons e moléculas. Após a adsorção os poros se apresentaram cobertos, saturados, devido essas ligações.

ABREU, (2013) também observou orifícios na estrutura fibrosa do bagaço da cana de açúcar, os quais chamou de poros, que funcionam como sítios de adsorção de metais pesados. FAROOQ et al., (2010) apresentaram as imagens de MEV de palha de trigo e observaram que sua superfície é porosa e portanto, adequada para adsorção de íons metálicos. Os autores ainda comentam que a presença de diferentes grupos funcionais, elevada concentração de celulose, associados a porosidade da superfície, fazem essa biomassa ser favorável para estudos de biossorção.

SOUTHCHAK et al., (2006) estudaram a biossorção e metais pesados pela macrófita *Phragmites australis* e observaram por meio de microscopia eletrônica de varredura, que a microestrutura dessa biomassa foi coberta com impurezas, e os poros superficiais dificilmente podiam ser vistos depois do experimento. Os grupos carboxílicos, ligninas e ésteres presentes na biomassa foram considerados essenciais para biossorção dos metais pesados.

LACHER & SMITH, (2002) também utilizaram imagens de MEV no estudo da biossorção de mercúrio pela biomassa da macrófita *Potamogeton natans*, e observaram manchas esbranquiçadas como indicativo dos locais de elevada biossorção de Hg, possivelmente, devido a maior densidade de sítios ativos. Através de análises de energia de raios-X esses autores observaram átomos de cloro, ferro e cálcio associados a esses sítios ativos de biossorção da biomassa, indicando que esses átomos podem estar envolvidos num processo de permuta iônica.

MURPHY et al. (2009) também observaram, através de imagens de MEV, a formação de regiões “achatadas”, “amassadas” na superfície das algas tratadas com Cr (VI), em



comparação com a testemunha, devido ao mecanismo de permuta iônica, trocando por elementos de menor raio iônico, causando relaxamento das estruturas da biomassa, levando a um achatamento aparente da superfície da alga.

As imagens obtidas através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostram o efeito da adsorção de metais na morfologia de superfície da biomassa da *Alface-d'água*. As alterações observadas se relacionam com os mecanismos envolvidos na biossorção dos metais pesados avaliados e confirmam suas características favoráveis para remediação de soluções contaminadas.

### 3.6 CONCLUSÕES

- A biomassa seca da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) é eficiente na remoção dos metais Zn e Cd presentes em solução e tem potencial para ser empregada na remediação de ambientes aquáticos contaminados com esses elementos;
- A biomassa seca da Alface-d'água, utilizada como material adsorvente, apresenta elevada afinidade pelos adsorbatos testados (Zn e Cd), chegando a apresentar um percentual de remoção superior a 70% para Zn e Cd, em todas as doses testadas (exceto na menor dose de Cd);
- O modelo de isoterma de melhor se ajuste aos dados experimentais foi o linear, evidenciando a alta afinidade do adsorvente (biomassa da Alface-d'água) pelos adsorbatos testados (Zn e Cd);
- As imagens de MEV indicam que a morfologia da superfície da biomassa foi alterada com a adsorção de Zn e Cd, demonstrando os mecanismos de biossorção, como a complexação pelos grupos funcionais de superfície, e conseqüentemente, seu potencial para utilização na remediação de soluções com Zn e Cd.

## **4 CAPÍTULO II**

### **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA ALFACE-D'ÁGUA (*Pistia stratiotes*) PARA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLUÇÕES AQUOSAS CONTENDO ZINCO E CÁDMIO: ACUMULAÇÃO E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS**

#### 4.1 RESUMO

Com objetivo de avaliar o potencial fitoextrator e verificar respostas fisiológicas da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) a contaminação por metais pesados, foram instalados dois experimentos em casa de vegetação, onde em cada um deles essa macrófita foi cultivada na presença de um metal pesado, sendo eles: zinco (Zn) e cádmio (Cd). Cada experimento constituiu de 3 doses, mais solução controle (Zn = 0; 1,8; 18 e 180 mg L<sup>-1</sup> e Cd = 0; 0,1; 1 e 10 mg L<sup>-1</sup>), em 4 diferentes tempos de cultivo (24, 48, 72 e 168 horas). A cada coleta foram analisados a fluorescência transiente da clorofila a e teor indireto de clorofila total, utilizando um fluorômetro e clorofilômetro portáteis respectivamente. As plantas foram retiradas da solução e ambas preparadas para determinação dos teores de metais pesados. Os dados obtidos demonstraram que a Alface-d'água tem potencial para diminuir os níveis de metais pesados (Zn e Cd) da solução através da absorção e acumulação em seus tecidos, principalmente nas raízes. Nas menores doses de contaminação, a planta incrementou relativamente a síntese de clorofilas, principalmente *b*, como mecanismo de tolerância a contaminação. As maiores doses de contaminação afetaram a síntese de clorofila *a* e *b* e incrementaram os teores de carotenoides, que foi relacionado com altas taxas de dissipação de calor demonstrado pelos dados de fluorescência. A eficiência fotossintética foi significativamente reduzida pela maior dose de Zn e Cd, devido a toxicidade desses elementos ao aparato fotossintético (transferência de elétrons), porém as contaminações menores foram toleradas pelas plantas, sugerindo seu potencial para utilização na remediação de corpos hídricos contaminados com esses elementos.

**Palavras chave:** Poluição. Descontaminação. Fotossíntese.

## 4.2 ABSTRACT

In order to evaluate the fitoextrator potential and check physiological responses Water Lettuce (*Pistia stratiotes*) contamination by heavy metals, two experiments were conducted in a greenhouse, where in each of them that macrophyte was grown in the presence of a metal heavy, as follows: zinc (Zn) and cadmium (Cd). Each experiment consisted of three doses, more control solution (Zn = 0, 1.8, 18 and 180 mg L<sup>-1</sup> and cd = 0, 0.1, 1 and 10 mg L<sup>-1</sup>) on four different cultivation times (24, 48, 72 and 168 hours). In each collect were analyzed transient fluorescence of chlorophyll "a" and indirect total chlorophyll content, using a fluorometer and portable chlorophyll meter respectively. The plants were removed from the solution and both were prepared to determine the levels of heavy metals. The data obtained showed that water lettuce has the potential to reduce levels of heavy metals (Zn and Cd) of the solution through the absorption and accumulation in the tissues, especially the roots. In smaller doses of contamination, the plant increased the synthesis of chlorophyll, particularly b as contamination tolerance mechanism. Larger doses of contamination affecting the synthesis of chlorophyll a and b, and increased levels of carotenoids, which was associated with high heat dissipation rates shown by the fluorescence data. The photosynthetic efficiency was significantly reduced by higher dose of Zn and Cd due to toxicity of these elements to the photosynthetic apparatus (electron transfer), but the smallest contaminations were tolerated by plants, suggesting their potential for use in remediation of water bodies contaminated with these elements.

**Key words:** Pollution. Decontamination. Photosynthesis.

### 4.3 INTRODUÇÃO

O abastecimento hídrico no Brasil apresenta um cenário bem distinto do habitual, uma vez que a escassez de água ocorria apenas em alguns estados. Atualmente essa realidade mudou, atingindo a maioria dos estados e, levando para dias bem próximos a preocupação sobre a oferta desse recurso e sua qualidade. A atual crise teve uma contribuição marcante do desmatamento dos biomas terrestres e a deterioração dos aquáticos impulsionados pela ânsia do avanço, desenvolvimento e urbanização das áreas que abrigam os mananciais.

Com esse cenário, a busca pela prevenção e remediação da contaminação dos corpos hídricos tem sido muito intensificada. Cientistas, governo e população têm investido esforços para que a disponibilidade de água de qualidade não seja interrompida e os contaminantes, principalmente os metais pesados, que foram incrementados com as atividades antrópicas, sejam eliminados de forma segura, viável e definitiva.

A fitorremediação é uma técnica que vem sendo utilizada em projetos de biorremediação de ambientes aquáticos contaminados por metais pesados. Nessa técnica são utilizadas plantas, principalmente as aquáticas, as macrófitas, para que, através de seus processos fisiológicos, possam retirar e/ou, conter os poluentes dispersos no ambiente (PIO et al., 2013).

O tipo de fitorremediação mais estudada é a fitoextração, onde as plantas extraem os metais pesados (ou outros poluentes) e acumulam nos seus tecidos. A remoção desses contaminantes do meio ocorre através da retirada das plantas, sendo que as mesmas podem ser usadas, posteriormente, para fins não alimentares, como produção de energia. (MIRZA et al., 2014). As plantas que se destacam nesse processo são chamadas de hiperacumuladoras de metais pesados. Elas são capazes de concentrar níveis elevados de metais em sua biomassa, que seriam fitotóxicos a outras espécies cultivadas sob condições semelhantes (ROMEIRO et al., 2007).

As características das macrófitas como seu fácil cultivo, elevada taxa de crescimento e tolerância a metais pesados, possibilitam um elevado potencial fitoextrator e favorecem a utilização em projetos de remediação (HADAD et al., 2006). Alguns estudos já confirmaram a tolerância de algumas espécies, com altas taxas de acumulação em relação a sua biomassa (RAI, 2008). Dentre elas, destacam-se o Aguapé (*Eichhornia crassipes*), e a Orelha de onça (*Salvinia auriculata*) (OLIVEIRA et al., 2001).

As plantas desenvolvidas em um ambiente contaminado por metais pesados podem responder de diferentes formas a essa contaminação. Elas podem ser sensíveis, exibindo sintomas de toxicidade, ou tolerantes, desenvolvendo mecanismos que evitam os efeitos deletérios desses elementos e, conseqüentemente, permitindo o melhor desenvolvimento das plantas (LASAT, 2002).

Alguns metais são essenciais ao crescimento dos vegetais, pois fazem parte da constituição de enzimas e proteínas (zinco e cobre, por exemplo), e podem tornar-se tóxicos às plantas quando em elevadas concentrações. Outros metais não possuem função conhecida no metabolismo vegetal, induzindo sintomas de toxicidade em concentrações mínimas (cádmio). Esses sintomas são causados por uma variedade de interações a nível celular/molecular que provocam alterações no metabolismo da planta (HALL, 2002).

Diante do exposto, este trabalho tem como o objetivo avaliar o potencial da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) na fitoextração dos metais pesados Zn e Cd, presentes em soluções contaminadas, e verificar os efeitos fisiológicos no metabolismo da planta. Para tanto, foram avaliados a síntese de pigmentos e a eficiência fotossintética através da fluorescência transiente da clorofila "a".

## 4.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.4.1 Coleta das plantas

Plantas de Alface-d'água foram coletadas no lago do prédio de química (PQ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), no município de Seropédica – RJ (25°45'46.58"S de Latitude e 43°41'19.68"O de Longitude) (Figura 12). As plantas coletadas foram levadas para Universidade Federal Fluminense (UFF), campus do município de Volta Redonda-RJ, onde foi conduzido o experimento.



**Figura 12:** Local de coleta das plantas. Lago do prédio de Química (PQ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Fonte: Google Maps

Após a coleta, as macrófitas foram lavadas em água corrente e posteriormente com água deionizada para eliminação de remanescentes do sedimento e outras partículas. Para aclimatação antes do cultivo na presença dos metais pesados, as plantas foram mantidas em caixas d'água contendo água deionizada por uma semana.

#### 4.4.2 Instalação do experimento

Foram selecionadas plantas saudáveis e com tamanho uniforme para serem cultivadas em vasos com capacidade de 5 litros, preenchidos com 3 litros de solução nutritiva de Hoagland a 10%, de acordo com LI et al., (2013), e enriquecida com doses crescentes do metal avaliado.

Foi instalado um experimento para cada metal pesado estudado, sendo eles: zinco e cádmio. Foram avaliadas 3 doses de contaminação mais solução controle para cada metal, determinadas a partir dos padrões estabelecidos pelo CONAMA para corpos hídricos (CONAMA, 2005), sendo para zinco: 0; 1,8; 18 e 180 mg L<sup>-1</sup>, na forma de ZnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e para cádmio: 0; 0,1; 1 e 10 mg L<sup>-1</sup> na forma de Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, em 4 períodos de cultivo (24, 48, 72 e 168 horas), com 3 repetições cada, totalizando 48 vasos cada experimento. A temperatura foi mantida entre 20 e 25°C e o pH foi monitorado a cada 2 dias e mantido na faixa de 5 a 5,5. A solução foi aerada em dias alternados por, aproximadamente, 10 minutos.

#### 4.4.3 Coleta das plantas e análise dos metais pesados

A cada coleta, as plantas foram lavadas com água corrente e em seguida com água deionizada, separadas em raiz e parte aérea, e pesadas. Depois, parte do material seco foi separada para determinar os teores de pigmentos (descrito adiante). O material restante foi seco em estufa de circulação forçada de ar a 65°C até peso constante. Após a secagem, o material vegetal foi moído para a digestão nitroperclórica (6:1) (TEDESCO et al., 1995). Os teores de metais na solução, raiz e parte aérea foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. O percentual de remoção dos metais da solução contaminada inicial foi calculado pela quantidade acumulada do metal em cada planta (modificado de MAGRO et al., 2013) e a massa do metal disponibilizado na solução (Equação 1).

##### Equação 1

$$\% \text{ remoção} = \frac{\text{mg Metal acumulado na planta} \times 100}{C_0}$$

Em que: C<sub>0</sub> = concentração inicial da solução (mg.L<sup>-1</sup>);

Foi calculado também o percentual de remoção por área (m<sup>3</sup>) de espelho d'água, baseado na área ocupada por uma planta (área de ocupação da parte aérea e profundidade de suas raízes) e sua capacidade de remoção dos metais Zn e Cd (em mg). Em média o raio das plantas de Alface-d'água utilizadas no experimento mediu em torno de 5cm. Esse valor foi utilizado no cálculo da área ocupada pela planta ( $\pi r^2$ ), que resultou em média de 79 cm<sup>2</sup> cada uma. A partir desses resultados admitiu-se que em cada metro quadrado de espelho d'água (10.000 cm<sup>2</sup>) podem ser cultivadas em média 127 plantas de Alface-d'água. Admitiu-se que as raízes utilizadas alcançaram em média 1,0 metro de profundidade. Baseado na capacidade de remoção de cada planta em cada dose de contaminação e tempo de cultivo, foram calculados os teores aproximados de Zn e Cd removidos em 1m<sup>3</sup> de espelho d'água, ou seja, por 127 plantas.

Considerando as concentrações dos metais nas diferentes partes da Alface-d'água, foram calculados os fatores de bioconcentração (também conhecido como fator de bioacumulação) (FBC), que relacionam os teores absorvidos em relação à sua concentração no meio (solução). O fator foi calculado segundo ZAYED et al. (1998) (Equação 2).

##### Equação 2

$$\text{FBC} = \frac{\text{Concentração do metal no tecido da planta no momento da colheita (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentração inicial do metal na solução (mg.L}^{-1}\text{)}}$$



O fator de translocação (FT), descrito como a concentração de metal pesado na parte aérea em relação a raiz da Alface-d'água foi calculado de acordo com LUO; SHEN; LI, (2005), pela utilização da Equação 3.

### Equação 3

$$FT = \frac{\text{Concentração do metal na parte aérea (mg.kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentração do metal raiz (mg.kg}^{-1}\text{)}}$$

#### 4.4.4 Análise de pigmentos fotossintéticos

No momento da coleta das plantas, foram retirados discos foliares da parte aérea com 2,83 cm<sup>2</sup> de área, que foram utilizados para extração e quantificação dos teores de clorofila a, clorofila b e carotenoides, utilizando-se dimetilsulfóxido (DMSO) de acordo com HISCOX & ISRAELSTAM (1979). Cinco discos foliares foram retirados e colocados em tubo do tipo “Falcon”, envolvidos com papel alumínio para proteção da luz, contendo 5ml de DMSO. As amostras foram mantidas à temperatura de 2 a 5°C por 24 horas e em seguida levadas ao banho-maria a temperatura de 64°C por, aproximadamente, 6 horas até a observação da completa extração dos pigmentos dos discos.

Os pigmentos foram quantificados com base nas leituras espectrofotométricas a 750nm (turbidez), 665nm (clorofila a), 649nm (clorofila b) e 480nm (carotenoides). Os valores obtidos foram expressos em concentração de pigmentos segundo as equações propostas por WELLBURN, (1994).

Os teores de pigmentos fotossintéticos também foram medidos de forma indireta e não destrutiva utilizando o clorofilômetro portátil ClorofiLOG (FALKER Automação Agrícola – Porto Alegre), que diferente do método destrutivo direto (anterior) se baseia nas características espectrais das clorofilas, gerando resultados proporcionais a absorvância de radiação por esses pigmentos, conhecidos como Índice de Clorofila Falker (ICF). Este aparelho é similar ao SPAD (*Soil Plant Analysis Development*, Konica Minolta, Japão), lançado anteriormente e mais difundido no mundo.

#### 4.4.5 Eficiência fotossintética

A cada tempo de coleta, com a planta ainda intacta e em contato com a solução de cultivo, foi medida a fluorescência transiente da clorofila *a* das plantas de todas as doses, utilizando um fluorômetro portátil (HandyPEA, Hanstech, King's Lynn, Norkfolk, UK). Para essa análise, foram inseridos clipes, fornecidos pelo fabricante, nas folhas das plantas (primeiro par totalmente estendido), que mantiveram uma área foliar (4 mm de diâmetro), totalmente no escuro por um tempo determinado de 20 minutos. Após esse tempo, a emissão de fluorescência foi induzida pela exposição da amostra a um pulso de luz saturante numa intensidade de 3.000  $\mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ , sendo o intervalo entre os pulsos de 500 ms.

A emissão de fluorescência transiente obtida após o primeiro pulso foi utilizada para o cálculo dos parâmetros instituídos pelo Teste JIP (STRASSER & STRASSER, 1995) que permite quantificar a atividade de diferentes parâmetros envolvidos na eficiência da fotossíntese (Tabela 3) e com isso analisar a interferência das diferentes doses de contaminação e tempos de cultivo, utilizados no experimento, nas taxas fotossintéticas da Alface-d'água.

**Tabela 3.** Principais parâmetros do Teste JIP (SOUSA, 2012 Adaptada de: STRASSER et al., 2004 e YUSUF et al., 2010)

<b>Parâmetros de fluorescência calculados a partir dos dados primários obtidos</b>	
$F_V = F_M - F_0$	Fluorescência variável
$F_V/F_M$	Rendimento quântico máximo do FSII
$V_t$	Fluorescência variável relativa em um tempo “t”
$V_j$	Fluorescência variável relativa em relação ao nível J
$V_i$	Fluorescência variável relativa em relação ao nível I
$M_0 = 4(F_{300\mu s} - F_0)/(F_M - F_0)$	Declive inicial aproximado (em $ms^{-1}$ ) da fluorescência transiente $V = f(t)$
$S_s = V_j/M_0$	Área total normalizada complementar correspondente apenas a fase OJ (reflete um único volume de eventos de redução de $Q_A$ )
$S_m = (Area)/(F_M - F_0)$	Área total normalizada complementar acima da curva OJIP (reflete múltiplos eventos de redução $Q_A$ )
$N = S_m/S_s$	Número total de elétrons transferidos para a cadeia de transporte de elétrons entre o tempo de 0 et (necessário para atingir $F_M$ )
<b>Atividade específica por centro de reação (RC)</b>	
$ABS/RC = M_0 (1/V_j) (1/\phi P_0)$	Medida do tamanho aparente do sistema antena ou o fluxo de absorção por RC
$TR_0/RC = M_0 (1/V_j)$	Máxima taxa pela qual um éxciton é capturado pelo RC resultando em uma redução da plastoquinona ( $Q_A^-$ )
$ET_0/RC = M_0 (1/V_j) \Psi_0$	Reoxidação da $Q_A^-$ via transporte de elétrons em um RC ativo
$DI_0/RC = (ABS/RC) - (TR_0/RC)$	Razão de dissipação total de energia de excitação não capturada do total de RC, sendo a dissipação neste caso à perda de energia na forma de calor
$RE_0/RC$	Redução do acceptor final de elétrons no lado do acceptor de elétrons do FSI por RC
<b>Rendimentos energéticos ou taxas de fluxo</b>	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = F_V/F_M$	Rendimento quântico máximo fotoquímico
$\phi E_0 = ET_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de $Q_A^-$ para o intersistema de aceptores de elétrons
$\phi_{D0} = 1 - \phi P_0 = (F_0/F_M)$	Rendimento quântico para dissipação de energia
$\phi_{R0} = RE_0/ABS$	Rendimento quântico de transporte de elétrons de $Q_A^-$ para o acceptor final de elétrons do FSI
<b>Eficiências</b>	
$\psi_0 = ET_0/TR_0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron de $Q_A^-$ para o intersistema de aceptores de elétrons
$\rho_0 = RE_0/TR_0$	Eficiência com que um éxciton capturado no RC pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de $Q_A^-$ para os aceptores finais de elétrons do FSI
$\delta_0 = RE_0/ET_0$	Eficiência com que um elétron pode mover o intersistema de aceptores de elétrons reduzidos no intersistema para o acceptor final de elétrons do FSI

**Tabela 3.** Continuação

---

**Índices de desempenho**

---

$$PI_{ABS} = \frac{RC}{ABS} \times \frac{(\phi P_0)}{(1-\phi P_0)} \times \frac{(\Psi_0)}{(1-\Psi_0)}$$
$$= \frac{RC}{ABS} \times \frac{TR_0}{DI} \times \frac{XET_0}{1-ET_0}$$

Índice de desempenho fotossintético (conservação de energia a partir do éxciton para a redução dos aceptores de elétrons do intersistema)

$$PI_{ABS,total} = \frac{PI_{ABS}}{1 - \delta_0} \times (\delta_0)$$

Índice de desempenho fotossintético total (conservação de energia a partir de éxciton para a redução de aceptores finais do FSI)

---

**4.4.6 Análises estatísticas:**

Para cada metal pesado foi realizado um experimento independente. Foram avaliados 3 doses mais solução controle x 4 períodos de cultivo (24, 48, 72 e 168 horas), com três repetições cada, totalizando 48 unidades experimentais, cada experimento. As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar versão 4.0 (FERREIRA, 2000).

## 4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.5.1 Resultados do experimento com zinco

#### a) Teores de zinco na solução e nos tecidos da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*):

A partir da análise da solução a cada tempo de coleta verificou-se o efeito do cultivo da Alface-d'água na contaminação inicial de cada dose testada. A Tabela 4 apresenta a variação nos teores de zinco da solução nos diferentes doses ao longo do tempo.

**Tabela 4.** Teores de Zn na solução de cultivo da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nos diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo (horas)			
	24	48	72	168
0,7	0,04 Ac	0,04 Ac	0,04 Ac	0,01 Ac
1,8	1,17 Ac	1,18 Ac	1,36 Ac	0,86 Ac
18,0	13,35 Ab	13,59 Ab	13,73 Ab	11,69 Bb
181,0	166,68 Ba	147,02 Ca	150,16 Ca	149,19 Ca

CV = 6,01%

Letras maiúsculas comparam teores de metal na solução nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam teores de metal na solução nos diferentes doses na mesma coluna. Letras idênticas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Na primeira dose, com 0,7 mg Zn L<sup>-1</sup>, não houve incremento de zinco mas somente o disponibilizado pela solução nutritiva de Hoagland (10%) por ser um micronutriente essencial. Porém, destaca-se que o teor de zinco encontrado nessa dose é superior ao permitido pela resolução 357 do CONAMA em águas doces (CONAMA, 2005).

Avaliando o efeito do tempo de cultivo da Alface-d'água na solução contaminada (Tabela 4), pode-se observar que as primeiras doses (Zn = 0,7 e 1,8 mg L<sup>-1</sup>) reduziram os teores de Zn em solução ao longo dos tempos de cultivo, porém essa redução não foi, estatisticamente, significativa. Entretanto, nas maiores doses (Zn = 18 e 181,0 mg L<sup>-1</sup>), o aumento do tempo de cultivo contribuiu, significativamente, para redução dos teores desse elemento em solução em comparação a solução inicial, sendo que na dose com 18 mg L<sup>-1</sup> de zinco esse efeito só foi observado no maior tempo de cultivo testado (168 horas).

A redução dos teores de zinco da solução inicial foi proporcionada pela absorção e acúmulo dos metais nos tecidos da Alface-d'água, como mostrado na Tabela 5.

Na primeira dose (Zn = 0,7 mg L<sup>-1</sup>), pode-se observar que houve um incremento no teor de zinco na raiz e parte aérea dos diferentes tempos de cultivo (24, 48, 72 e 168 horas), porém não significativo estatisticamente. A partir da segunda (Zn = 1,8; 18; 181 mg L<sup>-1</sup>) foi observado uma diferença significativa nos teores de zinco nos tecidos da Alface-d'água com o aumento do tempo de cultivo, atingindo os teores mais elevados nos maiores tempos avaliados, chegando a aproximadamente 12400 e 6000 mg de Zn kg<sup>-1</sup> de raiz e parte aérea respectivamente, na maior dose e tempo de cultivo (Zn = 181 mg L<sup>-1</sup> 168 horas de cultivo) (Tabela 5).

**Tabela 5.** Teores de Zn associados a raiz e parte aérea da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nos diferentes tratamentos e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Teor de metal na biomassa (mg kg <sup>-1</sup> )								
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas				
0,7	Raiz	70,13 Ad	102,71 Ad	114,68 Ad	240,49 Ad				
	P.aérea	66,09 Ac	67,38 Ac	63,25 Ad	127,25 Ad				
1,8	Raiz	548,35 Cc	1019,90 Bc	1059,48 Bc	1514,61 Ac				
	P.aérea	91,85 Bc	150,70 Bc	179,03 Bc	416,69 Ac				
18,0	Raiz	3341,42 Db	3707,96 Cb	4167,51 Bb	5807,50 Ab				
	P.aérea	350,18 Db	637,61 Cb	818,08 Bb	1745,69 Ab				
181,0	Raiz	8763,60 Da	10361,55 Ca	11346,45 Ba	12386,63 Aa				
	P.aérea	1142,56 Da	1489,12 Ca	3142,36 Ba	5780,57 Aa				

cvraiz 2,98% cvp.aérea 5,0% cvtotal 2,68%

Letras maiúscula comparam teores de zinco associado a biomassa nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam teores de zinco associado a biomassa (raiz e parte aérea) nos diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo órgão da planta ao longo do tempo (linha) e os diferentes doses (mesmo órgão da planta) (coluna).

A *E. crassipes* (Aguapé), apresenta nos tecidos concentração de 6500 mg kg<sup>-1</sup> de Zn quando cultivada em solução contaminada com 2mg L<sup>-1</sup> durante 12 dias. Acima dessa concentração, foi observada redução nos teores desse contaminante nos tecidos da planta, possivelmente, pela inibição da fotossíntese (MISHRA & TRIPATHI, 2008). MEGATELI et al., (2009) estudando o acúmulo de Zn pelas macrófitas *Lemna minor*, *Leptodictyum riparium* e *Eloдея canadensis* encontraram acúmulo variando de 65 a 115g kg<sup>-1</sup> quando cultivada por 24 horas em uma solução de aproximadamente 10<sup>-3</sup>M.

Comparando as diferentes doses testadas (Zn = 0,7; 1,8; 18; 181 mg L<sup>-1</sup>), verifica-se que a elevação das doses de contaminação influenciaram nos maiores teores de zinco na raiz e parte aérea das plantas (Tabela 5). Esse incremento foi mais expressivo nas raízes, certamente por ser o órgão responsável pela absorção, por estar em contato direto com a solução contaminada e como um mecanismo de tolerância, evitando a translocação desse elemento, manutenção do aparato fotossintético e sobrevivência da planta. Contudo, na parte aérea, o aumento nos teores de zinco foi estatisticamente significativo nas maiores doses analisadas (18 e 181 mg L<sup>-1</sup>). Nas menores (0,7 e 1,8 mg L<sup>-1</sup>), os incrementos só foram significativos nos tempos mais longos de cultivo (72 e 168 horas), indicando uma maior translocação desse elemento em ambientes mais contaminados e nos maiores tempos de contato da planta com a solução, o que pode favorecer a manutenção das taxas fotossintéticas e, conseqüentemente, o desenvolvimento da planta.

Analisando esses resultados (Tabela 5), observa-se que as maiores concentrações de zinco foram encontradas nas raízes da Alface d'água, em todas as doses e tempos avaliados. Embora tenha ocorrido o incremento da concentração desse metal na parte aérea com o aumento das doses de contaminação e tempos de cultivo, verifica-se, de um modo geral, uma restrição à translocação desse elemento nos menores tempos e doses, provavelmente, como uma estratégia para proteger o aparato fotossintético da condição de estresse.

FARNESE et al. (2014) observaram que o incremento de arsênio na solução aumentou o teor desse metal pesado na Alface-d'água (*Pistia stratiotes*), com concentrações também mais elevadas nas raízes quando comparado com as parte aérea. Os autores observaram também que o aumento das doses de contaminação na solução acima de  $15\mu\text{M}$  ( $1,125\text{ mg L}^{-1}$ ) reduziram os teores de arsênio nas raízes e, conseqüentemente, aumentaram na parte aérea. WOLFF et al., (2009) também verificou que o aumento da concentração de zinco na solução, influenciou nos maiores teores desse elemento associado aos tecidos da *S. auriculata*. MACFARLANE & BURCHETT, (2002) verificaram que a concentração de Zn nas raízes de *A. marina* foi proporcional às concentrações desse elemento no sedimento de fundo, entretanto, na parte aérea os maiores teores de Zn foram encontrados nas maiores concentrações do metal no sedimento, indicando uma maior translocação para parte aérea da planta, nos maiores níveis de contaminação.

LADISLAS et al., (2013) estudaram duas espécies de macrófitas (*Juncus effusus* e *Carex riparia*) em ambiente contaminado com Cd, Ni e Zn e encontraram as maiores acumulações desses elementos nas raízes quando comparado à parte aérea de ambas as espécies. VESK et al., (1999), analisando a localização do zinco dentro das raízes de *Eichhornia crassipes*, usando energia dispersiva de microanálise de raios X, observaram que os níveis mais altos foram encontrados nas células dos feixes vasculares, em grânulos. Quantidades significativas também foram encontradas nas paredes celulares, assim como MACFARLANE & BURCHETT, (2002) observaram para o mesmo elemento nas raízes de *Avicennia marina*. Esses estudos, provavelmente, ratificam a baixa translocação dos elementos para parte aérea e os maiores teores nas raízes, como foi encontrado nesse trabalho (Tabela 5).

Considera-se, portanto, que a Alface-d'água possui potencial para reduzir os níveis de zinco presentes em soluções contaminadas, absorvendo-o e armazenando-o em seus tecidos. Entretanto, para utilização dessa macrófita na remediação de corpos hídricos, é necessário avaliar a sua eficiência na remoção desse elemento pela biomassa da planta, afim de conhecer seu real potencial. O percentual de remoção, apresentado na Tabela 6, indica quanto de zinco foi removido pela biomassa de cada alface-d'água cultivada, tendo como referência a contaminação inicial total da solução.

De acordo com a Tabela 6, podemos notar que a capacidade de remoção de zinco da solução pela planta foi potencializada pelo aumento do tempo de cultivo na solução contaminada, em todas as doses avaliadas, como já havia sido comentado para Tabela 4.

Comparando as diferentes doses de contaminação, observa-se que o aumento das doses reduziu o percentual de remoção do metal pela planta, tanto na raiz como na parte aérea e conseqüentemente por toda planta. Analisando os dados da Tabela 6, verifica-se que a Alface-d'água alcançou os maiores percentuais de remoção nas menores doses avaliadas (Zn =  $0,7$  e  $1,8\text{ mg L}^{-1}$ ), atingindo o valor máximo, de aproximadamente 72% de remoção, na segunda dose e no maior tempo de cultivo (Zn =  $1,8\text{ mg L}^{-1}$  em 168 horas de cultivo). Nas maiores concentrações (Zn =  $18,0$  e  $181,0\text{ mg L}^{-1}$ ), a redução no percentual de remoção de zinco pela planta, atingiu o valor mínimo de 9,2%, na maior dose e no maior tempo de cultivo (Zn =  $181,0\text{ mg L}^{-1}$  em 168 horas de cultivo).

Corroborando os dados apresentados na Tabela 5, observou-se que em todas as doses e tempos avaliados a maior acumulação de zinco ocorreu nas raízes da Alface-d'água (Tabela 6).

**Tabela 6.** Percentual de remoção Zn pela biomassa seca de cada planta (g) de Alface-d'água cultivada em doses crescentes de contaminação e em diferentes tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )		% Remoção de Zn da solução			
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
0,7	Raiz	14,2 Cb	12,0 CBc	16,2 Bb	23,9 Ac
	P.aérea	9,6 Ba	9,3 Ba	9,7 Ba	20,4 Aa
	Total	23,8 Cb	21,3 CBb	25,9 Bb	44,3 Ab
1,8	Raiz	33,1 Da	40,1 Ca	48,0 Ba	53,7 Aa
	P.aérea	4,8 Db	6,8 Cb	9,2 Ba	18,0 Ab
	Total	37,8 Da	46,9 Ca	57,2 Ba	71,7 Aa
18,0	Raiz	14,6 Bb	15,6 Bb	14,9 Bc	28,2 Ab
	P.aérea	1,6 Dc	3,5 Cc	4,6 Bb	9,6 Ac
	Total	16,2 Bc	19,1 Bc	19,5 Bc	37,8 Ac
181,0	Raiz	4,2 Ac	5,4 Ad	3,6 Ad	6,8 Ad
	P.aérea	0,6 Bd	0,7 Bd	1,4 Bc	2,4 Ad
	Total	4,8 Bd	6,1 Bd	5,0 Bd	9,2 Ad

cv raiz 7,27% cv p.aérea 6,19% cvtotal 5,90 %

Letras maiúsculas comparam o percentual de remoção zinco nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nos diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo órgão da planta ao longo do tempo (linha) e as diferentes doses (mesmo órgão da planta) (coluna).

Desempenho semelhante foi observado nas macrófitas *Spirodela polyrrhiza* e *Eichhornia crassipes* com a maior percentagem removida da solução de Cu, Cd, Cr, Zn e Fe, na menor concentração testada (1mg L<sup>-1</sup>) e incremento dessa remoção com o tempo de cultivo (MISHRA & TRIPATHI, 2008). Resultados obtidos por BASILE et al., (2012) demonstraram que as macrófitas *Lemna minor*, *Elodea canadensis*, e *Leptodictyum riparium* foram capazes de remover 50% do Zn em solução nas primeiras 3 horas de cultivo, atingindo 90% em 5 horas de cultivo em uma solução com concentração de 10<sup>-4</sup> M (*L. riparium*), novamente, demonstrando a interferência do tempo na remoção dos metais em solução. *Lemna. Gibba* (Lentilha d'água) removeu 69% de Zn nos primeiros dois dias de cultivo, chegando alcançar, aproximadamente, 100% em 10 dias de cultivo em uma solução com 30 mg ZnL<sup>-1</sup> (MEGATELI et al., 2009). *E. crassipes* removeu 95% de Zn de uma solução contaminada a 2mg L<sup>-1</sup> após 12 dias de incubação. *S. polyrrhiza* removeu 92% quando cultivada sob as mesmas condições (MISHRA & TRIPATHI, 2008).

A partir dos resultados percentuais de remoção de Zn por planta (Tabela 6), foi estimada a quantidade removida pela biomassa seca da Alface-d'água por área de espelho d'água (1m<sup>2</sup>), baseado no espaço ocupado por uma planta viva. Essa estimativa é necessária para estabelecer o manejo dessa planta em ambientes aquáticos contaminados por zinco. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Capacidade aproximada de remoção de Zn por metro cúbico de espelho d'água nos diferentes doses e tempos de cultivo da Alface-d'água.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Zn removido (mg) / m <sup>3</sup> espelho d'água			
	24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
0,7	55,7 Ad	54,6 Ad	69,0 Ad	107,7 Ad
1,8	258,3 Bc	324,0 Bc	360,7 Bc	521,4 Ac
18,0	1069,5 Cb	1358,5 Bb	1236,2 Bb	2557,5 Ab
181,0	3314,8 Ca	3856,2 Ba	3417,7 Ba	6419,9 Aa

cv = 5,83%

Letras maiúsculas comparam a remoção zinco/m<sup>2</sup> nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nos diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Apesar da elevada produção de biomassa da Alface-d'água, essa espécie apresenta crescimento vertical e adensado, permitindo o cultivo de cerca de 127 plantas em 1m<sup>3</sup> de espelho d'água, mostrando sua capacidade de remoção de contaminantes como o Zn e o potencial na remediação de corpos hídricos. A redução de cerca de 90% da biomassa fresca facilita o armazenamento das plantas contaminadas, sendo que, posteriormente podem ser utilizadas como fonte de energia, ou incorporadas a construção civil.

A Tabela 7 apresenta os teores de Zn removidos por m<sup>3</sup> de espelho d'água, ou seja, por 127 plantas. Podemos observar que em todas as doses, a quantidade de Zn removida aumentou com o tempo de cultivo e da dose de contaminação da solução, atingindo 107, 521, 2557 e 6420 mg de Zn removido/m<sup>3</sup> em 168 horas de cultivo em cada dose (0,7; 1,8; 18 e 181 mg L<sup>-1</sup> respectivamente). Esses dados mostram a eficiência dessa macrófita em remover Zn de soluções contaminadas e são úteis para o planejamento, monitoramento e manutenção de projetos de remediação de corpos hídricos contaminados por esses elementos.

Com base nos teores de Zn encontrados na raiz e parte aérea (Tabela 5), foi calculado o fator de bioacumulação (FBC) de zinco nos tecidos da planta nas diferentes doses e tempos de cultivo, demonstrando a relação entre o teor do contaminante na planta (raiz e parte aérea) e o teor do elemento na solução inicial. Foi calculado também o fator de translocação desse elemento (FT), que indica a capacidade de transferir esse elemento da raiz para a parte aérea da planta (Tabela 8).

Analisando a Tabela 8 podemos observar que em todas as doses houve um aumento do fator de bioacumulação de zinco na raiz e parte aérea com o aumento do tempo de cultivo da Alface-d'água. Esse efeito só não foi, estatisticamente, demonstrado nas raízes na maior dose (Zn = 181 mg L<sup>-1</sup>), provavelmente devido a maior translocação para parte aérea da planta, como um mecanismo da planta para resistir a elevada dose de contaminação e ao alto teor desse elemento associado as raízes.



**Tabela 8.** Fator de bioacumulação (FBC) na raiz e parte aérea e fator de translocação (FT) de Zn na Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nas diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	FATOR DE BIOACUMULAÇÃO (FBC)				
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
0,7	Raiz	100,20 Cc	146,70 Bc	163,80 Bc	343,50 Ab
	P. aérea	94,40 Ba	96,25 Ba	90,30 Ba	181,80 Ac
	FT	0,94 Aa	0,65 Ba	0,55 Ca	0,52 Ca
1,8	Raiz	304,60 Ca	566,60 Ba	588,60 Ba	841,50 Aa
	P. aérea	51,00 Db	83,30 Cb	99,50 Ba	231,50 Aa
	FT	0,17 Bb	0,15 Bb	0,17 Bc	0,27 Ac
18,0	Raiz	185,60 Cb	205,90 Bb	231,52 Bb	322,60 Ac
	P. aérea	19,45 Cc	35,42 Bc	45,40 Bb	96,98 Ac
	FT	0,10 Bb	0,17 Bb	0,20 Bbc	0,30 Ac
181,0	Raiz	48,41 Ad	57,25 Ad	62,69 Ad	68,43 Ad
	P. aérea	6,31 Bd	8,20 Bd	17,36 Bc	31,94 Ad
	FT	0,13 Cb	0,13 Cb	0,28 Bb	0,47 Ab
cv BFC raiz = 5,32% cv BFC p.aérea = 6,67% cv FT = 12,94%					

Letras maiúsculas comparam o fator de bioacumulação (FBC) e de translocação (FT) de zinco nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nas diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo órgão da planta ao longo do tempo (mesma linha) e as diferentes doses (mesmo órgão da planta) (mesma coluna).

Comparando as diferentes doses testadas, verifica-se que os maiores fatores de bioacumulação foram encontrados nas menores doses de contaminação, sendo que a bioacumulação máxima encontrada na raiz e parte aérea foi de 841 e 231 respectivamente, na segunda dose e maior tempo de cultivo (Zn= 1,8 mg L<sup>-1</sup> em 168 horas de cultivo), onde também foram encontradas os maiores percentuais remoções do contaminante por planta e por m<sup>2</sup> (Tabela 6 e Tabela 7). Na maior dose (Zn = 181 mg L<sup>-1</sup>) foram encontrados os menores fatores de bioacumulação de zinco na raiz e parte aérea da Alface-d'água, demonstrando a menor remoção (Tabela 6) e acumulação desse elemento nos tecidos da planta proporcionalmente a disponibilidade desse elemento na solução inicial. O mesmo efeito foi observado por BASILE et al., (2012) no cultivo de *L. riparium* e *L. minor* quando aumentou a concentração de Zn na solução de 10<sup>-6</sup> para 10<sup>-4</sup> M e obteve uma redução no FBC.

Em todas as doses e tempos avaliados os maiores fatores de bioconcentração de zinco foram encontrados nas raízes da Alface-d'água, chegando a acumular 3,5 vezes mais que a parte aérea, no maior fator de bioacumulação encontrado (Zn=1,8 mg L<sup>-1</sup>). Esses resultados demonstram a maior capacidade desse órgão em remover e acumular esse elemento em seus tecidos como um mecanismo da planta para proteger o aparato fotossintético dos danos da contaminação por esse metal (OUARITI et al., 1997). ZOCCHÉ et al., (2010) estudando a fitorremediação por *Typha domingensis* em efluentes de beneficiamento de carvão mineral, observaram um acúmulo desse elemento 3 vezes maior nas raízes do que na parte

aérea dessa planta, obtendo resultados próximos aos encontrados nesse trabalho. Esses dados (Tabela 8) não indicam que no maior fator de bioacumulação encontrado exista uma maior acumulação de zinco na planta, pois esses dados se relacionam com a capacidade de bioacumular ou bioconcentrar zinco em relação a contaminação inicial da solução.

O fator de translocação inferior a 1, indica baixa translocação de zinco para parte aérea e conseqüentemente maior retenção desse elemento nas raízes da Alface-d'água, confirmando os resultados discutidos anteriormente (Tabela 4, Tabela 5 e 6).

Foi percebido que as maiores translocações de Zn (FT) na Alface-d'água foram encontrados nos maiores tempos de cultivo dessa planta, com exceção da primeira dose testada ( $Zn = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), que provavelmente, devido à baixa concentração desse elemento e seu papel como micronutriente o fez ser distribuído homogeneamente por toda planta. Já nas maiores concentrações, ( $Zn = 1,8; 18 \text{ e } 180 \text{ mg L}^{-1}$ ), a translocação de Zn só foi alterada nos maiores tempos de cultivo (72 e 168 horas), indicando uma resistência da planta em translocar esse elemento quando em concentrações elevadas.

Observando o fator de translocação nas diferentes doses, verifica-se que houve uma redução nesse fator com o aumento das doses de contaminação (de  $0,7$  para  $1,8 \text{ mg L}^{-1}$ ), porém esse fator voltou a aumentar nos maiores tempos de cultivo das maiores doses ( $Zn = 18 \text{ e } 180 \text{ mg L}^{-1}$  em 72 e 168 horas de cultivo), possivelmente devido as elevadas concentrações de zinco acumuladas na raiz.

BASILE et al., (2012) observaram que a macrófita *L. riparium* obteve o maior fator de bioconcentração de Zn do que as macrófitas *L. minor* e *E. canadenses*, atingindo um BFC total de 975,738 quando cultivada em uma solução a  $10^{-6}M$  ( $0,06 \text{ mg L}^{-1}$ ). As demais macrófitas testadas por esses autores tiveram o um FBC total de 562,307 e 593,338, respectivamente. YORKS, (1997) estudou a absorção de zinco e chumbo pela *Typha latifolia* e observou que esses metais se acumularam, majoritariamente, nas raízes dessa planta em todas as concentrações testadas, indicando um baixo fator de translocação desses elementos ( $<1$ ). MACFARLANE & BURCHETT, (2002) cultivaram *Avicennia marina*, uma macrófita emersa, e observaram que as taxas de acumulação de Zn nas raízes tenderam a diminuir com o aumento da concentração desse elemento no sedimento de fundo, levando a níveis significativamente mais elevados de Zn nas folhas, demonstrando também a maior translocação nas maiores contaminações. Os autores observaram que a translocação de Zn das raízes para a parte aérea foi maior do que observada para os metais Cu e Pb.

CRUZ, (2011) estudando o cultivo de *E. crassipes* em água de drenagem ácida de mina (DAM) verificaram que o maior acúmulo de cobre (Cu), ferro (Fe) e arsênio (As) e zinco (Zn) nas raízes dessa macrófita, potencializado pelo aumento da disponibilidade desses elementos em solução. O fator de translocação apresentado foi menor que 1 em todas as doses e reduziu conforme o aumento da contaminação em solução, confirmando o maior acúmulo nas raízes. O mesmo não foi observado para o manganês (Mn) que manteve concentrações semelhantes na raiz e parte aérea da planta em todas as concentrações da solução. VESELY et al., (2012) também estudaram a Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) e verificaram maior bioacumulação de alumínio, ferro e manganês nas raízes do que na parte aérea dessa planta e, encontraram o maior FBC nesse órgão para o alumínio de 6,146 em três dias de cultivo. MEGATELI et al., (2009) não observaram diferença significativa no acúmulo de Zn nas diferentes partes das macrófitas *E. canadenses* e *L. minor*, sugerindo absorção desse elemento também pelas folhas dessas plantas.

#### **b) Teores de pigmentos fotossintéticos nos tecidos da alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada no experimento com zinco:**

A cada coleta, foram destacados discos foliares, de diâmetro conhecido, das folhas das plantas cultivadas em todas as doses avaliadas, para analisar o efeito da contaminação e do

tempo de cultivo na síntese de pigmentos fotossintéticos pela Alface-d'água. Os resultados obtidos são demonstrados na Tabela 9.

**Tabela 9.** Teores de Clorofila a (Chl a), Clorofila b (Chl b), Clorofila total (C total) e Carotenoides (Cx+c) nas folhas da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada em doses crescentes de zinco e diferentes tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Pigmentos fotossintéticos µg.cm <sup>-2</sup>								
		24 horas		48 horas		72 horas		168 horas	
0,7	<b>Chl a</b>	6,35	<b>Bb</b>	6,55	<b>Ba</b>	6,54	<b>Bb</b>	9,82	<b>Aa</b>
	<b>Chl b</b>	2,37	<b>Ba</b>	2,56	<b>BAa</b>	2,50	<b>BAb</b>	3,25	<b>Aa</b>
	<b>Ctotal</b>	8,71	<b>Ba</b>	9,12	<b>Ba</b>	9,04	<b>Bb</b>	13,07	<b>Aa</b>
	<b>Cx+c</b>	1,72	<b>Ba</b>	1,57	<b>Ba</b>	1,53	<b>Bb</b>	2,16	<b>Ab</b>
1,8	<b>Chl a</b>	6,86	<b>Bb</b>	6,97	<b>Ba</b>	6,77	<b>Bb</b>	8,41	<b>Aa</b>
	<b>Chl b</b>	2,10	<b>Ba</b>	2,45	<b>Ba</b>	2,34	<b>Bb</b>	3,53	<b>Aa</b>
	<b>Ctotal</b>	8,96	<b>Aa</b>	9,43	<b>Aa</b>	9,12	<b>Ab</b>	11,94	<b>Aa</b>
	<b>Cx+c</b>	1,59	<b>Ba</b>	1,64	<b>Ba</b>	1,29	<b>Bba</b>	2,29	<b>Ab</b>
18,0	<b>Chl a</b>	6,14	<b>Bb</b>	7,93	<b>BAa</b>	9,18	<b>Aa</b>	9,89	<b>Aa</b>
	<b>Chl b</b>	2,36	<b>Ba</b>	2,74	<b>BAa</b>	3,35	<b>Baa</b>	3,62	<b>Aa</b>
	<b>Ctotal</b>	8,50	<b>Ba</b>	10,67	<b>BAa</b>	12,53	<b>Aa</b>	13,52	<b>Aa</b>
	<b>Cx+c</b>	1,64	<b>Ba</b>	1,58	<b>Ba</b>	2,21	<b>Aa</b>	2,09	<b>Ab</b>
181,0	<b>Chl a</b>	8,48	<b>Aa</b>	7,35	<b>Ba</b>	6,88	<b>Bb</b>	8,61	<b>Aa</b>
	<b>Chl b</b>	2,52	<b>Ba</b>	2,55	<b>Ba</b>	2,60	<b>Bba</b>	4,70	<b>Aa</b>
	<b>Ctotal</b>	10,99	<b>Ba</b>	9,91	<b>BCa</b>	9,48	<b>BCb</b>	13,31	<b>Aa</b>
	<b>Cx+c</b>	1,65	<b>Ba</b>	1,66	<b>Ba</b>	1,69	<b>Bb</b>	2,83	<b>Aa</b>

cv Ca= 6,01% cv Cb= 12,25% cv Ctotal= 13,86% cv Cx+c = 8,89%

Letras maiúsculas comparam os teores de pigmentos nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nas diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo pigmento ao longo do tempo (mesma linha) e nas diferentes doses (mesmo pigmento) (em mesma coluna).

Analisando os teores de pigmentos fotossintéticos obtidos (Tabela 9), podemos observar que houve um incremento na síntese desses pigmentos (Chl a, Chl b e Cx+c) com o aumento do tempo de cultivo da planta em todas as doses avaliadas. Na maior dose (Zn = 181,0 mg L<sup>-1</sup>), onde houve maior translocação de zinco da raiz para parte aérea da planta (Tabela 8), esse efeito foi mais significativo para clorofila *b* e carotenoides, indicando, possivelmente, um mecanismo de defesa da Alface-d'água, já que esses pigmentos são conhecidos como “pigmentos acessórios” e auxiliam na maior captação de luz (região do espectro não captada pela clorofila *a*) e transferência dessa energia para os centros de reação dos processos fotossintéticos (STREIT et al., 2005; CARDOSO, 1997), uma vez que, a planta entende que para sobreviver ao estresse é necessário incrementar a captação de energia. Os carotenoides também atuam como antioxidantes, evitando ou reduzindo os danos no aparato fotossintético pela formação de radicais livres, através da supressão do estado tripleto da clorofila, evitando a formação do oxigênio singleto, dissipando essa energia em situações de estresse (CARDOSO, 1997; PILLAI et al., 2013). Acredita-se que esse efeito seja mais pronunciado nos maiores tempos de cultivo da planta (Ver Figura 13 adiante).

Comparando os teores de pigmentos nas diferentes doses avaliadas, podemos observar que as clorofilas a e b, resistiram ao aumento das doses de contaminação, não alterando, significativamente, sua síntese com a maior concentração de zinco na solução e, conseqüentemente, maiores teores associados à planta (Tabela 5). Para os carotenoides foi observado um incremento em sua síntese na maior dose e tempo de cultivo ( $Zn = 181,0 \text{ mg L}^{-1}$  em 168 horas de cultivo), indicando mais uma vez um mecanismo de resistência dessa planta a contaminação. A manutenção e incremento da síntese de pigmentos em ambientes contaminados podem estar associados com a baixa translocação do contaminante para parte aérea dessa planta, porém mesmo nos maiores fatores de translocação observou-se um incremento ao invés de redução em suas sínteses.

CRUZ, (2011) estudando as macrófitas aquáticas *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* cultivadas em água de drenagem ácida de mina (DAM) com altos teores de zinco, observou que nos meios mais ácidos (pH 2,5) e com maior disponibilidade desse elemento ( $Zn = 7,08 \text{ mg L}^{-1}$ ) as macrófitas apresentavam os menores teores de clorofila total e carotenoides. TEWARI et al., (2008) estudando o cultivo da *Pistia stratiotes* em lamas urbanas com altos teores de metais pesados não constataram variação significativa na síntese de clorofila total até o sétimo dia de cultivo. Porém, no 15º dia foi verificado uma redução de 48% na quantidade desses pigmentos acompanhada de um incremento nos teores de carotenoides de aproximadamente 35%, próximo aos resultados de carotenoides obtidos nesse experimento (Tabela 9). AUGUSTYNOWICZ et al., (2014) avaliando a fitorremediação de metais pesados pela macrófita *Callitriche cophocarpa*, observaram que altos níveis de bioacumulação de zinco não afetaram significativamente a síntese de pigmentos fotossintéticos. MARQUES, (2013) também observou o incremento dos pigmentos fotossintéticos no cultivo hidropônico do pinhão manso nas menores concentrações de zinco na solução, justificado pelo papel como micronutriente essencial e indicando um funcionamento normal do aparato fotossintético. Já nas maiores concentrações testadas, o autor verificou o efeito tóxico desse elemento e redução nos teores de pigmentos fotossintéticos.

A partir dos dados apresentados na Tabela 9 foi calculado a razão entre a clorofila *a/b* nas diferentes doses e tempos de cultivo, afim de observar se houve um efeito dessas variáveis na razão entre esses pigmentos. Segundo STREIT et al., (2005) essas clorofilas encontram-se, naturalmente, na proporção 3:1, e nas plantas C3 entre 2,5 e 3,5 segundo LICHTENTHALER & BUSCHMANN, (2011), análogo as macrófitas flutuantes livres como a Alface-d'água (PIERINI & THOMAZ, 2004). Os dados obtidos com esses cálculos são apresentados na Tabela 10.

Pode-se observar que não houve uma diferença significativa na razão Chl a / Chl b ao longo dos tempos de cultivo nas doses avaliadas, mantendo-se dentro da faixa de razão natural da espécie (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001), exceto na maior concentração da solução ( $Zn = 181,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) onde foi verificado uma redução nessa razão com aumento do tempo de cultivo, indicando a manutenção dos teores de clorofila *b* e redução na síntese de clorofila *a* (Tabela 10).

**Tabela 10.** Razão Chl a/ Chl b nas folhas da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nas diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Razão Chl a / Chl b			
	24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
<b>0,7</b>	2,67 <b>Ab</b>	2,56 <b>Aa</b>	2,62 <b>Aa</b>	3,02 <b>Aa</b>
<b>1,8</b>	3,27 <b>Aa</b>	2,87 <b>ABa</b>	2,90 <b>ABa</b>	2,39 <b>Bab</b>
<b>18,0</b>	2,60 <b>Aba</b>	2,90 <b>Aa</b>	2,74 <b>Aa</b>	2,74 <b>Ab</b>
<b>181,0</b>	3,40 <b>Aa</b>	2,88 <b>ABa</b>	2,64 <b>Ba</b>	1,83 <b>Cb</b>

cv = 11,04%

Letras maiúsculas comparam a Razão ao longo do tempo na mesma linha, entre colunas. Letras minúsculas comparam a Razão nos diferentes doses (doses de Zn) na mesma coluna, entre linhas.

Comparando as diferentes doses, pode-se observar que houve um incremento na razão entre as clorofilas no primeiro tempo de cultivo (24 horas) com o aumento das doses de contaminação, demonstrando uma superioridade da clorofila *a* em relação a clorofila *b* nesse tempo avaliado. Nos tempos de 48 e 72 horas, não foi observado diferença significativa na razão Chl a/Chl b, demonstrando uma estabilização na síntese dos pigmentos mesmo em condição de estresse. Em 168 horas de cultivo, com as maiores doses foi observado uma redução significativa na razão entre as clorofilas, demonstrando, novamente, o aumento do teor da clorofila *b* em condição de maior contaminação (Tabela 10).

Esses resultados indicam, mais uma vez, que o incremento na produção de clorofila *b*, nas maiores translocações de zinco para parte aérea da planta (Tabela 8), foi uma estratégia de defesa da Alface-d'água para aumentar a absorção de luz e transferência de energia para o centro de reação, afim de manter a fotossíntese e consequentemente o desenvolvimento da planta em uma situação de estresse.

A variação na produção dos pigmentos fotossintéticos está relacionada a diferentes estresses (KOPSELL et al., 2011). SOUZA, (2010) cultivou *Mentha arvensis L.* em sistema hidropônico sob diferentes condições de cultivo e observou, em uma condição de estresse por baixa luminosidade, uma menor razão Chl a / Chl b. Esse autor comenta que a razão entre clorofilas pode indicar o nível de dano que determinado estresse causa na planta. COSTA, (2015) estudou a produção de arroz em diferentes substratos e proporções de casca de arroz carbonizada (CAC) e verificou que a razão clorofila a / b foi reduzida nas doses com menor proporção de CAC, indicando uma maior síntese de clorofila *b* devido ao estresse pela diminuição de nutrientes.

Com base nos teores de pigmentos obtidos (Tabela 9) foram calculados também as relações clorofila total / carotenoides afim de indicar as possíveis respostas das plantas ao cultivo em doses crescentes de Zn e tempos de cultivo da Alface-d'água. Segundo LICHTENTHALER & BUSCHMANN, (2001) para plantas do metabolismo C3 está na faixa entre 4,2-5,0. Os valores obtidos nesse experimento são apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11.** Razão C total / Cx+c nas folhas da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nas diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Razão C total /Cx+c			
	24	48	72	168
0,7	5,06 Bb	5,81 Ab	5,91 Ab	6,04 Aa
1,8	5,63 Cb	5,75 Cb	7,01 Ba	5,21 Ab
18,0	5,17 Cb	6,75 Aa	5,67 Bbc	5,45 Bc
181,0	6,66 Aa	5,8 Bb	5,62 Bc	4,70 Cd

cv = 3,05%

Letras maiúsculas comparam a Razão ao longo do tempo, na mesma linha, entre colunas. Letras minúsculas comparam a Razão nas diferentes doses na mesma coluna, entre linhas.

Analisando os dados, podemos observar que o maior do tempo de cultivo (168 horas) favoreceu a maior relação Clorofila total / carotenoides nas menores doses (Zn = 0,7 e 1,8 mg L<sup>-1</sup>), demonstrando a superioridade nos teores de clorofilas em proporção aos carotenoides. Na maior concentração (Zn = 180 mg L<sup>-1</sup>) verificou-se o inverso, com a redução nessa relação Ctotal / Cx+c, indicando um incremento na proporção dos teores de carotenoides em relação a clorofila. Esses resultados se relacionam com maiores teores de zinco associado à biomassa da parte aérea (Tabela 5), que, possivelmente, pode ter influenciado nessa razão entre os pigmentos fotossintéticos.

Comparando essa relação entre as diferentes doses testadas (Tabela 11), pode-se observar uma maior razão entre esses pigmentos com o aumento das doses de contaminação nos menores tempos de cultivo (24 e 48 horas), demonstrando o favorecimento na síntese de clorofilas em proporção aos carotenoides. Nos maiores tempos de cultivo (72 e 168 horas), o aumento das doses de contaminação reduziram a razão Ctotal / Cx+c em comparação a dose controle, demonstrando uma maior síntese de carotenoides nesse cenário de maior contaminação na parte aérea (Tabela 5 e Tabela 8). Esses resultados se justificam pela atuação dos carotenoides como pigmento acessório, absorvendo luz na faixa de 400-500nm onde a clorofila não é muito eficiente, aumentando assim a capacidade de absorção de luz e translocação dessa energia para os centros de reação (PSII) da fase fotoquímica da fotossíntese e também como fotoprotetor e antioxidante, dissipando o excesso de energia da clorofila (extinção não-fotoquímica), evitando a formação de radicais livres que possam causar danos ao aparato fotossintético (COLLINS et al., 2011).

Ressalta-se também, que os dados obtidos, na sua maioria, foram superiores a faixa de razão considerada normal para plantas do tipo C3 (4,2 a 5,0) segundo LICHTENTHALER & BUSCHMANN, (2001). Esses resultados indicam, possivelmente, a ação de um mecanismo da Alface-d'água para investir na síntese de pigmentos, principalmente clorofilas, em resposta a um ambiente contaminado, para manter, em condição de estresse, sua fotossíntese e desenvolvimento. SOUZA, (2010) explica que a razão clorofila / carotenoide nas folhas pode demonstrar o nível de dano causado a planta pelo contaminante avaliado, pois alguns estresses podem afetar mais fortemente as clorofilas que os carotenoides. ZHANG et al., (2014) avaliaram a tolerância da macrófita *Hydrilla verticillata* a doses crescentes de zinco e observaram que os menores teores desse elemento associados à parte aérea não afetaram, significativamente, a produção de pigmentos fotossintéticos, enquanto as maiores concentrações reduziram os teores de clorofila total, a partir do 4º dia de cultivo. Os teores de carotenoides foram reduzidos até o 4º dia, apresentando um incremento a partir daí até o 8º dia de cultivo, principalmente, nas doses onde houve maior acúmulo de zinco na parte aérea, possuindo menor razão Ctotal / Cx+c. Esses autores afirmam que o incremento nos teores de

carotenoides podem aliviar os efeitos tóxicos do estresse oxidativo nos cloroplastos, por realizar um papel essencial no centro de reação fotossintético dos organismos fotossintetizantes. MISHRA & TRIPATHI, (2008) cultivaram *E. crassipes*, *S. polyrrhiza* e *P. stratiotes* em concentrações crescentes de metais pesados e observaram uma redução nos teores de clorofila total, com aumento das doses de contaminação. NUNES et al., (2013) cultivaram a alga *Haematococcus pluvialis* sob estresse nutricional e luminoso e verificaram o aumento nos teores de carotenoides já no segundo dia de estresse.

**c) Teores de pigmentos fotossintéticos por clorofilômetro portátil (ClorofiLOG):**

O clorofilômetro portátil utilizado neste trabalho, ClorofiLOG (Falker Automação Agrícola, Brasil), é um dos mais recentes lançados e se baseia na emissão de radiação em três comprimentos de onda, por fotodiodos. Dois são emitidos na banda do vermelho (635 e 660 nm, próximos aos picos de cada clorofila) e outro na banda do infravermelho próximo (880 nm). O sensor do aparelho recebe a radiação transmitida pela folha e a partir desses dados, gera os resultados em valores proporcionais a absorvância das clorofilas, conhecidos como Índice de Clorofila Faker (ICF) (BARBIERI JUNIOR et al., 2012).

Com o uso do clorofilômetro portátil foi aferido de forma indireta e não destrutiva os teores de clorofila, designado como índice de clorofila Falker (ICF). Esse índice se baseou nas propriedades ópticas dos tecidos foliares da Alface-d'água cultivada em diferentes doses de contaminação e tempos de cultivo. Esses índices são apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12.** Índice de clorofila Falker (ICF) dos tecidos foliares da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nas diferentes doses de contaminação por Zn e diferentes tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	ICF			
	24	48	72	168
0,7	27,4 Aa	26,0 Aa	25,1 Aa	27,7 Ab
1,8	27,0 Aa	26,0 Aa	26,0 Aa	26,76 Ab
18,0	26,1 Aa	27,4 Aa	23,9 Aa	26,35 Ab
181,0	26,5 Ba	26,0 Ba	25,4 Ba	32,8 Aa

cv = 8,60%

Letras maiúsculas comparam ICF ao longo do tempo, na mesma linha, entre colunas. Letras minúsculas comparam ICF nas diferentes doses de contaminação por Zn na mesma coluna, entre linhas.

Analisando os dados obtidos observou-se que o aumento do tempo de cultivo favoreceu os maiores índices de clorofila na maior dose testada (Zn = 181,0 mg L<sup>-1</sup>) onde houve maior translocação desse elemento para parte aérea, não demonstrando efeitos significativos nas demais doses avaliadas. Resultados semelhantes foram encontrados para os teores de clorofila total (Tabela 9), nas análises de pigmentos fotossintéticos (método destrutivo), marcadamente pelo incremento de clorofila *b*. Esses dados demonstram uma resistência dos pigmentos fotossintéticos em se manterem inalterados mesmo em condição de estresse.

Comparando as diferentes doses observamos também que somente no maior tempo de cultivo (168 horas) e na maior concentração (Zn = 181,0 mg L<sup>-1</sup>) houve um maior índice de

clorofila pela Alface-d'água. Nas demais doses e tempos cultivo não houve diferença estatística nos índices de clorofila encontrados (Tabela 12).

DUARTE, (2015) cultivou a Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) em diversas proporções de elementos terras raras (ETR) com altas concentrações de Zn e não observou diferença significativa no índice de clorofila SPAD. O autor também encontrou uma taxa fotossintética semelhante em todas as doses avaliadas. ZABINI et al., (2002) avaliaram a eficiência no uso do zinco de diferentes cultivares de café e observaram que a variedade Caturra V. 4 reduziu seu índice de clorofila SPAD com o aumento da disponibilidade desse elemento para planta. ADAMSKI et al., (2011) estudaram as alterações fotossintéticas induzidas por doses crescentes de ferro na batata doce e verificaram que as maiores doses desse elemento favoreceram os maiores índices de clorofila nas plantas, o que não significou maior fotossíntese líquida, quando comparadas com a dose controle.

#### **d) Eficiência fotossintética da Alface-d'água cultivada sob doses de contaminação por zinco**

O Teste JIP foi descrito por STRASSER & STRASSER, (1995), como uma ferramenta de análise da fluorescência transiente, onde se analisa, quantitativamente, diferentes parâmetros que estão relacionados com a funcionalidade do “maquinário fotossintético”. Este teste tem-se mostrado muito adequado para avaliar a fotossíntese de plantas submetidas a estresse (BUSSOTTI et al., 2007), uma vez que, através dele é possível quantificar o fluxo de energia que passa pelos fotossistemas e as alterações pontuais nas estruturas que fazem parte deste metabolismo (parâmetros), avaliando assim o desempenho fotossintético geral da planta (STIRBET & GOVINDJEE, 2011).

A Figura 13 apresenta os parâmetros obtidos através do Teste-JIP da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada em diferentes tempos e doses de contaminação por zinco.

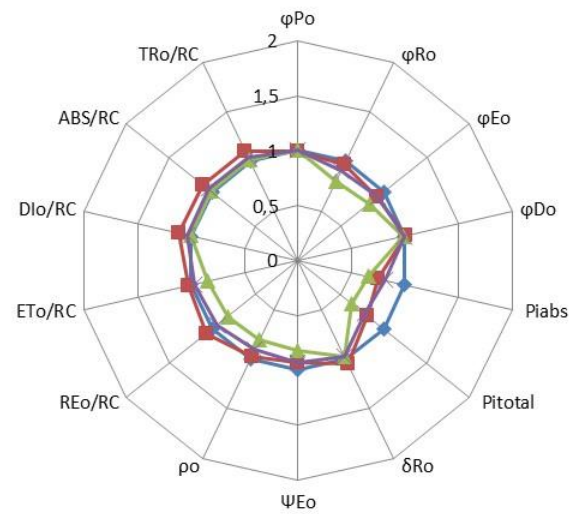
Na primeira dose avaliada ( $Zn = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$ ), assumida como tratamento controle, uma vez que não houve incremento de zinco, mas somente os teores utilizados na solução nutritiva de Hoagland (10%) por ser um micronutriente essencial. Esta dose foi ajustada a 1,0, conforme a metodologia utilizada (STRASSER & STRASSER, 1995).

No primeiro tempo de cultivo avaliado (24 horas) observou-se que as plantas desenvolvidas com incremento de zinco na solução nutritiva ( $Zn = 1,8; 18 \text{ e } 180 \text{ mg L}^{-1}$ ), reduziram seu índice de desempenho fotossintético total ( $Pi_{total}$ ), em aproximadamente 25%. Este parâmetro se caracteriza por englobar o efeito de vários constituintes do aparato fotossintético, sendo considerado como multiparamétrico.

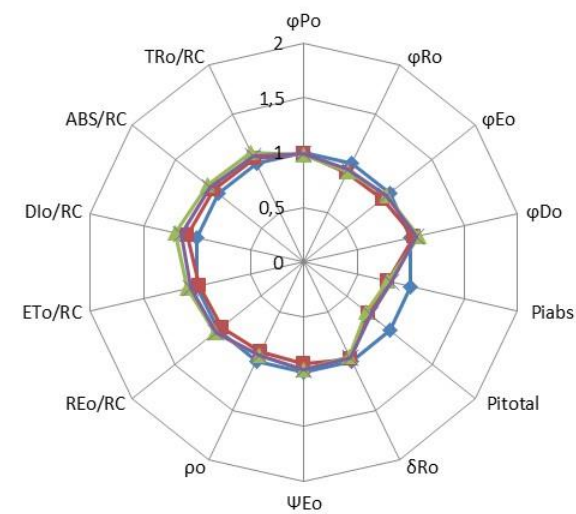
De acordo com a Figura 13, verifica-se que esse efeito foi consequência, principalmente, da redução  $Pi_{abs}$ , que se refere ao índice de desempenho fotossintético do fotossistema II (PS II). Na dose com  $18 \text{ mg Zn L}^{-1}$ , foi demonstrada também uma pequena redução em outros parâmetros avaliados, como: rendimento quântico fotoquímico ( $\phi P_0$ ); rendimento quântico do transporte de elétrons da plastoquinona ( $Q_A$ ) para o aceptor final de elétrons do fotossistema I (PS I) ( $\phi R_0$ ); rendimento quântico do transporte de elétrons de  $Q_A$  para o intersistema de aceptores de elétrons ( $\phi E_0$ ); eficiência com que se pode mover um elétron dentro da cadeia de transporte de elétrons de  $Q_A$  para os aceptores finais do PS I ( $P_0$ ); diminuição da redução do aceptor final de elétrons no lado do aceptor de elétrons do PS I pelo centro de reação ( $RE_0/RC$ ) e também, diminuição da reoxidação da  $Q_A^-$  via transporte de elétrons em um centro de reação (CR) ativo ( $ET_0/RC$ ). A redução dos valores desses parâmetros, nas doses avaliadas, determinou menor índice de desempenho fotossintético total ( $Pi_{total}$ ) das macrófitas em comparação ao controle, demonstrando o efeito tóxico do Zn na eficiência fotossintética dessas plantas em 24 horas de cultivo.



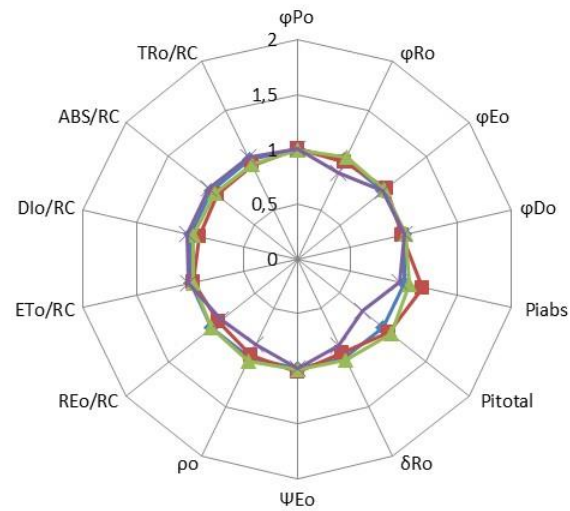
24 horas



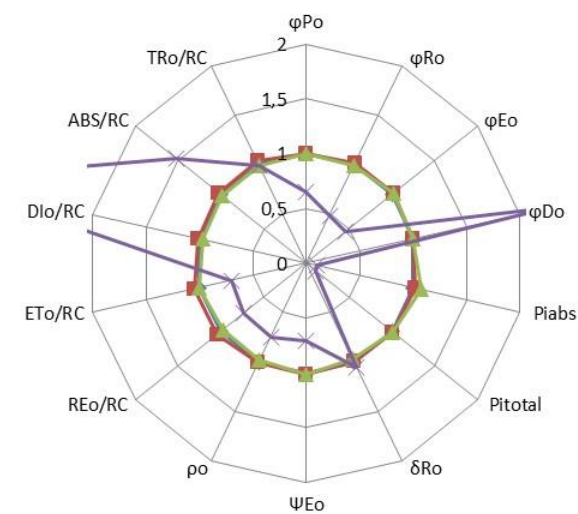
48 horas



72 horas



168 horas



◆ 0,68 mg.L-1    ■ 1,8 mg.L-1    ▲ 18 mg.L-1    ✕ 180 mg.L-1

**Figura 13.** Teste JIP aplicado nas folhas da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada sob doses crescentes de Zn em diferentes tempos de cultivo.

DAYAN & ZACCARO, (2012) explicam que a fotossíntese é diretamente afetada pelo desvio de elétrons, uma vez que, em condições normais, eles são energizados e transferidos do PSII para plastoquinona, plastocianina e PSI onde vão reduzir o NADPH que, posteriormente, será utilizado para fixação de carbono. Quando esse fluxo é inibido, os elétrons podem ser transferidos a outros receptores, gerando espécies reativas de oxigênio (EROS), e tornando o caminho da fotossíntese cada vez mais dificultado.

Em 48 horas de cultivo, fica evidente a redução do índice de desempenho fotossintético total ( $Pi_{total}$ ) em função da redução do funcionamento do PS II ( $Pi_{abs}$ ) em todas as doses de contaminação ( $Zn = 1,8; 18$  e  $180 \text{ mg L}^{-1}$ ), demonstrando a sensibilidade desse fotossistema a contaminação por zinco. A terceira dose ( $18 \text{ mg L}^{-1}$ ) recuperou as atividades normais dos demais parâmetros afetados em 24 horas ( $\phi P_0, \phi R_0, \phi E_0, P_0, RE_0/RC$  e  $ET_0/RC$ ), retornando a condições muito próximas ao controle ( $Zn = 0,68 \text{ mg L}^{-1}$ ), o que indica ação de um mecanismo de resistência da planta a contaminação. A Figura 13 também demonstra que as concentrações avaliadas ( $Zn = 1,8; 18$  e  $180 \text{ mg L}^{-1}$ ) em 48 horas de cultivo tiveram um leve incremento na dissipação da energia de excitação não captada pelo CR na forma de calor ( $DI_0/RC$ ), possivelmente, pela redução do funcionamento do PS II ( $Pi_{abs}$ ). SOUSA, (2012) também observou um efeito do herbicida fomesafen na redução dos índices fotossintéticos do fotossistema II e conseqüentemente da fotossíntese total da planta ( $PI_{ABS}$  e  $PI_{total}$ ), em até 20%, quando comparado ao controle (Figura 13).

As macrófitas analisadas, após 72 horas de cultivo, mostraram uma recuperação dos índices de desempenho do fotossistema II e conseqüentemente do índice fotossintético total, e não sendo observado efeito na maior dose de contaminação avaliada ( $Zn = 180 \text{ mg L}^{-1}$ ). A dissipação de energia na forma de calor ( $DI_0/RC$ ) também foi reduzida. A fluorescência da Alface-d'água neste tempo de cultivo demonstrou um mecanismo de resistência a contaminação, com a retomada dos índices fotossintéticos próximos aos normais (controle), como uma tentativa de sobreviver ao ambiente contaminado, possivelmente relacionado com o incremento de clorofila *b*, como apresentado na Tabela 9. Observa-se que a dose mais elevada ( $Zn = 180 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresentou uma leve redução nos parâmetros  $\phi R_0, P_0$  e  $RE_0/RC$ , indicando um comprometimento do transporte de elétrons de  $Q_A$  para o PS I, que contribuíram para redução do índice fotossintético, como resposta a elevada dose de contaminação, o que também está relacionado com a diminuição dos pigmentos fotossintéticos observados nessa dose (Tabela 9). CISCATO et al., (1999) afirmam que os dados de fluorescência podem ser interpretados de acordo com aptidão da planta para suportar situações de estresse. A planta pode apresentar respostas elásticas, quando as modificações ocasionadas pela contaminação são reversíveis, ou plásticas, quando as alterações são irreversíveis, o que pode significar também a adaptação da planta ao estresse.

No maior tempo de cultivo avaliado (168 horas), observou-se que as doses com  $1,8$  e  $18 \text{ mg L}^{-1}$  de zinco, mantiveram a recuperação dos índices fotossintéticos (já observada no tempo anterior), atingindo as taxas obtidas no controle (Figura 13). Esses resultados se relacionam com o incremento dos pigmentos fotossintéticos, especialmente clorofila *b*, e demonstram a tolerância da Alface-d'água a contaminação por zinco, confirmando seu potencial para utilização na remediação de corpos hídricos contaminados por esse elemento, sobretudo nessa faixa de contaminação. Entretanto, este desempenho não foi observado na maior dose de contaminação ( $Zn = 180 \text{ mg L}^{-1}$ ), onde ocorreu uma completa redução dos índices fotossintéticos totais ( $Pi_{total}$ ), devido a diminuição de vários parâmetros envolvendo o transporte de elétrons ( $\phi E_0, P_0, RE_0/RC$  e  $ET_0/RC$ ). Esta redução, favoreceu o incremento dos parâmetros de dissipação de energia na forma de calor ( $DI_0/RC$  e  $\phi D_0$ ) e da medida do tamanho aparente do sistema antena ou do fluxo de absorção por CR ( $ABS/RC$ ), afetando assim, o rendimento quântico fotoquímico ( $\phi P_0$ ) e do fotossistema II ( $PI_{ABS}$ ), reduzindo o índice fotossintético a zero. O aumento da dissipação da energia não capturada pelo CR do PS

II, nessa dose de contaminação ( $DI_0/RC$  e  $\phi D_0$ ) é coerente com os resultados obtidos de pigmentos fotossintéticos (Tabela 9), onde foi demonstrado um incremento nos teores de carotenoides que atuam nesse processo. Esses resultados demonstram que a Alface-d'água não suportou essa dose contaminação ( $180 \text{ mg L}^{-1}$ ) durante esse tempo de cultivo (168 horas), devido aos efeitos fitotóxicos apresentados no aparato fotossintético. Nesse tempo e dose foram encontrados os maiores teores e translocações de Zn para parte aérea (Tabela 5 e Tabela 8). SOUSA, (2012) também observou, em discos foliares de soja tratados com elevada dose do herbicida clomazone, uma redução dos parâmetros relacionados ao transporte de elétrons ( $\phi E_0$ ,  $\Psi_0$ ,  $ET_0/RC$  e  $RE_0/RC$ ), reduzindo, conseqüentemente, a eficiência fotossintética do fotossistema II ( $PI_{ABS}$ ), que foi acompanhado de um incremento na dissipação de energia na forma de calor ( $DI_0/RC$ ). EULLAFFROY et al., (2009) observaram que todos os herbicidas utilizados na macrófita *Lemna minor* induziram a um aumento significativo na dissipação de energia na forma de calor ( $DI_0/RC$ ). Os autores acrescentam que esse parâmetro pode ser entendido como a absorção de fótons em maiores taxas do que pode ser capturado pelo centro de reação, o que pode ser movido pela redução da atividade deste centro que levam o fluxo de energia a cadeia transportadora ou devido a um aumento relativo deste centro de reação ( $ABS/RC$ ), favorecendo a dissipação de energia através de vias não-fotoquímicas. A inativação do centro de reação do FSII, como aconteceu nesse experimento, não irá formar  $Q_A$  reduzida, gerando assim o chamado “dissipador de calor” ou “centro de reação silenciosa” uma vez que o transporte de elétrons é bloqueado entre  $Q_A$  e  $Q_B$ , sendo que o incremento de  $ABS/RC$  é, principalmente, devido a menor quantidade de CR por absorção, que pode estar relacionado com a diminuição da clorofila *a* nessa dose (Tabela 9).

Em todas as doses e tempos avaliados podemos observar que os parâmetros mais sensíveis a contaminação por Zn foram  $PI_{ABS}$  e  $PI_{total}$ . Segundo ADAMSKI et al., (2011) o índice de desempenho desses parâmetros fornece dados adicionais sobre a eficiência fotossintética de plantas. O  $PI_{ABS}$  compreende a quantidade de centros de reação fotossintética por clorofila, o influxo máximo de energia que atinge o centro de reação do fotossistema II e a eficiência no transporte de elétrons no início da iluminação (STRASSER & TSIMILLI-MICHAEL, 2004). YUSUF et al., (2010) apontam o  $PI_{total}$  como parâmetro mais sensível do Teste JIP, por avaliar a atuação do aparato fotossintético até os receptores finais de elétrons do PSI, estando intensamente relacionado com as taxas fotossintéticas exibidas pela planta, conseqüentemente, no seu crescimento e sobrevivência quando cultivada em situações estressantes. Os mesmos autores explicam esse parâmetro, sendo negativo ou positivo se relacionam com a diminuição ou aumento da capacidade de conservação de energia, ou seja, a quantidade de elétrons que realmente foram transferidos para os receptores finais de elétrons em comparação ao teor de fótons absorvidos.

De uma maneira geral, pode-se concluir que a Alface-d'água apresentou elevada tolerância as diferentes doses de contaminação por Zn, o que favoreceu sua atuação como fitoextratora desse metal. Contudo, na maior dose testada ( $181 \text{ mg L}^{-1}$ ), que equivale a mil vezes o permitido nos corpos hídricos pela resolução do CONAMA (CONAMA, 2005), resultou em danos irreversíveis ao aparato fotossintético dessa planta. Esses danos foram agravados com o aumento do tempo de cultivo, não permitindo seu desenvolvimento até 168 horas (Figura 13), tornando desaconselhável sua utilização em corpos hídricos com essa faixa de contaminação e nesse tempo de cultivo.

#### 4.5.2 Resultados do experimento com cádmio

##### a) Teores de cádmio na solução e nos tecidos da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*)

Ao final de cada tempo de cultivo foram coletadas amostras da solução para análise do teor de cádmio por espectrofotometria de absorção atômica. A Tabela 13 apresenta os teores de cádmio (Cd) na solução nos diferentes tratamentos e tempos de cultivo da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*).

**Tabela 13.** Concentrações de Cd na solução de cultivo da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nos diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Tempo de cultivo (horas)			
	24	48	72	168
nd	nd	nd	nd	nd
0,1	0,04 Ac	0,03 Ac	0,03 Ac	0,03 Ac
1,1	0,50 Ab	0,33 Ab	0,33 Ab	0,28 Bb
8,1	4,27 Aa	3,58 Ba	2,74 Ca	2,75 Ca

cv = 6,76%

Letras maiúsculas comparam teores de metal na solução nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam teores de metal na solução nos diferentes doses na mesma coluna. Letras idênticas não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

\*nd = valores não detectados pelo equipamento; Considerado = 0 mg.L<sup>-1</sup>;

Na ausência de Cd na solução (controle) não foi detectado esse elemento na solução ao longo dos tempos de cultivo da Alface-d'água, demonstrando que a solução nutritiva de Hoagland a 10%, não apresentava contaminação por esse metal. Dessa forma essa solução serviu como base de orientação para o desenvolvimento da planta em um ambiente livre descontaminação por Cd.

Avaliando o efeito do tempo de cultivo da Alface-d'água na solução contaminada (Tabela 13), podemos observar que na segunda dose (Cd = 0,1mg L<sup>-1</sup>) a redução do cádmio em solução não foi, estatisticamente, significativa nos diferentes tempos analisados. Contudo, nas maiores concentrações (Cd = 1,1 e 8,1 mg L<sup>-1</sup>), o aumento do tempo de cultivo favoreceu a redução de cádmio em comparação aos teores da solução inicial. As diferentes doses de contaminação testadas foram consideradas estatisticamente diferentes (Conc. Inicial) e se mantiveram, dessa forma, durante todo experimento (168 horas de cultivo).

A redução nos níveis de contaminação da solução inicial foi proporcionada pela absorção e acúmulo do cádmio nos tecidos da Alface-d'água, como pode ser demonstrado na Tabela 14.

Na “testemunha” (Cd = 0 mg L<sup>-1</sup>), não foram encontrados teores de Cd associados a raiz e parte aérea da Alface-d'água, devido à ausência desse elemento na solução. Na dose de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, apesar de verificarmos um aumento na concentração de cádmio na raiz e parte aérea da Alface-d'água com o aumento do tempo de cultivo, esse incremento não foi significativo estatisticamente, pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. A partir da terceira dose (Cd = 1,1 e 8,1 mg L<sup>-1</sup>), foi observado uma diferença significativa no teor desse elemento nos tecidos da Alface-d'água com o aumento do tempo de cultivo, verificando-se os teores mais elevados nos maiores tempos avaliados, atingindo aproximadamente 5000 mg kg<sup>-1</sup> de cádmio na raiz e 1500 na parte aérea na maior concentração (Cd = 8,1 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 14).

**Tabela 14.** Teores de Cd associados a biomassa da raiz e parte aérea da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nas diferentes doses e tempos de coleta.

Conc. solução (mg L <sup>-1</sup> )		Teor de Cd na biomassa (mg kg <sup>-1</sup> )			
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
0	Raiz	nd	nd	nd	nd
	P. aérea	nd	nd	nd	nd
0,1	Raiz	49,48 Ac	74,67 Ac	55,90 Ac	64,68 Ac
	P. aérea	3,30 Ab	9,45 Ac	10,50 Ac	25,07 Ac
1,1	Raiz	434,78 Bb	518,29 Bb	671,93 Ab	710,49 Ab
	P. aérea	16,61 Db	39,73 Cb	90,51 Bb	125,53 Ab
8,1	Raiz	3546,36 Da	4316,49 Ca	4587,93 Ba	4909,23 Aa
	P. aérea	228,23 Da	430,40 Ca	533,19 Ba	1561,08 Aa

cv raiz 2,67% cv p.aérea 3,26%

Letras maiúscula comparam teores de cádmio associado a biomassa nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam teores de cádmio associado a biomassa nas diferentes doses na mesma colunas. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo órgão da planta ao longo do tempo (linha) e as diferentes doses (mesmo órgão da planta) (coluna).

\*nd = valores não detectados pelo equipamento. Considerado = 0 mgL<sup>-1</sup>.

Comparando as diferentes doses testadas, verifica-se que o aumento das doses de contaminação determinou teores elevados de cádmio na raiz e na parte aérea das plantas (Tabela 14), principalmente, nas raízes onde foram encontradas as maiores concentrações quando comparado com a parte aérea de todas as doses e tempos avaliados, demonstrando uma restrição da planta na translocação desse elemento, possivelmente, como uma estratégia de proteção do aparato fotossintético.

LI et al., (2013) também observaram o efeito das doses de contaminação (0,5; 1; 5 e 10 mg L<sup>-1</sup>) e do tempo de cultivo (5,10,15 e 20 dias) no aumento dos teores de cádmio na raiz e parte aérea da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) e também verificaram os teores mais elevados desse elemento nas raízes dessa planta. LADISLAS et al., (2013) estudaram duas espécies de macrófitas (*Juncus effusus* e *Carex riparia*) em ambiente contaminado com Cd, Ni e Zn e encontraram uma maior acumulação desse elemento nas raízes e menor na parte aérea de ambas as espécies. Segundo WEIS & WEIS, (2004) o acúmulo de metais tóxicos nas raízes ao invés da parte aérea é mais vantajoso, pois os tecidos da parte aérea expostos ao ambiente, podem transferir os contaminantes, mais rapidamente.

DAS et al., (2014) testando o potencial fitoextrator de cádmio pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) observaram que a planta alcançou o máximo de 11670 mg kg<sup>-1</sup> nas raízes e 4810 mg kg<sup>-1</sup> na parte aérea quando cultivada na dose de 10 mg L<sup>-1</sup> durante 21 dias. O Aguapé (*E. crassipes*), concentrou em seus tecidos 310 mg kg<sup>-1</sup> de Cd quando cultivado em solução contaminada com 2mg L<sup>-1</sup> por 12 dias (MISHRA & TRIPATHI, 2008). Os mesmos autores constataram que a *Pistia stratiotes* apresentou os maiores teores de Cd em seus tecidos quando comparado a *E. crassipes* e *S. polyrrhiza*, acumulando 390 mg kg<sup>-1</sup> desse elemento quando cultivada sob as mesmas condições.

Esses resultados mostram, portanto, que a Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) é eficiente na redução dos níveis de cádmio da solução de cultivo, armazenando-o em seus tecidos. Essa

capacidade é proporcional ao nível de contaminação e ao tempo de cultivo na solução contaminada. A partir desses dados, é importante conhecer a quantidade efetiva de remoção desse elemento pela biomassa da planta, afim de avaliar seu potencial para utilização em projetos de remediação de reservatórios contaminados por esse metal. Esses dados serão apresentados na Tabela 15.

**Tabela 15.** Percentual de remoção de Cd pela biomassa seca de cada planta (g) da Alfaca-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada em doses crescentes de contaminação e diferentes tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	% Remoção Cd da solução pela biomassa								
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas				
0,1	Raiz	61,3	<b>Ba</b>	65,3	<b>Aa</b>	65,5	<b>Aa</b>	54,2	<b>Ca</b>
	P. aérea	3,7	<b>Da</b>	9,5	<b>Ca</b>	11,5	<b>Ba</b>	28,0	<b>Aa</b>
	Total	65,0	<b>Ca</b>	74,8	<b>Ba</b>	77,0	<b>Ba</b>	82,2	<b>Aa</b>
1,1	Raiz	35,1	<b>Cb</b>	60,7	<b>Ab</b>	54,7	<b>Bb</b>	53,2	<b>Ba</b>
	P. aérea	1,8	<b>Db</b>	4,8	<b>Cb</b>	9,5	<b>Bb</b>	13,1	<b>Ab</b>
	Total	36,9	<b>Bb</b>	65,5	<b>Ab</b>	64,2	<b>Ab</b>	66,3	<b>Ab</b>
8,1	Raiz	31,2	<b>Cc</b>	44,2	<b>Ac</b>	35,7	<b>Bc</b>	31,6	<b>Cb</b>
	P. aérea	2,3	<b>Cb</b>	3,6	<b>Bc</b>	4,5	<b>Bc</b>	13,9	<b>Ab</b>
	Total	33,6	<b>Cc</b>	47,8	<b>Ac</b>	40,2	<b>Bc</b>	45,5	<b>Ac</b>

cv raiz = 2,74% cv p. aérea = 5,75% cv total = 2,51%

Letras maiúsculas comparam o percentual de remoção de Cd nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nas diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo órgão da planta ao longo do tempo (linha) e as diferentes doses (mesmo órgão da planta) (coluna).

Não houve remoção de Cd na testemunha;

No controle não foi possível calcular a remoção de Cd por não ter sido disponibilizado esse elemento na solução inicial. Em todas as doses avaliadas foi observado incremento da capacidade de remoção do cádmio da solução pela raiz e parte aérea com o aumento do tempo de cultivo da Alfaca-d'água. Essa capacidade foi reduzida na raiz e parte aérea, com o aumento das doses de contaminação determinando na menor dose e maior tempo de cultivo (Cd = 0,1 mgL<sup>-1</sup> em 168 horas de cultivo) a maior remoção por planta (82%) e a menor (45%) observada na maior dose avaliada (Cd = 8,1 mg L<sup>-1</sup>) (Tabela 15).

Observa-se em todas as doses e tempos de cultivo uma maior contribuição das raízes no percentual de remoção de cádmio pela planta, possivelmente, como um mecanismo de defesa, evitando a translocação e prováveis sintomas de toxicidade no aparato fotossintético na parte aérea. Entretanto, percebe-se que a partir de 72 horas, houve uma redução do percentual de remoção de cádmio pelas raízes e conseqüente incremento nesse percentual na parte aérea de todas as doses, levando a estabilização do percentual de remoção total da planta, provavelmente, como uma forma de “escoamento” da contaminação concentrada nas raízes. (Tabela 15).

O percentual de remoção pela biomassa não indica maior ou menor concentração de Cd nos tecidos da planta, pois o menor percentual encontrado (45%) na maior dose (Cd = 8,1

mg L<sup>-1</sup>) representa uma maior acumulação desse elemento (3,6 mg). Entretanto, o maior percentual de remoção na menor dose (82%) determinou uma acumulação de apenas 0,082mg de Cd por planta. Esse percentual indica a capacidade da biomassa utilizada reduzir o teor de Cd da solução em relação à contaminação da solução inicial, mostrando o quanto mais limpa, ou livre de cádmio ficou o meio após o cultivo da Alface-d'água.

A macrófita *E. canadenses* foi capaz de remover de 50 a 90% dos metais Cd, Pb, Zn e Cu em solução nas primeiras 3 horas de cultivo, removendo 96,6% de Cd em 7 horas de cultivo na solução com 10<sup>-4</sup> M de Cd (BASILE et al., 2012), demonstrando a interferência do tempo na remoção dos metais em solução. *L. gibba* atingiu 90% de remoção de Cd de uma solução com 10<sup>-1</sup> M desse elemento, em 6 dias de cultivo, estabilizando-se mais rapidamente do que para Zn e Cu também avaliados (MEGATELI et al., 2009). LADISLAS et al., (2013) encontraram elevados percentuais de remoção de Cd pelas macrófitas, *Juncus effusus* e *Carex riparia*, cultivadas durante 4 meses sob três concentrações crescentes.

A Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) removeu acima de 30% de todo cádmio presente na solução inicial em todas as doses testadas (Cd = 0; 0,1; 1; e 8 mg L<sup>-1</sup>), sendo considerada eficiente mesmo quando em elevadas concentrações desse elemento em solução e pouco tempo de cultivo. A *E. Crassipes* removeu 85% de Cd de uma solução contaminada a 2 mg L<sup>-1</sup> após 12 dias de incubação, já a *S. polyrrhiza* removeu 71% de Cd sendo cultivada sob mesmas condições (MISHRA & TRIPATHI, 2008). Esses dados demonstram a superioridade da Alface d'água (*Pistia stratiotes*) na remoção de cádmio da solução, já que este trabalho testou contaminações mais elevadas e em menores tempos de cultivo e encontrou percentuais de remoção superiores. O potencial de remoção dessa planta pode ser atribuído ao elevado crescimento, produção de biomassa e tolerância a metais pesados em ambientes contaminados (MANT et al., 2006).

Baseado nos dados de remoção de Cd por planta (Tabela 15), no espaço ocupado pelas raízes e parte aérea de cada uma no espelho d'água (79 cm<sup>2</sup>), foram estimados os teores de remoção de Cd pela biomassa seca da Alface-d'água, por área (1m<sup>3</sup>) (Tabela 16). De acordo com as dimensões médias das plantas utilizadas nesse experimento, foi determinado que, mesmo com sua alta produção de biomassa, aproximadamente 127 plantas podem ser cultivadas em uma área de 1m<sup>3</sup>. Esse resultado se justifica pelo crescimento vertical e adensado das mesmas, o que é uma característica favorável para utilização na remediação de corpos hídricos contaminados. A elevada redução da biomassa quando desidratada favorece seu armazenamento, após ser utilizada em áreas contaminadas. Os teores aproximados de remoção de Cd/m<sup>3</sup> nas diferentes doses e tempos de cultivo são apresentados na Tabela 16.

Em todas as doses avaliadas a remoção de Cd/m<sup>3</sup> de espelho d'água foi potencializada pelo aumento do tempo de cultivo e das doses de contaminação, obtendo os maiores teores de remoção no maiores tempos e doses analisadas. A remoção nas diferentes doses de contaminação (0,1; 1,1 e 8,1 mg L<sup>-1</sup>) atingiu em torno de 32, 247 e 1741 mg de Cd/m<sup>3</sup>, respectivamente, em 168 horas de cultivo. Esses dados demonstram o elevado potencial da Alface-d'água em remover Cd de soluções contaminadas e são úteis para utilização em projetos de remediação de corpos hídricos contaminados por esse elemento.

**Tabela 16.** Capacidade aproximada de remoção de Cd por metro cúbico de espelho d'água, nas diferentes doses e tempos de cultivo da Alface-d'água.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Cd removido (mg) / m <sup>3</sup> espelho d'água			
	24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
0,1	24,31 Ac	29,01 Ac	28,36 Ac	31,51 Ac
1,1	151,05 Bb	249,48 Ab	232,42 Ab	246,54 Ab
8,1	1278,60 Ca	1605,30 Ba	1524,92 Ba	1741,04 Aa

cv = 3,84%

Letras maiúsculas comparam a remoção de cádmio nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nas diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Relacionando a contaminação inicial da solução com concentração de Cd nos tecidos da planta no final do tempo de cultivo, obtemos o fator de bioacumulação (FBC), o que nos permite perceber o quanto da contaminação da solução foi realmente acumulado na planta. Através do fator de translocação (FT) confirmamos a região de acúmulo desse elemento. Esses dados são apresentados na Tabela 17.

**Tabela 17.** Fator de bioacumulação (FBC) na raiz e parte aérea e fator de translocação (FT) de Cd na Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nas diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )		FATOR DE BIOACUMULAÇÃO (FBC)			
		24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
0,1	Raiz	494,80 Dc	746,70 Ca	559,00 Bc	646,80 Ac
	P. aérea	33,00 Da	94,50 Ca	105,00 Ba	250,07 Aa
	FT	0,07 Da	0,12 Ca	0,18 Ba	0,38 Aa
1,1	Raiz	395,20 Db	471,20 Cb	610,80 Ba	64,59 Aa
	P. aérea	15,10 Db	36,10 Cb	82,30 Ba	114,10 Ab
	FT	0,04 Db	0,08 Cc	0,14 Bb	0,18 Ac
8,1	Raiz	437,80 Da	532,90 Ca	566,40 Bb	606,10 Ab
	P. aérea	28,20 Da	53,30 Cc	65,82 Bb	192,70 Aa
	FT	0,06 Da	0,10 Cb	0,11 Bc	0,32 Ab

cv FBC raiz = 1,22% cv FBC p. aérea = 5,52% cv FT = 4,41%

Letras maiúsculas comparam o fator de bioacumulação (FBC) e de translocação (FT) de cádmio nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nas diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo órgão da planta ao longo do tempo (mesma linha) e as diferentes doses (mesmo órgão da planta) (mesma coluna).

- Não houve bioacumulação na testemunha;

Analisando os dados de bioacumulação de cádmio pela Alface-d'água (Tabela 17), verifica-se que o aumento do tempo de cultivo favoreceu o maior fator de bioacumulação



desse metal pela raiz e parte aérea. Consequentemente, esse efeito também foi observado no fator de translocação (FT).

Comparando o FBC nas diferentes doses observou-se que o aumento da contaminação provocou um incremento no fator de bioacumulação de Cd nas raízes. Na parte aérea, foi observado uma redução nesse fator na terceira dose ( $Cd = 1,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e posterior aumento na maior ( $Cd = 8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Logo, o mesmo foi demonstrado no fator de translocação desse elemento na planta. Possivelmente, essa redução inicial na translocação do metal foi uma estratégia da planta de proteção da parte aérea dos danos causados pela toxicidade desse elemento, afim de manter as taxas fotossintéticas e consequentemente o desenvolvimento da planta. Porém, com a elevação das concentrações em solução, houve necessidade de translocá-lo para parte aérea afim de “aliviar” os altos teores armazenados nas raízes, o que aumentou assim a capacidade de bioacumulação da planta como um todo, como possível comprometimento das atividades fotossintéticas.

Os maiores fatores de bioacumulação de cádmio foram encontrados nas raízes de todas as doses e tempos avaliados, chegando a bioacumular aproximadamente 3,5 vezes mais que a parte aérea na maior dose avaliada ( $Cd = 8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Isso é demonstrado também pelo fator de translocação expressivamente inferior a 1 em todas as análises realizadas. A resistência em transferir esse elemento para parte aérea confirma a hipótese de um mecanismo de proteção da Alface-d'água, evitando prejuízos ao metabolismo fotossintético, como na síntese de pigmentos, etc.

Os dados de bioacumulação de Cd (Tabela 17), assim como os dados de remoção apresentados, anteriormente (Tabela 15), não indicam os teores desse metal associados a biomassa da planta. Esses dados se relacionam com a capacidade da planta bioacumular ou bioconcentrar cádmio em seus tecidos, proporcionalmente, a contaminação inicial da solução.

DAS et al., (2014) estudando a Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) na fitoextração de Cd obtiveram um acúmulo desse elemento nas raízes aproximadamente 2,5 vezes maior que na parte aérea na dose com  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de Cd, cultivada por 21 dias. Comparando esses dados com os obtidos nesse trabalho, entende-se que a translocação aumenta com o aumento da dose de contaminação e tempo de cultivo dessa planta, já que esses autores encontraram uma diferença menor de acumulação na raiz e parte aérea. Os autores constataram que nessa planta o acúmulo de Cd nas raízes sempre supera o teor acumulado na parte aérea, indicando uma restrição no transporte interno desse elemento. Eles encontraram o maior FBC de Cd na raiz e parte aérea da Alface-d'água na dose de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  em 21 dias de cultivo, apresentando um fator de 2294 e 870 para raiz e parte aérea, respectivamente. Confirmando mais uma vez a influência do tempo de cultivo na bioconcentração desse elemento nos tecidos dessa planta, como comentado anteriormente.

TEWARI et al., (2008) alegam que a baixa translocação de Cd para a parte aérea da planta pode ser devido ao sequestro da maior parte desse elemento nos vacúolos das células das raízes para torna-lo não tóxico, possivelmente, como uma resposta da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) ao ambiente contaminado. LI et al., (2013) sugerem que plantas tolerantes a cádmio podem ser capazes de impedir a absorção do excesso de Cd ou desintoxicar o Cd, depois de ter sido absorvida.

Por outro lado, MEGATELI et al., (2009) observaram o maior acúmulo de Cd, Pb e Cu nas folhas das macrófitas *E. canadenses* e *L. minor* e justificaram pelo hábito da planta, sugerindo absorção desses elementos também pelas folhas.

BASILE et al., (2012) constataram que a macrófita *L. minor* apresentou a maior capacidade de bioacumulação de cádmio em seus tecidos quando comparada as macrófitas *L. riparium* e *E. canadensis*, apresentando um BCF total de 13991, quando cultivada em solução contaminada a  $10^{-6} \text{ M}$  ( $0,1124 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os autores encontraram para as demais macrófitas um BCF de 7625 e 8333, respectivamente, quando cultivadas sob mesmas condições.

DAS et al., (2014) verificaram que a maior translocação de Cd pela Alface-d'água ocorreu no maior tempo e dose testada ( $15\text{mg L}^{-1}$  aos 21 dias de cultivo), apresentando um FT de 0,60. Esse resultado confirma os dados obtidos nesse trabalho (Tabela 17), onde foi verificado um aumento da translocação de cádmio na maior concentração utilizada e comprova mais uma vez a influência do tempo de cultivo no aumento do FT.

**b) Teores de pigmentos fotossintéticos nos tecidos da alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada no experimento com cádmio:**

Ao final de cada tempo de cultivo, as plantas de todas as doses avaliadas foram coletadas e discos foliares foram destacados para análises dos teores de pigmentos fotossintéticos. Os dados obtidos (Tabela 18) demonstram o efeito dessas variáveis na síntese dos pigmentos pela planta e conseqüentemente na fotossíntese.

Analisando os dados da Tabela 18, podemos observar que na testemunha e na menor dose ( $\text{Cd} = 0,0$  e  $0,1\text{ mg L}^{-1}$ ) os teores de pigmentos fotossintéticos não variaram, significativamente, com aumento do tempo de cultivo. Entretanto, nas maiores doses ( $\text{Cd} = 1,1$  e  $8,1\text{ mg L}^{-1}$ ), foi percebido uma redução na síntese desses pigmentos (Chl a, Chl b e carotenoides) com os maiores tempos de contato da planta com a solução contaminada, possivelmente, devido as maiores taxas de translocação e bioacumulação de Cd na parte aérea da Alface-d'água nessas doses e tempos (Tabela 17), demonstrando que as maiores concentrações desse elemento na parte aérea tiveram efeito fitotóxico na síntese de pigmentos pela planta.

Comparando os teores de pigmentos nas diferentes doses avaliadas, verifica-se que os teores de clorofila a e clorofila b, não variaram significativamente com o aumento da contaminação nos menores tempos de cultivo (24 e 48 horas), porém nos maiores tempos de avaliados (72 e 168 horas) houve uma redução nos teores desses pigmentos com aumento da concentração de cádmio na solução de cultivo, evidenciando, também, os efeitos tóxicos desse elemento no aparato fotossintético. Para os carotenoides foi observado uma “estabilização” em seus teores com o aumento das doses, havendo um incremento significativo somente no último tempo de cultivo testado (168 horas), demonstrando uma estratégia de proteção da planta nesse tempo onde houve maior concentração de cádmio na parte aérea em todas as doses avaliadas (Tabela 14 e Tabela 17). Vários autores apontam aos carotenoides duas funções na fotossíntese: como pigmento acessório, ampliando a absorção de luz e transferindo energia para etapa fotoquímica, mesmo em condição de estresse e papel de fotoproteção do aparato fotossintético reduzindo ou suprimindo as espécies reativas de oxigênio (PILLAI et al., 2013; STREIT et al., 2005; CARDOSO, 1997)

**Tabela 18.** Teores de Clorofila a (Chl a), Clorofila b (Chl b), Clorofila total (Ctotal) e Carotenoides (Cx+c) na parte aérea da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada em doses crescentes de cádmio e diferentes tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Pigmentos fotossintéticos µg.cm <sup>-2</sup>								
	24 horas		48 horas		72 horas		168 horas		
0	<b>Chl a</b>	7,01	<b>Ba</b>	7,43	<b>Ba</b>	8,99	<b>Aa</b>	7,51	<b>Ba</b>
	<b>Chl b</b>	2,46	<b>Ba</b>	2,40	<b>Ba</b>	3,29	<b>Aa</b>	2,63	<b>Ba</b>
	<b>Ctotal</b>	9,47	<b>Ba</b>	9,83	<b>Ba</b>	12,28	<b>Aa</b>	10,14	<b>Ba</b>
	<b>Cx+c</b>	1,28	<b>Bb</b>	1,51	<b>Aa</b>	1,34	<b>Bab</b>	1,04	<b>Cc</b>
0,1	<b>Chl a</b>	6,58	<b>Aa</b>	5,57	<b>Bb</b>	6,94	<b>Ab</b>	5,64	<b>Bb</b>
	<b>Chl b</b>	2,25	<b>Aa</b>	1,77	<b>Bb</b>	2,52	<b>Ab</b>	2,21	<b>Ab</b>
	<b>Ctotal</b>	8,83	<b>Ba</b>	7,34	<b>Cb</b>	9,46	<b>Ab</b>	7,85	<b>ABb</b>
	<b>Cx+c</b>	1,62	<b>Aa</b>	1,03	<b>Bb</b>	1,62	<b>Aa</b>	1,09	<b>Bc</b>
1,1	<b>Chl a</b>	7,32	<b>Aa</b>	7,25	<b>Aa</b>	6,25	<b>Bb</b>	5,25	<b>Cb</b>
	<b>Chl b</b>	2,34	<b>Aa</b>	2,54	<b>Aa</b>	2,26	<b>Aab</b>	1,73	<b>Bc</b>
	<b>Ctotal</b>	9,66	<b>Aa</b>	9,78	<b>Aa</b>	8,51	<b>Ab</b>	6,98	<b>Bb</b>
	<b>Cx+c</b>	1,57	<b>Aa</b>	1,07	<b>Bb</b>	1,21	<b>Bbb</b>	1,25	<b>Bb</b>
8,1	<b>Chl a</b>	6,98	<b>Aa</b>	5,79	<b>Bb</b>	6,55	<b>ABb</b>	3,80	<b>Cc</b>
	<b>Chl b</b>	2,35	<b>Aa</b>	1,90	<b>Bb</b>	2,07	<b>ABb</b>	1,29	<b>Cd</b>
	<b>Ctotal</b>	9,34	<b>Aa</b>	7,69	<b>Bb</b>	8,62	<b>ABb</b>	5,09	<b>Cc</b>
	<b>Cx+c</b>	1,55	<b>Aa</b>	1,43	<b>ABa</b>	1,32	<b>Bb</b>	1,39	<b>Aba</b>

cv Ca= 5,38% cv Cb= 8,15% cv Ctotal= 5,34% cv Cx+c = 6,53%

Letras maiúsculas comparam os teores de pigmentos nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nas diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Comparação realizada no mesmo pigmento ao longo do tempo (mesma linha) e nas diferentes doses (mesmo pigmento) (em mesma coluna).

SANTOS (2009) cultivou três macrófitas aquáticas (*Azolla caroliniana*, *Salvinia. mínima* e *Spirodela polyrhiza*) sob doses crescentes de manganês e também observou uma redução no teor de pigmentos fotossintéticos (Chl a, Chl b e Cx+c) em todas as três espécies avaliadas, principalmente, nas maiores doses de contaminação. FARNESE et al., (2014) estudando o potencial da *Pistia stratiotes* em fitorremediar arsênio de soluções contaminadas, observaram que houve uma influência negativa na produção de pigmentos fotossintéticos (Chl a, Chl b, Ctotal e Cx+c) com o aumento da concentração desse elemento na solução de cultivo, principalmente na redução dos teores de clorofila *a*. SÁRVÁRI et al., (1999) cultivaram pepino em sistema hidropônico com contaminação por Cd e Pb e observaram uma redução na síntese de clorofila, mais pronunciada nas plantas cultivadas com Cd. Esses autores comentam que o Cd é conhecido por reduzir os complexos de pigmento de lipoproteínas, incluindo o fotossistema I. MARQUES et al., (2011), cultivando plantas jovens de eucalipto em doses crescentes de Cd, por 20 dias, observaram que nas maiores concentrações e tempos de cultivo houve uma redução nos teores de clorofila, acompanhado de um incremento nos de carotenoides, sugerindo sua participação no aumento da tolerância ao estresse oxidativo.

Com base nos dados da Tabela 18 foi calculada a razão entre os teores de clorofila *a* e clorofila *b* nas diferentes doses e tempos de cultivo, afim de demonstrar o efeito dessas

variáveis na proporção entre esses dois pigmentos. Os dados obtidos são apresentados na Tabela 19.

**Tabela 19.** Razão Chl a / Chl b nos tecidos da parte aérea da Alface-d'água nas diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Razão Chl a / Chl b			
	24horas	48horas	72horas	168 horas
0	2,85 Aa	3,10 Aa	2,73 Aa	2,86 Ab
0,1	2,93 Aa	3,14 Aa	2,76 ABa	2,55 Bb
1,1	3,17 Aa	2,89 Aa	2,78 Aa	3,05 Aa
8,10	2,97 Aa	3,05 Aa	3,16 Aa	2,97 Aba

cv = 7,40%

Letras maiúsculas comparam a razão entre os pigmentos nos diferentes tempos de cultivo na mesma linha e letras minúsculas comparam nas diferentes doses na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Observando esses dados verificamos que somente houve efeito do tempo na razão entre as clorofilas na menor dose avaliada (Cd =0,1 mg L<sup>-1</sup>), onde foi percebida uma redução nessa razão, indicando um acréscimo nos teores de clorofila b em relação a clorofila a. Esse resultado coincide com a dose onde houve maior translocação do contaminante para parte aérea, indicando a ocorrência de um mecanismo de defesa da planta a toxicidade do Cd, já que, como comentado para o experimento com Zn, a clorofila b é apontada por aumentar o espectro de captação de energia pela planta, favorecendo os processos fotossintéticos. Nas outras doses avaliadas essa razão se manteve constante ao longo do tempo.

Comparando a razão entre as clorofilas a e b com aumento da contaminação em solução (doses), verificou-se que, somente após 168 horas de cultivo a planta demonstrou algum efeito da contaminação na síntese de clorofilas. Observa-se nesse tempo, que a razão Chl a / Chl b aumentou com as doses de contaminação da solução, o que indicando que a clorofila b foi mais sintetizada na concentração de 0,1 mg L<sup>-1</sup>, onde também foi encontrada a maior remoção e translocação de Cd (Tabela 15 e Tabela 17), e a clorofila a nas maiores doses (1,1 e 8,1 mg L<sup>-1</sup>) onde a translocação do contaminante foi suprimida pela planta, porém foram encontradas os maiores teores de Cd (Tabela 14). Esses resultados demonstram uma tolerância da planta para manter a razão normal entre os pigmentos (quando comparado ao controle) mesmo quando cultivada em ambiente muito estressante.

Em todas as doses e tempos avaliados a razão clorofila a/b se manteve na faixa entre 2,5 e 3,5 indicada como normal para plantas com metabolismos C3 (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001), como a Alface-d'água.

HOREMANS et al., (2015) estudando os estresses provocados por doses crescentes de Cd no cultivo da *L. Minor* observaram que não houve diferença significativa nos níveis de clorofila a e b com o aumento das doses de contaminação, durante 7 dias de cultivo, demonstrando a estabilização da razão entre esses pigmentos mesmo em ambiente estressante. AUGUSTYNOWICZ et al., (2014) avaliaram a fitorremediação de águas contaminadas por Cd e outros metais pesados pela macrófita *Callitriche cophocarpa* e observaram um decréscimo não significativo nos teores de clorofila a e b em relação ao controle, mantendo a mesma razão entre esses pigmentos. HOU et al., (2007) estudaram o efeito da poluição por Cd na macrófita *Lemna minore* observaram a redução nos teores de clorofila a e b com o incremento da contaminação na solução de cultivo. Verificou-se que os teores de clorofila b

foram reduzidos mais lentamente, do que a clorofila *a*, alcançando maiores proporções nas doses mais elevadas, ou seja, reduzindo a razão Chl *a* / Chl *b*. MARQUES et al., (2011) também observaram que a razão clorofila *a/b* não diferiu na maioria das doses de cultivo do eucalipto com Cd, porém na maior dose de contaminação e tempo de cultivo foi verificado a menor razão entre as clorofilas em relação ao controle, sugerindo uma redução na síntese de clorofila *a* provocada pela toxicidade desse metal.

Com base nos teores de pigmentos fotossintético apresentados na Tabela 18, foram calculados também, a relação entre os teores totais de clorofila e carotenoides, afim de demonstrar o efeito das doses crescentes de contaminação e do tempo de cultivo na síntese e na relação entre esses pigmentos, que, naturalmente está na faixa entre 4,2 e 5,0 para plantas do metabolismo do tipo C3 (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001). Os dados obtidos são apresentados na Tabela 20.

**Tabela 20.** Razão C total / Cx+c nas folhas da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) nas diferentes doses e tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Razão Ctotal / Cx+c			
	24horas	48horas	72horas	168 horas
0	7,39 Aa	6,50 Aa	9,41 Ba	9,97 Ba
0,1	5,20 Ab	7,10 Ba	5,31 Ab	7,51 Bb
1,1	5,93 Aab	9,67 Bb	7,29 Ac	3,90 Cc
8,10	5,71 Aab	5,53 Aa	6,96 Abc	3,67 Bc

cv = 11,92%

Letras maiúsculas comparam a Razão ao longo do tempo, na mesma linha, entre colunas. Letras minúsculas comparam a Razão nas diferentes doses na mesma coluna, entre linhas.

O aumento do tempo de cultivo favoreceu as maiores razões entre clorofila total / carotenoides nas menores concentrações avaliadas (Cd = 0,0 e 0,1 mg L<sup>-1</sup>), demonstrando a superioridade nos teores de clorofila em relação aos carotenoides, justificado pelos menores teores desse elemento associado a parte aérea da planta. Contudo, nas doses mais elevadas e maior tempo de cultivo (Cd = 1,1 e 8,1 mg L<sup>-1</sup> em 168 horas) foi observado uma redução nessa razão, devido ao incremento na proporção de carotenoides, onde observou-se uma maior concentração do Cd na parte aérea da Alface-d'água (Tabela 14 e Tabela 17), evidenciando, mais uma vez, que o aumento do teor desse pigmento atuou como mecanismo de defesa a toxicidade dos metais pesados.

Avaliando os dados relativos as diferentes concentrações testadas (Tabela 20), observa-se que não houve diferença significativa na razão Ctotal / Cx+c com o aumento das doses de contaminação nos menores tempos de cultivo (24 e 48 horas). Nos maiores tempos (72 e 168 horas), o aumento do cádmio em solução reduziu, significativamente, a razão entre esses pigmentos, demonstrando um aumento na proporção dos teores de carotenoides em relação à clorofila total. Esses resultados, novamente, demonstram o sincronismo entre os maiores teores do contaminante na parte aérea com o incremento dos carotenoides, indicando, de forma clara, a ação de um mecanismo de defesa da planta auxiliando a absorção e transferência de energia na etapa fotoquímica da fotossíntese e na fotoproteção às espécies reativas de oxigênio (EROS).

Comparando os valores das razões encontradas com a faixa considerada natural para esse tipo de planta (4,2 a 5,0) (LICHTENTHALER & BUSCHMANN, 2001), observa-se que mesmo na dose controle os valores encontrados foram superiores a essa faixa, sugerindo que essa espécie tenha naturalmente uma maior razão entre esses pigmentos.

SINGH & KUMAR, (2013) estudaram o efeito do Cd na macrófita *H. verticillata* e notaram um incremento no teor de clorofila total nas menores doses testadas (5 mg L<sup>-1</sup>) após 3 dias de cultivo. Porém, nas doses mais elevadas percebeu-se uma redução nesses pigmentos em todos os tempos analisados em comparação ao controle. Os autores verificaram um aumento nos teores de carotenoides até a dose de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de Cd, em todos os tempos de cultivo, sugerindo a atuação desse mecanismo de defesa da planta para restringir os danos provocados pelos radicais livres gerados pela contaminação da solução de cultivo. COLLINS et al., (2011) relatam que várias condições de estresse podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROS) capazes de danificar proteínas, membranas até o DNA. A produção dessas espécies desencadeia a síntese de carotenóides que consomem oxigênio molecular, suprimindo a síntese de EROS, evitando seus efeitos tóxicos nas células. HOU et al. (2007) avaliaram os efeitos tóxicos do Cd sobre a macrófita *L.minor* e observaram que os teores de carotenoides foram reduzidos de forma constante com o aumento da concentração do contaminante. Mantendo a mesma razão entre a clorofila total e esse pigmento devido aos efeitos tóxicos também as clorofilas. Os autores comentam que a taxa de “degradação” da clorofila *b* foi mais lenta quando comparado à clorofila *a* e carotenoides, sugerindo que os efeitos tóxicos sejam maiores a esses dois pigmentos. CHANDRA & KULSHRESHTHA, (2004) explicam, que, nas macrófitas, a redução nos teores totais de clorofila esta associada a inibição da síntese de clorofila, influenciando, conseqüentemente, no metabolismo fotossintético. AUGUSTYNOWICZ et al., (2014) verificaram que os teores de carotenoides em *Callitriche cophocarpa* não variaram com a presença de Cd e outros metais em solução, mantendo a mesma razão Ctotal / Cx+c, mesmo sob condições de estresse.

### c) Teores de pigmentos fotossintéticos por clorofilômetro portátil (ClorofiLOG):

Foi realizada a medição não destrutiva de clorofila de forma direta e não destrutiva, conhecido como índice de clorofila Falker (ICF), utilizando um clorofilômetro portátil, fundamentando-se nas propriedades ópticas das folhas para gerar seus dados. Essa técnica foi realizada em todas as doses e tempos de cultivo e os dados são apresentados na Tabela 21.

**Tabela 21.** Índice de clorofila Falker (ICF) dos tecidos foliares da Alface-d'água nas diferentes doses de contaminação por Cd e diferentes tempos de cultivo.

Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	ICF			
	24 horas	48 horas	72 horas	168 horas
0	25,56 Ba	31,11 Aa	27,01 Ba	25,76 Ba
0,1	26,61 Aa	26,38 Ab	27,53 Aa	27,71 Aab
1,1	24,08 Ba	29,21 Aab	25,30 ABa	29,66 Aab
8,1	26,50 Aa	30,05 Aab	29,31 Aa	30,03 Ab

cv = 9,72%

Letras maiúsculas comparam ICF ao longo do tempo, na mesma linha, entre colunas. Letras minúsculas comparam ICF nas diferentes doses de contaminação por Cd, entre linhas na mesma coluna. Letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando os ICF obtidos nas folhas de Alface-d'água ao longo do tempo de cultivo, podemos observar que não houve diferença significativa nesse índice, demonstrando, novamente, a resistência dessa planta manter sua síntese de pigmentos fotossintéticos, mesmo quando em situações de estresse.

Comparando os índices de clorofila nas diferentes doses avaliadas (Tabela 21), também não foi observado diferença significativa mesmo com o aumento da disponibilidade de cádmio na solução de cultivo da planta. Esses resultados confirmam os anteriores sobre a capacidade dessa planta manter sua síntese de pigmentos fotossintéticos mesmo quando cultivada em ambiente contaminado por Cd.

BENZEKRY et al., (2010) avaliaram os efeitos fisiológicos do cultivo de duas variedades de repolho crescidas sob doses crescentes de cádmio e perceberam uma redução no índice de clorofila SPAD já na primeira dose de contaminação em comparação ao controle. Nessa situação, a clorofila pode ser degradada pela substituição do Mg na sua parte central pelo Cd fornecido pela solução contaminada ou então sua síntese pode ser comprometida pela destruição do ácido aminolevulínico, utilizado na síntese desse pigmento (NIKOLIĆ et al., 2008). CALDELAS, (2009) estudou as respostas fisiológicas da macrófita *E. crassipes* a exposição ao excesso de nutrientes e mercúrio e observou que o índice de clorofila foi reduzido em comparação com o controle. O autor acrescenta que apesar de não ter sido observado cloroses visuais, essa redução chegou a atingir 26% nas maiores concentrações. SILVA, (2014), estudou as características anatômicas e fisiológicas da macrófita *Typha domingensis* cultivada sob doses crescentes de arsênio e verificaram uma redução nos teores de clorofila pelo índice SPAD com o aumento da concentrações desse elemento na solução de cultivo. O autor observou que as plantas perderam a intensidade do verde de suas folhas, com o aumento da contaminação.

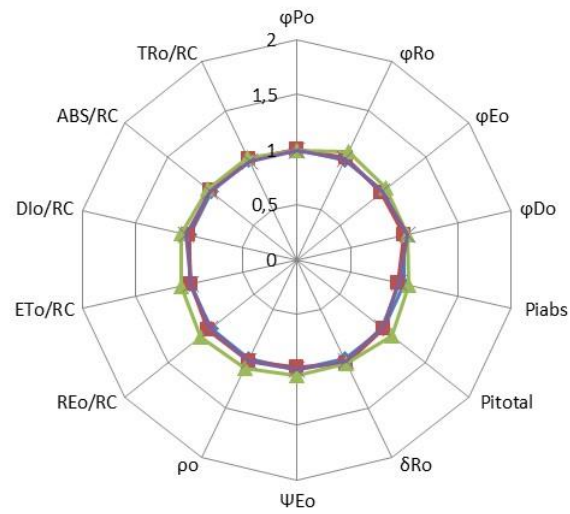
#### **d) Eficiência fotossintética da Alface-d'água cultivada sob doses de contaminação por cádmio**

Assim como no experimento com Zn, a fluorescência transiente da clorofila a foi utilizada para avaliar os efeitos do cádmio na funcionalidade do aparato fotossintético, através do Teste JIP. Com este teste observa-se, pontualmente, a interferência do estresse por meio de uma análise quantitativa do fluxo de energia que atravessa os fotossistemas e as possíveis alterações em cada parâmetro que influencia o desempenho fotossintético da planta (BUSSOTTI et al., 2011; STIRBET & GOVINDJEE, 2011).

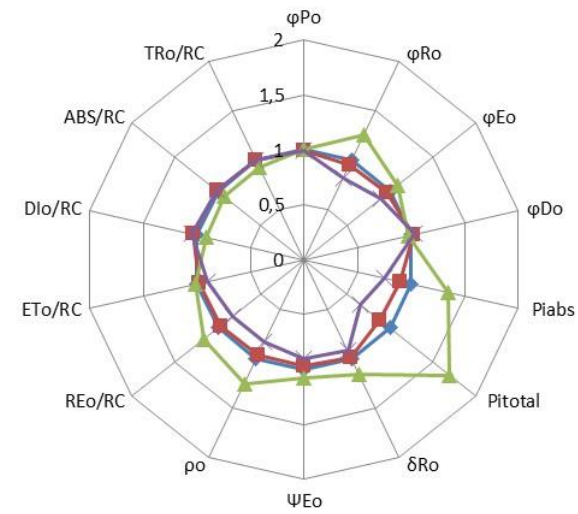
A influência dos diferentes tempos de cultivo e das doses crescentes de Cd, nos parâmetros e na taxa fotossintética da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) determinadas pelo Teste JIP, são apresentadas na Figura 14.

No primeiro tempo de cultivo avaliado (24 horas), observou-se que em todas as doses de contaminação (Cd = 0,1; 1,0 e 8,1 mg L<sup>-1</sup>) as plantas mantiveram o funcionamento normal do seu aparato fotossintético, i.e, sem alterações em relação ao controle (Cd = 0,0 mg L<sup>-1</sup> ajustado a 1, conforme a metodologia utilizada), resistindo as mais elevadas doses de contaminação nesse tempo de cultivo, como foi observado também para síntese de pigmentos (Tabela 18), o que pode ser justificado pelas baixíssimas taxas de translocação de Cd nesse tempo de cultivo (Tabela 17). Destaca-se, porém, que a dose de 1,0 mg.L<sup>-1</sup>, apresentou um pequeno incremento em diferentes parâmetros relacionados ao transporte de elétrons ( $\phi R_0$ ,  $P_0$ ,  $RE_0/RC$  e  $ET_0/RC$ ), levando a maiores índices de desempenho do fotossistema II (PSII) e, conseqüentemente, na taxa fotossintética total da planta ( $Pi_{total}$ ), possivelmente, como uma estratégia de adaptação ao estresse provocado pelo Cd.

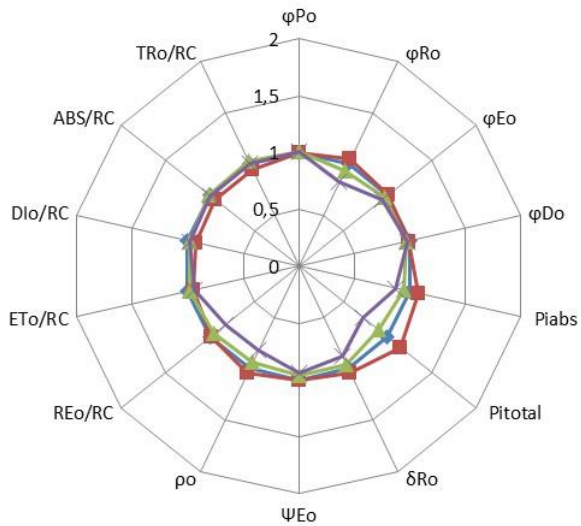
24 horas



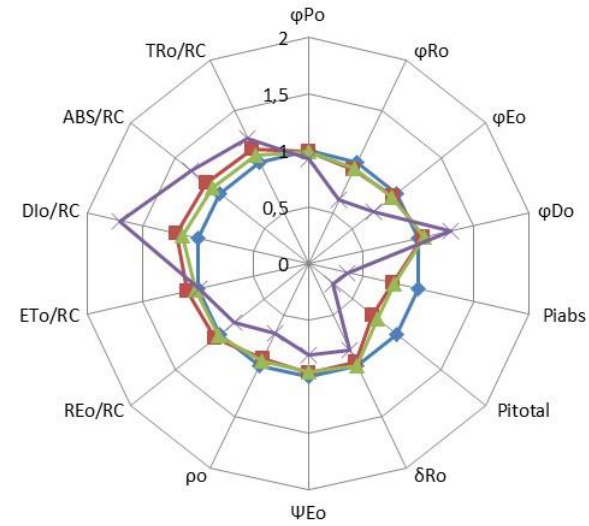
48 horas



72 horas



168 horas



—◆— 0,0 mg.L-1    —■— 0,1 mg.L-1    —▲— 1,0 mg.L-1    —×— 8,1 mg.L-1

**Figura 14.** Teste JIP aplicado na folhas da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada sob doses crescentes de Cd em diferentes tempos de cultivo.



Após 48 horas de cultivo da Alface-d'água (Figura 14) os resultados demonstram que na concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  ocorreu um incremento contínuo do índice de desempenho do PS II ( $P_{i_{abs}}$ ) em consequência do maior funcionamento de outros parâmetros avaliados, como já havia sido percebido em 24 horas de cultivo. Em geral, houve uma maior eficiência no transporte de elétrons, principalmente do PS II ( $Q_A$ ) para o fotossistema I (PS I) e para o intersistema, como demonstrado pelos parâmetros:  $\phi R_0$ ,  $\phi E_0$ ,  $P_0$ ,  $\delta R_0$ , que levam a maior redução do acceptor final de elétrons do PS I ( $RE_0/RC$ ), e combinados geram um maior desempenho fotossintético total ( $P_{i_{total}}$ ) da planta. Nessa dose também foi observado uma pequena redução da dissipação da energia na forma de calor ( $Di_0/RC$ ) em relação ao controle, possivelmente gerado pela alta eficiência na captação e transporte de elétrons pelo centro de reação. Esses resultados complementam e corroboram com os resultados obtidos de pigmentos fotossintéticos (Tabela 18). Nessa dose ( $Cd = 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), os maiores teores de clorofila (principalmente Chl b - Tabela 19), em 48 horas de cultivo, possivelmente, proporcionaram aumento da atividade fotossintética da planta, evidenciando um mecanismo de tolerância a contaminação por Cd, uma vez que ela aumenta a funcionalidade do aparato fotossintético como alternativa de sobrevivência ao ambiente contaminado. Entretanto, na maior dose ( $Cd = 8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), essa tolerância não foi observada, sendo demonstrado uma redução de aproximadamente 35% no desempenho fotossintético total da planta, influenciado por uma redução dos parâmetros de transporte de elétrons, principalmente, relacionados com a  $Q_A$  como:  $\phi R_0$ ,  $\phi E_0$ ,  $P_0$ ,  $RE_0/RC$  e  $ET_0/RC$ , possivelmente, levado pela toxicidade da elevada dose de Cd nessa dose, ao aparato fotossintético. Nessa dose ( $Cd = 8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), os teores de clorofila foram reduzidos e houve um leve incremento nos teores de carotenoides (Tabela 18), que provavelmente atuaram como fotoprotetor do aparato fotossintético. ADAMSKI et al., (2011) testaram doses crescentes de ferro (Fe) no cultivo de batata doce e verificaram que a maior dose desse metal ( $9,0 \text{ mM}$ ) aumentou os índices fotossintéticos totais da planta ( $P_{i_{total}}$ ) e atribuíram esse aumento aos maiores teores de clorofila.

Após 72 horas de cultivo, a dose de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  retoma o seu funcionamento normal, reduzindo o índice de desempenho fotossintético total, devido à redução dos parâmetros que envolvem o transporte de elétrons, atingindo valores muito próximos ao controle. A dose de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  apresentou um incremento discreto na eficiência fotossintética total da planta ( $P_{i_{total}}$ ), como consequência do maior funcionamento do fotossistema II ( $P_{i_{abs}}$ ), assim como foi observado para a concentração de  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$  em 48 horas de cultivo, indicando a ação de um mecanismo de tolerância dessa planta, através do aumento da taxa fotossintética, consequentemente, da produção de fotoassimilados, como uma tentativa de adaptação ao meio ambiente contaminado. Esses resultados vão de encontro a produção mais elevada de carotenoides observada nesse tratamento ( $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) quando comparada aos demais, em 72 horas de cultivo (Tabela 18). Provavelmente, esse comportamento só foi demonstrado após 72 horas, para essa concentração devido a menor dose de cádmio avaliada, ter levado a um maior tempo de tolerância para necessitar de uma estratégia de “adaptação” da planta.

As maiores doses de contaminação ( $Cd = 1,0$  e  $8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) reduziram os índices fotossintéticos totais nesse tempo de cultivo, sendo que essa redução foi mais pronunciada na dose mais elevada, que teve aproximadamente 30% de redução em comparação ao controle. Essa redução expressiva foi causada pela menor eficiência do transporte de elétrons de  $Q_A$  para PS I, demonstrada pelos parâmetros  $\phi R_0$ ,  $P_0$ , que influenciam na menor redução do acceptor final de elétrons do PSI ( $RE_0/RC$ ).

EULLAFFROY et al. (2009) estudaram o efeito do herbicida diuron na fotossíntese da macrófita *Lemma minor* e observaram uma forte inibição do fluxo de elétrons da  $Q_A$  reduzida para PQ, diminuindo a eficiência do transporte de elétrons da planta intacta. Os autores observaram também uma diminuição da capacidade de um elétron excitado mover outro na cadeia transportadora além da  $Q_A$  ( $P_0$ ), diminuição do rendimento quântico do transporte de

elétrons de  $Q_A$  para o intersistema ( $\phi E_0$ ), confirmando uma restrição da sua reoxidação, via transporte de elétrons em um centro de reação ativo ( $ET_0/RC$ ).

No maior tempo de cultivo avaliado (168 horas), foi verificado que todas as doses de ( $Cd = 0,1; 1,0$  e  $8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) reduziram os índices fotossintéticos totais em comparação ao controle (ausência de  $Cd$ ) (Figura 14). Mais uma vez, esse resultado foi mais pronunciado na maior dose de contaminação, influenciado pela diminuição do funcionamento dos parâmetros relativos ao transporte de elétrons ( $\phi R_0$ ,  $\phi E_0$ ,  $P_0$ ,  $RE_0/RC$ ,  $\delta R_0$ ), que juntos levaram a uma redução de 72% no índice fotossintético total na maior dose ( $Cd = 8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Em todas as doses, esse efeito foi acompanhado pelo incremento dos parâmetros relacionados com a dissipação da energia não capturada na forma de calor ( $Di_0/RC$  e  $\phi D_0$ ), chegando a atingir 70% de incremento na maior dose ( $Cd = 8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ). A menor eficiência na captação e transporte de elétrons proporcionada pelo incremento nos teores de carotenoides, nesse tempo de cultivo (Tabela 20), atuaram nesse processo.

SOUSA, (2012) também verificou que a maior dose avaliada do herbicida clomazone aplicado em discos foliares de milho, aumentou os níveis de dissipação de energia na forma de calor (aumento do parâmetro  $Di_0/RC$ ) como consequência da redução da eficiência fotossintética do PSII ( $PI_{ABS}$ ) e da fotossíntese total da planta ( $PI_{total}$ ). RALPH, (2000) constatou que a aplicação dos herbicidas: Antrazine, Simazine, DCMU e Glifosato na alga marinha *Halophila ovalis* reduziram a razão clorofila/carotenoide, devido ao aumento significativo dos teores de carotenoides, associados com a maior necessidade de dissipação de energia. Esse fato está associado ao comprometimento do transporte de elétrons como uma consequência da utilização dos herbicidas, o que também foi observado para o estresse por  $Zn$  e  $Cd$  observados neste trabalho.

Constata-se que a Alface-d'água apresenta elevada tolerância a contaminação por  $Cd$ , por manter as atividades normais do seu aparato fotossintético em todas as doses de contaminação avaliadas em 24 horas de cultivo e, dessa forma, demonstrando a presença de mecanismos que incrementam suas taxas fotossintéticas como uma maneira de resistir a contaminação, também em 48 e 72 horas, o que favorece sua indicação para a remediação de corpos hídricos com esse cenário. Entretanto, na maior dose de contaminação ( $8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ) e a partir de 48 de cultivo, a Alface-d'água começa a apresentar leves danos no aparato fotossintético e, conseqüentemente, nas taxas fotossintéticas. Contudo, manteve-se viva e ainda com elevadas taxas de remoção de  $Cd$  (Tabela 15), demonstrando seu potencial para utilizá-la em projetos de remediação. A capacidade de manutenção e incremento da atividade fotossintética da Alface-d'água foi claramente proporcionada pelas baixas taxas de translocação de  $Cd$  para parte aérea (Tabela 17), que permitiram a manutenção da síntese de clorofilas e incremento dos teores de carotenoides nas maiores doses (Tabela 18), favorecendo a fotossíntese mesmo em ambiente com elevadas doses de cádmio.

Somente no maior tempo de cultivo (168 horas) foi percebido danos ao aparato fotossintético em todas as doses de contaminação, principalmente na maior dose ( $8,1 \text{ mg L}^{-1}$ ), porém mantendo-se com o metabolismo fotossintético ativo, o que não justifica sua utilização para remediação até esse tempo avaliado, uma vez que as taxas de remoção por planta (Tabela 15) e os fatores de bioacumulação (Tabela 17) não diferiram estatisticamente dos dados encontrados no tempo de cultivo anterior (72 horas). Após a utilização das plantas em ambientes contaminados, é recomendada sua colheita para efetiva remoção do  $Cd$  dos corpos hídricos, podendo sua biomassa ser utilizada para fins não alimentares, como produção de energia, ou seu armazenamento, que é favorecido pela redução de quase 90% da biomassa após sua secagem.

#### 4.6 CONCLUSÕES

- A Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) possui capacidade de remoção dos metais pesados Zn e Cd de soluções contaminadas, proporcional ao tempo de cultivo dessa planta e aos níveis de contaminação da solução;
- A Alface –d'água (*Pistia stratiotes*) absorve os metais pesados Zn e Cd da solução e acumula em seus tecidos, com maior acumulação nas raízes, aumentando sua taxa de translocação para parte aérea com o aumento da contaminação e tempo de cultivo;
- Os teores de pigmentos fotossintéticos tiveram incremento significativo nas menores doses de Zn e Cd avaliadas. As maiores doses foram tóxicas a síntese de das clorofilas *a* e *b* e induziram o incremento de carotenoides.
- A eficiência fotossintética da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) foi tolerante a contaminação por Zn e Cd, exceto na maior dose, onde houve uma significativa redução dessa eficiência, acompanhada por um incremento na dissipação da energia não captada na forma de calor, possibilitada pelo aumento nos teores de carotenoides.

## **5 CAPÍTULO III**

### **CINÉTICA DE ABSORÇÃO DE ZINCO E CÁDMIO EM PLANTAS DE ALFACE-D'ÁGUA (*Pistia stratiotes*)**

## 5.1 RESUMO

A absorção de metais pesados pelas plantas representa uma ameaça, visto que esses elementos podem provocar efeitos danosos irreversíveis e serem introduzidos na cadeia alimentar, causando problemas a saúde humana, desequilibrando o ambiente como um todo. Por outro lado, essa absorção pode constituir uma forma muito útil de se remediar ambientes contaminados por esses elementos através das técnicas de fitorremediação. Com o objetivo de conhecer o potencial de absorção de zinco (Zn) e cádmio (Cd) pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*), foi realizado um estudo de cinética de absorção desses elementos por essa macrófita. Foram instalados dois experimentos separados, com duas concentrações diferentes de Zn (1,8 e 18 mg L<sup>-1</sup>) e Cd (0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva de Hoagland a 10%, com 3 repetições cada, totalizando 12 unidades experimentais (6 unidades para cada elemento). As plantas utilizadas foram coletadas, lavadas em água corrente e mantidas em água destilada por uma semana antes da instalação do experimento. Posteriormente as plantas foram pesadas e colocadas em contato com as soluções nutritivas contaminadas, e alíquotas dessas soluções foram coletadas de 15 em 15 minutos na primeira hora, de 30 em 30 minutos na segunda hora e de hora em hora até a estabilização dos teores dos metais na solução. Na última coleta, foi avaliada a produção de biomassa, os teores de metais e os parâmetros cinéticos de absorção ( $K_m$  e  $V_{max}$ ). Os resultados demonstram que o pH das soluções não foi afetado pelo cultivo da Alface-d'água e que as maiores velocidades de absorção de Zn e Cd foram encontrados nas maiores doses de contaminação da solução, o que demonstra potencial para sua utilização em projetos de remediação de corpos hídricos contaminados. A produção de biomassa foi afetada negativamente pelo cultivo em soluções contaminadas por Zn e Cd, porém esses resultados não interferiram na velocidade de absorção desses metais pela planta.

**Palavras chave:** Proteínas transportadoras. Contaminação. Macrófitas aquáticas.

## 5.2 ABSTRACT

The absorption of heavy metals by plants is a threat, as these items can cause irreversible harmful effects and be introduced into the food chain, causing problems to human health, unbalancing the environment as a whole. Furthermore, this absorption may constitute a very useful way of remedying environment contaminated by these elements via phytoremediation techniques. In order to meet the zinc absorption potential (Zn) and cadmium (Cd) by Water lettuce (*Pistia stratiotes*), we performed a kinetic study of absorption of these elements by this macrophyte. Two separate experiments were conducted with two different concentrations of Zn (1.8 and 18 mg L<sup>-1</sup>) and Cd (0.1 and 1.0 mg L<sup>-1</sup>) in the Hoagland to 10%, with 3 repetitions each, totaling 12 experimental units (6 units for each element). The plants used were collected, washed in water and kept in distilled water for one week prior to the experiment. Subsequently the plants were weighed and placed in contact with the nutrient solutions contaminated, and aliquots of these solutions were collected from 15 to 15 minutes in the first hour of 30 in 30 minutes in the second hour, and each hour until stabilization of the levels of metals in solution. At the last harvest was evaluated: biomass production, the concentrations of metals and kinetic parameters of absorption ( $K_m$  and  $V_{max}$ ). The results demonstrate that the pH of the solutions was not affected by the cultivation of Water Lettuce and the larger velocity of absorption of Zn and Cd were found in larger doses of contamination of the solution, which demonstrates the potential for their use in the project remediation of contaminated water bodies. Biomass production was negatively affected by contaminated solutions by Zn and Cd, but these results did not affect the rate of absorption of these metals by the plant.

**Keywords:** Transporter proteins. Contamination. Macrophytes.

### 5.3 INTRODUÇÃO

A fitorremediação é um tipo de biorremediação que utiliza plantas para retirar, imobilizar ou tornar os contaminantes menos danosos ao meio ambiente. Em ambientes aquáticos, utilizam-se as macrófitas, por possuírem rápido crescimento e elevada produção de biomassa, atuando principalmente na fitoextração, absorvendo os elementos tóxicos e armazenando em seus tecidos, sem comprometer seu desenvolvimento.

Essa estratégia é recomendada para remediação de reservatórios contaminados por metais pesados, por ser uma técnica limpa, de baixo custo e eficiente na remoção desses elementos altamente tóxicos (BARRETO, 2011). Os metais pesados podem interferir no crescimento, distribuição e no ciclo biológico das espécies vegetais, acumulando-se nos organismos e sedimentos de fundo dos ambientes aquáticos, afetando o equilíbrio de todo o ambiente (MANAHAN, 2004).

As macrófitas aquáticas selecionadas para utilização na fitoextração de metais pesados presentes em corpos hídricos contaminados devem ser consideradas tolerantes a elevadas concentrações desses elementos tóxicos, sendo capazes de absorver, translocar e compartimentalizar em diferentes tecidos e células. Segundo HALL, (2003), os transportadores de membrana desenvolvem importante papel nesses eventos.

A Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) é uma macrófita aquática que tem sido, nos últimos anos, estudada e citada quanto a sua tolerância, rápido crescimento e elevada produção de biomassa (VESELY et al., 2012; DAS et al., 2014; FARNESE et al., 2014), conferindo alto potencial de fitoextração para cádmio (Cd) e zinco (Zn), sendo considerada como eficiente para utilização na despoluição de reservatórios aquáticos contaminados.

Para o manejo adequado dessa espécie na remediação de reservatórios contaminados, é importante conhecer, além do metabolismo dessa macrófita, a velocidade de absorção desses contaminantes. Dessa forma, será possível relacionar os níveis de contaminação do corpo hídrico a ser recuperado com a cinética de absorção do elemento pela planta e, indiretamente, estimar o tempo de “manutenção” da planta empregada na recuperação do reservatório.

A cinética de absorção relaciona o sistema de transporte com a absorção do elemento tóxico pela planta. Para tal, dois parâmetros são utilizados:  $V_{max}$ , que descreve a máxima velocidade de absorção quando todos os transportadores estão saturados, e a constante de Michaelis-Menten -  $K_m$ , que descreve a afinidade da proteína transportadora com o elemento a ser absorvido (ALVES et al., 2016).

As macrófitas *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata* foram avaliadas quanto a cinética de absorção de Cd e foi observada redução acentuada desse elemento na solução nas primeiras 3 horas de cultivo, seguindo por um período constante até aproximadamente 12 horas. Essas macrófitas apresentaram respectivamente:  $K_m$  4,04 e 4,19  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $V_{max}$  4,26 e 10,44  $\mu\text{mol h}^{-1} \text{g}^{-1} \text{MS}$  (OLIVEIRA, 1998).

Nesse sentido, este capítulo teve como objetivo avaliar a velocidade de absorção de Cd e Zn pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) como forma de conhecer seu potencial para utilização na remediação de ambientes aquáticos contaminados por esses elementos.

## 5.4 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.4.1 Coleta das plantas e preparação para o experimento:

As macrófitas foram coletadas no lago do Pavilhão de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) – campus Seropédica-RJ (mesmo local descrito no capítulo anterior), e levadas para Universidade Federal Fluminense (UFF), campus Volta Redonda, para condução do experimento. No local, as plantas foram lavadas em água corrente e mantidas em água destilada para aclimatação por uma semana. Antes da realização do experimento, as plantas foram pesadas e selecionadas com peso de cerca de 50 gramas cada.

### 5.4.2 Condução do experimento:

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, utilizando vasos plásticos com capacidade para 5 litros, preenchidos com 3 litros de solução nutritiva de Hoagland a 10%, onde foram adicionadas as doses de contaminação. Foram testadas neste experimento as duas menores doses utilizadas no capítulo anterior ( $Zn = 1,8$  e  $18 \text{ mg L}^{-1}$  e  $Cd = 0,1$  e  $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), correspondente a  $27,5$  e  $275 \mu\text{mols L}^{-1}$  de Zn e  $0,89$  e  $8,9 \mu\text{mols L}^{-1}$  de Cd, respectivamente. Para cinética de absorção são utilizadas doses baixas do íon na solução para avaliar a afinidade do mesmo pelo seu transportador em condição restritiva. O pH da solução inicial foi ajustado a 5,5 e aferido a cada tempo de coleta da solução. O ambiente de condução do experimento foi controlado a temperatura de 20 a 25°C e, aproximadamente 60% de umidade relativa do ar.

Alíquotas de 1,5 mL foram coletadas de cada vaso, inicialmente, de 15 em 15 minutos na primeira hora do experimento e de 30 em 30 minutos durante a segunda hora. Em seguida, as alíquotas foram coletadas de hora em hora até que a concentração dos metais se estabilizasse na solução nutritiva, conforme OLIVEIRA et al., (2001).

### 5.4.3 Coleta do experimento e análise dos dados:

Ao final do experimento, as plantas foram retiradas da solução, pesadas, lavadas e secas em estufa de circulação forçada de ar a 65°C. Foram medidos os volumes das soluções nutritivas restantes em cada vaso e analisado quanto a concentração final dos metais.

Os teores de Zn e Cd nas alíquotas coletadas foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica. Os parâmetros cinéticos da absorção ( $V_{máx}$  e  $K_m$ ) de Cd e Zn foram determinados a partir da diminuição na concentração desses íons na solução nutritiva (CLAASSEN & BARBER, 1974). As curvas de depleção desses nutrientes e os cálculos dos parâmetros cinéticos foram realizados por meio de método gráfico matemático desenvolvido por Ruiz (1985) e COMETTI et al. (2006), utilizando-se o programa CinéticaWin 1.0 (UFV).

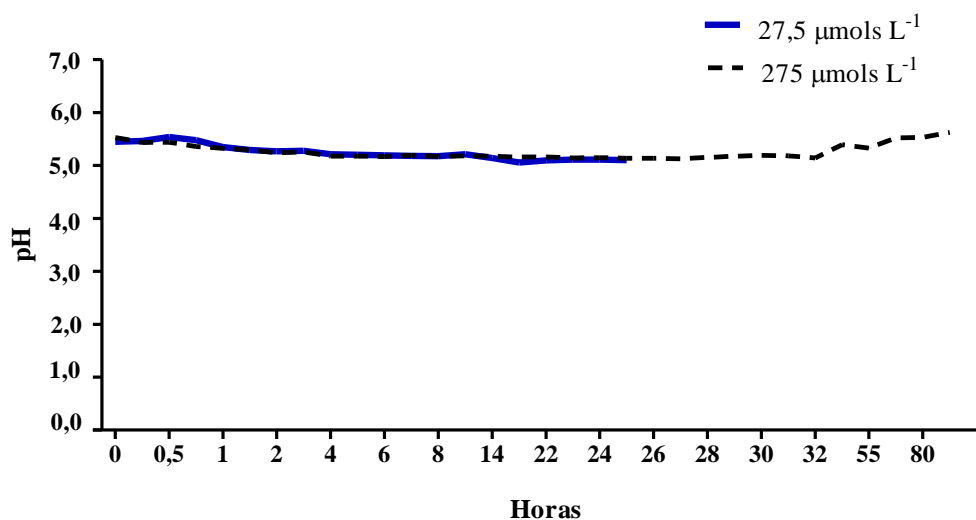
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 2 doses de contaminação para cada metal testado (Zn e Cd), e 3 repetições cada, totalizando 6 unidades experimentais para cada elemento.



## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.5.1 Cinética de absorção de zinco:

A Figura 15 apresenta a variação de pH nas soluções nutritivas com diferentes concentrações de zinco ( $Zn = 1,8$  e  $18 \text{ mg L}^{-1}$ ) ao longo do tempo de cultivo da Alface-d'água. As medições do pH foram realizadas a cada coleta de solução.



**Figura 15.** Efeito da absorção de Zn pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) no pH das soluções nutritivas com diferentes doses de contaminação. obs.: Algumas coletas foram ocultadas no gráfico para melhor visualização.

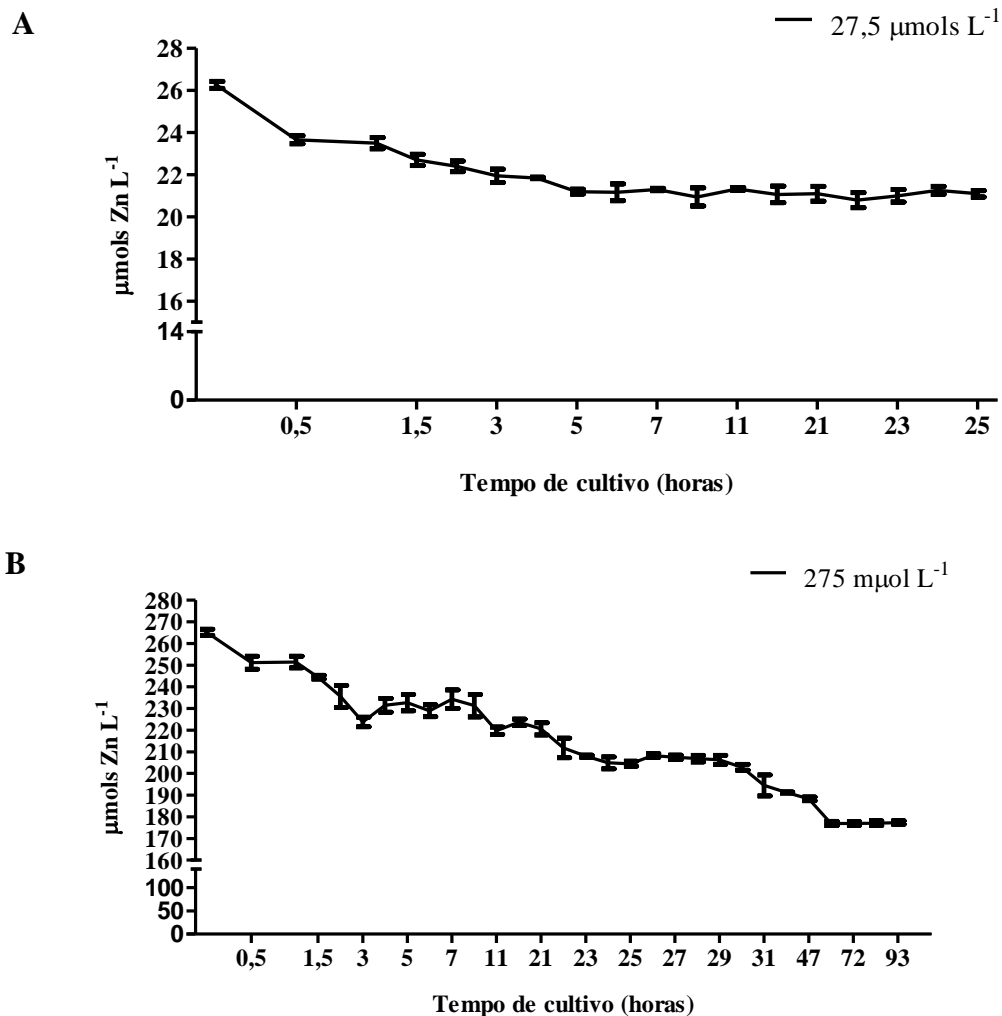
O pH inicial da solução nutritiva com diferentes doses de zinco foi ajustado a 5,5 a fim de garantir a biodisponibilidade deste metal para as plantas. Não houve variação significativa no pH destas soluções ao longo do tempo, ocorrendo um leve declínio inicial até aproximadamente a primeira hora de cultivo (4ª coleta) que se manteve estabilizado em torno de 5,2 até o final do cultivo da menor dose avaliada ( $27,5 \text{ µmols L}^{-1}$ ) e até 32 horas de cultivo (26ª coleta) para a maior dose de contaminação, onde iniciou um leve incremento no pH em relação ao inicial (5,7), até a última coleta (93 horas de cultivo). Não houve variação marcante em todos os tempos de coleta, em comparação ao pH inicial das soluções (Figura 15).

A absorção de alguns cátions metálicos é mediada por um grupo de transportadores pertencente à família ZIP, onde ZRT1 e ZRT2 (transportador regulado de zinco) são designados pelo transporte de zinco de alta e baixa afinidade respectivamente (GUERINOT, 2000). Esses transportadores são caracterizados até o momento pelo transporte ativo do tipo uniporte, ou seja, de uma única espécie, sem troca por outro íon ou molécula (SAIER, 2000), o que justifica a manutenção do pH das soluções nutritivas mesmo com absorção de Zn pela Alface-d'água.

Por outro lado, ROCHA et al., (2014) observaram que a absorção de nitrato pelo girassol elevou o pH da solução nutritiva, já que seu transporte pela membrana plasmática é realizado via simporte com dois prótons. Após 5 horas de cultivo, com o esgotamento de nitrato da solução, observou-se uma redução do pH, justificada pela supressão desse nutriente e influência da absorção de outros elementos presentes na solução nutritiva.

A Figura 16 demonstra que soluções nutritivas com diferentes concentrações de zinco ( $27,5$  e  $275 \text{ µmols L}^{-1}$ ), tiveram seus níveis de contaminação reduzidos ao longo do tempo de cultivo até o ponto de estabilização, evidenciando a absorção do contaminante pelas plantas. FAQUIN, (2005) comentou que na maioria das vezes as plantas não conseguem esgotar o

elemento absorvido da solução de cultivo, mas sim, reduzir a uma concentração mínima onde o influxo líquido é igual a zero.



**Figura 16.** Depleção de Zn em soluções nutritivas com diferentes concentrações (A = 27,5 m μols L<sup>-1</sup> e B = 275 m μols L<sup>-1</sup>) em função da absorção pela Alface-d'água ao longo do tempo de cultivo. obs.: Algumas coletas foram ocultadas para melhor visualização do gráfico.

Observa-se o mesmo padrão de depleção de zinco nas soluções nutritivas com diferentes concentrações desse elemento (Figura 16), havendo uma fase de redução rápida, seguida por uma mais lenta, até a sua estabilização nas soluções. Entretanto, os períodos de cada etapa variaram com a concentração inicial de Zn na solução. A solução de menor concentração (Zn = 27,5 μmols L<sup>-1</sup>) teve uma redução rápida até 45 minutos de cultivo (3<sup>a</sup> coleta), dando início a uma segunda etapa de redução, porém mais lenta, atingindo uma estabilização dos teores de zinco nessa solução nutritiva por volta de 5 horas de cultivo (9<sup>a</sup> coleta). Contudo, a solução mais concentrada (Zn = 275 μmols L<sup>-1</sup>) apresentou uma etapa inicial caracterizada por uma redução acentuada até, aproximadamente, 3 horas de cultivo (7<sup>a</sup> coleta), seguida por uma fase mais lenta, e alcançando uma estabilização mais tardiamente que a solução anterior, cerca de 47 horas de cultivo (27<sup>a</sup> coleta), devido a maior disponibilidade do elemento nessa solução.

Esses resultados indicam que, na solução nutritiva de menor concentração de zinco ( $Zn = 27,5 \mu\text{mols L}^{-1}$ ) atuaram os transportadores de membrana de alta afinidade, que operam quando há baixas concentrações do elemento na solução, o que explica sua fase inicial de redução e final de estabilização mais rápida, quando comparada a solução mais concentrada ( $Zn = 275 \mu\text{mols L}^{-1}$ ). Entretanto na solução de maior concentração de zinco ( $Zn=275 \mu\text{mols L}^{-1}$ ), possivelmente, houve a atuação de um mecanismo duplo, onde, inicialmente os transportadores de baixa afinidade, associados a maior disponibilidade desse íon, operaram. Com a redução das concentrações do elemento, devido à absorção pela Alfaced'água, os transportadores de alta afinidade passaram a agir. Segundo FAQUIN, (2005), quando a faixa de variação na concentração do íon é muito ampla, observa-se a atuação de um mecanismo duplo, com os transportadores de alta afinidade operando em baixas concentrações, e os de baixa afinidade em elevadas concentrações. PENCE et al., (2000) verificaram que células de leveduras modificadas que expressam ZNT1, exibiram uma cinética de absorção também bifásica, dependente da concentração.

Resultados semelhantes foram encontrados por ZHAO & EIDE, (1996) que observaram, em células cultivadas em diferentes concentrações de zinco, que a velocidade de absorção desse elemento é dependente da concentração e saturação, passando por dois processos distintos de absorção: um que apresenta alta afinidade pelo íon, atuando em condições de menor disponibilidade, e o outro com uma menor afinidade, operando em meios com altas concentrações de Zn. HALL, (2003) também corrobora com essa discussão quando afirma que a família de transportadores de metais pesados é muito diversa para atender necessidades de adaptação variadas das plantas como: proporcionar sistemas de alta e baixa afinidade; para obter as condições adequadas para o transporte nas diferentes membranas das organelas vegetais, e para responder as variadas condições de estresse.

A atividade do transportador de alta afinidade – ZRT1 é regulada pelos teores intracelulares de zinco. ZHAO & EIDE, (1996), observaram a existência de sequências ricas em histidina nesses transportadores, e sugerem que essas regiões funcionem como ligantes de metais, que, quando em elevadas concentrações desses elementos, serão “imobilizados” por essa ligação, reduzindo a atividade do transportador e confirmando sua atuação somente em baixas concentrações de zinco. ZHAO & EIDE, (1996b) complementam esses argumentos, demonstrando que o incremento de  $200\mu\text{M}$  de Zn inibiu a absorção pelos transportadores de alta afinidade, sugerindo a atuação do sistema de baixa afinidade para absorção desse elemento nessa faixa de concentração. Esses autores verificaram que este sistema não é regulado pela presença de  $Zn^{2+}$  intracelular, como acontece para o transporte de alta afinidade. Esses resultados corroboram com os encontrados neste experimento (Figura 16), onde verificou-se na maior dose de contaminação ( $275 \mu\text{mols L}^{-1}$ ) a inibição da atividade dos transportadores de alta afinidade, e conseqüentemente, fazendo com que o sistema de baixa afinidade seja o responsável pela absorção inicial do Zn na solução.

Os dados de depleção do metal na solução foram utilizados no software CineticaWin para obtenção dos parâmetros cinéticos da absorção de zinco pela Alfaced'água (*Pistia stratiotes*). Esses dados são apresentados na Tabela 22.

Na menor concentração de zinco testada ( $Zn = 27,5 \mu\text{mols L}^{-1}$ ), foi verificada a maior a afinidade desse elemento pelo seu transportador (menor  $K_m$ ) e menor velocidade de absorção pela Alfaced'água ( $V_{max}$ ). O menor  $K_m$  (maior afinidade) é explicado pela atuação dos transportadores de alta afinidade de zinco nas menores concentrações, entretanto, a baixa  $V_{máx}$ , possivelmente, refletiu a menor quantidade de transportadores de alta afinidade nessa planta. Com o aumento da disponibilidade de zinco na solução ( $275 \mu\text{mols L}^{-1}$ ), houve uma redução da afinidade do transportador pelo elemento ( $K_m$ ) e incremento da velocidade de absorção ( $V_{max}$ ), provavelmente devido ao processo duplo de captação desse elemento, como discutido anteriormente.

**Tabela 22.** Parâmetros cinéticos da absorção de Zn pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada em soluções nutritivas com diferentes concentrações do elemento.

Conc. Solução ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Parâmetro cinéticos			
	$K_m$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	
27,5	1,590	<b>b</b>	0,080	<b>b</b>
275,0	61,240	<b>a</b>	0,189	<b>a</b>
	cv = 9,3%		cv = 13,17%	

Letras iguais em mesma coluna não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

ZHAO & EIDE, (1996) explicam que os transportadores de zinco de alta e baixa afinidade (ZRT1 e ZRT2 respectivamente) atuam em diferentes parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, sendo encontrado um  $K_m$  na faixa de  $1 \mu\text{mol L}^{-1}$  em ambientes com baixas concentrações deste metal, indicando a atuação dos transportadores de alta afinidade e um  $K_m$  na faixa de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  em ambientes com maiores concentrações, relacionando a atividade dos transportadores de menor afinidade pelo Zn. Esses dados vão de encontro aos resultados obtidos nesse trabalho (Tabela 22), confirmando mais uma vez a atuação dos sistemas de absorção de alta e baixa afinidade nas soluções com diferentes concentrações de Zn. HOMMA & HIRATA, (1984) também observaram um padrão duplo no mecanismo de absorção de zinco em arroz mesmo numa faixa estreita de 0,089 a 0,267  $\mu\text{M}$ . Os autores também encontraram maior  $V_{m\acute{a}x}$  e menor  $K_m$  na maior dose de zinco testada.

PENCE et al., (2000) estudaram a fisiologia molecular do transporte de metais pesados na hiperacumuladora *T. caerulescens* e observaram que a velocidade de absorção de zinco dessa planta foi 5 vezes superior à não hiperacumuladora *T. arvense*, enquanto os valores de  $K_m$  não foram significativamente diferentes entre elas. Os autores sugerem que a absorção de zinco é controlada pela quantidade de transportadores ativos nas membranas, que vão diferenciar uma planta hiperacumuladora de uma não acumuladora de metais. LASAT, (2002), utilizou radiotraçadores e relacionou a capacidade hiperacumuladora de Zn de *T.caerulescens* com sua elevada densidade de transportadores por área da membrana.

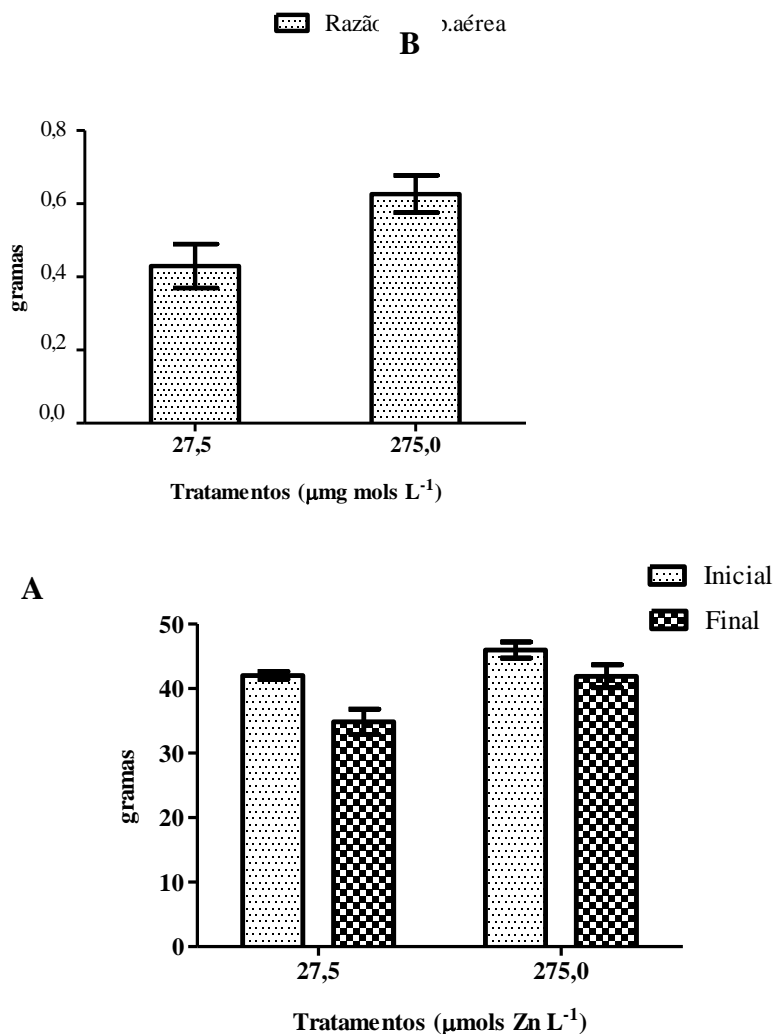
Os resultados obtidos nesse experimento demonstram que há um incremento na velocidade de absorção de zinco pela Alface-d'água nas maiores concentrações desse elemento na solução nutritiva, característica que torna essa planta muito promissora para utilização em projetos de recuperação de corpos hídricos contaminados com esse metal.

A Figura 17 apresenta a variação da biomassa e da razão raiz/parte aérea da Alface-d'água cultivada nas soluções nutritivas em diferentes doses de contaminação, afim de demonstrar o efeito da absorção de Zn no desenvolvimento da planta.

Após 93 horas de cultivo foi observado que os diferentes tratamentos afetaram negativamente o crescimento da Alface-d'água, reduzindo 15 e 10% da sua massa na menor e maior dose de contaminação, respectivamente (27,5 e 275  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ). A razão entre raiz e parte aérea permaneceu abaixo de 1 nos dois tratamentos avaliados, evidenciando uma maior participação da parte aérea na massa total da planta.

Esses resultados sugerem que a planta sob estresse, priorizou o desenvolvimento da parte aérea em detrimento das raízes, possivelmente, para manutenção da atividade fotossintética para sua sobrevivência e também devido a maior toxicidade do zinco nesse órgão que teve contato direto com a solução contaminada e maior acúmulo deste metal (Tabela 8 – Capítulo II). A menor participação das raízes neste cenário não afetou os

parâmetros cinéticos de absorção (Tabela 22), provavelmente, devido ao elevado número de sítios de absorção, como já comentado.



**Figura 17.** Variação da biomassa da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) (A) e razão raiz x parte aérea (B) após 93 horas de cultivo em solução nutritiva contaminada com diferentes doses de zinco.

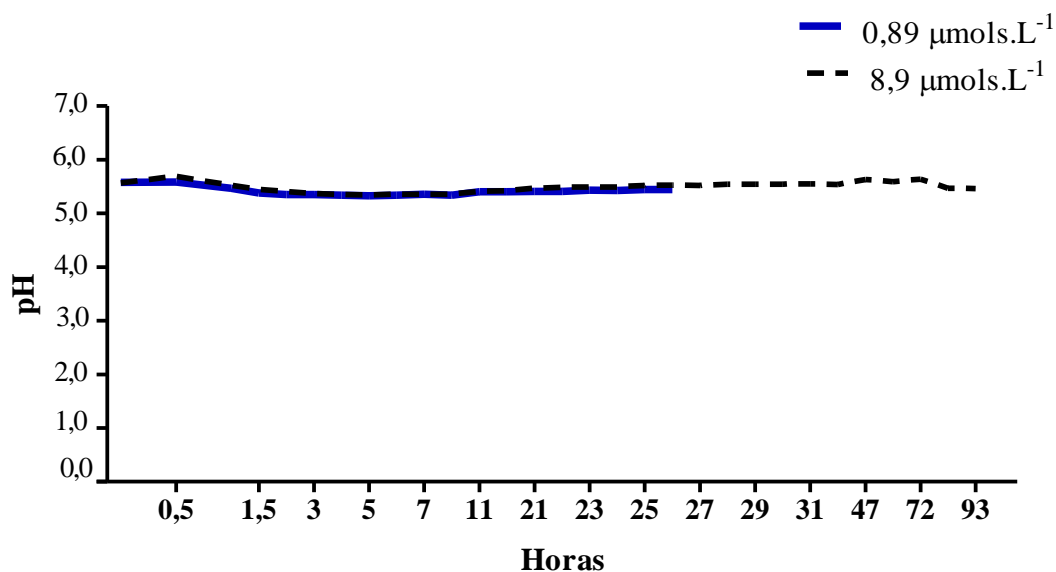
WOLFF et al. (2009) também observaram o efeito prejudicial de doses crescentes de zinco na produção de biomassa pela macrófita *Salvina auriculata*, sendo que os maiores efeitos foram observados nas concentrações mais elevadas desse elemento. Resultados semelhantes foram encontrados por MEGATELI et al., (2009) que também verificaram redução de 50% do crescimento da macrófita *L. gibba* nas maiores concentrações de zinco.

Por outro lado, ALVES et al. (2016) observaram o efeito das doses de  $\text{NO}_3^-$  e  $\text{NH}_4^+$  na produção de biomassa pelas raízes, onde elevadas doses de  $\text{NO}_3^-$  favoreceram a produção de biomassa pelas raízes e o contrário para as elevadas doses de  $\text{NH}_4^+$ , que reduziu o crescimento das mesmas. Os autores constataram que esses resultados interferiram nos parâmetros cinéticos de absorção desses elementos.

### 5.5.2 Cinética de absorção de cádmio:

A Figura 18 apresenta a variação do pH nas duas soluções de cultivo da Alface-d'água contendo Cd ao longo do tempo. A solução inicial foi ajustada a pH 5,5, para garantir a

biodisponibilidade do cádmio para planta, e as medições seguintes foram realizadas a cada tempo de coleta da solução.



**Figura 18.** Efeito da absorção de Cd pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) no pH das soluções nutritivas com diferentes doses de contaminação. Obs: Algumas coletas foram ocultadas para melhor visualização do gráfico

O pH das soluções nutritivas com diferentes concentrações de cádmio (Cd = 0,89 e 8,9 µmols L<sup>-1</sup>) não se diferenciaram ao longo das coletas, observando-se pouca interferência da absorção desse elemento pela Alface-d'água no pH das duas soluções nutritivas.

Ambas soluções demonstraram um pequeno acréscimo no pH (aproximadamente 5,8) nas primeiras coletas, que voltou a se estabilizar na faixa do pH inicial a partir de 45 minutos de cultivo (3<sup>a</sup> coleta) e se manteve até o final do experimento (26 horas para menor dose e 93 horas para maior) (Figura 18).

As pesquisas ainda não identificaram um transportador de membrana específico para absorção de Cd, sendo, geralmente, mencionado sua mediação pelas plantas como “oportunistas”, por utilizar de carreadores de outros cátions divalentes como Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> ou Ca<sup>2+</sup> para sua entrada nas células das raízes (REDJALA et al., 2009).

Assim como descrito para zinco, a absorção de cádmio tem sido relacionada com os transportadores de membrana da raiz da família ZIP (HALL., 2003), através das proteínas transportadoras do tipo IRT, que são transportadores reguladores de ferro, que recebem esse nome por ter sido identificada primeiro para o transporte desse elemento em *Arabidopsis thaliana*. Algumas evidências experimentais obtidas por vários pesquisadores (GUERINOT, 2000; ZHAO & EIDE, 1996) tem demonstrado que esse mesmo transportador opera na mediação de cádmio. Segundo esses autores, a competição de Cd e Fe na absorção por leveduras que expressam esse transportador, o fato que leveduras que expressam IRT são mais sensíveis a esse metal, e a superexpressão de IRT1 em plantas modificadas que levam a acumulações de Cd em quantidades superiores as plantas selvagens, podem ser considerados como indícios importantes da mediação desses transportadores.

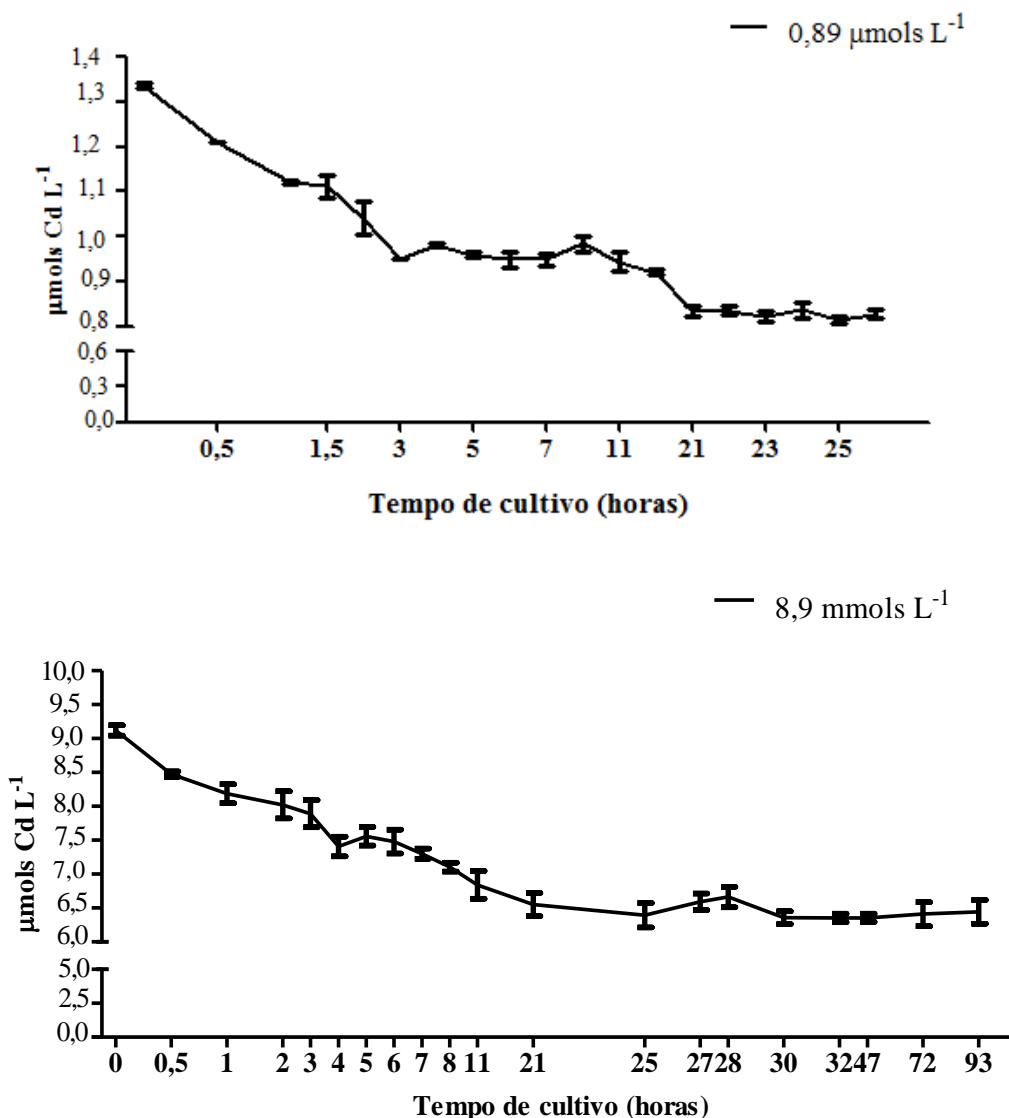
Essa classe de transportadores catalisa o transporte ativo tipo uniporte, ou seja, de uma única espécie, sem troca por outro íon ou molécula (SAIER, 2000), o que justifica a manutenção do pH das soluções nutritivas mesmo com a absorção de Cd pela Alface-d'água.

OLIVEIRA et al., (2001) demonstraram que, no cultivo de salvínia e aguapé, o pH das soluções com o nutriente amônio diminuiu mais pronunciadamente do que quando ele foi

suprimido da solução em favor do nitrato. Esse efeito é observado devido aos transportadores desses nutrientes, uma vez que, a absorção de nitrato envolve o consumo de prótons da solução (transportador simporte) e a absorção de amônio libera íons  $H^+$  no meio. Esses dados confirmam a interferência do tipo de transportador envolvido na absorção, no pH da solução de cultivo.

A absorção de Cd via IRT1 pode representar um risco relevante à saúde humana, visto que esse meio é a porta de entrada desse elemento tóxico na cadeia alimentar, porém esse mecanismo pode ser muito favorável se o objetivo é a fitoextração de ambientes contaminados (GUERINOT, 2000).

A absorção de Cd pela Alface-d'água é apresentada pela depleção desse elemento nas soluções nutritivas na Figura 19.



**Figura 19.** Depleção de Cd em soluções nutritivas com diferentes concentrações em função da absorção pela Alface-d'água ao longo do tempo de cultivo. \*obs.: Algumas coletas foram ocultadas no gráfico para melhor visualização do gráfico.

A depleção de cádmio nas diferentes soluções nutritivas é demonstrada em duas etapas, sendo a primeira caracterizada por uma rápida redução do elemento, seguida por uma

fase de redução mais lenta até a estabilização do metal nas soluções. A solução de menor concentração de Cd ( $0,89 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) teve sua fase rápida até aproximadamente 3 horas de cultivo (7ª coleta), passando a redução mais lenta até 21 horas de cultivo (15ª coleta), quando iniciou a estabilização da concentração do Cd nessa solução nutritiva. Já a solução nutritiva com maior concentração de Cd ( $8,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) teve sua fase de redução rápida até aproximadamente 5 horas de cultivo (9ª coleta), seguido por uma fase mais lenta até 29 horas de cultivo (23ª coleta) quando se iniciou a estabilização da concentração do metal até o tempo final de avaliação (93 horas). Observa-se que a solução de maior concentração demonstrou as fases de redução de cádmio mais longas do que na solução de menor concentração, que se estabilizou mais rapidamente (26 horas) (Figura 19).

Segundo REDJALA et al., (2009) em milho, os transportadores de alta afinidade de Cd atuaram em concentrações bem abaixo de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , ressaltando que para hiperacumuladoras essa faixa pode ser mais ampla. Esses dados corroboram os resultados encontrados neste experimento, onde foi testado uma concentração baixa ( $0,89 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e outra mais alta próximo a  $10 \mu\text{M}$ , ( $8,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), sugerindo a atuação dos transportadores de alta e baixa afinidade respectivamente.

Padrão semelhante de depleção de cádmio na solução de cultivo foi observado por OLIVEIRA et al., (2001) quando cresceram salvinia e aguapé em soluções contaminadas por esse elemento. HARDY & RABER, (1985) cultivaram aguapé em soluções com doses crescentes de Cd e também observaram duas fases de absorção desse elemento, uma considerada rápida e outra mais lenta. Esses autores também citam que o incremento de Cd na solução reduz os teores desse elemento absorvidos na fase rápida, porém o total absorvido pela planta é maior.

Na Tabela 23 são apresentados os parâmetros cinéticos da absorção de cádmio pela Alface-d'água nas soluções nutritivas com diferentes doses de contaminação por esse metal.

**Tabela 23.** Parâmetros cinéticos da absorção de Cd pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) cultivada em soluções nutritivas com diferentes concentrações do elemento.

Conc. Solução ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Parâmetro cinéticos	
	$K_m$ ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$V_{m\acute{a}x}$ ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ )
0,89	1,197 <b>a</b>	0,005 <b>b</b>
8,9	0,930 <b>b</b>	0,032 <b>a</b>
	cv = 3,07%	cv = 16,18%

Letras iguais em mesma coluna não diferem pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

Observa-se que na concentração mais elevada cádmio na solução, houve uma redução significativa do valor de  $K_m$ , caracterizando aumento da afinidade pelo transportador e também, aumento significativo da velocidade de absorção desse elemento pela Alface-d'água, característica bastante promissora para utilização dessa planta em projetos de fitoextração de corpos hídricos contaminados.

Possivelmente, a maior duração das fases de rápida e lenta de absorção do Cd da solução nutritiva mais concentrada ( $8,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) (Figura 19), é consequência de uma maior atuação dos transportadores de alta e baixa afinidade, determinando um menor  $K_m$  e uma maior  $V_{max}$ . Esses resultados também indicam que, na Alface-d'água, existe uma maior quantidade de transportadores de cádmio de baixa afinidade, ou seja, que atuam na condição



de maiores concentrações, do que transportadores de alta afinidade, que operam quando este elemento encontra-se em baixas concentrações.

Aguapé e salvinia apresentaram uma  $V_{max}$  de 4,26 e 7,99  $\mu\text{mol h}^{-1}\text{g}^{-1}$  MS, respectivamente, quando cultivadas em solução nutritiva contaminada com aproximadamente 0,5  $\text{mg.L}^{-1}$  (5  $\mu\text{moles L}^{-1}$ ) de Cd (OLIVEIRA et al., 2001). HARDY & RABER, (1985) observaram que o aumento da concentração de Cd na solução de cultivo resultou em uma maior velocidade de absorção desse elemento pela macrófita *E. crassipes*. HOMMA & HIRATA, (1984) também verificaram que o aumento das doses de contaminação de Cd na solução incrementaram a velocidade de absorção desse elemento pelas raízes de arroz.

LUX et al., (2011) estimam que os valores de  $K_m$  para transportadores de Cd de alta afinidade variem entre 0,02 a 1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , o que está de acordo com os valores obtidos nesse experimento (Tabela 23) para o transportador de maior afinidade, sendo que o de menor afinidade superou esses valores.

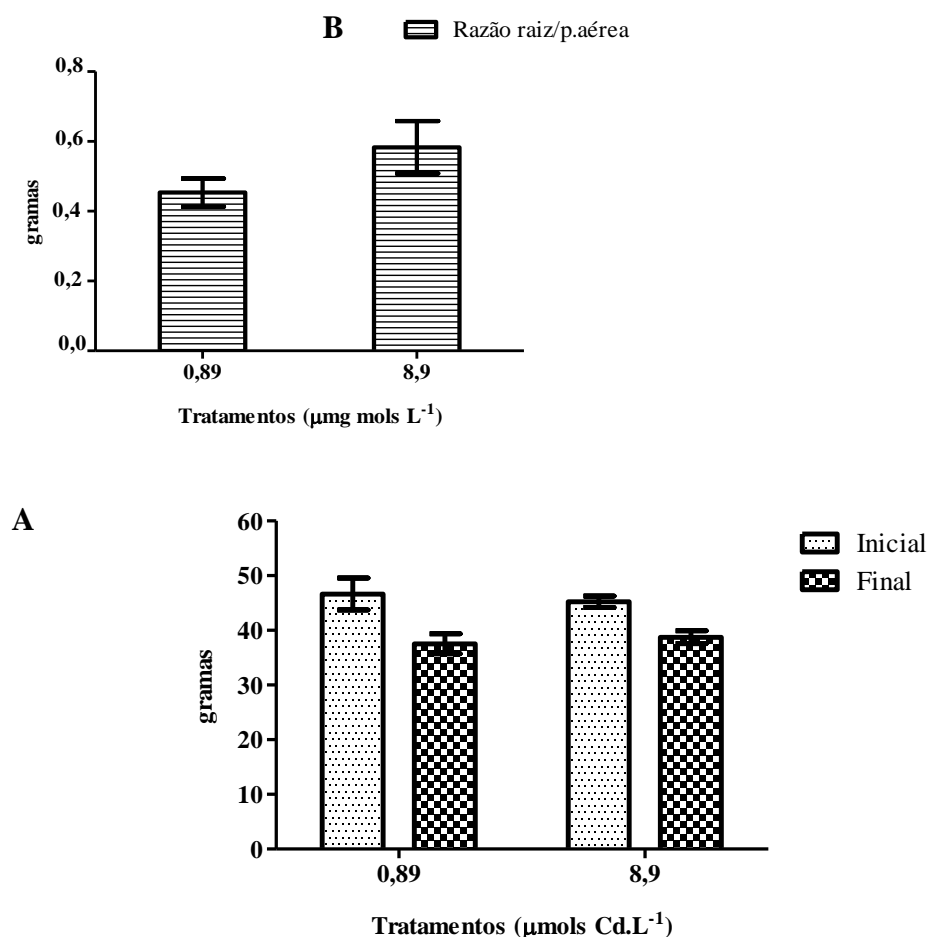
REDJALA et al., (2009) observaram que duas espécies avaliadas (milho e dois ecótipos de *Thlaspi caerulescens*), não diferiram significativamente no seu valor de  $K_m$ , porém demonstraram capacidades diferentes de absorver e acumular Cd, evidenciando que esse parâmetro não é o principal para explicar a absorção de metais pelas plantas. Os autores explicam que os diferentes influxos de Cd encontrados nas plantas são resultantes das diferentes densidades de transportadores de elevada afinidade, o que também foi identificado na absorção de Zn por *T. caerulescens* e *T. averse* (PENCE et al., 2000). LOMBI et al., (2001) também encontraram resultados semelhantes para absorção de Cd em dois ecótipos (Prayon e Ganges) de *T. caerulescens*, com valor de  $K_m$  muito similar entre eles, porém a  $V_{m\acute{a}x}$  do ecótipo Ganges foi 5 vezes maior que o de Prayon, sugerindo a maior densidade de transportadores de Cd na membrana das células das raízes desse ecótipo.

Alguns estudos vêm demonstrando a redução da velocidade de absorção de cádmio pelas plantas com o incremento da concentração desse metal na solução, devido aos seus efeitos fitotóxicos no crescimento e na produção de biomassa em algumas espécies (PLAZA et al., 2007; HOWDEN & COBBETT, 1992).

O efeito das soluções nutritivas contaminadas com Cd sobre a produção de biomassa da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) é apresentado na Figura 20.

Verifica-se nas duas concentrações avaliadas, que houve uma diminuição na produção de biomassa das plantas, reduzindo aproximadamente 20% da biomassa inicial nos dois tratamentos avaliados. A razão raiz/parte aérea ficou abaixo de 1 nos dois tratamentos, sugerindo que a planta priorizou o desenvolvimento da parte aérea em detrimento das raízes, ou também, os efeitos tóxicos do Cd nesse órgão que teve contato direto com a solução contaminada e prioritariamente acumulou este metal (Tabela 17- capítulo II).

LUX et al. (2011) comentam que concentrações elevadas de Cd muitas vezes levam a mudanças na proporção relativa da raiz, tamanho dos tecidos e nos tipos de células. Essas alterações variam para cada espécie. SEREGIN & IVANOV, (2001) verificaram que a contaminação por Cd pode reduzir o crescimento da raiz em até 50% , porém também tem sido apontada por aumentar a síntese de pelos radiculares no milho. Os mesmo autores comentam que muitos aspectos na anatomia da raiz são alterados quando são expostas a elevadas concentrações de Cd.



**Figura 20.** Variação da biomassa da Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) (A) e razão raiz x parte (B) aérea após 93 horas de cultivo em solução nutritiva contaminada com diferentes doses de cádmio.

Entretanto, os parâmetros cinéticos de absorção, não foram afetados, uma vez que houve incremento na  $V_{máx}$  com o aumento da contaminação na solução (Tabela 23), sugerindo, novamente, a maior quantidade de sítios de absorção.

Esses resultados demonstram que a Alface-d'água é uma planta promissora para utilização na remediação de soluções contaminadas por esse elemento tóxico.

OLIVEIRA et al. (2001) observaram uma redução na taxa de crescimento relativo das macrófitas salvinia e aguapé cultivados em doses crescentes de Cd, sendo que as raízes foram consideradas mais sensíveis por reduzirem seu crescimento em doses mais baixas desse elemento. As salvinias tiveram esse efeito mais pronunciado, onde contrariamente, assim como nesse experimento, foi obtida a maior  $V_{máx}$ , novamente apontando para maior densidade de transportadores de membranas.

## 5.6 CONCLUSÕES

- A absorção de Zn e Cd pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) não provocou variações significativas no pH das soluções nutritivas com as diferentes doses avaliadas, devido ao transporte desses elementos ser do tipo uniporte;
- A absorção de Zn e Cd pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) apresentou duas fases, sendo uma considerada rápida, com redução do elemento da solução em pouco tempo, e uma fase lenta, com a remoção dos elementos pela planta em maior tempo de cultivo;
- As maiores velocidades de absorção ( $V_{máx}$ ) de Zn e Cd pela Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) foram alcançadas nas maiores concentrações desses metais na solução nutritiva, o que favorece sua utilização em projetos de fitoextração;
- As maiores doses de contaminação de Zn e Cd influenciaram negativamente a produção de biomassa da Alface-d'água. Esses resultados não se relacionaram com os parâmetros cinéticos obtidos, possivelmente pela elevada densidade dos transportadores de membrana nas células das raízes.

## 6 CONCLUSÕES GERAIS

- A Alface-d'água (*Pistia stratiotes*) é uma macrófita eficiente na biossorção e absorção dos metais pesados Zn e Cd, podendo ser utilizada em projetos de remediação de ambientes aquáticos contaminados por esses elementos. Em elevados níveis de contaminação, a absorção dos elementos é mais rápida, o que favorece o processo de biorremediação.
- Sugere-se mais pesquisas sobre este tema, principalmente que envolvam a ação combinada das técnicas de biossorção e fitoextração com essa macrófita, de forma a potencializar a remediação da área contaminada.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, M. B. DE. Preparação de carvão ativado de bagaço de cana-de-açúcar e sua aplicação na adsorção de Cd(II) e Cu(II). 2013. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana.
- ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. *Journal of plant physiology*, v.168, p. 2056-2062, 2011.
- AHLUWALIA, S. S.; GOYAL, D. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*, v. 98, n. 12, p. 2243–2257, 2007.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactionson Automatic Control*, v.19, n.6, p. 716–723, 1974.
- ALEXANDRE, J. R.; OLIVEIRA, M. L.; SANTOS, T. C.; CANTON, G. C.; CONCEIÇÃO, J. M.; EUTRÓPIO, F. J.; CRUZ, Z. M.; DOBBSS, L. B.; RAMOS, A. C. Zinco e ferro: de Micronutrientes a Contaminantes do Solo. *Natureza On line*, v.10, p. 23-28, 2012.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals—Concepts and applications. *Chemosphere*, v.91, n.7, p. 869–881, 2013.
- ALVAREZ, E. A.; MOCHON, M. C.; SÁNCHEZ, J. J.; RODRÍGUEZ, M. T. Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plants. *Chemosphere*, v. 47, n.7, p. 765-775, 2002.
- ALVES, L. S.; JUNIOR, T.; VERGARA, C.; FERNANDES, M. S.; SANTOS, A. M. D.; SOUZA, S. R. D. Soluble fractions and kinetics parameters of nitrate and ammonium uptake in sunflower (“Neon” Hybrid). *Revista Ciência Agrônômica*, v.47, n.1, p. 13-21, 2016.
- ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; ANTONIOLLI, Z. I.; QUADRO, M. S.; BARCELOS, A. A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. *Revista de Ciências Agrárias*, v. 36, n. 2, p. 127–136, 2013.
- AUGUSTYNOWICZ, J.; TOKARZ, K.; BARAN, A.; PŁACHNO, B. J. Phytoremediation of water polluted by thallium, cadmium, zinc, and lead with the use of macrophyte *Callitriche cophocarpa*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, v.66, n.4, p. 572-581, 2014.
- BARBIERI JUNIOR, É.; ROSSIELLO, R. O. P.; SILVA, R. V. M. M.; RIBEIRO, R. C.; MORENZ, M. J. F. Um novo clorofilômetro para estimar os teores de clorofila em folhas do capim Tifton 85. *Ciência Rural*, v. 42, n.12, p. 2241-2245, 2012.
- BARRETO, A. B. A seleção de macrófitas aquáticas com potencial para remoção de metais-traço em fitorremediação. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BASILE, A.; SORBO, S.; CONTE, B.; COBIANCHI, R. C.; TRINCHELLA, F.; CAPASSO, C.; CARGINALE, V. Toxicity, accumulation, and removal of heavy metals by three aquatic macrophytes. *International journal of phytoremediation*, v.14, n.4, p. 374-387, 2012.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American chemical society*, v.60, n.2, p. 309-319, 1938.
- BURNHAM, K. P.; ANDERSON, D. R. Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach. 2.ed. Colorado. Springer Science & Business Media, 2003. 515p.

- BUSSOTTI, F.; NALI, C.; LORENZINI, G. Chlorophyll fluorescence: From theory to (good) practice. An introduction. *Environmental and Experimental Botany*, v.73, n.1, p. 1–2, 2011.
- BUSSOTTI, F.; STRASSER, R. J.; SCHAUB, M. Photosynthetic behavior of woody species under high ozone exposure probed with the JIP-test: A review. *Environmental Pollution*, v.147, n.3, p. 430–437, 2007.
- CABRAL, L.; SIQUEIRA, J. O.; SOARES, C. R. F. S.; PINTO, J. E. B. P. Retenção de metais pesados em micélio de fungos micorrízicos arbusculares. *Química Nova*, v.33, n.1, p. 25–29, 2010.
- CAKMAK, I.; WELCH, R. M.; HART, J.; NORVELL, W. A.; OZTÜRK, L.; KOCHIAN, L. V. Uptake and retranslocation of leaf-applied cadmium (109Cd) in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Journal of Experimental Botany*, v.51, n.343, p. 221-226, 2000.
- CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a, considerações teóricas e aplicações práticas. UENF, Rio de Janeiro. 198f, p. 1–34, 1998.
- CARDOSO, S. I. Fotofísica de carotenóides eo papel antioxidante de  $\beta$ -caroteno. *Química Nova*, v. 20, n.5, p. 535–540, 1997.
- CARVALHO, M. E. K. Utilização de turfa para remoção de metais potencialmente tóxicos de efluente de uma empresa recicladora de plástico. 2015.89f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba.
- CASTRO, S. V.; LOBO, C. H.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Proteínas de choque termico Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.7, n.4, p. 261-271, 2014.
- CHANDRA, P.; KULSHRESHTHA, K. Chromium Accumulation and Toxicity in Aquatic Vascular Plants. *The Botanical Review*, v.70, n.3, p. 313–327, 2004.
- CHIENG, H. I.; PRIYANTHA, N.; LIM, L. B. L. Effective adsorption of toxic brilliant green from aqueous solution using peat of Brunei Darussalam: isotherms, thermodynamics, kinetics and regeneration studies. *RSC Adv.*, v.5, n.44, p. 34603–34615, 2015.
- CÍCERO, E. A. S.; SENA, J. A. D.; FERRAUDO, A. S. Variabilidade genética e sensibilidade de acessos de *Pistia stratiotes* ao herbicida glyphosate. *Planta Daninha*, v.25, n.3, p. 579–587, 2007.
- CISCATO, M; VANGRONSVELD, J; VALCKE, R. Effects of heavy metals on the fast chlorophyll fluorescence induction kinetics of photosystem II: a comparative study. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, v.54, n.9-10, p. 735–739, 1999.
- CLAASSEN, N.; BARBIERI, C. A method for characterizing the relation between nutrient concentration and flux into roots of intact plants. *Plant physiology*, v.54, n.4, p. 564–568, 1974.
- COLLINS, A. M.; JONES, H. D.; HAN, D.; HU, Q.; BEECHEM, T. E.; TIMLIN, J. A. Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS one*, v.6, n.9, p. 1-7, 2011.
- CONAMA. Resolução n 357, 18 de março de 2005. *Diário Oficial*, n. 053, p. 58–63, 2005.
- COSTA, C. A.; RUBIO, J.; SCHNEIDER, I. A. Plantas aquáticas secas: uma alternativa moderna para remoção de metais pesados de efluentes industriais. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v.5, p. 19–24, 2000.
- COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações gerais e

- características de utilização. *Silva Lusitana*, v.15, n.1, p. 103–117, 2007.
- CRUZ, M. B. Macrófitas aquáticas cultivadas em águas de drenagem ácida de mina. 2011. 90f. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- DAS, S.; GOSWAMI, S.; TALUKDAR, A. A study on cadmium phytoremediation potential of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.92, n.2, p. 169–174, 2014.
- DAYAN, F. E.; ZACCARO, M. L. M. Chlorophyll fluorescence as a marker for herbicide mechanisms of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.102, n.3, p. 189–197, 2012.
- DE SÁ, T. C. L. L.; MARQUES, M.; SOARES, A. M.; GOMES, M. P.; MARTINS, G. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. *Revista Árvore*, v.35, n.5, p. 997-1006, 2011.
- DEBRASSI, A.; LARGURA, M C T.; RODRIGUES, C A. Adsorption of congo red dye by hydrophobic O-carboxymethyl chitosan derivatives. *Química Nova*, v.34, n.5, p. 764–770, 2011.
- DEMMIG-ADAMS, B.; ADAMS, W. W. The Xanthophyll Cycle, Protein Turnover, and the High Light Tolerance of Sun-Acclimated Leaves. *Plant physiology*, v.103, n.4, p. 1413–1420, 1993.
- DUARTE, A. C. O. Elementos terras raras nas características anatômicas, fisiológicas e nutricionais de *Pistia stratiotes* L. (Araceae) e *Zea mays* L. (Poaceae). 2015. 80f. Dissertação (Mestrado em Botânica aplicada). Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- EULLAFFROY, P.; FRANKART, C.; AZIZ, A.; COUDERCHET, M.; BLAISE, C. Energy fluxes and driving forces for photosynthesis in *Lemna minor* exposed to herbicides. *Aquatic Botany*, v.90, n.2, p. 172-178, 2009.
- FADIGAS, F. D. S.; AMARAL-SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C. D.; FREIXO, A. A. Natural contents of heavy metals in some Brazilian soil classes. *Bragantia*, v.61, n.2, p. 151-159, 2002.
- FAQUIN, V. Nutrição Mineral De Plantas, 2005. 183p. Monografia (Especialização). Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- FARNESE, F. S., OLIVEIRA, J. A., LIMA, F. S., LEÃO, G. A., GUSMAN, G. S., & SILVA, L. C. Evaluation of the potential of *Pistia stratiotes* L. (water lettuce) for bioindication and phytoremediation of aquatic environments contaminated with arsenic. *Brazilian Journal of Biology*, v.74, n.3, p. S108-S112, 2014.
- FAROOQ, U.; KOZINSKI, J. A.; KHAN, M. A.; ATHAR, M. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents – a review of the recent literature. *Bioresource technology*, v.101, n.14, p. 5043-5053, 2010.
- FLECK, L.; TAVARES, M. H. F.; EYNG, E. Adsorventes naturais como controladores de poluentes aquáticos : uma revisão. *Revista EIXO*, v.2, n.1, p. 39–52, 2013a.
- FREITAS, A.; BARROS, H. B.B.; SANTOS, M. M.; NASCIMENTO, I.R.; COSTA, J. L.; SILVA, R.R. Production of lettuce seedlings under different substrates and proportions of rice hulls. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. v.4, n.3, p. 260-268, 2013.
- GALLON, R. Modelagem e estimação de parâmetros da adsorção de corantes em carvão ativado. 2011. 73f. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

- GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. D.; SILVA, G. H.; SOARES, A. M.; Utilização do Salgueiro (*Salix humboldtiana* Willd) como espécie fitorremediadora em rejeitos da indústria de Zinco. *Scientia Forestalis/Forest Sciences*, v.39, n.89, p. 117–123, 2011.
- GONÇALVES, J. F. C.; SILVA, C. E.; GATO GUIMARÃES, D.; BERNARDES, R. S. Análise dos transientes da fluorescência da clorofila a de plantas jovens de *Carapa guianensis* e de *Dipteryx odorata* submetidas a dois ambientes de luz. *Acta Amazonica*, v.40, n.1, p. 89–98, 2010.
- GRANT, C. A.; BUCKLEY, W. T.; BAILEY, L. D.; SELLES, F. Cadmium accumulation in crops. *Canadian Journal of Plant Science*, v.78, n.1, p. 1–17, 1998.
- GUERINOT, M. L. The ZIP family of metal transporters. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, v. 1465, n. 1-2, p. 190–198, 2000.
- GUIMARÃES, M.D.A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E.; Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica*, v.1, n.3, p. 58–68, 2008.
- HADAD, H. R.; MAINE, M. A.; BONETTO, C. A. Macrophyte growth in a pilot-scale constructed wetland for industrial wastewater treatment. *Chemosphere*, v.63, n.10, p. 1744–1753, 2006.
- HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of experimental botany*, v.53, n.366, p. 1-11, 2002.
- HALL, J. L. Transition metal transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, v.54, n.393, p. 2601–2613, 2003.
- HARDY, J. K.; RABER, N. B. Zinc uptake by the water hyacinth: Effects of solution factors. *Chemosphere*, v.14, n.9, p. 1155–1166, 1985.
- HOMMA, Y.; HIRATA, H. Kinetics of cadmium and zinc absorption by rice seedling roots. *Soil Science and Plant Nutrition*, v.30, n.4, p. 527–532, 1984.
- HOREMANS, N.; VAN HEES, M.; VAN HOECK, A.; SAENEN, E.; DE MEUTTER, T.; NAUTS, R.; BLUST, R.; VANDENHOVE, H. Uranium and cadmium provoke different oxidative stress responses in *Lemna minor* L. *Plant Biol (Stuttg)*, v.17 Suppl 1, p. 91–100, 2015.
- HOU, W.; CHEN, X.; SONG, G.; WANG, Q.; CHANG, C. C. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). *Plant Physiology and Biochemistry*, v.45, p. 62–69, 2007.
- HOWDEN, R.; COBBETT, C. S. Cadmium-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, v.100, n.1, p. 100–107, 1992.
- ITAIPU BINACIONAL. Relatório final de projeto da central hidrelétrica de Itaipu, 1997.
- JESUS, T. B.; SOUZA, S.S.; SANTOS, L. T. S. O.; AGUIAR, W.M. Evaluation of the Potential use of Macrophytes as Heavy Metal Accumulator. *Revista Virtual de Química*, v.7, n.4, p. 1102–1118, 2015.
- JUNIOR, A. C. G.; SELZLEIN, C.; NACKE, H. Uso de biomassa seca de aguapé (*Eichornia crassipes*) visando a remoção de metais pesados de soluções contaminadas. *Acta Scientiarum - Technology*, v.31, n.1, p. 103–108, 2009.
- KELLY-VARGAS, K.; CERRO-LOPEZ, M.; REYNA-TELLEZ, S.; BANDALA, E. R.; SANCHEZ-SALAS, J. L. Biosorption of heavy metals in polluted water, using different waste fruit cortex. *Physics and Chemistry of the Earth*, v.37, n.39, p. 26–29, 2012.



- KOPSELL, D. A.; ARMEL, G. R.; ABNEY, K. R.; VARGAS, J. J.; BROSNAN, J. T.; KOPSELL, D. E. Leaf tissue pigments and chlorophyll fluorescence parameters vary among sweet corn genotypes of differential herbicide sensitivity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v.99, n.2, p. 194–199, 2011.
- KÜPPER, H.; JIE ZHAO, F.; MCGRATH, S. P. Cellular compartmentation of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant physiology*, v.119, n.1, p. 305–312, 1999.
- LACHER, C.; SMITH, R. W. Sorption of Hg(II) by *Potamogeton natans* dead biomass. *Minerals Engineering*, v.15, n.3, p. 187–191, 2002.
- LADISLAS, S.; GERENTE, C.; CHAZARENC, F.; BRISSON, J.; ANDRES, Y. Performances of two macrophytes species in floating treatment wetlands for cadmium, nickel, and zinc removal from urban stormwater runoff. *Water, Air, and Soil Pollution*, v.224, n.2, 2013.
- LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. *Journal of environmental quality*, v.31, n.1, p. 109–120, 2002.
- LEE, Y. C.; CHANG, S. P. The biosorption of heavy metals from aqueous solution by *Spirogyra* and *Cladophora* filamentous macroalgae. *Bioresource Technology*, v.102, n.9, p. 5297–5304, 2011.
- LI, Y.; ZHANG, S.; JIANG, W.; LIU, D. Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde (MDA) content in *Pistia stratiotes* L. *Environmental Science and Pollution Research*, v 20, n.2, p. 1117–1123, 2013.
- LOVLEY, D. R.; COATES, J. D. Bioremediation of metal contamination. *Current Opinion in Biotechnology*, v.8, n.3, p. 285–289, 1997.
- LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P.; YOUNG, S. D.; SACCHI, G. A. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytologist*, v.149, n.1, p. 53–60, 2001.
- LUCENA, G. L.; SILVA, A. G.; SANTOS, V. D. Cinética de adsorção de cobre (II) utilizando bioadsorventes. *Scientia Plena*, v.8, n.9, p. 1–6, 2012.
- LUO, C.; SHEN, Z.; LI, X. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere*, v.59, n.1, p. 1–11, 2005.
- LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULÍK, M.; WHITE, P. J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, v.62, n.1, p. 21–37, 2011.
- MACFARLANE, G. R.; BURCHETT, M. D. Toxicity, growth and accumulation relationships of copper, lead and zinc in the grey mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Marine Environmental Research*, v.54, n.1, p. 65–84, 2002.
- MAGRO, C.; DEON, M. C.; THOMÉ, A.; PICCIN, J. S.; COLLA, L. M. Biossorção passiva de cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. *Química Nova*, v.36, n.8, p. 1139–1145, 2013.
- MANAHAN, S. E. *Environmental Science chemistry*. CRC Press, p. 743, 2004.
- MANT, C.; COSTA, S.; WILLIAMS, J.; TAMBOURGI, E. Phytoremediation of chromium by model constructed wetland. *Bioresource Technology*, v.97, n.15, p. 1767–1772, 2006.
- MATOTT, L. S.; RABIDEAU, A. J. ISOFIT - A program for fitting sorption isotherms to experimental data. *Environmental Modelling and Software*, v.23, n.5, p. 670–676, 2008.

- MEGATELI, S.; SEMSARI, S.; COUDERCHET, M. Toxicity and removal of heavy metals (cadmium, copper, and zinc) by *Lemna gibba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.72, n.6, p. 1774–1780, 2009.
- MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; FERNÁNDEZ CIRELLI, A. Simultaneous heavy metal removal mechanism by dead macrophytes. *Chemosphere*, v.62, n.2, p. 247–254, 2006.
- MIRZA, N.; MAHMOOD, Q.; MAROOF SHAH, M.; PERVEZ, A.; SULTAN, S. Plants as useful vectors to reduce environmental toxic arsenic content. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014.
- MISHRA, V. K.; TRIPATHI, B. D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. *Bioresource Technology*, v.99, n.15, p. 7091–7097, 2008.
- MÓDENES, A. N.; PIETROBELLI, J. M. T. A.; ESPINOZA-QUIÑONES, F.R.; SUZAKI, P. Y. R.; ALFLEN, V. L.; FAGUNDES-KLEN, M. R. Potencial de bioabsorção do zinco pela macrófita *Egeria densa*. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v.14, n.4, p. 465–470, 2009.
- MÓDENES, A. N.; ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; LAVARDA, F. L.; COLOMBO, A.; BORBA, C. E.; LEICHTWEIS, W. A.; MORA, N.D. Remoção dos metais pesados Cd(II), Cu(II) e Zn(II) pelo processo de bioabsorção utilizando a macrófita *Eichhornia crassipes*. *Revista Escola de Minas*, v.66, p. 355–362, 2013.
- MOHSENZADEH, F.; SHAHROKHI, F. Biological removing of cadmium from contaminated media by fungal biomass of trichoderma species. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, v.12, n.1, p. 102, 2014.
- MOLINA, M. V. Nitrogênio e metais pesados em latossolo e eucalipto cinquenta e cinco meses após a aplicação de biossólido. 2004. 81f. Dissertação (mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- MUDHOO, A.; GARG, V. K.; WANG, S. Removal of heavy metals by biosorption. *Environmental Chemistry Letters*, v.10, n.2, p. 109–117, 2012.
- MUFARREGE, M. M.; HADAD, H. R.; MAINE, M. A. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.58, n.1, p. 53–61, 2010.
- MURPHY, V.; TOFAIL, S. A.; HUGHES, H.; McLOUGHLIN, P. A novel study of hexavalent chromium detoxification by selected seaweed species using SEM-EDX and XPS analysis. *Chemical Engineering Journal*, v.148, n.2-3, p. 425–433, 2009.
- NUNES, M.; VIEIRA, A. A. H.; PINTO, E.; CARNEIRO, R. L.; MONTEIRO, A. C. Carotenogênese em células de haematococcus pluvialis induzidas pelos estresses luminoso e nutricional. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v.48, n.8, p. 825–832, 2013.
- OLIVEIRA, C. D E. Características morfoanatômicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *Pistia stratiotes L.* na presença de cádmio, chumbo e arsênio. 2010. 163f. Dissertação (mestrado em Fisiologia Vegetal), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- OLIVEIRA, J. A. D.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvínia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, n.3, 2001.
- OLIVEIRA, J. A. Efeito do cádmio sobre a absorção, a distribuição e assimilação de enxofre em aguapé (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms) e salvínia (*Salvinia auriculata* Aubl.). 1998. 93f, Tese (Doutorado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

OUARITI, O.; BOUSSANMA, N.; ZARROUK, M.; CHERIF, A.; GHORBAL, M. H. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry*, v.45, n.7, p. 1343–1350, 1997.

ÖZCAN, A. S.; ÖZCAN, A. Adsorption of acid dyes from aqueous solutions onto acid-activated bentonite. *Journal of Colloid and Interface Science*, v.276, n.1, p. 39–46, 2004.

PENCE, N. S.; LARSEN, P. B.; EBBS, S. D.; LETHAM, D. L.; LASAT, M. M.; GARVIN, D. F.; EIDE, D.; KOCHIAN, L. V. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.97, n.9, p. 4956–4960, 2000.

PEREIRA, A. C. C.; RODRIGUES, A. C. D.; DOS SANTO, F. S.; DO NASCIMENTO GUEDES, J.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B. Concentração de metais pesados em espécies arbóreas utilizadas para revegetação de área contaminada. *Revista Ciencia Agronomica*, v.43, n.4, p. 641–647, 2012.

PEREIRA, W. S.; FREIRE, R. S. Ferro zero: Uma nova abordagem para o tratamento de águas contaminadas com compostos orgânicos poluentes. *Quimica Nova*, v.28, n.1, p. 130–136, 2005.

PIERINI, S. A.; THOMAZ, S. M. Adaptações de plantas submersas à absorção do carbono inorgânico. *Acta Botanica Brasilica*, v.18, n.3, p. 629–641, 2004.

PIETROBELLI, J. M. T. A.; CORRÊA, A. R. Avaliação da capacidade de remoção dos íons cádmio (ii) e zinco (ii) pela macrófita *Egeria densa*. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais*, n.28, p. 1-9, 2013.

PILLAI, S.; RAVENSBERGEN, J.; ANTONIUK-PABLANT, A.; SHERMAN, B. D.; VAN GRONDELLE, R.; FRESE, R. N.; MOORE, T. A.; GUST, D.; MOORE, A. L.; KENNIS, J. T. Carotenoids as electron or excited-state energy donors in artificial photosynthesis: an ultrafast investigation of a carotenoporphyrin and a carotenofullerene dyad. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, v.15, p. 4775–84, 2013.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, v.56, n.1, p. 15–39, 2005.

PIO, M. C. S.; SOUZA, K. S.; SANTANA, G. P. Capacidade da *Lemna aequinoctialis* para acumular metais pesados de água contaminada. *Acta Amazonica*, v.43, n.2, p. 203–210, 2013.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SANTOS, E. A.; CECON, P. R. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de tebuthiuron. *Planta Daninha*, v.21, n.3, p. 451–458, 2003.

PLAZA CAZÓN, J.; VIERA, M.; DONATI E.; GUIBAL, E. Zinc and cadmium removal by biosorption on *Undaria pinnatifida* in batch and continuous processes. *Journal of Environmental Management*, v.129, p. 423–434, 2013.

PLAZA, S.; TEARALL, K. L.; ZHAO, F. J.; BUCHENER, P.; McGRATH, S. P.; HAWKESFORD, M. J. Expression and functional analysis of metal transporter genes in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botany*, v.58, n.7, p. 1717–1728, 2007.

POTT, V. J.; POTT, A. Potencial de uso de plantas aquáticas na despoluição da água. 1.ed. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 25p. (Documentos Embrapa Gado de Corte).

PRASAD, M. N. V.; OLIVEIRA FREITAS, H. M. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Electronic Journal of*

Biotechnology, v.6, n.3, p. 110–146, 2003.

QUARTACCI, M. F.; COSI, E.; NAVARI-IZZO, F. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membrane vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. *Journal of experimental botany*, v.52, n.354, p. 77–84, 2001.

RAI, P. K. Heavy metal pollution in aquatic ecosystems and its phytoremediation using wetland plants: an ecosustainable approach. *International journal of phytoremediation*, v.10, n.2, p. 131–158, 2008.

RALPH, P. J. Herbicide toxicity of *Halophila ovalis* assessed by chlorophyll a fluorescence. *Aquatic Botany*, v.66, n.2, p. 141–152, 2000.

REDILLAS, M.; STRASSER, R. J.; JEONG, J. S.; KIM, Y. S.; KIM, J. K. The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. *Plant Biotechnology Reports*, v.5, n.2, p. 169–175, 2011.

REDJALA, T.; STERCKEMAN, T.; MOREL, J. L. Cadmium uptake by roots: Contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. *Environmental and Experimental Botany*, v.67, n.1, p. 235–242, 2009.

ROCHA, G.; FERREIRA, L. M.; TAVARES, O. C. H.; SANTOS, A. M.; SOUZA, S. R. Cinética de absorção de nitrogênio e acúmulo de frações solúveis nitrogenadas e açúcares em girassol. *Pesquisa Agropecuária*, v.44, n.4, p. 381-390, 2014.

RODRIGUES, A. C. D.; DOS SANTOS, A. M.; SANTOS, F. S.; PEREIRA, A. C. C.; SOBRINHO, N. M. B. A. Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. *Revista Virtual de Química*, v.8, n.1, p. 262-276, 2016.

RODRIGUES, R. F. Adsorção de metais pesados em serragem de madeira tratada com ácido cítrico. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v.11, n.1, p. 21–26, 2006.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R.; ABREU, C. D.; PEREIRA, B. F. F. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia*, v.66, n.2, p. 327–334, 2007.

NIKOLIĆ, N.; KOJIĆ, D.; PILIPOVIĆ, A.; PAJEVIĆ, S.; KRSTIĆ, B.; BORIŠEV, M.; ORLOVIĆ, S. Responses of hybrid poplar to cadmium stress : accumulation, and antioxidant enzyme activity. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, v. 50, n.2, p. 95–103, 2008.

SAIER, M. H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, v.64, n.2, p. 354–411, 2000.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N.; GARBISU, C. Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. *Quim. Nova*, v.34, n.1, p. 16-20, 2011.

SANTOS, C. L. D. Acúmulo e toxidez de manganês em macrófitas aquáticas flutuantes livres, 2009. 57f. Dissertação (mestrado em Botânica). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SANTOS, F. H. D. S. Crescimento , nutrição e produção “ in vitro” de *Gomphrena claussenii* exposta a zinco e cádmio. 2012. 79f. Dissertação (mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SÁRVÁRI, É.; FODOR, F.; CSEH, E.; VARGA, A.; ZÁRAY, G.; ZOLLA, L. Relationship between changes in ion content of leaves and chlorophyll-protein composition in cucumber

- under cd and pb stress. Zeitschrift fur Naturforschung C, v.59, n.9-10, p. 746-753.
- SCHNEIDER, I. A.; RUBIO, J.; SMITH, R. W. Biosorption of metals onto plant biomass: Exchange adsorption or surface precipitation. International Journal of Mineral Processing, v.62, n.1-4, p. 111–120, 2001.
- SCHNEIDER, I. A. Biossorção de Metais Pesados com a Biomassa de Macrófitas Aquáticas. 1995. 157f. Tese (doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology, v.48, n.4, p. 523–544, 2001.
- SEYBOLD, A.; EGGLE, K. Light field and leaf pigments I. Planta, v.26, p. 491-515, 1970.
- SINGH, A.; KUMAR, C. S. Effect of lead and cadmium on aquatic plant *Hydrilla verticillata*. Journal of Environmental Biology, v.34, n.1, p. 891–895, 2013.
- SOUSA, C. P. Ação de herbicidas sobre a atividade fotossintética de plantas com metabolismo C3 e C4. 2012. 122 f. Tese (doutorado em Biologia), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- SOUTHICAK, B.; NAKANO, K.; NOMURA, M.; CHIBA, N.; NISHIMURA, O. *Phragmites australis*: A novel biosorbent for the removal of heavy metals from aqueous solution. Water Research, v.40, n.12, p. 2295–2302, 2006.
- SOUZA, E. P. D.; FRANÇA, I. D.; FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados. Revista Brasileira de Agrociência, v.17, n.2, p. 167–173, 2011.
- SOUZA, M. A. A. D. Expressão gênica relacionada à produção de óleo essencial e avaliação do metabolismo de *Mentha arvensis l.* sob diferentes condições de cultivo. 2010. 123f. Tese (doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- SOUZA, V. L.; SILVA, D. D. C.; SANTANA, K. B.; MIELKE, M. S.; ALMEIDA, A. F. D.; MANGABEIRA, P. A. O.; ROCHA, E. A. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. Acta Botanica Brasilica, v.23, n.2, p. 343–354, 2009.
- STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, v.104, n.1-2, p. 236–257, 2011.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRISVASTAVA, A. Analysis of the Fluorescence Transient Summary II . The Theoretical Background. p. 1–47, 2004.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; SRIVASTAVA, A. Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. 1.ed. Springer Netherlands, 2004, v.19, p. 321-362.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transients to address environmental questions: the JIP-test, 1995.
- STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As Clorofilas. Ciência Rural, v.35, p. 748–755, 2005.
- SUÑE, N.; SÁNCHEZ, G.; CAFFARATTI, S.; MAINE, M. A. Cadmium and chromium removal kinetics from solution by two aquatic macrophytes. Environmental Pollution, v.145, n.2, p. 467–473, 2007.
- TAGLIAFERRO, G. V.; PEREIRA, P. H. F.; ÁLVARES, L.; LÚCIA, M.; PINTO, C. Adsorção de chumbo, cádmio e prata em óxido de nióbio (v) hidratado preparado pelo método

da precipitação em solução homogênea. *Química Nova*, v.34, n.1, p. 101–105, 2011.

TAVARES, S. R. L. Fitorremediação em solo e água de áreas contaminadas por metais pesados provenientes da disposição de resíduos perigosos. 2009. 371f. Tese (doutorado em Engenharia Civil). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

TEWARI, A.; SINGH, R.; SINGH, N. K.; RAI, U. N. Amelioration of municipal sludge by *Pistia stratiotes* L.: Role of antioxidant enzymes in detoxification of metals. *Bioresource Technology*, v.99, n.18, p. 8715–8721, 2008.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. A expansão das macrófitas aquáticas e implicações para o manejo de reservatórios: um estudo na represa de Itaipu. In: HENRY, R. (Ed.). *Ecologia de reservatórios: estrutura, função e aspectos sociais*. Botucatu, FUNDIBIO: FAPESP, 1999. p. 599-625.

VASQUES, A. R. Caracterização e aplicação de adsorvente para remoção de corantes de efluentes têxteis em batelada e colunas de leito fixo. 2008. 153f. Dissertação (mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VERMA, V. K.; TEWARI, S.; RAI, J. P. N. Ion exchange during heavy metal bio-sorption from aqueous solution by dried biomass of macrophytes. *Bioresource Technology*, v.99, n.6, p. 1932–1938, 2008.

VESELY, T.; NEUBERG, M.; TRAKAL, L.; SZAKOVA, J.; TLUSTOA, P. Water lettuce *Pistia stratiotes* L. response to lead toxicity. *Water, Air, and Soil Pollution*, v.223, n.4, p. 1847–1859, 2012.

VESELÝ, T.; TRAKAL, L.; NEUBERG, M.; SZAKOVA, J.; DRABEK, O.; TEJNECKY, V.; BALIKOVA, M.; TLUSTOS, P. Removal of Al, Fe and Mn by *Pistia stratiotes* L. and its stress response. *Central European Journal of Biology*, v.7, n.6, p. 1037–1045, 2012.

VESK, P. A.; NOCKOLDS, C. E.; ALLAWAY, W. G. Metal localization in water hyacinth roots from an urban wetland. *Plant, Cell and Environment*, v.22, n.2, p. 149–158, 1999.

VIJAYARAGHAVAN, K.; YUN, Y. S. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, v.26, n.3, p. 266–291, 2008.

WALKER, G. M.; WEATHERLEY, L. R. Adsorption of dyes from aqueous solution — the effect of adsorbent pore size distribution and dye aggregation. *Chemical Engineering Journal*, v.83, n.3, p. 201–206, 2001.

WANG, Q.; CUI, Y.; DONG, Y. Phytoremediation of polluted waters potentials and prospects of wetland plants. *Acta Biotechnologica*, v.22, n.1-2, p. 199–208, 2002.

WEIS, J. S.; WEIS, P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: Implications for phytoremediation and restoration. *Environment International*, v.30, n.5, p. 685–700, 2004.

WOLFF, G.; ASSIS, L. R.; PEREIRA, G.C.; CARVALHO, J. G.; CASTRO, E. M. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. *Planta Daninha*, v.27, n.1, p. 133–137, 2009.

YABE, M. J. S.; OLIVEIRA, E. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de bacias hidrográficas. *Química Nova*, v.21, n.5, p. 551–556, 1998.

YEH, T. Y.; LIN, C. L.; CHEN, C. W.; PAN, C. T. Heavy metal biosorption properties of four harvested macrophytes. *Journal of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste*, v.15, n.2, p. 108–113, 2011.

YORKS, S. Zinc , lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*.

New Phytologist, v.136, n.36, p. 469–480, 1997.

YUSUF, M.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M. G.; SARIN, N, B. Overexpression of  $\gamma$ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v.1797, n.8, p. 1428–1438, 2010.

ZABINI, A. V.; EMILIA, H.; MARTINEZ, P.; FINGER, F. L.; SILVA, C. A. Concentração de micronutrientes e características bioquímicas de progênies de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) eficientes no uso de zinco. *Bioscience Journal*, v.23, n.4. p. 95–103, 2002.

ZHANG, S.; JIANG, W.; LIU, D. Effects of nitric oxide on zinc tolerance of the submerged macrophyte *Hydrilla verticillata*. *Aquatic Biology*, v.23, n.1, p. 61–69, 2014.

ZHAO, H.; EIDE, D. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.93, p. 2454–2458, 1996a.

ZHAO, H.; EIDE, D. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, v.271, n.38, p. 23203–10, 1996b.

ZOCHE, J. J.; FREITAS, M.; QUADROS, K. E. D. Concentração de zn e mn nos efluentes do beneficiamento de carvão mineral e em *Typha domingensis* pers (typhaceae). *Revista Árvore*, v.34, n.1, p. 177–188, 2010.

## 8 ANEXOS

**Anexo 1.** Concentração de zinco e cádmio em solução e percentual de remoção desses metais nos diferentes tempos de contato com a biomassa seca da Alface-d'água.

Metal	Conc. Inicial (mg L <sup>-1</sup> )	Concentração final (mg L <sup>-1</sup> )																	
		1h	dp	3h	dp	6h	dp	12h	dp	24h	dp	36h	dp	48h	dp	60h	dp	72h	dp
Zn	0,00	0,15	± 0,03	0,4	± 0,007	0,4	± 0,043	0,5	± 0,06	0,6	± 0,02	0,6	± 0,09	0,6	± 0,02	0,6	± 0,008	0,6	± 0,006
	2,13	1,55	± 0,04	1,33	± 0,07	1,23	± 0,08	1,76	± 0,49	2,24	± 0,22	1,76	± 0,05	1,34	± 0,04	1,16	± 0,045	0,44	± 0,01
	21,04	7,10	± 0,21	7,24	± 0,14	5,47	± 0,30	5,76	± 0,57	5,09	± 0,29	4,12	± 0,12	2,93	± 0,3	3,82	± 0,3	2,95	± 0,1
	51,98	28,50	± 0,12	16,76	± 0,52	17,30	± 0,95	11,83	± 0,19	11,27	± 0,82	8,15	± 0,14	9,66	± 0,5	7,33	± 0,06	9,25	± 0,3
	61,91	42,21	± 0,69	38,57	± 0,5	23,61	± 0,24	24,40	± 0,14	14,37	± 0,66	14,76	± 1,3	14,81	± 0,1	12,18	± 0,6	17,28	± 0,6
	104,54	97,16	± 0,96	95,90	± 1,5	86,17	± 3,32	58,70	± 3,6	45,42	± 1,9	47,59	± 1,4	39,66	± 2,1	38,04	± 2,0	30,53	± 4,4
Cd	0,00	0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00		0,00	
	0,05	0,04	± 0,002	0,04	± 0,002	0,04	± 0,002	0,02	± 0,005	0,02	± 0,003	0,02	± 0,001	0,01	± 0,001	0,02	± 0,003	0,02	± 0,007
	0,13	0,12	± 0,004	0,11	± 0,004	0,10	± 0,002	0,06	± 0,001	0,04	± 0,005	0,03	± 0,005	0,03	± 0,006	0,02	± 0,003	0,02	± 0,004
	1,21	0,94	± 0,03	0,89	± 0,06	0,84	± 0,033	0,55	± 0,03	0,33	± 0,021	0,24	± 0,012	0,23	± 0,02	0,43	± 0,04	0,28	± 0,004
	11,45	8,34	± 0,45	7,39	± 0,37	6,40	± 0,23	5,17	± 0,11	3,66	± 0,2365	2,53	± 0,24	2,18	± 0,137	2,51	± 0,09	2,13	± 0,05



