



DOUGLAS CARVALHO AMARAL

**ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS E DA
CAPACIDADE BIOACUMULADORA DE Zn, Cd
e Pb POR PLANTAS EM ÁREA DE
MINERAÇÃO DE ZINCO**

LAVRAS - MG

2013

DOUGLAS CARVALHO AMARAL

**ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS E DA CAPACIDADE
BIOACUMULADORA DE Zn, Cd e Pb POR PLANTAS EM ÁREA DE
MINERAÇÃO DE ZINCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador
Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

LAVRAS-MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Amaral, Douglas Carvalho.

Estudos ultraestruturais e da capacidade bioacumuladora de Zn,
Cd e Pb por plantas em área de mineração de zinco / Douglas
Carvalho Amaral. – Lavras : UFLA, 2013.

99 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Elementos-traço. 3. Microanálise de
Raios-X. 4. Microscopia eletrônica. 5. Espécies hiperacumuladoras.
6. Contaminação do solo. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 628.55

**ESTUDOS ULTRAESTRUTURAIS E DA CAPACIDADE
BIOACUMULADORA DE Zn, Cd e Pb POR PLANTAS EM ÁREA DE
MINERAÇÃO DE ZINCO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2013.

Dra. Cláudia Regina Gontijo Labory	UFLA
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. João José Granate de Sá e Melo Marques	UFLA

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Orientador

**LAVRAS – MG
2013**

Aos meus pais, Arriel e Imêlda, pelo amor e por ensinarem que a melhor herança é a educação. Ao meu irmão, Rafael, pelo companheirismo. À Thaís, minha noiva, pelo amor, incentivo e amizade.

DEDICO

AGRACEDIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela força, saúde, graça, sabedoria e a certeza de que sempre estive ao meu lado em todos os momentos.

À minha mãe e ao meu pai, pelo amor incondicional, compreensão, pela força e suporte, mesmo antes do início, até a concretização deste trabalho.

Ao meu irmão, Rafael, pelo companheirismo e amizade.

À minha noiva, Thaís, meu suporte, minha companheira, conselheira, incentivadora, meu tudo! Obrigada, sempre, por ser meu alicerce e ser esta pessoa maravilhosa em minha vida. Amo-te, minha linda!

À Cláudia, por ser a minha amiga, companheira, incentivadora e meu bom senso, tanto nos bons como, principalmente, nos piores momentos. Eu a admiro e a respeito. A sua presença, durante esses anos, fez-me uma pessoa mais feliz, trouxe-me paz e tranquilidade. Serei eternamente grato a Deus por colocar uma pessoa como você em meu caminho. Obrigado por tudo!

Ao meu orientador, Bebeto, pessoa admirável, muito obrigado por não se restringir a apenas orientar e ensinar a pesquisa e atividades acadêmicas. Muito maior que conseguir o título é ser uma pessoa muito melhor do que quando entrei.

Ao professor Eduardo Alves pela orientação, por toda atenção, oportunidade, confiança, paciência e ensinamentos dispensados desde o início da graduação até o término desta etapa.

Ao professor João José pelos ensinamentos, dedicação, atenção e paciência.

Às “meninas”, Olívia, Jéssica e Flávia, pela convivência, amizade e suporte dado durante todo o período de desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência do Solo (DCS), que me proporcionaram uma oportunidade de crescimento profissional.

Aos professores do Departamento de Ciência do Solo da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos.

A Capes e ao CNPq pelas bolsas de estudo concedidas.

À Fapemig, CNPq e Capes pelo suporte financeiro no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia, Geoquímica, Fertilidade, entre outros: Fabiano, Glauco, Bruno, Rafael, André, Fábio, Ênio, Guilherme, Henrique, Geila, Regla, Rômulo, Satoshi, Breno, Clério e Julian que foram indispensáveis na realização dos experimentos, pela amizade e agradável convivência durante esses anos.

À Elô, técnica do laboratório de microscopia, pela amizade, ensinamento e pelo suporte e atenção neste período de convivência.

Aos funcionários do DCS: Cristina, Dirce, Humberto, Roberto, Carlinho, João Gualberto e Pezão, pela amizade e disponibilidade em auxiliar e ensinar.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e fizeram parte dessa caminhada.

Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL	09
RESUMO GERAL	10
GENERAL ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1 Elementos-traço em solos	15
2.2 Fitorremediação	17
2.3 Estudos com Microscopia Eletrônica	22
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO II: Avaliação de tolerância a elementos-traço em espécies de plantas nativas de solos contaminados em uma área de mineração de zinco	32
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1 Descrição do local de estudo	38
2.2 Coleta das amostras	39
2.3 Identificações das espécies	42
2.4 Procedimentos analíticos empregados nas amostras de solos e plantas	42
2.4.1 Caracterização físico-química dos solos	42
2.4.2 Concentração total de metais nos solos – USEPA 3051	43
2.4.3 Concentração de metais extraídos dos solos – Mehlich 1	43
2.4.4 Análise dos teores de elementos-traço na planta	44
2.4.5 Fatores de Bioacumulação e Translocação em plantas	45
2.5 Análises estatísticas	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Características físico-químicas dos solos	46
3.2 Concentração de elementos-traço nos solos	47
3.3 Identificação das espécies	49
3.4 Concentração de metais em plantas	50
3.5 Bioacumulação e Translocação em plantas	57
4 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO III: Utilização de MET e MEV/EDS no estudo da localização e composição de elementos-traço em tecidos de plantas	67
1 INTRODUÇÃO	70
2 MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1 Descrição do local de estudo	73
2.2 Coleta das espécies	73

2.3	Análise do solo	74
2.4	Análise do Cádmio, Chumbo e Zinco total na planta	75
2.5	Análise ultraestrutural da planta através de estudos com microscopia	76
2.5.1	Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X	76
2.5.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão	77
2.6	Análises estatísticas	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.1	Análise do solo	79
3.2	Concentração de Cd, Pb e Zn na planta	80
3.3	Localização e quantificação de Cd, Pb e Zn na planta	82
4	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS.....	96

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO GERAL

Atualmente, a preocupação com a saúde e a qualidade de vida da população, assim como a do ambiente que a cerca, tem sido constante. Uma das principais causas são as atividades de mineração. Essas atividades são de fundamental importância. Contudo, podem causar impactos ambientais que levam a danos ao ambiente e à saúde da população por exporem à superfície concentrações elevadas de elementos-traço. Um dos requisitos básicos para os sucessos de qualquer técnica de recuperação de áreas degradadas é encontrar plantas tolerantes aos contaminantes. Neste contexto, aplica-se a fitorremediação, técnica onde se utilizam plantas para remover os contaminantes do solo e, ou, torná-los inofensivos ao meio ambiente. O primeiro passo para implementação dessa técnica é o estudo de espécies com potencial fitoestabilizador ou fitoextrator dos metais presentes na área. Neste contexto, a microscopia eletrônica tem se mostrado como uma técnica bastante promissora, por ser capaz de dar não apenas informações ultraestruturais, mas também analíticas das amostras estudadas. O presente estudo foi realizado com o objetivo de: (i) determinar as concentrações de cádmio, chumbo e zinco em espécies desenvolvidas, naturalmente, em áreas contaminadas visando à viabilidade de se utilizar estas espécies em programas de fitorremediação; e, (ii) identificar e caracterizar, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)/Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X (EDS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), os mecanismos de tolerância aos elementos-traço Cd, Pb e Zn, assim como sua distribuição celular. Os resultados indicam que níveis hiperacumuladores (mg kg^{-1}) foram obtidos para as espécies *Gomphrena claussenii* Moq. ($[\text{Zn}] = 10434$; $[\text{Cd}] \sim 100$) e *Pteris* sp. ($[\text{Zn}] = 10809$; $[\text{Pb}] \sim 1000$). A espécie *Andropogon* sp. pode ser considerada uma espécie tolerante a estes elementos tóxicos (Fator de Bioacumulação ≥ 1) e uma importante fonte na revegetação de áreas degradadas. Para as espécies *Andropogon* sp. e *Gomphrena claussenii* Moq., por meio da MEV/EDS, foi observada a formação de cristais e acúmulo nos espaços intercelulares de Cd, Pb e Zn tanto na parte aérea quanto na raiz. Para a espécie *Pteris* sp. foram observadas, na parte aérea, estruturas semelhantes a hifas, acumulando teores significativos de Cd, enquanto nas células mais externas da folha e da raiz e nos espaços intercelulares foram quantificados elevados teores de Zn e Pb. Por meio da MET, observou-se que houve diferenciação significativa em nível celular, sendo possível observar grandes alterações na organização das células. As espécies em estudo mostraram grande habilidade em tolerar elevados níveis de elementos tóxicos pelo uso de complexos mecanismos de tolerância.

Palavras-chave: Elementos-traço. Espécies hiperacumuladoras. Fitorremediação. Microscopia eletrônica. Microanálise de raios-X.

GENERAL ABSTRACT

At present, the concern with the population's health and life quality as well as with that of environment which surrounds it, has been constant. One of the main causes is the mining activities. Those activities are of fundamental importance. However, they can cause environmental impacts which lead to damages to environment and the population's health for exposing elevated concentrations of trace-elements to the surface. One of the basic requisites to the success of any technique of restoration of degraded areas is finding contaminant-tolerant plants. In this context, phytoremediation is applied, techniques where plants are utilized to remove soil contaminants and or make them harmless to environment. The first step to the implementation of this technique is the study of species with a potential phytostabilizing or phytoextracting the metals present in the area. In this context, electron microscopy has proved a quite promising technique for being capable of not only giving ultrastructural information but also analytical of the studied samples. The present study was carried out with the objectives of (i) determining the concentrations of cadmium, lead and zinc in species developed naturally in contaminated areas aiming at the viability of utilizing these species in phytoremediation programs and (ii) identifying and characterizing through Scanning Electron Microscopy (SEM)/ Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (EDX) and Transmission Electron Microscopy (TEM), the mechanisms of tolerance to trace-elements Cd, Pb and Zn as well as cell distribution. The results point out that hyperaccumulating levels (mg/kg^{-1}) were obtained for the species *Gomphrena clausenii* Moq. ($[\text{Zn}] = 10434$, $[\text{Cd}] \sim 100$) and *Pteris* sp. ($[\text{Zn}] = 10809$, $[\text{Pb}] \sim 1000$). The species *Andropogon* sp. may be regarded as a species tolerant to these toxic elements (Bioaccumulation factor > 1) and an important source in the revegetation of degraded areas. For the species *Andropogon* sp. and *Gomphrena clausenii* Moq. through SEM/EDX, the formation of crystals and accumulation of Cd, Pb and Zn were found in the cell spaces both in the shoot and in the root. For the species *Pteris* sp., structures similar to hyphae accumulating significant contents of Cd were found while in the outermost cells in the leaf and root and in the intercell spaces, high contents of Zn and Pb were quantified. Through TEM, it was found that there was significant differentiation in the cell level, great alterations in the cell organization being possible to observe. The species under study showed great ability to tolerate elevated levels of toxic elements through the use of complex tolerance mechanisms.

Key words: Trace elements. Hyperaccumulating species. Phytoremediation. Electron microscopy. X-ray microanalysis.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a preocupação com a saúde e a qualidade de vida da população, assim como a do ambiente que a cerca, tem sido constante. Neste contexto, estudos envolvendo a contaminação de solos e corpos d'água vêm merecendo destaque, e a procura de técnicas para minimizar os riscos potenciais relacionados a essas contaminações têm sido cada vez mais frequentes. Uma das principais causas de contaminação destes ambientes são as atividades de mineração.

Essas atividades de mineração são de fundamental importância para obtenção de materiais necessários para a fabricação de bens indispensáveis para o homem. Contudo, podem causar impactos ambientais que levam a danos ao ambiente, comprometendo os ecossistemas, a saúde da população e a vida das gerações futuras.

Apesar de sua fundamental importância, as atividades de mineração, expõem à superfície do solo material de rocha que contém elementos-traço (e.g., Cd, Pb, Zn) os quais podem contaminar o meio, sendo essa contaminação capaz de ser expandida para milhares de quilômetros de distância do ponto de origem.

O termo elemento-traço tem sido utilizado para descrever elementos em baixa concentração tanto em solos quanto em plantas. Alguns são considerados essenciais do ponto de vista biológico, inclusive, exercendo papel fundamental no metabolismo e desenvolvimento de plantas, enquanto outros não o são. Porém, mesmo os elementos essenciais podem se tornar tóxicos em outras condições. Para elementos que possuem a característica de causar danos, a redução da exposição é a única maneira efetiva de se diminuir o risco ambiental e à saúde humana.

A transferência de elementos-traço do solo para as plantas é parte de seu ciclo natural, bioquímico e sua concentração nos tecidos vegetais reflete a abundância no ambiente de crescimento destas, ou seja, solo, solução nutritiva ou água. Sendo assim, um dos requisitos básicos para o sucesso de qualquer técnica de recuperação/revegetação de áreas degradadas é encontrar plantas tolerantes aos contaminantes. Neste contexto, aplica-se a fitorremediação, técnica onde se utilizam plantas capazes de desenvolver diversas estratégias de sobrevivência, quer seja promovendo alterações morfológicas e anatômicas para suportar níveis fitotóxicos de elementos-traço em seus tecidos, quer seja por remover ou imobilizar os contaminantes do solo, tornando-os inofensivos ao meio ambiente. Neste sentido, além da identificação das espécies, especialmente a vegetação encontrada naturalmente em áreas contaminadas, é necessário um melhor conhecimento e entendimento dos mecanismos de absorção, transporte e acúmulo dos metais nas plantas, o que implica em melhor desempenho da técnica de fitorremediação.

Diante disso, para entender estes mecanismos de tolerância das plantas aos contaminantes, a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) têm evoluído na direção de dar não apenas informações ultraestruturais, ou seja, da estrutura detalhada de um espécime biológico como uma célula, tecido, ou órgão, mas também analíticas das amostras estudadas. Contando, ainda, com um detector de Espectroscopia de Energia Dispersiva com Raios-X (EDS) e, ou, de Microanálise de Raios-X, pode-se, além de gerar imagens, determinar a composição química do espécime em estudo, proporcionando a detecção de elementos-traço envolvidos na adaptação das espécies estudadas e encontradas em áreas de mineração. A Microanálise de Raios-X é uma técnica que tem permitido a análise qualitativa e quantitativa de amostras, permitindo mensurar quase todos os elementos de interesse fisiológico, celular e subcelular em plantas. Ou seja, pode-se, além de

detectar o elemento de interesse, determinar a sua localização na amostra estudada.

Diante desse conhecimento, destaca-se a importância de estudos para a identificação de espécies hiperacumuladoras que se adaptem às áreas contaminadas encontradas em regiões tropicais, assim como seus mecanismos fisiológicos e ultraestruturais relacionados à acumulação dos elementos-traço.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Elementos-traço em solos

Com o crescente desenvolvimento da agricultura, dos centros urbanos e das atividades industriais e de mineração, a produção de resíduos vem aumentando e pode vir a constituir fontes de contaminação ambiental, em razão da possível presença de elevadas concentrações de elementos químicos. Enfatiza-se, nesta gama, os elementos-traço, termo que, segundo Pierzynski, Sims e Vance (1994) e Sparks (1995), tem sido, preferivelmente, usado para definir metais catiônicos e aniônicos que, normalmente, estão presentes em baixas concentrações no ambiente, usualmente, menor que 1 g kg^{-1} .

Os elementos-traço são e, sempre, serão onipresentes em solos, sedimentos e sistemas aquáticos (GUILHERME et al., 2005). Os elementos-traço podem ser adicionados ao solo em virtude tanto de ações naturais quanto antropogênicas. As ações naturais compreendem o intemperismo de rochas e minerais, as emissões vulcânicas e outros a ações antropogênicas, os aterros sanitários, as atividades industriais e de mineração, as aplicações de corretivos, de fertilizantes e de pesticidas, entre outros. Sua concentração em solos antes da adição antropogênica é, geralmente, aceita como benigna, ou de pouco risco, porque o crescimento de plantas ou a qualidade da água não são afetados adversamente (CHANG et al., 1984). Entretanto, há locais onde, mesmo sem a adição de materiais contendo elementos-traço, sua concentração excede os limites admissíveis para solos em função de processos naturais de enriquecimento com elementos-traço ou de fatores de formação do solo. Nos locais onde esses níveis base de elementos-traço são altos e em situações onde

eles possam estar presentes em formas muito móveis no solo, podendo vir a ser biodisponíveis, o risco gerado pela presença desses elementos-traço se eleva (GUILHERME et al., 2005). O conteúdo total de elementos-traço em solos tem refletido a extensão da contaminação de atividades humanas e processos naturais de intemperismo de solos, mas o comportamento de elementos-traço depende de sua forma química ou iônica. Esta forma é, certamente, muito influenciada pelo pH, quantidade presente, solubilidade, origem – se pedogênica ou antropogênica – e sua interação com os coloides do solo em um ambiente dinâmico, como o solo. Adicionalmente, a disponibilidade destes elementos-traço pode ser afetada pelas reações mediadas biologicamente e redução/oxidação sequenciais ocorrendo no solo (SLAGLE, 2000).

A poluição do solo tem merecido atenção especial, nos últimos anos, por apresentar sérios riscos à saúde humana e à qualidade do ambiente (GUILHERME et al., 2005). Dentre as atividades que mais contribuem para a poluição do solo com esses agentes destacam-se a mineração e a indústria metalúrgica, principalmente, a de metais não ferrosos. Isso porque ao promoverem a extração de alguns metais, produzem grandes quantidades de rejeitos, muitas vezes com elevados teores de Ni, Cr, Cu, Pb, Cd e Zn.

As atividades de extração e beneficiamento de metais promovem uma contaminação constante do ambiente, levando à população que reside próximo à região, diferentes níveis de exposição aos elementos-traço. Diferentemente dos poluentes orgânicos, os elementos-traço não são degradados por meio de processos químicos ou biológicos. Essa característica leva à permanência desses elementos dentro do ecossistema, podendo ser eventualmente acumulados nos seres humanos, por meio da bioacumulação, durante a cadeia alimentar (PUERTAS-MEJÍA; RUIZ-DÍEZ; FERNÁNDEZ-PASCUAL, 2010).

Os solos possuem características únicas, quando comparados aos outros componentes da biosfera (ar, água e biota), pois se apresentam não apenas como

um dreno para contaminantes, mas também como um tampão natural que controla o transporte de elementos químicos e outras substâncias para a atmosfera, a hidrosfera e a biota (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

A ocupação e uso do solo podem alterar, sensivelmente, os processos biológicos, físicos e químicos dos sistemas naturais afetando, severamente, a vegetação (BAKER et al., 1994) e as atividades biológicas do solo, como respiração e decomposição, no local e em áreas adjacentes (VANGRONSVELD; COLPAERT; TICHELEN, 1997).

Os impactos negativos causados pelos elementos-traço Pb, Cd, Zn e outros aos solos têm despertado grande interesse do público, em virtude, principalmente, da contaminação de uma parcela significativa de populações vizinhas às fontes geradoras desse elemento (RAWLINS et al., 1997).

2.2 Fitorremediação

A contaminação dos solos por elementos-traço é um problema atual e exige abordagem adequada, tendo em vista as necessidades da sociedade moderna. Uma área é considerada contaminada quando as concentrações de elementos ou substâncias de interesse estiverem acima de dado limite. Sendo assim, atualmente, grandes esforços têm sido feitos visando à reabilitação de solos contaminados com elementos-traço. Os métodos correntes de remediação de solos incluem remoção, lavagem do solo e estabilização física. Todos esses métodos possuem como desvantagem o alto custo (TU; MA, 2002). Os métodos tradicionais de remediação de solos contaminados precisam ser substituídos por métodos com custos mais baixos e menos agressivos ao ambiente.

Nesse sentido, vários produtos têm sido testados como amenizantes da fitotoxidez de elementos-traço em plantas de modo a aumentar o potencial fitorremediador destas (KUMPIENE; LAGERKVIST; MAURICE, 2008).

Dentre os amenizantes mais estudados destacam-se: calcário (ACCIOLY et al., 2004; CUNHA et al., 2008), silicatos (ACCIOLY; SOARES; SIQUEIRA, 2008), fosfatos (GALINDO et al., 2005), compostos contendo óxidos de ferro (COSTA et al., 2008; GUILHERME; COSTA, 2007) e compostos orgânicos (SIMÃO, 1999). As diversas atividades que geram resíduos com potenciais de uso, como amenizantes de solo, precisam substituir os tradicionais métodos de descarte de rejeitos por outros mais inovadores, econômicos e, ambientalmente, favoráveis.

Porém, como primeiro passo, há a necessidade de se descobrirem espécies capazes de se adaptar às condições climáticas e ambientais dos solos contaminados, ou seja, aquelas capazes de absorver, por meio das suas raízes e translocar, para a parte aérea, teores considerados elevados destes contaminantes, fitorremediando estes ambientes.

A fitorremediação é uma técnica emergente para descontaminação ambiental (LINDBLOM et al., 2006; MEMON; SCHRODER, 2009), de baixo custo e que gera o mínimo de perturbação ao solo quando comparado com outras técnicas (HENRY, 2000). Consiste no uso de plantas e microbiota associada para remover, imobilizar ou tornar os contaminantes inofensivos ao ecossistema. Esta técnica apresenta inúmeras vantagens, dada a sua natureza permanente, combinada aos baixos custos de manutenção, à proteção contra a erosão eólica e hídrica, à melhoria na estrutura do solo, ao aumento da fertilidade do solo e a recuperação da estética das áreas contaminadas (RASKIN; ENSLEY, 2000).

A fitorremediação é estudada em vários países e a indústria mundial de fitorremediação já abrange dezenas de empresas. Um exemplo desse crescimento é o investimento dos Estados Unidos na remediação, da ordem de 7 a 8 bilhões de dólares ao ano, sendo 35% desse valor gastos com a remediação de metais (MEMON; SCHRODER, 2009).

Em virtude do custo relativamente baixo, a fitorremediação comporta-se como uma atrativa opção para a despoluição de solos com elementos-traço, principalmente, em países em desenvolvimento, onde financiamentos para recuperação ambiental são escassos (NASCIMENTO; XING, 2006). Accioly e Siqueira (2000) acreditam que a fitorremediação é uma prática promissora, com mercado garantido no país, se for considerada a existência de inúmeras e extensas áreas contaminadas, particularmente com elementos-traço.

A fitorremediação prevê vários mecanismos de despoluição e, para áreas contaminadas com elementos-traço, destacam-se a fitoestabilização e a fitoextração. A fitoestabilização visa reduzir o potencial de dano ao ambiente, pela redução da mobilidade e disponibilidade do contaminante no solo, sendo as plantas, neste caso, escolhidas por tolerar as condições da área, controlar a erosão e a lixiviação e evitar a translocação do contaminante para a parte aérea, evitando possíveis contaminações ao homem e ao meio ambiente (ZHAO; MCGRATH, 2009).

A fitoextração consiste na absorção e acumulação de elementos-traço na parte aérea de plantas (SANTOS; AMARAL SOBRINHO; MAZUR, 2006). O potencial de fitoextração depende da interação entre solo, metal, planta e microrganismos de solo (LASAT, 2002). A planta ideal para fitoextração de elementos-traço deve ser tolerante aos seus altos níveis, acumular grandes quantidades na parte aérea, ter alta taxa de crescimento, produzir grande biomassa e ter sistema radicular abundante (GARBUSU; ALKORTA, 2001; ZHAO; MCGRATH, 2009). A translocação do contaminante da raiz para a parte aérea facilita a retirada do contaminante e, no final do ciclo da planta, quando a parte aérea é colhida, estas poderão ser, posteriormente, dispostas em aterros sanitários ou recicladas para a recuperação do metal (CUNNINGHAM; OW, 1996).

Hiperacumulação de metais é um raro fenômeno em plantas superiores terrestres. Aproximadamente 400 espécies de plantas são identificadas como hiperacumuladoras de elementos-traço, representando menos de 0,2% de todas as angiospermas (BAKER; BROOKS, 1989; BAKER et al., 2000). No entanto, o desenvolvimento da tecnologia fitorremediadora só é possível uma vez que algumas espécies vegetais adquiriram, durante o seu processo evolutivo, a capacidade de tolerar ou, até mesmo, absorver e acumular elementos não essenciais, que não têm função biológica, ou metais essenciais que se encontram em concentrações de toxidez no ambiente (CLEMENS, 2006). A descoberta de plantas com capacidade de acumular grandes quantidades de metais (hiperacumuladoras) resultou em avanços no uso de plantas na remediação de solos contaminados (BAKER, 1981). Porém, a maioria das espécies estudadas é de clima temperado, sendo escassas as informações a respeito desta característica para espécies tropicais.

Para ser hiperacumuladora, a planta deve ter habilidade para absorver e reter na parte aérea (caule e folhas) as seguintes concentrações: $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd, $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Pb, Cu, Co, Cr ou Ni, ou $> 10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Zn ou Mn (BAKER; BROOKS, 1989; MARQUES; MOREIRA; SIQUEIRA, 2000; RASKIN; SMITH; SALT, 1997). Outros parâmetros capazes de auxiliar na definição de uma espécie como hiperacumuladora são o fator de acumulação (concentração do metal na parte aérea/concentração no solo) e o fator de translocação (concentração do metal na parte aérea/concentração na raiz). Quando esses parâmetros apresentam valores maiores que a unidade (1), há uma indicação da elevada taxa de absorção do elemento e sua preferência em se acumular na parte aérea (BAKER; WHITING, 2002; MCGRATH; ZHAO, 2003).

De acordo com Watanabe (1997), uma boa hiperacumuladora deve possuir características tais como, alta taxa de acumulação mesmo em baixas

concentrações do contaminante, alta taxa de crescimento e de produção de biomassa, resistência a pragas e doenças e tolerância ao contaminante.

Importante fonte potencial de espécies apropriadas para a fitorremediação é a vegetação encontrada, naturalmente, em áreas contaminadas, pois essas plantas apresentam-se adaptadas ao ambiente estressante (WATANABE, 1997). Um exemplo desta situação é o genótipo de planta encontrado em área de mineração de calamina (minério de Zn), primeira planta nativa hiperacumuladora, citada na literatura brasileira, como sendo de ecossistema tropical, identificada anteriormente como *Pfaffia* sp. E, atualmente, classificada como sendo do gênero *Gomphrena*, mostrou-se bem adaptada às condições de multicontaminação por Zn, Cu, Cd e Pb em relação a outras espécies estudadas (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002). Carneiro, Siqueira e Moreira (2002), em estudos com a espécie *Gomphrena* sp., constataram que as concentrações de Cd na parte aérea aumentaram linearmente com a contaminação, atingindo valores superiores a 100 mg kg^{-1} de Cd. A partir desse resultado, esses autores puderam indicar esta planta como hiperacumuladora de Cd, fato que até então não havia sido relatado na literatura com relação a este gênero de plantas. Entretanto, os mecanismos de tolerância desta espécie são desconhecidos. Santos (2008), também, identificou uma planta nativa, do cerrado brasileiro, capaz de absorver Cd e que se mostrou promissora para a absorção de outros tipos de elementos-traço. Trata-se da *Galianthe grandifolia* - Rubiaceae, uma herbácea da família do café, encontrada de forma abundante em áreas de cerrado do estado de São Paulo, mais precisamente na cidade de Itirapina.

A fitorremediação é praticada em vários países, mas, no Brasil, ainda não é explorada por desconhecimento do mercado, falta de capacitação técnica (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000) e pelo fato de serem as espécies de plantas hiperacumuladoras conhecidas, em sua maioria, de clima temperado (BAKER;

BROOKS, 1989). As plantas tolerantes são endêmicas de solos poluídos, o que sugere significativa adaptação ecofisiológica, manifestando resistência à contaminação do solo com elementos-traço (RASKIN et al., 1994). Em solos contaminados com diferentes metais, tem-se comprovado que as plantas podem apresentar uma tolerância múltipla e, ainda, pode-se observar co-tolerância (tolerância a um metal induzida por outro metal presente).

A complexidade do grau de resistência e os modelos de comportamento das plantas à toxicidade de metais atestam a diversidade de estratégias de proteção que as plantas desenvolveram (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1992). Diante da importância da fitoextração, como técnica remediadora para áreas contaminadas por elementos-traço, é fundamental o desenvolvimento de estudos que estabeleçam a capacidade da tolerância e do acúmulo de espécies de clima tropical, buscando o cultivo de hiperacumuladoras nas áreas contaminadas no Brasil.

2.3 Estudos com Microscopia Eletrônica

A resistência a elementos-traço pode ocorrer tanto por mecanismos que evitem a absorção dos metais e por meio da tolerância propriamente dita (CHOI et al., 2001; SHAW, 1989). Dentre estes mecanismos, pode-se ressaltar: i) exclusão seletiva de metais; ii) mudança na capacidade de absorção, onde pode ocorrer o impedimento na absorção em consequência da alteração da permeabilidade da membrana; iii) aumento da exsudação de substâncias quelantes que reduzem a fitodisponibilidade do metal para a planta; iv) restrição do transporte dos metais; v) retenção do metal na raiz e, ou nas vias de condução; vi) imobilização na parede celular; vii) associações com micorrizas; e, viii) mecanismos bioquímicos como alterações nas formas de compartimentalização do elemento-traço, imobilização do metal no vacúolo,

alteração no metabolismo celular e na produção intercelular de compostos ligantes com formação de compostos sequestrantes e inativadores de metais tóxicos (SHAW, 1989).

Um mecanismo de grande importância na tolerância é a alteração nos modelos de compartimentalização de metais em estruturas subcelulares, visto que íons metálicos em excesso são removidos do citossol (SANTOS; AMARAL SOBRINHO; MAZUR, 2006). No âmbito subcelular, algumas plantas usam o vacúolo como reservatório para acumulação de elementos-traço (SHAW, 1989). Além disso, a compartimentalização de metais no vacúolo tem um importante papel na desintoxicação, pois esse mecanismo previne a livre circulação de íons no citossol (SANITÁ DI TOPPI; GABBRIELLE, 1999).

Diante da importância da fitoextração como técnica remediadora para áreas contaminadas por elementos-traço (e.g., Zn, Cd e Pb), depreende-se, pois, da necessidade de estudos que relacionam os mecanismos de tolerância de espécies de clima tropical, com os aspectos fisiológicos, para que possam ser efetivamente cultivadas como fitoextratoras nas áreas contaminadas no Brasil. Logo, existe a necessidade de se testarem novas espécies, além de novos estudos para o entendimento das interações químicas dos elementos-traço tanto em solos como em espécies de climas tropicais de modo a maximizar a eficiência da fitoextração destes elementos.

Neste contexto, a moderna microscopia tem evoluído na direção de dar, não apenas, informações ultraestruturais, mas também analíticas das amostras estudadas. Basicamente, existem três tipos de microscopia: a Microscopia de Luz (ML), a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), sendo estas duas últimas de grande importância em pesquisas avançadas.

O Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) foi introduzido como instrumento de pesquisa, por volta de 1950 e sua utilização trouxe contribuições

marcantes ao conhecimento humano, ao mostrar detalhes jamais antes visualizados na área biológica e de ciência de materiais. Por exemplo, a biologia celular sofreu marcante revolução quando a ultraestrutura celular foi revelada em toda sua exuberância, não só mostrando detalhes de poucas organelas até então conhecidas como membrana plasmática, núcleo, nucléolo, cromossomos, cloroplasto, mitocôndria, centro celular e plasmodesma, mas também permitindo a descoberta de uma série de outros componentes como retículo endoplasmático, ribossomos, microtúbulos, microfilamentos, filamentos intermediários, lisossomo, peroxissoma, complexo juncional, junções comunicantes, glicocalix, dentre outros (ALVES; PERINA, 2012).

Praticamente na mesma época do desenvolvimento do MET foi também desenvolvido um protótipo do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). A introdução deste microscópio causou uma segunda revolução no estudo do mundo microscópico, em decorrência de suas características como a alta profundidade de campo, conferindo o aspecto tridimensional às imagens, à larga gama de aumento (10 a 1.000.000 de vezes), à rápida digitalização do sistema de captação de imagens, além das facilidades de operação e preparação da amostra, que tornaram este aparelho extremamente popular (ALVES; PERINA, 2012). Contando, ainda, com o sistema de Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X (EDS), Microanálise de Raios-X, é uma técnica que tem permitido a análise qualitativa e quantitativa de amostras, permitindo mensurar quase todos os elementos de interesse fisiológico, celular e subcelular em plantas (FREY, 2007).

Recentes estudos, mostrando diferentes mecanismos de desintoxicação celular, foram realizados utilizando a microscopia como ferramenta. Baruah, Hazarika e Sarma (2012), estudando a localização do Pb em uma espécie vegetal, *Eichhornia crassipes*, por meio de MEV e EDS, detectaram no interior das raízes, pecíolos e folhas o acúmulo deste elemento, indicando que esta

macrófita pode absorver e transportar Pb dentro das raízes, o que representa um importante mecanismo no acúmulo de elementos tóxicos. Faheed, Mazen e Elmohsen (2013) observaram, por meio de MET, algumas diferenças, em níveis de organização celular, entre idioblastos formadores de cristais e de não formadores de cristais sob diferentes tratamentos com elementos-traço. Lang e Wernitznig (2011) mostraram que a espécie *Pohlia drummondii*, como forma de tolerância ao Zn, acumulava o elemento, em excesso, na parede celular.

O uso da MET e MEV associadas ao EDS como ferramenta analítica é insuperável em relação à análise de amostras botânicas e de solo, pois permite combinar, simultaneamente, análise composicional e morfológica, ou seja, pode se detectar o elemento e determinar a localização deste na amostra. Porém, no Brasil, as aplicações de técnicas de MEV e EDS em estudos químicos e mineralógicos, ainda, são incipientes (FABRIS et al., 2009).

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, A. M. A. et al. Amenização do calcário na toxidez de zinco e cádmio para mudas de *Eucalyptus camaldulensis* cultivadas em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 775-783, 2004.
- ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v. 1, p. 299-352.
- ACCIOLY, A. M. A.; SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O. Silicato de cálcio como amenizante da toxidez de metais pesados no solo para mudas de eucalipto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 2, p. 180-188, fev. 2008.
- ALVES, E.; PERINA, F. J. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura e microanálises de raios-X**. Lavras: UFLA, 2012. 63 p. Apostila.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 3, n. 1/4, p. 643-654, 1981.
- BAKER, A. J. M.; BROOKS, R. R. Terrestrial higher plants with hyperaccumulate metallic elements: a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, Berkhamsted, v. 1, p. 81-126, 1989.
- BAKER, A. J. M. et al. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metalpolluted soils. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Ed.). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton: Lewis, 2000. p. 85-107.
- _____. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, n. 1/4, p. 41-49, June 1994.
- BAKER, A. J. M.; WHITING, S. N. In search of the holy grail: a further step in understanding metal hyperaccumulation? **New Phytologist**, Cambridge, v. 155, n. 1, p. 1-7, June 2002.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**, Madrid, v. 2, p. 345-361, 1992.

BARUAH, S.; HAZARIKA, K. K.; SARMA, K. P. Uptake and localization of Lead in *Eichhornia crassipes* grown within a hydroponic system. **Advances in Applied Science Research**, Tokyo, v. 3, n. 1, p. 51-59, 2012.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1629-1638, nov. 2002.

CHANG, A. C. et al. Accumulation of heavy metals in sewage sludge-treated soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 13, n. 1, p. 87-91, 1984.

CHOI, Y. E. et al. Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 1, p. 45-50, May 2001.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, p. 1707-1719, July 2006.

COSTA, E. T. S. et al. Caracterização de subproduto da indústria de alumínio e seu uso na retenção de cádmio e chumbo em sistemas monoelementares. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 868-874, 2008.

CUNHA, K. P. V. et al. Cellular localization of cadmium and structural changes in maize plants grown on a Cd contaminated soil with and without liming. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 160, n. 1, p. 228-234, Dec. 2008.

CUNNINGHAM, S. D.; OW, D. W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 110, n. 3, p. 715-719, Mar. 1996.

FABRIS, J. D. et al. Métodos físicos de análises em mineralogia do solo. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (Ed.). **Química e mineralogia do solo: parte I, conceitos básicos**. Viçosa, MG: SBCS, 2009. p. 611-695.

FAHEED, F.; MAZEN, A.; ELMOHSEN, S. A. B. D. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. **Turkish Journal of Botany**, Sohag, v. 37, n. 1, p. 139-152, 2013.

FREY, B. Botanical X-ray microanalysis in cryoscanning electron microscopy. In: KUO, J. (Ed.). **Electron microscopy: methods and protocols**. New York: Humana, 2007. p. 529-541.

GALINDO, I. C. L. et al. Fertilizantes fosfatados e orgânicos e seus efeitos na imobilização de chumbo em solo contaminado. **Caatinga**, Mossoró, v. 18, n. 1, p. 58-65, 2005.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 229-236, May 2001.

GUILHERME, L. R. G.; COSTA, E. T. S. **Subproduto da indústria de alumínio como amenizante de áreas contaminadas com elementos-traço**. BR n. PI 014070009185, 20 dez. 2007.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos de ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. v. 4, p. 345-390.

HENRY, J. R. **An overview of the phytoremediation of lead and mercury**. Washington: USEPA, 2000. 51 p. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsarp/i/fulltext/over/over.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 413 p.

KUMPIENE, J.; LAGERKVIST, A.; MAURICE, C. Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments: a review. **Waste Management**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 215-225, 2008.

LANG, I.; WERNITZNIG, S. Sequestration at the cell wall and plasma membrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 74, p. 186-193, Dec. 2011.

LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 109-120, Jan./Feb. 2002.

LINDBLOM, S. D. et al. Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 3, p. 726-733, Apr. 2006.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 121-132, jan. 2000.

MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 3, p. 277-282, June 2003.

MEMON, A. R.; SCHODER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environment Science Polluted**, New York, v. 16, p. 162-175, Dec. 2009.

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Science Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 299-311, May/June 2006.

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis, 1994. 313 p.

PUERTAS-MEJÍA, M. A.; RUIZ-DÍEZ, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Effect of cadmium ion excess over cell structure and functioning of *Zea mays* and *Hordeum vulgare*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 285-291, June 2010.

RASKIN, I. et al. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 5, n. 3, p. 285-290, June 1994.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. **Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environmental**. New York: J. Wiley, 2000. 304 p.

RASKIN, I.; SMITH, R. D.; SALT, D. E. Phytoremediation of metals using plants to remove pollutants from the environment. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 8, n. 2, p. 221-226, Apr. 1997.

RAWLINS, B. G. et al. **Preliminary investigation of mining-related arsenic contamination in the provinces of Mendoza and San Juan (Argentina) and Minas Gerais (Brazil)**. Nottingham: British Geology Survey, 1997. 27 p. (Technical Report WC, 60).

SANITÁ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 2, p. 105-130, 1999.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 419-432.

SANTOS, R. C. Planta do cerrado absorve metal nocivo ao meio ambiente. **Jornal da UNICAMP**, Campinas, v. 23, n. 409, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/node/152>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

SHAW, A. J. **Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects**. New York: CRC, 1989. 355 p.

SIMÃO, J. B. P. **Mitigação da fitotoxicidade de metais pesados no solo, através do uso de materiais orgânicos e inorgânicos**. 1999. 135 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

SLAGLE, A. **Background concentrations of trace elements in three West Virginia soils: MLRA-126**. 2000. 174 p. Dissertation (Master in Agriculture) - West Virginia University, Morgantown, 2000.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic, 1995. 267 p.

TU, C.; MA, L. Q. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 2, p. 641-647, Mar./Apr. 2002.

VANGRONSVELD, J.; COLPAERT, J. V.; TICHELEN, K. K. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physicochemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 131-140, 1997.

WATANABE, M. E. Phytoremediation on the brink of commercialization. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 31, n. 4, p. 182A-186A, 1997.

ZHAO, F.; MCGRATH, S. P. Biofortification and phytoremediation. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 373-380, June 2009.

CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DE TOLERÂNCIA A ELEMENTOS-TRAÇO EM ESPÉCIES DE PLANTAS NATIVAS DE SOLOS CONTAMINADOS EM UMA ÁREA DE MINERAÇÃO DE ZINCO

RESUMO

A poluição do solo com elementos-traço, pela intensificação das atividades industriais, agrícolas e urbanização, é um problema crescente e responsável por diversos impactos ambientais. Dentre estas atividades, a que mais contribui para a poluição do solo com esses agentes, em se tratando de intensidade de efeitos, é a mineração. A fitorremediação possui mecanismos promissores para remediar áreas contaminadas por essas atividades. O primeiro passo para implementação dessa técnica é o estudo de espécies com potencial fitoestabilizador ou fitoextrator dos metais presentes na área. Objetivou-se neste trabalho determinar as concentrações de Cd, Pb e Zn, em espécies desenvolvidas, naturalmente, em áreas contaminadas, visando estudar a viabilidade de se utilizar estas espécies em programas de fitorremediação. Foram selecionadas seis áreas para coleta de plantas e solos em uma área de mineração de zinco no município de Vazante, MG. As amostras coletadas de três espécies vegetais, *Gomphrena claussenii* Moq., *Andropogon* sp. e *Pteris* sp., assim como amostras de solo, foram analisadas quanto à concentração total de Zn, Cd e Pb. As concentrações totais de Zn, Cd e Pb dos solos variaram de 896 a 77665, 4,3 a 228,4 e 202 a 3586 mg kg⁻¹, respectivamente. Os resultados das análises das plantas indicam que níveis hiperacumuladores (mg kg⁻¹) foram obtidos para as espécies *Gomphrena claussenii* Moq. ([Zn] = 10434; [Cd] ~ 100) e *Pteris* sp. ([Zn] = 10809; [Pb] ~ 1000). Considerando a concentração de elementos-traço e nos fatores de bioacumulação e translocação (FB e FT ≥ 1), as espécies *Gomphrena claussenii* Moq. e *Pteris* sp. são promissoras na remediação de solos contaminados por Zn, Cd e Pb. A espécie *Andropogon* sp., embora não tenha sido descrita como hiperacumuladora ([Zn, Cd e Pb] < 10000, 100 e 1000, respectivamente), pode ser considerada uma espécie tolerante a estes elementos tóxicos (FB ≥ 1) e uma importante aliada na revegetação de áreas degradadas.

Palavras-chave: Elementos tóxicos. Contaminação do solo. Fitorremediação. Espécies hiperacumuladoras.

ABSTRACT

Soil pollution with trace-elements by the intensification of the industrial, agricultural activities and urbanization, is a growing problem and responsible for a number of environmental impacts. From among these activities, the one which contributes the most to the soil pollution with those agents, as far as the intensity of the effects is concerned, is mining. Phytoremediation possesses promising mechanisms to remedy areas contaminated by those activities. The first step to the implementation of that technique is the study of species with potential phytostabilizing or phytoextracting of the metals present in the area. The objective of this work was determining the concentrations of Cd, Pb and Zn in species developed naturally in contaminated areas aiming to study the viability of utilizing these species in phytoremediation programs. Six areas were selected for collection of plants and soils in a Zn-mining area in the municipality of Vazante, MG. The samples collected from three plant species *Gomphrena claussenii* Moq., *Andropogon* sp. and *Pteris* sp. as well as the soil samples were analyzed as to the total concentration of Zn, Cd and Pb. The total concentrations of Zn, Cd and Pb of the soils ranged from 896 to 77665, 4.4 to 228.4 and 202 to 3586 mg kg⁻¹, respectively. The results of the analyses of the plants point out hyperaccumulating levels (mg kg⁻¹) were obtained for the species *Gomphrena claussenii* Moq. ([Zn] = 10434; [Cd] ~ 100 and *Pteris* sp. ([Zn] = 1089; [Pb] ~ 1000). Based upon the concentration of trace-element and on the bioaccumulation and translocation factors (BF and TF > 1), the species *Gomphrena claussenii* Moq. and *Pteris* sp. are promising in the remediation of soils contaminated by Zn, Cd and Pb. The species *Andropogon* sp., although has not been reported as a hyperaccumulator ([Zn, Cd and Pb] < 10000, 1000 and 1000, respectively), may be considered a species tolerant to these toxic elements (BF > 1) and an important ally in the revegetation of degraded areas.

Key words: Toxic elements. Soil contamination. Phytoremediation. Hyperaccumulating species.

1 INTRODUÇÃO

A poluição do solo com elementos-traço, pela intensificação das atividades industriais, agrícolas e urbanização, é um problema ambiental crescente (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Uma das atividades que mais contribuem para a poluição do solo com esses agentes é a mineração, que ao promover a extração de alguns metais, produz grandes quantidades de rejeitos, muitas vezes com elevados teores de Ni, Cr, Cu, Pb, Cd e Zn, que agridem, severamente, a vegetação (BAKER et al., 1994) e as atividades biológicas do solo, como respiração e decomposição, no local e em áreas adjacentes (VANGRONSVELD; COLPAERT; TICHELEN, 1997), dificultando e, muitas vezes, impedindo seu desenvolvimento.

Os elementos-traço são, atualmente, um problema de grande interesse ambiental. Pelo fato de poderem se acumular na cadeia alimentar, seu excesso pode ser prejudicial aos organismos vivos. Além disso, os problemas causados por alguns destes elementos-traço à saúde humana e à dos animais é agravado pela sua longa persistência no meio ambiente.

Várias são as tecnologias utilizadas para a descontaminação ambiental em ecossistemas afetados por excesso de elementos-traço. No entanto, muitas destas tecnologias são de elevado custo (TU; MA, 2002) ou não alcançam a longo tempo resultados satisfatórios, além de agredir severamente o ambiente. Neste sentido, os métodos tradicionais de remediação de solo contaminado precisam ser substituídos por métodos com custos mais baixos e menos agressivos ao meio ambiente. A fitorremediação é uma técnica emergente para descontaminação ambiental (LINDBLOM et al., 2006; MA et al., 2001), de baixo custo e que gera o mínimo de perturbação ao solo quando comparado com outras técnicas (HENRY, 2000). Esta técnica apresenta inúmeras vantagens, dada a sua natureza permanente, combinada aos baixos custos de manutenção, à

proteção contra a erosão eólica e hídrica, à melhoria na estrutura do solo, ao aumento da fertilidade do solo e à recuperação da estética das áreas contaminadas (RASKIN; ENSLEY, 2000).

Várias espécies de plantas são conhecidas como hiperacumuladoras de elementos-traço, por serem capazes de acumular alta concentração de elementos-traço em sua biomassa. Hiperacumuladoras são definidas como plantas capazes de acumular $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd, $> 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Pb, Cu, Co, Cr ou Ni, ou $> 10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Zn ou Mn (BAKER; BROOKS, 1989; MARQUES; MOREIRA; SIQUEIRA, 2000; RASKIN; SMITH; SALT, 1997). Várias espécies já foram descritas como hiperacumuladoras, tais como, para Zn, *Thlaspi caerulescens* (REEVES; BROOKS, 1983) e *Pteris vittata* (MA et al., 2001), para Pb, *Sedum alfredii* (DENG et al., 2008), *Sesbania drummondii* (SHARMA et al., 2004) e *Piptathertan miliacetall* (GARCIA; FAZ; CUNHA, 2004), e, para Cd, *Arabidopsis hallerii* (KUPPER et al., 2000), *Tamarix smyrnensis* (MANOUSAKI et al., 2008), *Brassica napus* (SELVAM; WONG, 2008) e *Rarippa globosa* (SUN; JIN; ZHOU, 2010), dentre outras.

O uso de espécies nativas em programas de fitorremediação é de suma importância, visto que estas plantas apresentam melhores condições, em termos de sobrevivência, desenvolvimento e reprodução sob o *stress* desses ambientes quando comparadas a espécies introduzidas de outros ambientes (YOON et al., 2006). Por outro lado, ao mesmo tempo em que se faz necessário uma busca por espécies nativas tolerantes a elementos-traço, os estudos com estas espécies devem ser desenvolvidos com intuito de avaliar o seu potencial hiperacumulador sob condições de campo (MCGRATH; ZHAO, 2003; YOON et al., 2006).

Os elementos-traço causam severa fitotoxidez em plantas não adaptadas aos ambientes contaminados, sendo, principalmente, um dos fatores responsáveis pela evolução das populações de espécies tolerantes encontradas nestas áreas (YOON et al., 2006). Deste modo, torna-se possível a identificação

de grupos de espécies nativas adaptadas aos ambientes altamente contaminados com diferentes elementos-traço e promissoras na recuperação de áreas degradadas.

Objetivou-se neste trabalho determinar as concentrações de Cd, Pb e Zn em espécies desenvolvidas, naturalmente, em áreas contaminadas, assim como observar a relação dos teores acumulados na raiz e parte aérea visando estudar a viabilidade de se utilizar estas espécies em programas de fitorremediação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição do local de estudo

O local onde as espécies e as amostras de solo foram coletadas localiza-se no entorno e dentro de uma cava de mineração, doravante denominada de Cava 3A, a qual se encontra localizada numa área de mineração de zinco, Mina Extremo Norte/Votorantim Metais, na cidade de Vazante, no noroeste de Minas Gerais (Figuras 1 e 2). O clima é considerado tropical semiúmido e a média de temperatura anual varia de 21° a 24°C, sendo, nos meses mais quentes, de 21° a 26°C e, nos meses mais frios, de 17° a 22°C. A umidade relativa, no verão, oscila entre 75% e 80% e, no inverno, entre 50% e 60%.



Figura 1 Mapa de Minas Gerais, com destaque para a região onde se encontra o Município de Vazante



Figura 2 Localização da área de estudo, Programa de Recuperação de Área Degradada (PRAD), Cava 3A. *VM - Votorantim Metais

2.2 Coleta das amostras

Considerando os resultados das análises efetuadas em 20 amostras de solos coletadas no entorno e dentro da cava 3A, foram selecionadas seis áreas representativas para uma nova coleta visando à continuidade dos estudos envolvendo a recuperação de áreas degradadas (Figura 3). Ressalta-se que essas seis áreas foram escolhidas pelo fato de, segundo resultados prévios, apresentarem os principais atributos que possam vir a limitar o desenvolvimento de plantas. As coletas foram realizadas em dezembro de 2011.

As amostras de solo foram coletadas, com o auxílio de enxadão e identificadas conforme se observa na Tabela 1.

Tabela 1 Identificações das amostras coletadas no entorno e dentro da cava 3ª, Vazante, MG

Amostra	Identificação	Latitude	Altitude
P1	Área de referência no topo da mata	17°55'56"S	46°49'16"W
P7	Ponto inferior dentro da cava 3A próxima ao beneficiamento	17°55'23"S	46°48'57"W
P9	Ponto inferior no meio da cava 3A	17°55'43"S	46°49'15"W
P12	Ponto superior dentro da cava 3A a leste	17°55'27"S	46°48'58"W
P17	Barranco vermelho do talude dentro da cava 3A a oeste	17°55'41"S	46°49'14"W
P18	Área de depósito em torno do beneficiamento	17°55'15"S	46°48'45"W

Três espécies foram selecionadas, coletadas e identificadas como A1, A2 e A3 (Figura 4). Vale ressaltar que as coletas foram realizadas em março e setembro de 2012. As amostras foram coletadas com o auxílio de enxadão onde se tomou o cuidado de manter o torrão de solo visando à manutenção do sistema radicular. A coleta destas três espécies se justifica pela ampla distribuição das mesmas na área e, mais especificamente, nos pontos coletados.

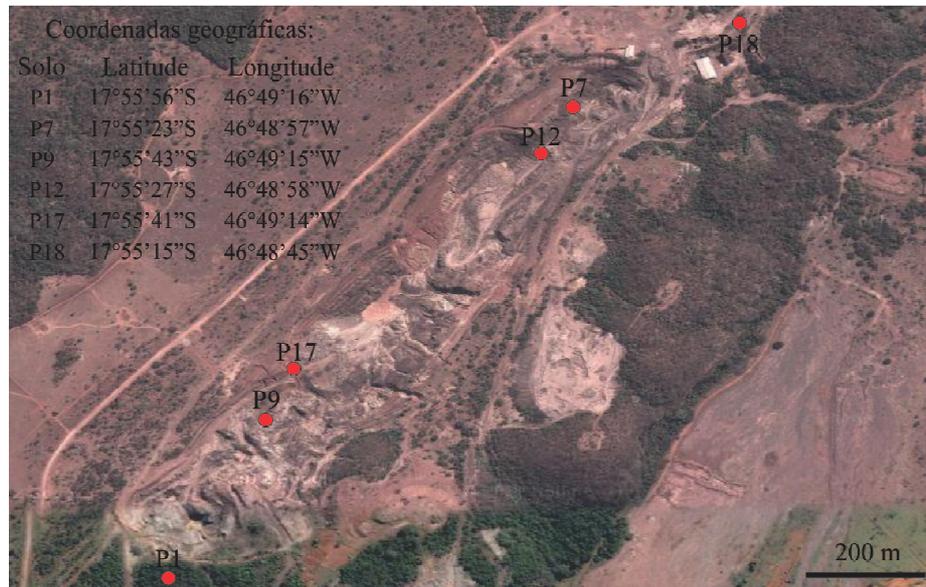


Figura 3 Locais de coleta de solos e plantas, Cava 3A, Vazante - MG



Figura 4 Detalhes das espécies coletadas nos diferentes pontos selecionados, Vazante - MG

2.3 Identificações das espécies

Exsicatas das diferentes espécies foram comparadas com exemplares existentes no Herbário Esal - UFLA, pelo especialista Daniel Quedes Domingos, da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As espécies não identificadas foram, então, encaminhadas, em diferentes estágios (flores e frutos), juntamente com fotografias do material em campo, para a Professora Ana Paula Santos Gonçalves, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa (UFV), para conclusão da identificação do material.

2.4 Procedimentos analíticos empregados nas amostras de solos e plantas

2.4.1 Caracterização físico-química dos solos

Como caracterização física, foi realizada uma análise granulométrica, conforme metodologia proposta por Bouyoucos (1927), modificado, visando avaliar a distribuição dos tamanhos de partículas das cinco amostras coletadas. Por outro lado, para a caracterização dos atributos químicos dos solos foram, também, analisados os seguintes atributos: pH em água (relação 1: 2,5); P-rem (fósforo remanescente); P (fósforo), K (potássio) – extrator Mehlich-1; Ca (cálcio), Mg (magnésio), Al (alumínio) – extrator KCl 1 mol L⁻¹; H + Al (hidrogênio + alumínio) – extrator SMP; SB (soma de bases trocáveis); t (capacidade de troca catiônica efetiva); T (capacidade de troca catiônica a pH 7,0); V (índice de saturação de bases); m (índice de saturação de alumínio). Tais atributos foram feitos conforme metodologia proposta pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (1997). As análises foram conduzidas

nos Laboratórios de Física e de Fertilidade do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

2.4.2 Concentração total de metais no solo – USEPA 3051A

O solo coletado foi encaminhado ao Laboratório de Geoquímica, Departamento de Ciência do Solo, na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Os teores de Cd, Pb e Zn totais foram obtidos por digestão, de acordo com o método 3051 A, da United States Environmental Protection Agency - USEPA (1998). As amostras foram maceradas em moinho de ágata e passadas por meio de peneira de náilon de 150 μm de abertura. Efetuou-se a digestão das amostras em forno de micro-ondas MARS-5. Para isso, adicionaram-se 0,5 g de material sólido (triplicata) e 5 mL de HNO_3 concentrados em tubos de teflon[®], os quais foram hermeticamente fechados para o início do procedimento. Após a digestão, o extrato foi filtrado em filtro tipo Whatman n^o 40, juntamente com 5 mL de água bidestilada. Posteriormente, os teores de Cd, Pb e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800[®] com atomizador tipo chama. O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd, Pb e Zn foram assegurados pelo uso de material de referência BCR-142R (*Light Sandy Soil*), em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 74% a 120%.

2.4.3 Concentração de metais extraídos do solo – Mehlich 1

Em erlenmeyers de 125 mL, colocaram-se 10 gramas de terra fina seca ao ar (fração < 2 mm) e 100 mL da solução extratora Mehlich-1 (0,05 mol L⁻¹ HCl + 0,0125 mol L⁻¹ H₂SO₄). A solução foi agitada, por 5 minutos, em mesa agitadora (150 rpm) e, em seguida, filtrada por meio de papel filtro Whatman n^o

42. Os extratos filtrados foram preservados sob refrigeração (4°C), até serem analisados conforme procedimento descrito anteriormente.

2.4.4 Análise dos teores de elementos-traço na planta

Após a coleta, as plantas foram colhidas em parte aérea (folha e caule) e raiz e, em seguida, levadas ao Laboratório de Geoquímica, Departamento de Ciência do Solo (DCS), da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, para análises.

A parte aérea foi lavada em água deionizada e as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico 10% (v/v) por um minuto e, em seguida, enxaguadas em água deionizada. A seguir, ambas as partes foram secas em estufa em temperatura entre 65° e 75°C, até atingir massa constante. A massa da matéria seca foi determinada em balança de precisão (0,01 g) e, em seguida, a matéria seca foi moída em moinho tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm, para ser analisada quimicamente.

O material moído foi digerido, segundo o método 3051 da USEPA (1998), utilizando-se de 0,5 g de material em 5 mL de HNO₃ concentrado, em forno de micro-ondas, com tubos de Teflon® PTFE, à pressão 0,76 MPa, por dez minutos. A temperatura alcançada à pressão de 0,76 MPa é de, aproximadamente, 175°C. Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado até 10 mL com água destilada. A partir dos extratos, foram determinados os teores de cádmio, chumbo e zinco por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800® com atomizador tipo chama.

O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd, Pb e Zn foram assegurados pelo uso de material de referência BCR-482 Lichen, proveniente do Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM), em cada bateria de análise, bem como de uma amostra

em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 80% a 98% para Cd, de 73% a 81% para Pb e de 74% a 89% para Zn.

2.4.5 Fatores de Bioacumulação e Translocação em plantas

As habilidades de absorção e translocação de Cd, Pb e Zn pelas plantas foram mensuradas por meio dos fatores de Bioacumulação (FB) e de Translocação (FT), que são definidos como a concentração do elemento na planta em relação à concentração do elemento no solo (CAILLE; ZHAO; MCGRATH, 2005) e a quantidade do elemento na parte aérea em relação à quantidade total do elemento na raiz (ZU et al., 2005), respectivamente. O FB e o FT são calculados de acordo com a seguinte fórmula (YOON et al., 2006):

$$FB = \frac{C_{pa}}{C_s}$$

$$IT = \frac{C_{pa}}{C_r}$$

em que C_s , C_r e C_{pa} são as concentrações médias dos elementos-traço no solo, raiz e parte aérea, respectivamente.

2.5 Análises estatísticas

Os resultados das concentrações de Cd, Pb e Zn no solo e na planta foram submetidos à análise de variância, por meio do uso do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características físico-químicas dos solos

As propriedades físicas dos solos de todos os locais de amostragem estão representadas na Tabelas 2. Houve ampla variação nos atributos físicos dos solos, sendo classificados de acordo com diagrama textural, proposto por Medina (1975) como Franco, solos P1, P7 e P12, Argiloso, solos P9 e P17, e Franco Arenoso o solo P18.

Tabela 2 Distribuição do tamanho de partículas (areia, silte e argila) das amostras e suas respectivas classes texturais

Amostras	Frações (g kg ⁻¹)			Classe Textural ^(*)
	Areia	Silte	Argila	
P1	305	440	255	Franco
P7	425	430	145	Franco
P9	250	225	525	Argiloso
P12	380	495	125	Franco
P17	145	295	560	Argiloso
P18	580	315	105	Franco Arenoso

^(*) Classes texturais determinadas de acordo com diagrama textural proposto por Medina (1975)

As propriedades químicas dos solos estudados estão representadas na Tabela 3. O pH dos solos variou de 5,6 a 7,6 e, dentre os seis locais escolhidos, quatro apresentaram um pH > 7,0, o que se configura como importante parâmetro para restringir a biodisponibilidade dos elementos-traço estudados. A capacidade de troca catiônica (t) foi considerada baixa nesses solos, com variação de 2,0 a 4,9 cmol_c dm⁻³, exceto para o solo P1, onde o valor encontrado foi de 15,4 cmol_c dm⁻³. As concentrações de P disponível, de uma forma geral,

foram baixas, sendo, significativamente, diferentes entre os solos. As concentrações de K disponíveis nas amostras de solo P7, P9, P12, P17 e P18 foram semelhantes, mas, significativamente, diferente do solo P1. Os teores de Ca e Mg disponíveis foram considerados médios para a maioria dos solos. Dentre os solos analisados, dois apresentaram uma diferença significativa dos atributos químicos; o solo P1, como já esperado, por se tratar de uma área de referência no topo da mata, com menor contaminação, e o solo P7, apresentando uma deficiência geral nos atributos estudados, diferindo dos demais solos coletados na cava 3A.

Tabela 3 Atributos químicos das amostras coletadas em uma área de mineração de zinco no município de Vazante, MG

Amostra	Atributos Químicos ^(*)												
	pH H ₂ O	P-rem	P	K	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H+Al	SB	t	T	V	m
	mg L ⁻¹		-- mg dm ⁻³ --		----- cmol _c dm ⁻³ -----							%	%
P1	5,6	27,3	10	226	10,4	4,4	0	6,3	15,4	15,4	21,7	71	0
P7	7,4	23,6	44	28	2,6	1,7	0	0,9	4,4	4,4	5,2	84	0
P9	7,6	12,1	8	27	2,0	1,8	0	1,2	3,9	3,9	5,1	77	0
P12	7,4	18,8	52	20	3,2	1,7	0	0,8	4,9	4,9	5,7	87	0
P17	5,9	5,9	4	15	0,9	0,7	0,4	2,2	1,6	2,0	3,8	43	18
P18	7,3	6,4	5	37	2,6	1,2	0	0,8	3,8	3,8	4,6	83	0

^(*) Atributos químicos: pH – pH em água (relação 1: 2,5); P-rem (fósforo remanescente); P (fósforo), K (potássio), Na (sódio) – extrator Mehlich 1 (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹); Ca (cálcio), Mg (magnésio), Al (alumínio) – extrator KCl 1 mol L⁻¹; H + Al (hidrogênio + alumínio) – extrator SMP; SB (soma de bases trocáveis); t (capacidade de troca catiônica efetiva); T (capacidade de troca catiônica a pH 7,0); V (índice de saturação de bases); m (índice de saturação de alumínio) (EMBRAPA, 1997)

3.2 Concentração de elementos-traço nos solos

A concentração dos elementos-traço, tanto os teores totais quanto os disponíveis, podem ser observados na Tabela 4. Zinco, Cd e Pb, potencialmente tóxicos, foram encontrados em todos os solos, ressaltando que, para o solo P1,

amostra usada como referência, estes teores foram menores. A grande concentração destes elementos está diretamente relacionada ao uso desta área pela atividade mineradora.

A concentração total de elementos-traço nos solos foi altamente variável, decrescendo do solo P18 para o solo P1, na seguinte ordem P18 > P7 > P12 > P9 > P17 > P1. As maiores concentrações totais de elementos-traço, de uma maneira geral, foram encontrados no solo P18, sendo, para Zn 77665 mg kg⁻¹, Cd 228,38 mg kg⁻¹ e Pb 3223 mg kg⁻¹. Para os teores de elementos-traço disponíveis houve, também, grande variação nos solos estudados, decrescendo, também, do solo P18 para o solo P1, na mesma ordem anterior, sendo os maiores valores para Zn e Cd no P18, 10681 mg kg⁻¹ e 160,99 mg kg⁻¹, respectivamente, e para o Pb no solo P17, 123,42 mg kg⁻¹. Nestes casos, representando 14%, 71% e 7% disponível para as plantas de Zn, Cd e Pb, respectivamente.

Tabela 4 Concentração total e fitodisponível de elementos-traço nos solos

Elementos traço (mg kg ⁻¹)	Solos					
	P1	P7	P9	P12	P17	P18
	Total					
Zinco	1446 a	23315 c	1069 a	15514 b	896 a	77665 d
Cádmio	5,05 a	147,40 c	4,48 a	92,44 b	4,33 a	228,38 d
Chumbo	202 a	1777 b	3586 d	3208 c	1883 b	3223 c
	Disponível (%)					
Zinco	567 b (39)	4204 d (18)	421 b (39)	1758 c (11)	143 a (16)	10681 e (14)
Cádmio	2,86 a (57)	50,37 b (34)	4,03 a (89)	57,65 c (62)	1,54 a (35)	160,99 d (71)
Chumbo	18,77 b (9)	55,94 d (3)	107,33 e (3)	3,87 a (0,1)	123,42 f (7)	49,03 c (1,5)

*Valores médios seguidos pela mesma letra na linha não são, significativamente, diferentes de acordo com o teste de Scott-Knott (p<0.05)

Segundo valores calculados considerando em risco à saúde humana, de acordo com o escopo da Resolução Conama (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2009), para uma área industrial, os valores de investigação (VI), ou seja, concentração de determinada substância no solo ou na água subterrânea, acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, considerando um cenário de exposição padronizado, para Cd, Pb e Zn são 20 mg kg^{-1} , 900 mg kg^{-1} e 2000 mg kg^{-1} , respectivamente. Nos solos analisados, para Cd, P7, P12 e P18, para Pb, P7, P9, P12, P17 e P18, e para Zn, P7, P12 e P18, estão todos acima dos limites permitidos, sendo os solos P7, P12 e P18 apresentando os maiores riscos por estarem acima do limite estabelecido para todos os elementos. Por outro lado, esta mesma resolução estabelece um Valor de Prevenção (VP), que é a concentração de valor limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais, como desenvolvimento de espécies da flora e fauna. Os VP estabelecidos para Cd, Pb e Zn são $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$, 72 mg kg^{-1} e 300 mg kg^{-1} , respectivamente. Analisando os resultados do presente estudo, observou-se, no entanto que, de acordo com este VP, todos os solos analisados estão acima do limite estabelecido, principalmente, no que diz respeito ao desenvolvimento de espécies vegetais. As espécies que se desenvolveram nos locais de amostragem foram expostas a grandes concentrações destes elementos, i.e. para Cd = 228 mg kg^{-1} , Pb = 3586 mg kg^{-1} e Zn = 77665 mg kg^{-1} , sendo em muitos casos com elevada disponibilidade destes elementos para as plantas, como no caso do Cd chegando a estar disponível até 71% do total encontrado.

3.3 Identificação das espécies

As exsiccatas das plantas encaminhadas para os especialistas foram classificadas como espécie A1, pertencente à família Amaranthacea, gênero

Gomphrena, espécie *Gomphrena claussenii* Moq., espécie A2, pertencente à família Poaceae, gênero *Andropogon*, espécie, ainda, em identificação, e, espécie A3, pertencente à família Pteridaceae, gênero *Pteris* e espécie, ainda, em identificação (Tabela 5).

Tabela 5 Identificações das espécies coletadas

<i>Amostra</i>	<i>Identificação</i>
A1	<i>Gomphrena claussenii</i> Moq.
A2	<i>Andropogon sp.</i>
A3	<i>Pteris sp.</i>

3.4 Concentração de metais em plantas

Não houve diferença significativa na concentração de elementos-traço em plantas coletadas em dezembro e julho de 2012 (teste de Scott-Knott 5%), portanto, os resultados aqui apresentados são baseados nos dados combinados. Ha et al. (2011), avaliando o potencial fitorremediador de 10 espécies desenvolvidas naturalmente em área de mineração de Pb e Zn no Vietnã do Norte, em duas diferentes épocas de coleta, março e novembro de 2009, não observou diferença estatística quanto à época de coleta.

Os teores de elementos-traço variaram de espécie para espécie. Todas as espécies, de uma maneira geral, apresentaram maior teor de Cd, Pb e Zn na raiz, comparativamente à parte aérea, característica encontrada na maioria das espécies tolerantes e acumuladoras desses metais (BROWN et al., 1995; PUERTAS-MEJÍA; RUIZ-DÍEZ; FERNÁNDEZ-PASCUAL, 2010; YOON et al., 2006). Entretanto, de acordo com Franco-Hernández et al. (2010), algumas espécies podem apresentar maiores concentrações na parte aérea, dependendo das condições às quais elas são submetidas.

Os resultados das concentrações dos elementos-traço para *Gomphrena claussenii* Moq., *Andropogon sp.* e *Pteris sp.* apresentaram grande variabilidade.

Para *Andropogon sp.*, as concentrações variaram na raiz e na parte aérea, respectivamente (Figura 1):

- para Zn, 350 a 5306 mg kg⁻¹ e 215 a 6801 mg kg⁻¹,
- para Pb, 122 a 2403 mg kg⁻¹ e 65 a 748 mg kg⁻¹,
- para Cd, 3 a 40 mg kg⁻¹ e 3 a 28 mg kg⁻¹.

Para *Pteris sp.*, as concentrações variaram na raiz e na parte aérea, respectivamente (Figura 2):

- para Zn, 326 a 13994 mg kg⁻¹ e 328 a 10809 mg kg⁻¹,
- para Pb, 129 a 1619 mg kg⁻¹ e 42 a 943 mg kg⁻¹,
- para Cd, 5 a 124 mg kg⁻¹ e 4 a 74 mg kg⁻¹.

Para *Gomphrena claussenii* Moq., as concentrações variaram na raiz e na parte aérea, respectivamente (Figura 3):

- para Zn, 980 a 5559 mg kg⁻¹ e 230 a 10434 mg kg⁻¹,
- para Pb, 230 a 661 mg kg⁻¹ e 32 a 580 mg kg⁻¹,
- para Cd, 10 a 94 mg kg⁻¹ e 6 a 96 mg kg⁻¹.

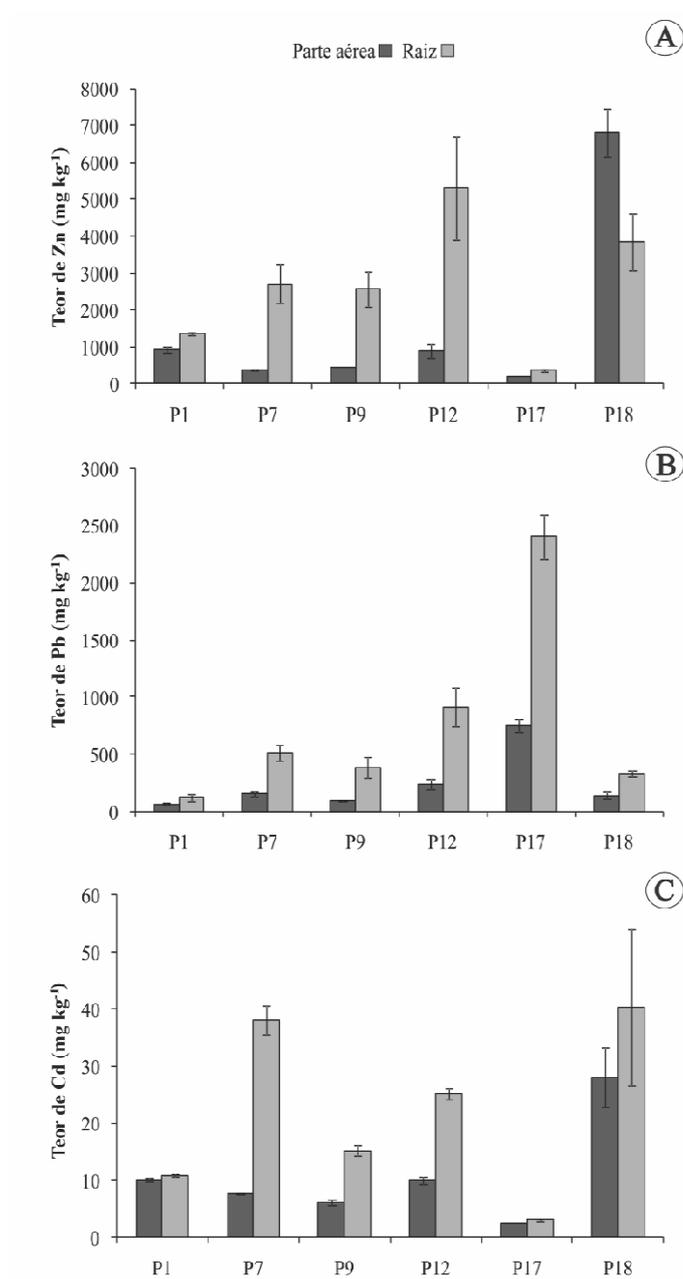


Figura 1 Concentração de Zn (A), Pb (B) e Cd (C), em raiz e parte aérea, para a espécie *Andropogon sp.*, nos diferentes pontos de coleta

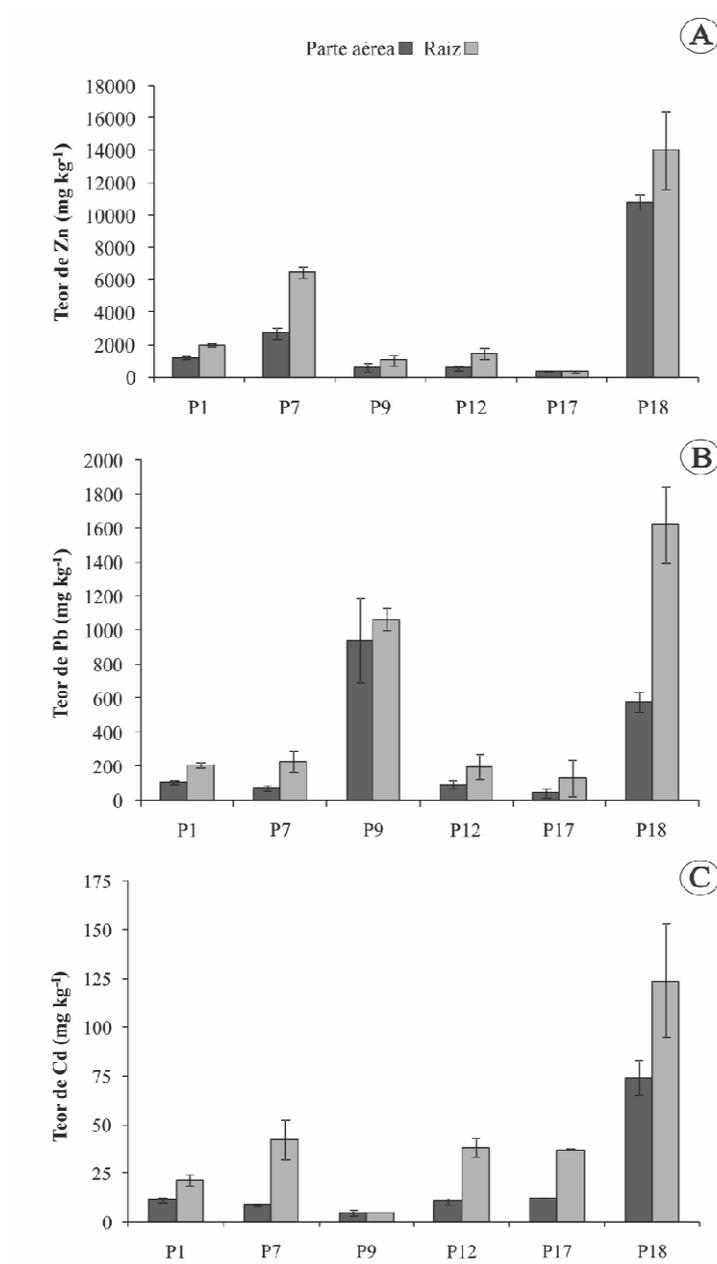


Figura 2 Concentração de Zn (A), Pb (B) e Cd (C), em raiz e parte aérea, para a espécie *Pteris sp.*, nos diferentes pontos de coleta

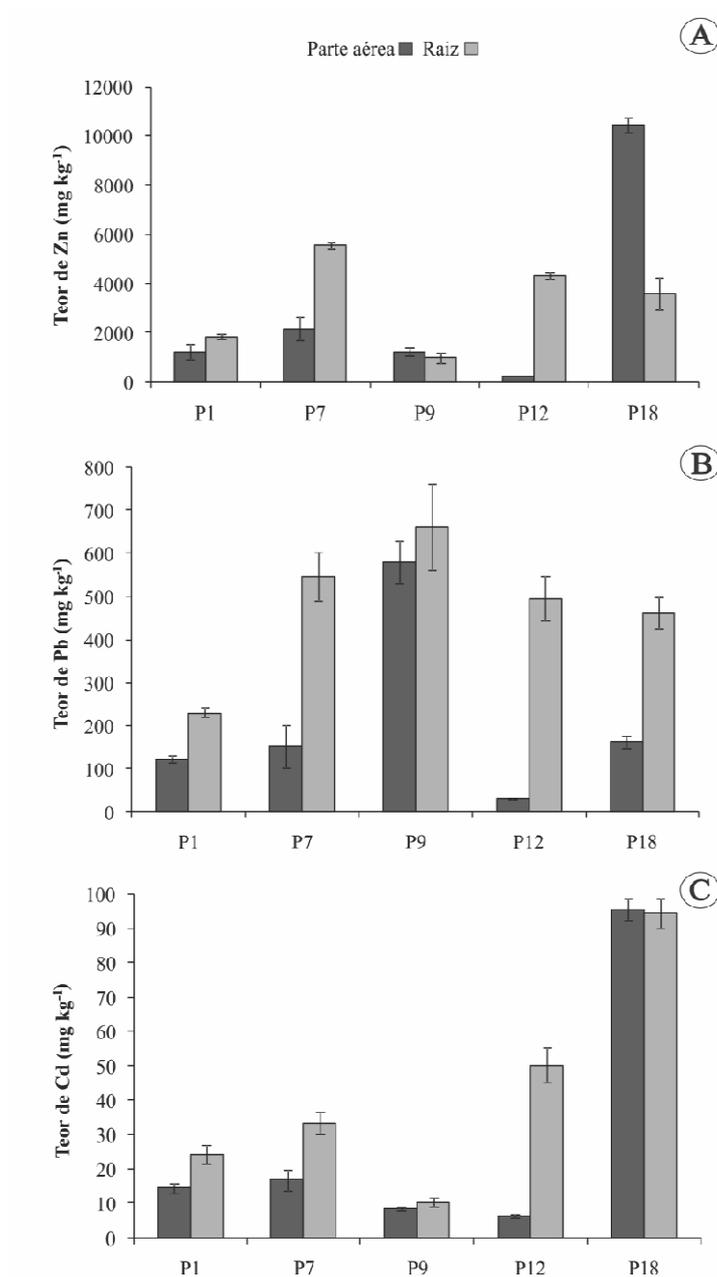


Figura 3 Concentração de Zn (A), Pb (B) e Cd (C), em raiz e parte aérea, para a espécie *Gomphrena claussenii* Moq, nos diferentes pontos de coleta

As concentrações normais e tóxicas de elementos-traço (mg kg^{-1}) em plantas são, respectivamente, consideradas de 27 a 150 e 100 a 400 para Zn; 0,05 a 0,2 e 5 a 30 para Cd; e, 5 a 10 e 30 a 300 para Pb (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Todas as espécies coletadas apresentaram concentrações superiores aos limites tóxicos para os elementos estudados. Os resultados, ainda, indicam que as espécies que estão se desenvolvendo nestes solos contaminados são tolerantes a estes metais, assim como observado em estudo realizado por Ha et al. (2011), analisando diferentes espécies coletadas em área de mineração no Vietnã do Norte.

Em estudos anteriores, Yoon et al. (2006) observaram concentrações máximas (mg kg^{-1}), em raiz e parte aérea, respectivamente, de 1183 e 491 para Pb e 598 e 453 para Zn em plantas nativas desenvolvidas em solo contaminado. Sainger et al. (2011) observaram concentrações (mg kg^{-1}) de Zn nas raízes variando de 236 a 958 e parte aérea de 437 a 977, em plantas de uma área contaminada por zinco e cromo. Testiati et al. (2013) observaram concentrações, em raiz e parte aérea, respectivamente, de Zn de 980 e 1023 mg kg^{-1} e Pb de 2640 e 1350 mg kg^{-1} em uma área com elevados teores de Zn e, principalmente, Pb. Deng et al. (2008) observaram concentrações de 11116, 1249 e 1090 mg kg^{-1} para Zn, Cd e Pb, respectivamente, em *Sedum alfredii*, em uma mina de Pb e Zn. Bech et al. (2012) observaram concentrações (mg kg^{-1}) máximas, em parte aérea, de 8240 para Pb e 11550 para Zn, de plantas coletadas em uma mina multicontaminada no Peru. Estudando a vegetação nativa de uma área fluvial próxima a uma vazante tóxica de uma área de mineração, Rio et al. (2002) encontraram concentrações de Pb, Zn e Cd, de abaixo do limite de detecção a 450, 13 a 1138, abaixo do limite de detecção a 9,7, respectivamente. No presente estudo, as concentrações foram superiores às encontradas de Zn e Pb por Yoon et al. (2006), de Zn por Sainger et al. (2011), para Zn por Testiati et al. (2013) e para Cd, Pb e Zn por Rio et al. (2002), mas abaixo das concentrações

encontradas de Pb por Testiati et al. (2013), para Zn, Cd e Pb por Deng et al. (2008) e para Pb e Zn por Bech et al. (2012).

Dentre as espécies capazes de acumular altas concentrações de Cd, Pb e Zn, poucas têm o mecanismo de acumulação dos dois elementos, simultaneamente. Wang et al. (2009), estudando 68 espécies em uma área de mineração de Zn e Pb na China, encontraram 6 espécies hiperacumuladoras, sendo apenas uma hiperacumuladora de Pb, Cd e Zn. Phaenark et al. (2009) avaliaram o potencial fitoextrator de Cd e Zn em 36 espécies e revelaram 4 como hiperacumuladoras de Cd e apenas 1 com capacidade de fitoextrair tanto Cd como Zn. Essa capacidade fitoextratora múltipla é essencial para remediação das áreas contaminadas por meio da mineração ou beneficiamento de Zn, uma vez que ambos os elementos se encontram presentes nessa condição. Essa característica foi relatada para as espécies *Silene viscidula*, *Plantago orbignyana*, *Sedum alfredii*, *Picris divaricata*, *Thlaspi caerulescens* e *Justicia procumbens* e foi encontrada em duas das espécies estudadas, *Pteris* sp. e *Gomphrena claussenii* Moq. (Tabela 6).

Tabela 6 Exemplos de espécies vegetais hiperacumuladoras de dois ou mais elementos-traço

Espécies	PARTE AÉREA			Referência
	Teor Cd	Teor Zn	Teor Pb	
	------(mg kg ⁻¹)-----			
<i>Pteris</i> sp.	-	10800	1000	-
<i>Gomphrena clausenii</i> Moq.	100	10500	-	-
<i>Silene viscidula</i>	230	11150	3900	Wang et al. (2009)
<i>Plantago orbignyana</i>	-	11500	8200	Bech et al. (2012)
<i>Sedum alfredii</i>	1250	11100	1100	Deng et al. (2008)
<i>Justicia procumbens</i>	550	10750	-	Phaenark et al. (2009)
<i>Picris divaricata</i>	360	15100	-	Ying et al. (2010)
<i>Thlaspi caerulescens</i>	1300	26000	-	Brown et al. (1995)

* Valores aproximados apresentados para ambas as espécies, sendo os valores para *Pteris* sp. e *Gomphrena clausenii* Moq. correspondentes ao estudo atual

3.5 Bioacumulação e Translocação em plantas

Hiperacumuladora é um termo utilizado para plantas capazes de acumular um teor maior que 100 mg kg⁻¹ de Cd, 1000 mg kg⁻¹ de Pb e 10,000 mg kg⁻¹ de Zn (BAKER; BROOKS, 1989; MARQUES; MOREIRA; SIQUEIRA, 2000; RASKIN et al., 1997). Além disso, existem outros dois critérios, Fatores de bioacumulação (FB) e de translocação (FT), que são utilizados para estimar o potencial de fitorremediação de plantas (HA et al., 2011; ZHANG et al., 2010) em que FB e FT devem ser maiores que 1 (BAKER; WHITING, 2002; MCGRATH; ZHAO, 2003; PILON-SMITS, 2005).

Para todas as espécies foi encontrado um FB superior a 1, porém, em pontos diferentes de coleta (Tabela 7). Para *Andropogon* sp. os valores variaram

de 0,0 a 2,4, 0,1 a 3,4 e 0,1 a 1,3 para Zn, Cd e Pb, respectivamente. Para *Pteris* sp. os valores variaram de 0,0 a 1,4, 0,3 a 8,6 e 0,0 a 1,0 para Zn, Cd e Pb, respectivamente. Para *Gomphrena claussenii* Moq. os valores variaram de 0,0 a 1,3, 0,2 a 4,8 e 0,1 a 1,1 para Zn, Cd e Pb, respectivamente. Vale ressaltar que, com o acréscimo da concentração de Zn, Cd e Pb no solo, houve um decréscimo no FB. Testiati et al. (2013), estudando o FB de diferentes espécies em diferentes solos contaminados, observaram que houve um decréscimo do FB com o acréscimo da concentração de elementos tóxicos no solo. Segundo estes mesmos autores, esta diferença se dá em decorrência de uma restrição de absorção do solo para a raiz em resposta ao elevado teor destes elementos no solo. Segundo Liang et al. (2009), a comparação do FB entre espécies, também, é limitada, uma vez que ele é dependente da espécie e pode ser alterado, de acordo com a concentração do elemento disponível para a planta, seja no solo ou na solução nutritiva. Os mesmos autores relataram, também, que, assim como Testiati et al. (2013), com o aumento da concentração do elemento no meio há uma queda do FB nas espécies. Wang et al. (2009) chegaram à conclusão de que o critério “ $FB > 1$ ” não é suficiente para designar uma espécie como hiperacumuladora, especialmente, quando se trata de certas condições de campo, quando a concentração de elementos-traço é altamente superior ao nível crítico de espécies hiperacumuladoras tolerantes. Nesse sentido, o conceito de FB seria impossível de ser alcançado (ZHAO; LOMBI; MCGRATH, 2003). A concentração de elementos-traço nos solos do nosso estudo foi, significativamente, elevada e com grande variação na distribuição, e as espécies estudadas acumularam na parte aérea elevadas concentrações de elementos-traço, acima do nível crítico, onde, frequentemente, colonizavam solos com elevados teores destes elementos. Resultados semelhantes foram obtidos por Wang et al. (2009) e Zu et al. (2005). Portanto, para este estudo, o FB não é um

parâmetro para designar se a espécie é ou não hiperacumuladora (REEVES, 2006).

Tabela 7 Fator de Bioacumulação das espécies em estudo para os diferentes pontos de coleta

Espécies	Elementos-traço	Solos					
		P1	P7	P9	P12	P17	P18
<i>Andropogon sp.</i>	Zinco	1,0	0,1	2,4	0,3	0,4	0,0
	Cádmio	2,1	0,3	3,4	0,3	0,7	0,1
	Chumbo	0,9	0,3	0,1	0,3	1,3	0,1
<i>Pteris sp.</i>	Zinco	1,4	0,3	0,9	0,0	0,4	0,2
	Cádmio	4,2	0,3	1,1	0,4	8,6	0,5
	Chumbo	1,0	0,1	0,3	0,0	0,5	0,5
<i>Gomphrena clausenii</i> Moq.	Zinco	1,3	0,2	0,9	0,3	-	0,0
	Cádmio	4,8	0,2	2,3	0,5	-	0,4
	Chumbo	1,1	0,3	0,2	0,2	-	0,1

O FT mostra as espécies mais eficientes em translocar, com facilidade, elementos-traço para a parte aérea. Houve grande variação do FT no presente estudo (Tabela 8). Para *Andropogon sp.*, os valores variaram de 0,1 a 1,8, 0,2 a 0,9 e 0,3 a 0,5 para Zn, Cd e Pb, respectivamente. Para *Pteris sp.*, os valores variaram de 0,4 a 1,0, 0,2 a 0,9 e 0,0 a 0,9 para Zn, Cd e Pb, respectivamente. Para *Gomphrena clausenii* Moq., os valores variaram de 0,0 a 2,9, 0,1 a 1,0 e 0,0 a 0,9 para Zn, Cd e Pb, respectivamente. Considerando os critérios sugeridos por Baker e Brooks (1989), podem ser consideradas hiperacumuladoras, *Gomphrena clausenii* Moq., Cd ($FT \geq 1$; $[Cd] \geq 100 \text{ mg kg}^{-1}$) e Zn ($FT \geq 1$; $[Zn] \geq 10000 \text{ mg kg}^{-1}$), e *Pteris sp.*, Zn ($FT \geq 1$; $[Zn] \geq 10000 \text{ mg kg}^{-1}$). A espécie *Pteris sp.* não atingiu todos os critérios para ser considerada hiperacumuladora de Pb ($FT \geq 1$; $[Pb] \geq 1000 \text{ mg kg}^{-1}$), no entanto, acumulou

significativo teor deste elemento ($[Pb] \geq 1000 \text{ mg kg}^{-1}$) na parte aérea. Pelo contrário, a espécie *Andropogon sp.*, para o elemento Zn, obteve um $FT \geq 1$, porém uma concentração inferior a 10000 mg kg^{-1} na parte aérea, não sendo considerada hiperacumuladora.

Tabela 8 Fator de Translocação das espécies em estudo para os diferentes pontos de coleta

Espécies	Elementos- traço	Solos					
		P1	P7	P9	P12	P17	P18
<i>Andropogon sp.</i>	Zinco	0,7	0,1	0,2	0,2	0,6	1,8
	Cádmio	0,9	0,2	0,4	0,4	0,8	0,7
	Chumbo	0,5	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4
<i>Pteris sp.</i>	Zinco	0,6	0,4	0,6	0,4	1,0	0,8
	Cádmio	0,5	0,2	0,9	0,3	0,3	0,6
	Chumbo	0,5	0,3	0,9	0,5	0,0	0,4
<i>Gomphrena claussenii Moq.</i>	Zinco	0,7	0,4	1,3	0,0	-	2,9
	Cádmio	0,6	0,5	0,8	0,1	-	1,0
	Chumbo	0,5	0,3	0,9	0,0	-	0,4

4 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que *Pteris* sp. e *Gomphrena claussenii* Moq. podem ser consideradas como hiperacumuladoras de elementos-traço, a princípio, sendo a espécie *Gomphrena claussenii* Moq. hiperacumuladora de Zn e Cd, e a espécie *Pteris* sp. de Zn e Pb. As espécies *Pteris* sp. e *Gomphrena claussenii* Moq. são promissoras para a remediação de áreas contaminadas com Zn, Cd e Pb. A espécie *Andropogon* sp., embora não tenha sido descrita como hiperacumuladora, pode ser considerada uma espécie tolerante a estes elementos, sendo assim, uma importante espécie para revegetação de áreas contaminadas. Contudo, para a confirmação do potencial fitorremediador, mais estudos (casa de vegetação e campo) são necessários para o entendimento e manejo destas espécies.

REFERÊNCIAS

- BAKER, A. J. M.; BROOKS, R. R. Terrestrial higher plants with hyperaccumulate metallic elements: a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, Berkhamsted, v. 1, p. 81-126, 1989.
- BAKER, A. J. M. et al. The possibility of in situ heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, n. 1/4, p. 41-49, June 1994.
- BAKER, A. J. M.; WHITING, S. N. In search of the holy grail: a further step in understanding metal hyperaccumulation? **New Phytologist**, Cambridge, v. 155, n. 1, p. 1-7, June 2002.
- BECH, J. et al. Shoot accumulation of several trace elements in native plant species from contaminated soils in the Peruvian Andes. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 113, p. 106-111, Feb. 2012.
- BOUYOUCOS, G. J. The hydrometer as a new method for the mechanical analysis of soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 23, p. 343-349, 1927.
- BROWN, S. L. et al. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge amended soils. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 29, n. 6, p. 1581-1585, Mar. 1995.
- CAILLE, N.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P. Comparison of root absorption translocation and tolerance of arsenic in the hyperaccumulator *Pteris vittata* and the non hyperaccumulator *Pteris tremula*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 165, n. 3, p. 755-761, Mar. 2005.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução N° 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 27 jan. 2013.
- DENG, D. M. et al. Liao, accumulation of zinc, cadmium, and lead in four populations of *Sedum alfredii* growing on lead/zinc mine spoils. **Journal of Integrative Plant Biology**, Beijing, v. 50, n. 6, p. 691-698, 2008.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. rev. e atual. Rio de Janeiro, 1997. 212 p. (EMBRAPA-CNPS. Documentos, 1).

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos**. Lavras: UFLA, 2003. Software.

FRANCO-HERNÁNDEZ, M. O. et al. Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central Mexico. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 11, p. 3864-3869, June 2010.

GARCIA, G.; FAZ, A.; CUNHA, M. Performance of *Piptatherum miliaceum* (Smilo grass) in edaphic Pb and Zn phytoremediation over a short growth period. **International Biodeterioration and Biodegradation**, Birmingham, v. 54, n. 2/3, p. 245-250, Sept./Oct. 2004.

HA, N. T. H. et al. Uptake of metals and metalloids by plants growing in a lead-zinc mine area, Northern Vietnam. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 186, n. 2/3, p. 1384-1391, Feb. 2011.

HENRY, J. R. **An overview of the phytoremediation of lead and mercury**. Washington: USEPA, 2000. 51 p. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsarp/i/fulltext/over/over.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 413 p.

KUPPER, H. et al. Cellular compartmentation of nickel in the Hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 365, p. 2291-3000, Dec. 2001.

LIANG, H. et al. Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators. **Environmental Pollution**, Barking, v. 157, n. 6, p. 1945-1952, June 2009.

LINDBLOM, S. D. et al. Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in Indian mustard affects metal tolerance and accumulation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 3, p. 726-733, Apr. 2006.

MA, L. Q. et al. A fern that hyperaccumulates arsenic. **Nature**, London, v. 409, n. 6820, p. 579, Feb. 2001.

MANOUSAKI, E. et al. Phytoextraction and phytoexcretion of Cd by the leaves of *Tamarix smyrnensis* growing on contaminated non-saline and saline soils. **Environmental Research**, New York, v. 106, n. 3, p. 326-329, Mar. 2008.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 121-132, jan. 2000.

MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 3, p. 277-282, June 2003.

MEDINA, H. P. Constituição física. In: MONIZ, A. C. (Ed.). **Elementos de pedologia**. Rio de Janeiro: LTC, 1975. p. 1-20.

PHAENARK, C. et al. Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng Zinc Mine area. **International Journal of Phytoremediation**, London, v. 11, n. 5, p. 479-495, July 2009.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 15-39, 2005.

PUERTAS-MEJÍA, M. A.; RUIZ-DÍEZ, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Effect of cadmium ion excess over cell structure and functioning of *Zea mays* and *Hordeum vulgare*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, n. 3, p. 285-291, June 2010.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. **Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environmental**. New York: J. Wiley, 2000. 304 p.

RASKIN, I.; SMITH, R. D.; SALT, D. E. Phytoremediation of metals using plants to remove pollutants from the environment. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 8, n. 2, p. 221-226, Apr. 1997.

REEVES, R. D. Hyperaccumulation of trace elements by plants. In: MOREL, J. L.; ECHEVARRIA, G.; GONCHAROVA, N. (Ed.). **Phytoremediation of metal-contaminated soils**. Wageningen: Springer, 2006. p. 25-52. (Earth and Environmental Science, 68).

REEVES, R. D.; BROOKS, R. R. European species of *Thlaspi* L. (Cruciferae) as indicators of nickel and zinc. **Journal of Geobotanical Exploration**, New York, v. 18, n. 3, p. 275-283, Oct. 1983.

RIO, M. D. et al. Heavy metals and arsenic uptake by wild vegetation in the Guadiamar river area after the toxic spill of the Aznalcollar mine. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 98, n. 1, p. 125-137, Sept. 2002.

SAINGER, P. A. et al. Assessment of heavy metal tolerance in native plant species from soils contaminated with electroplating effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, n. 8, p. 2284-2291, Nov. 2011.

SELVAM, A.; WONG, J. W. C. Phytochelatin synthesis and cadmium uptake of *Brassica napus*. **Environmental Technology**, London, v. 29, n. 7, p. 765-774, 2008.

SHARMA, N. C. et al. Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 23, n. 9, p. 2068-2073, Sept. 2004.

SUN, R.; JIN, C.; ZHOU, Q. Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in *Rarippa globosa* (Turcz.) Thell., a species with some characteristics of cadmium hyperaccumulation. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 61, n. 1, p. 67-74, May 2010.

TESTIATI, E. et al. Trace metal and metalloid contamination levels in soils and in two native plant species of a former industrial site: evaluation of the phytostabilization potential. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 248/249, p. 131-141, Mar. 2013.

TU, C.; MA, L. Q. Effects of arsenic concentrations and forms on arsenic uptake by the hyperaccumulator ladder brake. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, n. 2, p. 641-647, Mar./Apr. 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3051a**: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Washington, 1998. 30 p.

VANGRONSVELD, J.; COLPAERT, J. V.; TICHELEN, K. K. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: physicochemical and

biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 94, n. 2, p. 131-140, 1997.

WANG, S. L. et al. Hyperaccumulation of lead, zinc, and cadmium in plants growing on a lead/zinc outcrop in Yunnan Province, China. **Environmental Geology**, Berlin, v. 58, n. 3, p. 471-476, Aug. 2009.

YING, R. et al. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplastin Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 81-87, Jan. 2010.

YOON, J. et al. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 368, n. 2/3, p. 456-464, Sept. 2006.

ZHANG, X. et al. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 6, p. 2063-2066, Mar. 2010.

ZHAO, F. J.; LOMBI, E.; MCGRATH, S. P. Assessing the potential for zinc and cadmium phytoremediation with the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 249, n. 1, p. 37-43, Feb. 2003.

ZU, Y. Q. et al. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous plants grown on lead-zinc mining area in Yunnan, China. **Environment International**, New York, v. 31, n. 5, p. 755-762, July 2005.

CAPÍTULO III

**UTILIZAÇÃO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO,
MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E
ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA POR RAIOS-X NO
ESTUDO DA LOCALIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO DE ELEMENTOS-
TRAÇO EM TECIDOS DE PLANTAS**

RESUMO

O crescente interesse pela técnica da fitorremediação tem atraído uma considerável atenção para o estudo de espécies hiperacumuladoras de elementos-traço. A Microscopia Eletrônica tem sido amplamente utilizada em pesquisas com o intuito de verificar a distribuição elementar em tecidos vegetais e tem se mostrado uma ferramenta promissora quanto ao estudo de elementos-traço em plantas. Objetivou-se neste trabalho identificar e caracterizar, por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura/Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X, (MEV/EDS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), os mecanismos de tolerância a elementos-traço como Zn, Cd e Pb de espécies nativas de uma área de mineração, assim como sua distribuição celular. Foram selecionadas seis áreas para coleta de plantas em uma área de mineração de zinco no município de Vazante, MG. As amostras coletadas de três espécies vegetais, *Gomphrena clausenii* Moq., *Andropogon* sp. e *Pteris* sp. foram analisadas quanto à composição elementar e à localização dos elementos-traço por MET e MEV/EDS. Para a espécie *Andropogon* sp., foram observados na parte aérea a formação de cristais e o acúmulo nos espaços intercelulares de todos os elementos tanto na parte aérea quanto na raiz. Na espécie *Gomphrena clausenii* Moq., foram observados na parte aérea, tanto no caule quanto nas folhas, e nas raízes, a formação de cristais e o acúmulo nos espaços intercelulares de todos os elementos. Para a espécie *Pteris* sp., foram observadas na parte aérea, estruturas semelhantes a hifas, supostos fungos endofíticos, acumulando teores significativos de Cd, enquanto nas células mais externas da folha e da raiz, epidérmicas, e nos espaços intercelulares foram quantificados teores significativos de Zn e Pb. Observou-se, por meio da MET, que houve diferenciação significativa em nível celular, sendo possível observar grandes alterações na organização das células. As espécies em estudo mostraram grande habilidade em tolerar elevados níveis de elementos tóxicos por meio do uso de complexos mecanismos de captura destes elementos em estruturas particulares como espaços intercelulares e vacúolos, ou pela formação de cristais de oxalato.

Palavras-chave: Fitorremediação. Espécies hiperacumuladoras. Microscopia eletrônica. Microanálise por raios-X.

ABSTRACT

The growing interest for the phytoremediation technique has attracted a considerable attention to the study of species hyperaccumulating trace-elements. Electron microscopy has been broadly utilized in research with the purpose of verifying the elemental distribution in plant tissues and has proved a promising tool as to the study of trace-elements in plants. The objective of this work was to identify and characterize through Scanning Electron Microscopy/ Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy (SEM/EDX) and Transmission Electron Microscopy (TEM), the mechanisms of tolerance to trace-elements as Zn, Cd and Pb of native species of a mining area as well as their distribution in the municipality of Vazante, MG. The samples collected of three plant species, *Gomphrena claussenii* Moq. *Andropogon* sp. and *Pteris* sp. were analyzed as for the elemental composition and the localization of trace elements by TEM and SEM/EDX. For the species *Andropogon* sp., formation of crystals in the shoot was observed as well as the accumulation in the intercell spaces of all the elements both in the shoot and in the root. In the species *Gomphrena claussenii* Moq., in the shoot both in the stem and in the leaves and in the roots, the formation of crystals and the accumulation in the intercell spaces of all the elements were found. For the species *Pteris* sp., in the shoot, structures similar to hyphae, supposed endophytic fungi, accumulating significant contents of Cd, while in the outmost cells of the leaf and root, epidermic and in the intercell species were quantified significant contents of Zn and Pb were observed. It was found through TEM that there was significant differentiation in the cell level, it is being possible to observe great alterations in the organization of the cells. The species in study showed a great ability to tolerate elevated levels of toxic elements through the use of complex mechanisms of capture of those elements in particular structures as intercell spaces and vacuoles or through the formation of oxalate crystals.

Key words: Phytoremediation. Hyperaccumulating species. Electron microscopy. X-ray microanalysis.

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse pela fitorremediação tem atraído uma considerável atenção para o estudo de espécies hiperacumuladoras de elementos-traço (PENG-JIE et al., 2012; SALT; SMITH; RASKIN, 1998). Espécies hiperacumuladoras e hipertolerantes são, naturalmente, selecionadas e apresentam uma complexa característica fisiológica, sendo, normalmente, encontradas num pequeno número na natureza (KRAMER, 2010). Um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na tolerância e na hiperacumulação de elementos-traço se faz necessário para se avançar no desenvolvimento da remediação em solos contaminados utilizando-se estas espécies (KRAMER, 2010; PENG-JIE et al., 2012).

Nos últimos anos, significantes progressos têm sido alcançados para o entendimento do acúmulo de elementos-traço, que envolvem o aumento da absorção pela raiz, eficiente translocação da raiz para parte aérea e, principalmente, a desintoxicação na parte aérea (PENG-JIE et al., 2012; VERKLEIJ et al., 2009). As plantas têm desenvolvido vários mecanismos de defesa contra elementos-traço, incluindo, principalmente, a complexação e quelação com fortes ligantes e a compartimentalização em tecidos, células e organelas específicas (CLEMENS, 2006), visando minimizar os danos causados por estes elementos (TIAN et al., 2011). Estudos anteriores têm mostrado que elementos-traço tendem a se acumular, principalmente, no tecido vegetal da parte aérea, e.g., vacúolo e nas estruturas superficiais das espécies hiperacumuladoras, e.g., tricomas (PENG-JIE et al., 2012; SARRET et al., 2009), enquanto outros estudos indicam um papel fundamental de células, inteiramente, especializadas, e.g., idioblastos, atuando na compartimentalização e desintoxicação destes elementos tóxicos (MA et al., 2005). A compartimentalização vacuolar, segundo Verbruggen, Hermans e Schat (2009),

é considerada como o melhor caminho para a desintoxicação, limitando possíveis interferências entre elementos-traço e o metabolismo celular.

Elevados teores de elementos-traço foram relatados em células especializadas de várias espécies como de *Eichhornia crassipes* (MAZEN; EI MAGHRABY, 1997), *Arabidopsis halleri* e *A. thaliana* (ISAURE et al., 2006; SARRET et al., 2002, 2009), *Nicotiana tabacum* (SARRET et al., 2006), *Erica andevalensis* (TURNAU et al., 2007), *Atriplex halimus* L. (LEFÈVRE et al., 2009), *Sedum alfredii* (TIAN et al., 2010, 2011), *Picris divaricata* (PENG-JIE et al., 2012), dentre outras. No entanto, há necessidade de mais estudos, envolvendo seus possíveis papéis na desintoxicação e os danos causados, principalmente, em plantas nativas de áreas contaminadas, assim como a localização exata onde ocorrem nos tecidos.

A Microscopia Eletrônica tem sido amplamente utilizada em pesquisas com o intuito de verificar a distribuição elementar em tecidos vegetais e tem se mostrado uma ferramenta promissora quanto ao estudo de elementos-traço em plantas. Em recente estudo, utilizando a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Ying et al. (2010) verificaram que o cloroplasto, importante estrutura de reserva em vegetais, manteve-se intacto sob altas concentrações de Cd na espécie hiperacumuladora *Picris divaricata*. Basile et al. (2008), utilizando MET em estudos de uma espécie vegetal proveniente de uma área de mineração, *Fontinalis hygrometrica*, relataram um acúmulo de Zn e Pb ocorrendo nas paredes celulares e em pequenos vacúolos intracelulares. Peng-Jie et al. (2012) observaram, por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com uso de Espectroscopia de Energia Dispersiva com Raios-X (EDS), para a espécie *Picris divaricata*, o acúmulo de Cd em tricomas, na epiderme superior e inferior, e no feixe vascular de folhas desta espécie. Turnau et al. (2007) verificaram que elementos presentes em níveis tóxicos no solo (e.g., Fe e Al) apresentavam distribuição espacial dentro das raízes e na parte aérea de *Erica andevalensis*,

predominantemente, nas paredes celulares dos tecidos epidérmicos, bem como nos pelos glandulares da folha. Por meio de estudos com MEV/EDS, Lang e Wernitznig (2011) relataram a absorção e o acúmulo de zinco em células do gametófito na espécie *Pohlia drummondii*, porém a localização celular do elemento permaneceu obscura. Este sequestro em estruturas especializadas atenua ou previne os efeitos tóxicos sobre os mais sensíveis alvos celulares, ou seja, mantém o metabolismo celular ativo sem que haja prejuízos para a planta.

Objetivou-se neste trabalho identificar e caracterizar, por meio da MET e MEV/EDS, os mecanismos de tolerância a elementos-traço como Zn, Cd e Pb de espécies nativas de uma área de mineração, assim como sua distribuição celular.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição do local de estudo

O local onde as espécies e as amostras de solo foram coletadas localiza-se no entorno e dentro de uma cava de mineração, doravante denominada de Cava 3A, a qual se encontra localizada numa área de mineração de zinco, Mina Extremo Norte/Votorantim Metais, na cidade de Vazante, no noroeste de Minas Gerais (Figuras 1 e 2). O clima é considerado tropical semiúmido e a média de temperatura anual varia de 21°C a 24°C, sendo, nos meses mais quentes, de 21°C a 26°C e, nos meses mais frios, de 17°C a 22°C. A umidade relativa, no verão, oscila entre 75% e 80% e, no inverno, entre 50% e 60%.

2.2 Coleta das espécies

As plantas foram coletadas na área descrita anteriormente, uma vez que essas se encontravam estabelecidas e adaptadas às condições edafoclimáticas locais, principalmente, no que diz respeito aos altos teores de elementos-traço comumente encontrados em áreas de mineração. As plantas foram coletadas em dezembro e julho de 2012, em seis locais diferentes (Tabela 1). Três espécies foram coletadas, *Gomphrena claussenii* Moq., *Andropogon* sp. e *Pteris* sp., com o auxílio de enxadão, tomando-se o cuidado de manter o torrão de solo, visando à manutenção do sistema radicular. A coleta destas três espécies se justifica pela ampla distribuição das mesmas na área e, mais especificamente, nos pontos coletados.

Tabela 1 Identificações das amostras coletadas

Amostra	Identificação
P1	Área de referência no topo da mata
P7	Ponto inferior dentro da cava 3A próxima ao beneficiamento
P9	Ponto inferior no meio da cava 3A
P12	Ponto superior dentro da cava 3A a leste
P17	Barranco vermelho do talude dentro da cava 3A a oeste
P18	Área de depósito em torno do beneficiamento

2.3 Análise do solo

O solo coletado foi encaminhado ao Laboratório de Geoquímica, Departamento de Ciência do Solo, na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. Os teores de Cd, Pb e Zn totais foram obtidos por digestão, de acordo com o método 3051, da United States Environmental Protection Agency - USEPA (1998). As amostras foram maceradas em moinho de ágata e passadas por meio de peneira de náilon de 150 μm de abertura. Efetuou-se a digestão das amostras em forno de micro-ondas MARS-5. Para isso, adicionaram-se 0,5 g de material sólido (triplicata) e 5 mL de HNO_3 concentrados em tubos de teflon[®], os quais foram, hermeticamente, fechados para o início do procedimento. Após a digestão, o extrato foi filtrado em filtro tipo Whatman n^o 40, juntamente com 5 mL de água bidestilada. Posteriormente, os teores de Cd, Pb e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800[®] com atomizador tipo chama. O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd, Pb e Zn foram assegurados pelo uso de material de referência BCR-142R (*Light Sandy Soil*) em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 74% a 120%.

As amostras de solo, também, foram analisadas quanto ao teor disponível de elementos-traço. Em erlenmeyers de 125 mL, colocaram-se 10 gramas de terra fina seca ao ar (fração < 2 mm) e 100 mL da solução extratora Mehlich-1 ($0,05 \text{ mol L}^{-1} \text{ HCl} + 0,0125 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$). A solução foi agitada, por 5 minutos, em mesa agitadora (150 rpm) e, em seguida, filtrada por meio de papel filtro Whatman nº 42. Os extratos filtrados foram preservados sob refrigeração (4°C), até serem analisados.

2.4 Análise do Cádmio, Chumbo e Zinco na planta

Após a coleta, as plantas foram colhidas em parte aérea (folha e caule) e raízes e, em seguida, levadas ao Laboratório de Geoquímica, Departamento de Ciência do Solo (DCS), da Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, para análises.

A parte aérea foi lavada em água deionizada e as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico 10% (v/v) por um minuto e, em seguida, enxaguadas em água deionizada. A seguir, ambas as partes foram secas em estufa em temperatura entre 65° e 75°C , até atingir massa constante. A massa da matéria seca foi determinada em balança de precisão (0,01 g) e, em seguida, a matéria seca foi moída em moinho tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm, para ser analisada quimicamente.

O material moído foi digerido, segundo o método 3051 da USEPA (1998), utilizando-se de 0,5 g de material em 5 mL de HNO_3 concentrado, em forno de micro-ondas, com tubos de Teflon® PTFE, à pressão 0,76 MPa, por dez minutos. A temperatura alcançada à pressão de 0,76 MPa é de, aproximadamente, 175°C . Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado até 10 mL com água destilada. A partir dos extratos, foram determinados os teores de cádmio, chumbo e zinco por espectrofotometria de

absorção atômica, utilizando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800® com atomizador tipo chama.

O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd, Pb e Zn foram assegurados pelo uso de material de referência BCR-482 Lichen, proveniente do Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM) em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 80% a 98% para Cd, de 73% a 81% para Pb e de 74% a 89% para Zn.

2.5 Análise ultraestrutural da planta por meio de estudos com microscopia

As espécies coletadas foram fixadas em Karnovsky (modificado) e mantidas em câmara fria (4°C) por um período mínimo de 24 horas.

O preparo das amostras coletadas na área foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), Departamento de Fitopatologia (DFP), da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, segundo o protocolo do LME, para posterior análise em Microscópio Eletrônico de Varredura/Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X (MEV/EDS) e Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).

2.5.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X

As amostras pré-fixadas foram transferidas para glicerol por um período de 30 minutos e, posteriormente, foram efetuados os cortes em nitrogênio líquido (criofratura). As amostras foram desidratadas em gradiente crescente de etanol (25, 50, 75, 90, 95 e 100% por 10 minutos, esta última por duas vezes) sendo, em seguida, levadas para o aparelho de ponto crítico modelo Baltec CPD

030 onde se completou a secagem. As amostras foram montadas em *stubs*, metalizadas no aparelho evaporador de carbono modelo Balzer CED 020 e observadas em Microscópio Eletrônico de Varredura modelo LEO EVO 40 XVP Zeiss e qualificadas/quantificadas quanto à composição química por Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X no aparelho Quantax XFlash 5010 Bruker.

2.5.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras pré-fixadas foram cortadas em pedaços de 1 mm², os quais foram lavados em tampão fosfato por três vezes durante 10 minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, lavados por três vezes em água destilada e transferidos para solução a 0,5% de acetato de uranila durante 12h a 4°C. Após este período foram, novamente, lavadas em água destilada por três vezes e desidratados em gradiente de acetona 25, 30, 40, 50, 70, 80, 85, 90 e 95% por 30 minutos cada e 100% por três vezes de 30 minutos cada. Em seguida, o material foi incluído em gradiente crescente da resina Spurr : Acetona nas seguintes concentrações, 1:3 por 12 horas, 1:2 por 24 horas, 1:1 por 24 horas, 2:1 por 24 horas e duas vezes com resina pura (100%) por 24 horas cada, sendo os espécimes, posteriormente, montados em moldes de silicone e colocados para polimerizar em estufa a 70°C por 8 horas. Após o período de polimerização, os blocos de resina, contendo a amostra, passaram por um processo de desbaste para retirar o excesso de resina e, em seguida, foram cortados em aparelho ultramicrotomo modelo Leica MT-Ultracut. Os cortes obtidos foram coletados em telas de cobre, contrastados com acetato de uranila 2% e citrato de chumbo 0,2% por 3 minutos cada. Após a secagem, as amostras foram observadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), modelo Zeiss EM 109.

2.6 Análises estatísticas

Os resultados das concentrações de Cd, Pb e Zn no solo e na planta foram submetidos à análise de variância, por meio do uso do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do solo

O solo foi, principalmente, contaminado com Zn, embora elevadas concentrações de Cd e Pb tenham sido encontradas. A concentração total de Zn nas amostras de solo coletadas em diferentes pontos variaram de 896 a 77665 mg kg⁻¹. A concentração total de Cd e Pb das amostras de solos dos seis diferentes pontos variaram de 4,33 a 228,38 mg kg⁻¹ e de 202 a 3586 mg kg⁻¹, respectivamente. As concentrações médias total (USEPA 3051A) e disponível (Mehlich 1) dos elementos-traço Zn, Cd e Pb estão representadas na Figura 1.

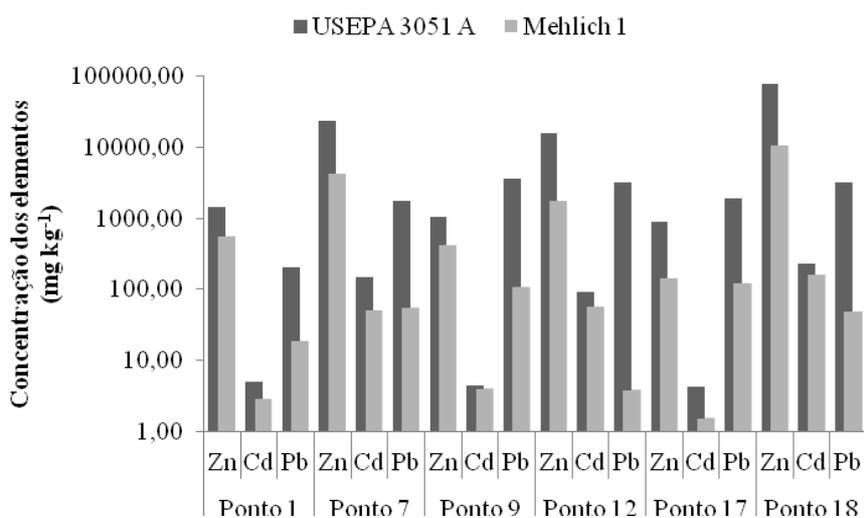


Figura 1 Concentração média total (USEPA 3051 A) e disponível (Mehlich 1) de elementos-traço de seis diferentes solos coletados em uma área de mineração de Zn

Ressalta-se, ainda, que todos os solos possuem teores dos elementos-traço estudados maiores que aqueles estabelecidos como Valor de Prevenção

(VP), segundo a Resolução Conama (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA, 2009), que é a concentração de valor limite de determinada substância no solo, tal que ele seja capaz de sustentar as suas funções principais, como desenvolvimento de espécies da flora e fauna. Os VP estabelecidos para Cd, Pb e Zn são $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$, 72 mg kg^{-1} e 300 mg kg^{-1} , respectivamente.

3.2 Concentração de Cd, Pb e Zn na planta

Não houve diferença significativa na concentração de elementos-traço em plantas coletadas em dezembro e julho de 2012 (teste de Scott-Knott 5%), portanto, os resultados aqui apresentados são baseados nos dados combinados (Tabela 2). As concentrações de todos os elementos-traço variaram amplamente entre os solos e as espécies de plantas (ALLOWAY et al., 1990; HA et al., 2011). Todas as espécies desenvolvidas nestes solos contaminados foram capazes de acumular elevadas concentrações de elementos-traço como Zn, Cd e Pb tanto na parte aérea quanto nas raízes.

A maior concentração de Zn foi encontrada na espécie *Pteris* sp. sendo 10809 e 13994 mg kg^{-1} , para parte aérea e raiz, respectivamente. Para Cd, a maior concentração foi encontrada na espécie *Gomphrena claussenii* Moq., sendo para parte aérea e raiz, 96 e 94 mg kg^{-1} , respectivamente. Para Pb, a maior concentração na parte aérea foi observada para a espécie *Pteris* sp., sendo de 943 mg kg^{-1} , já na raiz, a concentração de 2403 mg kg^{-1} foi encontrada na espécie *Andropogon* sp. Os valores médios de cada elemento, encontrados para cada espécie, nos diferentes pontos de coleta, estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 Concentração média (mg kg^{-1}) de Zn, Cd e Pb em plantas coletadas em uma área de mineração de zinco

Espécie	Ponto de coleta	Zn		Cd		Pb	
		PA	R	PA	R	PA	R
<i>Andropogon sp.</i>	P1	909	1358	10	11	65	122
	P7	372	2695	8	38	150	515
	P9	444	2555	6	15	97	384
	P12	882	5306	10	25	242	910
	P17	215	350	3	3	748	2403
	P18	6801	3837	28	40	140	330
<i>Pteris sp.</i>	P1	1159	1966	11	21	104	204
	P7	2676	6433	8	42	73	226
	P9	554	1011	4	5	943	1063
	P12	552	1422	10	38	91	193
	P17	328	326	12	37	42	129
	P18	10809	13994	74	124	577	1619
<i>Gomphrena clausenii</i> Moq.	P1	1218	1815	14	24	123	230
	P7	2168	5559	17	33	151	545
	P9	980	2213	8	10	580	661
	P12	230	4297	6	50	32	495
	P17	-	-	-	-	-	-
	P18	10434	3579	96	94	163	461

*As diferenças de concentração para Zn, Cd e Pb entre raiz (R) e parte aérea (PA), dentro da mesma espécie, foram significativas ($p < 0,05$)

Segundo Baker e Brooks (1989), hiperacumuladora é um termo utilizado para plantas capazes de acumular um teor maior que 100 mg kg^{-1} de Cd, 1000 mg kg^{-1} de Pb e $10,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Zn na parte aérea. De acordo com estes critérios, as espécies *Pteris sp.* e *Gomphrena clausenii* Moq., apresentam, a princípio, grande potencial para serem designadas como hiperacumuladoras, sendo, a primeira para Zn e Pb e a segunda para Zn e Cd. Embora não tenha atingido os critérios para espécies hiperacumuladoras, a espécie *Andropogon sp.* apresentou grande tolerância aos elementos-traço.

3.3 Localização de Cd, Pb e Zn na planta

As espécies em estudo foram coletadas em diferentes solos com diferentes concentrações de elementos-traço (Figura 1). Embora tenha sido observada grande diferença quanto ao acúmulo de elementos-traço nos tecidos (Tabela 2), o comportamento destas espécies foi semelhante para todos os pontos de coleta em termos de tolerância, adaptação e desenvolvimento. No entanto, foi observado, por meio de MEV e EDS que, com o aumento da concentração do elemento na planta, houve, também, um aumento de estruturas especializadas na desintoxicação celular.

Para a espécie *Andropogon* sp., foi observada, na parte aérea, a formação de cristais, tipo drusa e ráfide, e o acúmulo nos espaços intercelulares de todos os elementos, porém, com teores mais significativos de Zn e Pb. Nas raízes foram observados elevados teores de Zn e Pb nas camadas superficiais (córtex) e de Zn e Cd, em menor concentração, nos espaços intercelulares das camadas internas, próximas aos cilindros vasculares. A ocorrência de maior acúmulo de Zn e Pb, tanto na parte aérea quanto nas raízes, ocorre pelo fato desta espécie, como observado na análise química, acumular concentrações elevadas destes elementos quando comparado ao Cd. As eletromicrografias de *Andropogon* sp. e o gráfico representativo dos elementos são mostrados na Figura 2, assim como os valores médios encontrados nos cristais desta espécie na Tabela 3.

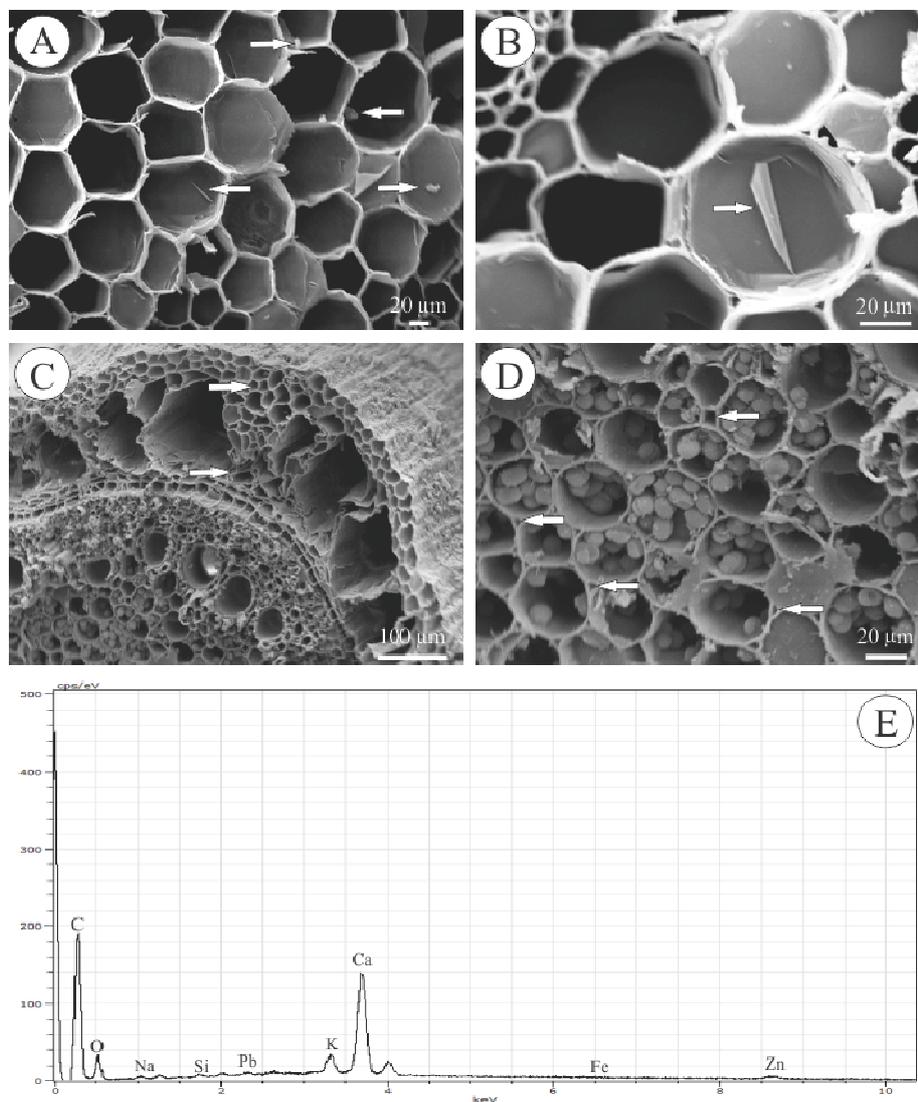


Figura 2 Eletromicrografia de varredura de *Andropogon* sp. (A-B, parte aérea; C-D, raiz) e (E) o gráfico de Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X (EDS) representativo dos cristais formados nesta espécie. Setas em (A-B) representam cristais encontrados; em (C) as setas representam os locais (camada celular mais externa, aerênquimas) onde foram encontrados elevados teores dos elementos-traço; e (D) as setas representam o espaço intercelular onde foram encontrados teores significativos dos elementos em estudo

Para a espécie *Gomphrena claussenii* Moq., foram observados na parte aérea, tanto no caule quanto nas folhas, e nas raízes, a formação de cristais tipo drusa e o acúmulo nos espaços intercelulares de todos os elementos, porém, com teores mais significativos de Zn e Cd. Foi observada uma maior ocorrência de cristais, acumulando Cd, quando comparado aos cristais acumuladores de Zn e Pb. Nos espaços intercelulares, foi observado maior acúmulo de Zn e Cd. Foram encontradas maiores concentrações de Pb nas raízes quando comparado à parte aérea da planta. As eletromicrografias de *Gomphrena claussenii* Moq. e o gráfico representativo de um cristal, assim como o mapeamento, são mostrados nas Figuras 3 e 4. Na Tabela 3 estão representados os valores médios encontrados nos cristais desta espécie.

Cristais em plantas são formados a partir do ácido oxálico sintetizado endogenamente com cátions divalentes como Ca e Fe, formando um oxalato (e.g., CaO_x), comum em plantas, inferiores e superiores vasculares, e algas. O Ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) é o mais simples dos ácidos dicarboxílicos e um dos compostos orgânicos, altamente oxidado, mais formado em plantas, possuindo diversas formas morfológicas podendo ocorrer tanto intracelular quanto extracelular. Há inúmeras hipóteses sobre a formação de cristais e suas funções em plantas como a regulação de íons, proteção mecânica, desintoxicação de elementos tóxicos, rigidez dos tecidos/suporte para a planta, e, até mesmo, captação de luz (FRANCESCHI; NAKATA, 2005).

Como no presente estudo, outros autores relataram a presença de cristais na possível desintoxicação celular de elementos tóxicos como chumbo (MAZEN; EI MAGHRABY, 1997; YANG et al., 2000), cádmio (CHOI et al., 2001; ISAURE et al., 2010; MAZEN; EI MAGHRABY, 1997; SARRET et al., 2006, 2007) e zinco (SARRET et al., 2006, 2007). A deposição de cristais de oxalato pode ocorrer tanto nos vacúolos das células como associado com as

paredes celulares. As células, referidas como idioblastos, em que se depositam cristais vacuolares são, frequentemente, especializadas na formação destes cristais, que são referidos como cristais idioblásticos (FOSTER, 1956).

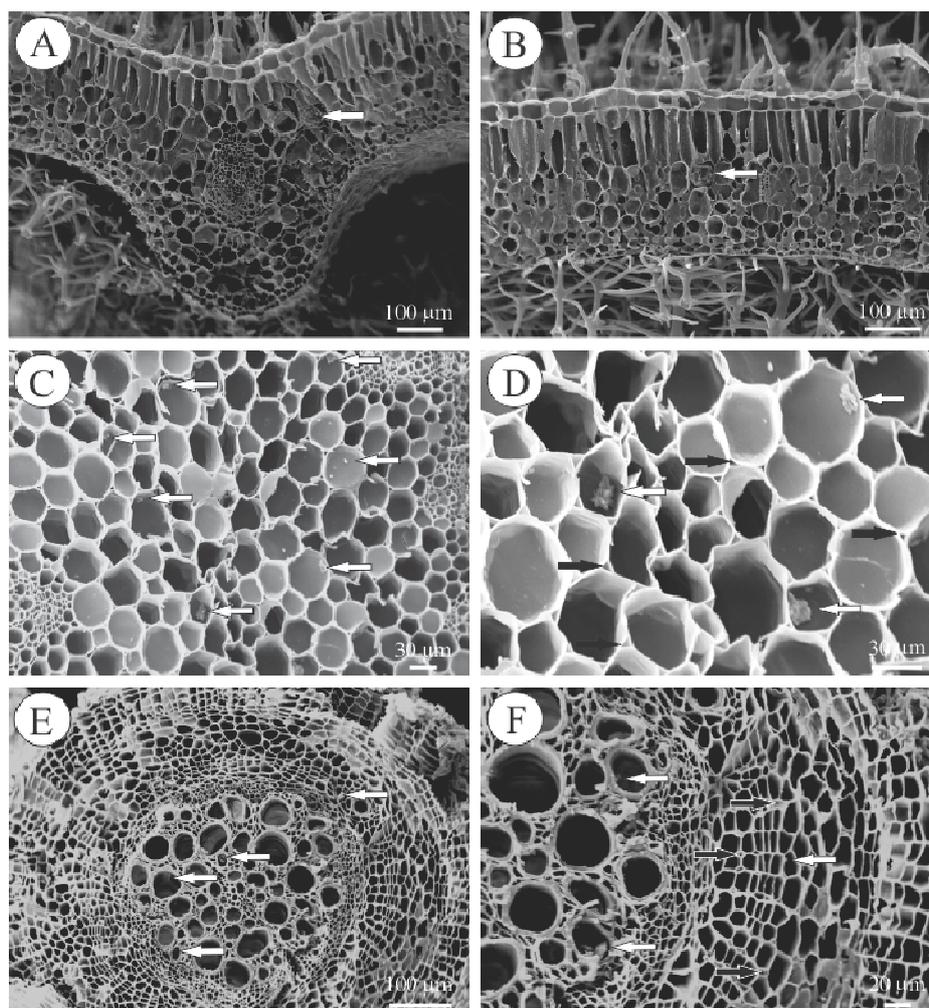


Figura 3 Eletromicrografia de varredura de *Gomphrena clausenii* Moq. (A-B, parte aérea; C-D, caule; E-F, raiz). Setas brancas representam cristais encontrados e setas escuras mostram o espaço intercelular onde foram encontrados teores significativos dos elementos em estudo

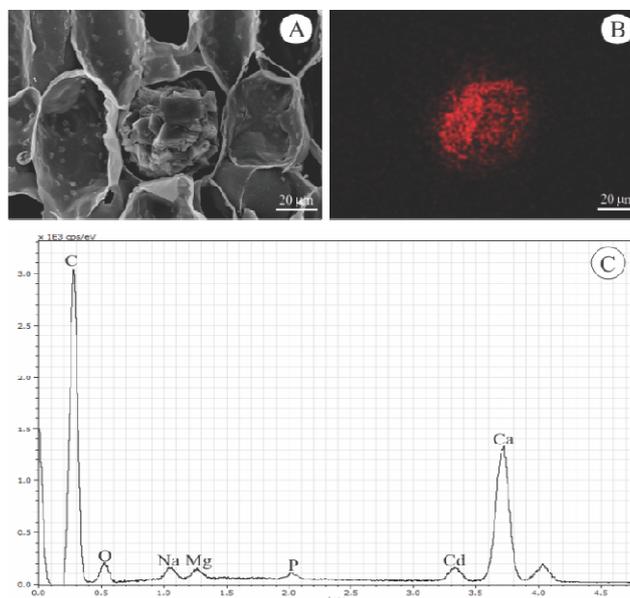


Figura 4 Eletromicrografia de varredura de um cristal de *Gomphrena clausenii* Moq. (A); mapeamento por Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X (EDS) (B) mostrando a distribuição do elemento Ca, formador de oxalato de Ca (CaO_x), o qual se liga ao Cd; e o gráfico (C) dos elementos qualificados pela mesma técnica

Tabela 3 Composição elementar dos cristais encontrados nas diferentes espécies por meio de leitura em EDS

Elemento	Espécie	
	<i>Gomphrena clausenii</i> Moq.	<i>Andropogon</i> sp.
	%	
Oxigênio	40,8	71,0
Sódio	2,5	-
Magnésio	1,4	-
Fósforo	0,6	-
Cálcio	52,3	18,7
Potássio	-	5,6
Chumbo	-	1,1
Zinco	-	3,0
Cádmio	2,4	-

Para a espécie *Pteris* sp., foram observadas na parte aérea estruturas semelhantes a hifas, supostos fungos endofíticos, acumulando teores significativos de Cd, enquanto nas células mais externas da folha, epidérmicas, e nos espaços intercelulares foram quantificados teores significativos de Zn e Pb. Nas raízes foram observados teores de Zn, Cd e Pb nas camadas superficiais (córtex) e nos espaços intercelulares destas células. As eletromicrografias de *Pteris* sp. e o gráfico representativo dos elementos são mostrados na Figura 5. Na Tabela 4 se encontra a composição elementar da estrutura fúngica encontrada.

A associação entre fungos endofíticos e plantas pode exercer um importante papel na desintoxicação de plantas (BLODGETT et al., 2007). Turnau et al. (2007) observaram uma associação entre uma espécie vegetal coletada em uma área de mineração, *Erica andevalensis*, e um fungo endosimbionte, *Hymenoschyphus ericae* e concluíram que isso seria responsável pela exclusão dos elementos tóxicos intracelulares que poderiam afetar o funcionamento celular. Outros autores, estudando a associação entre plantas e fungos, verificaram que o micélio fúngico foi capaz de complexar e sequestrar, na sua superfície e no seu interior, elementos tóxicos em altas concentrações, evitando a sua transferência para as células do hospedeiro e participando, assim, na desintoxicação de metais (TURNAU; KOTTKE, 2005). Embora a importância potencial da relação entre plantas e fungos seja reconhecida, pouco, ainda, se sabe sobre as condições ambientais favoráveis para que ocorram estas associações (RODRIGUEZ; REDMAN, 1997) havendo a necessidade de estudos mais detalhados.

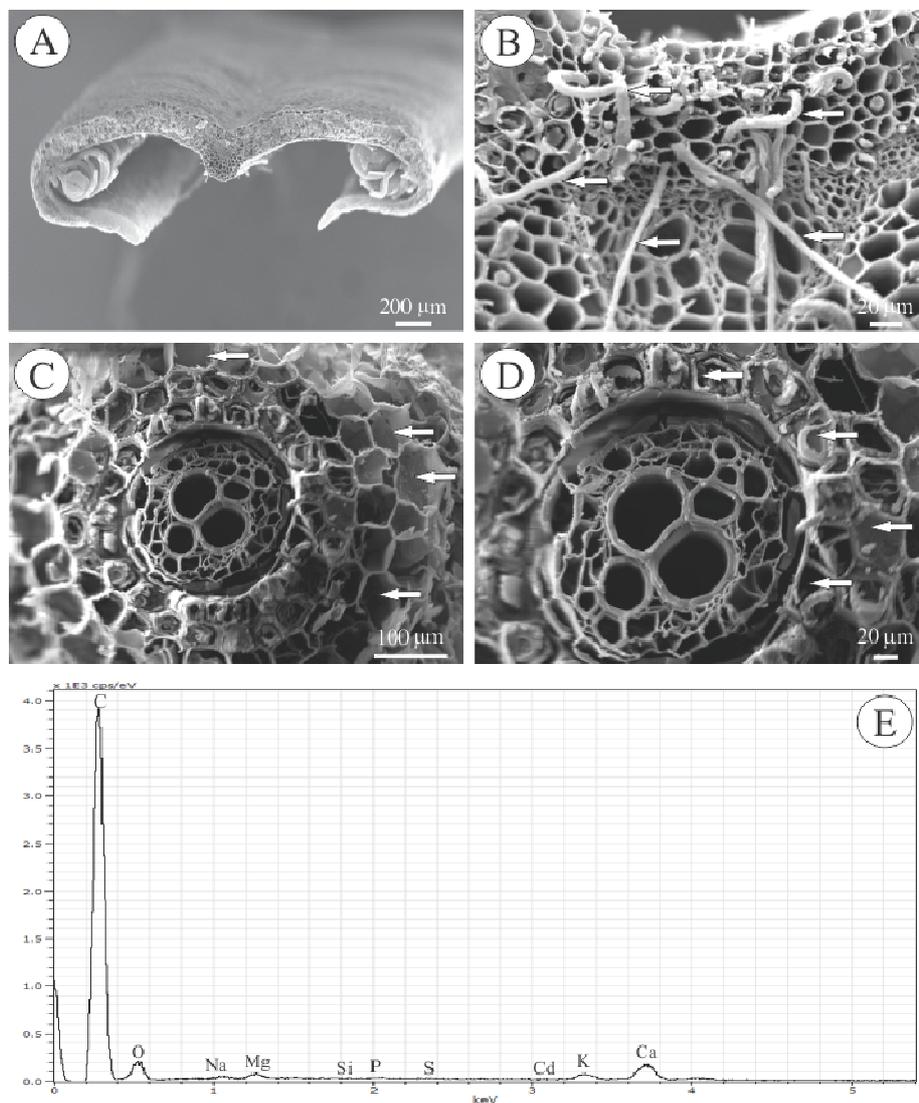


Figura 5 Eletromicrografia de varredura de *Pteris* sp. (A-B, parte aérea; C-D, raiz) e (E) o gráfico de Espectroscopia de Energia Dispersiva por Raios-X (EDS) representativo para esta espécie. Visão geral do corte (A); setas em (B) representam hifas encontradas; e em (C-D) representam os locais (camada celular mais externa) onde foram encontrados elevados teores dos elementos-traço

Tabela 4 Composição elementar das hifas encontradas em *Pteris* sp. por meio de leitura em EDS

Elemento	%
Oxigênio	61,7
Sódio	13,5
Magnésio	7,6
Fósforo	2,9
Silício	2,0
Cálcio	5,2
Cádmio	0,4

A célula vegetal é formada por componentes protoplasmáticos (núcleo, retículo endoplasmático, citoplasma, ribossomos, complexo de Golgi, mitocôndrias.) e por componentes não protoplasmáticos (vacúolos, parede celular e substâncias ergástricas). Estes componentes são responsáveis pelas funções vitais celulares, tais como, respiração celular (mitocôndrias), síntese de proteínas e lipídeos, desintoxicação celular e transporte intracelular (retículo endoplasmático), reserva de substâncias como o amido, remoção de metabólitos secundários tóxicos e digestão celular (vacúolo), e a integridade física das células (parede celular e membrana plasmática). A ausência do funcionamento de um ou mais destes componentes pode afetar ou mesmo impedir o funcionamento celular, causando danos severos à planta num todo e, inclusive, levando à morte.

Por meio de estudos com Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), observou-se, ultraestruturalmente, que não houve nenhuma alteração morfológica ou dano celular capaz de impedir o funcionamento celular, o que possibilitou o desenvolvimento e adaptação das espécies coletadas na área em estudo. No entanto, com o aumento do teor de elementos tóxicos nos tecidos das espécies, houve diferenciação significativa em nível celular, sendo possível observar grandes alterações na organização das células.

Foram observados para as espécies estudadas, com o aumento da concentração de elementos tóxicos, grandes núcleos, aumento no número de

mitocôndrias, inúmeros vacúolos de tamanhos consideravelmente grandes, inúmeras vesículas, grande número de plastídeos, e, principalmente, grande deposição de material eletro-denso, possíveis elementos tóxicos, tanto no vacúolo quanto nos espaços intercelulares. Vale ressaltar, também, que o acúmulo de amido foi baixo em células que continham material eletro-denso, assim como relatado em outras espécies expostas a elevados teores de elementos-traço (AZZARELLO et al., 2012; NAJEEB et al., 2009). As alterações celulares, nas espécies estudadas, *Andropogon* sp., *Gomphrena clausenii* Moq. e *Pteris* sp., podem ser observadas nas Figuras 6, 7 e 8, respectivamente.

Azzarello et al. (2012) relataram, por meio de estudos com MET e MEV, que a espécie *Paulownia tomentosa* tolerou níveis elevados de Zn por meio da utilização de mecanismos sofisticados como a captação de elementos-traço tanto na parede celular quanto nos vacúolos das raízes. Laperche et al. (1997) observaram, por meio de MET associada ao EDS, um acúmulo de Pb nos vacúolos das raízes da espécie *Sorghum bicolor* L. Moench, com aspecto semelhante aos materiais eletro-densos encontrados nos vacúolos das espécies em nosso estudo. Ying et al. (2010) observaram que não houve alterações nos cloroplastos das células de uma espécie, *Picris divaricata*, exposta a elevados níveis de Cd; no entanto, houve uma diminuição no número de amido nestas células. Faheed, Mazen e Elmohsen (2012), estudando as espécies *Corchorus olitorius* e *Malva parviflora*, expostas a diferentes concentrações de Cd, Cu, Pb e Zn em solução nutritiva, observaram alterações celulares em células especializadas no acúmulo de elementos-traço como núcleo alargado, plastídios com poucos grãos de amido, citoplasma rico em organelas, membranas e vesículas. Dou et al. (2009), estudando a interação entre Ca e Mn, na espécie hiperacumuladora *Phytolacca americana*, encontraram cristais de Mn nos vacúolos de células especializadas desta espécie como possível forma de

desintoxicação. Peng-Jie et al. (2012) relataram, para a espécie hiperacumuladora de Cd, *Picris divaricata*, maior acúmulo de elementos-traço em tecidos de baixa atividade celular como tricomas e células superiores e inferiores da epiderme.

Tal como outros organismos multicelulares, as plantas apresentam uma divisão nas funções. Células especializadas desenvolvem-se em função da variedade e das necessidades para se manter a vida, além de dar suporte ao crescimento e desenvolvimento, proteção, suporte mecânico, síntese ou armazenamento de energia, absorção, secreção, reprodução, divisão celular e união dos tecidos, independente do ambiente e da condição em que se encontram (GUNNING; STEER, 1975). No presente estudo, foram observadas diversas alterações relatadas por estes autores. Sendo assim, com os resultados obtidos, sugere-se que o vacúolo seja a principal forma de desintoxicação celular por elementos tóxicos como Zn, Cd e Pb, assim como os espaços intercelulares, por não apresentarem uma função vital direta, metabólica, nas atividades celulares.

A translocação para os órgãos da parte aérea, a distribuição e a acumulação de elementos-traço nos diferentes órgãos de uma planta, também, representam fatores-chave para o sucesso de fitoextração (AZZARELLO et al., 2012). Portanto, o acúmulo de elementos-traço nas espécies em estudo, principalmente, *Gomphrena claussenii* Moq. e *Pteris* sp., relatados tanto na parte aérea quanto nas raízes, mostram o grande potencial de ambas como fitoextratoras e possíveis espécies a serem aplicadas em programa de fitorremediação.

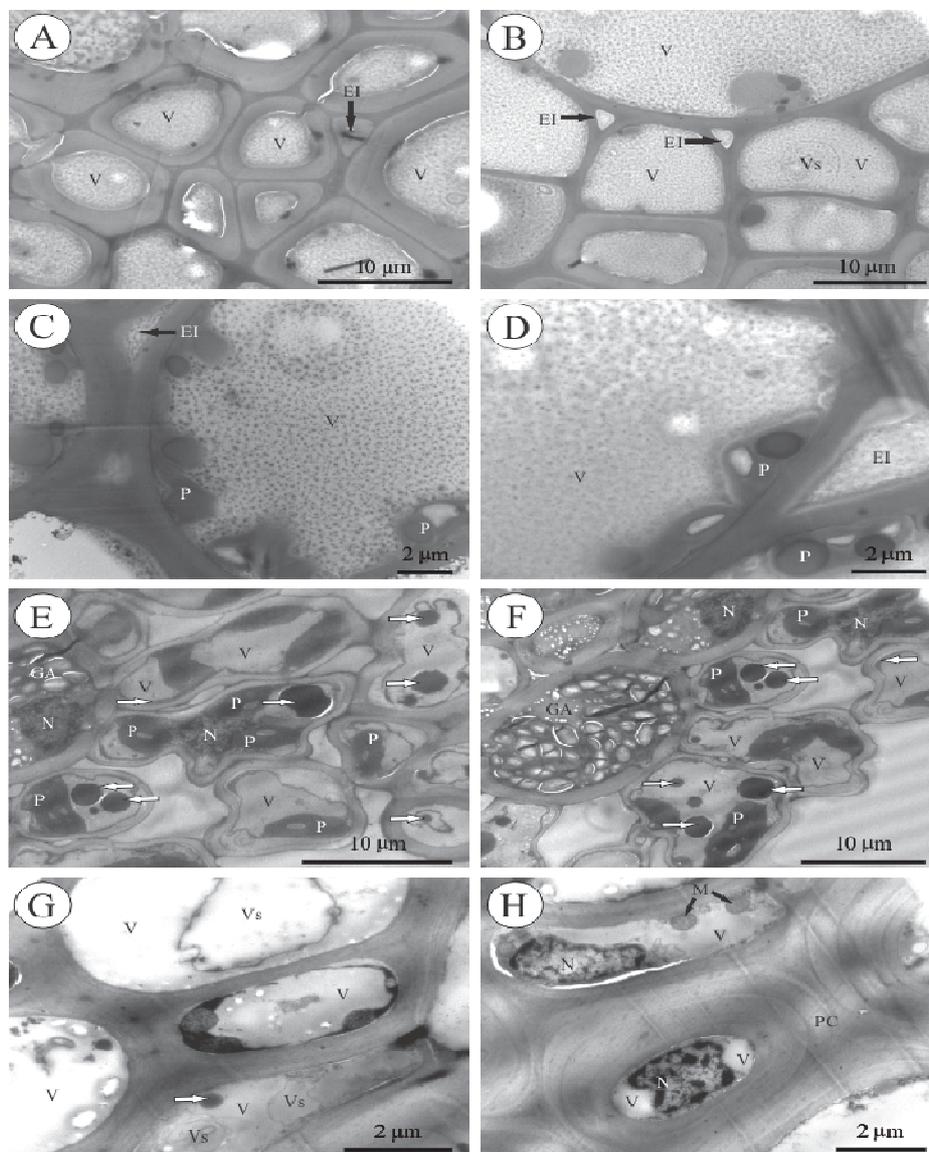


Figura 6 Eletromicrografia de transmissão de *Andropogon* sp. mostrando alterações celulares na possível adaptação à elevada concentração de elementos tóxicos. (A) a (D), raiz; (E) a (H), parte aérea. V = Vacúolo, Vs = Vesícula, EI = Espaço intercelular, N = Núcleo, P = Plastídio, GA = Grão de amido, M = Mitocôndria, PC = Parede celular, Setas = Material eletro-denso

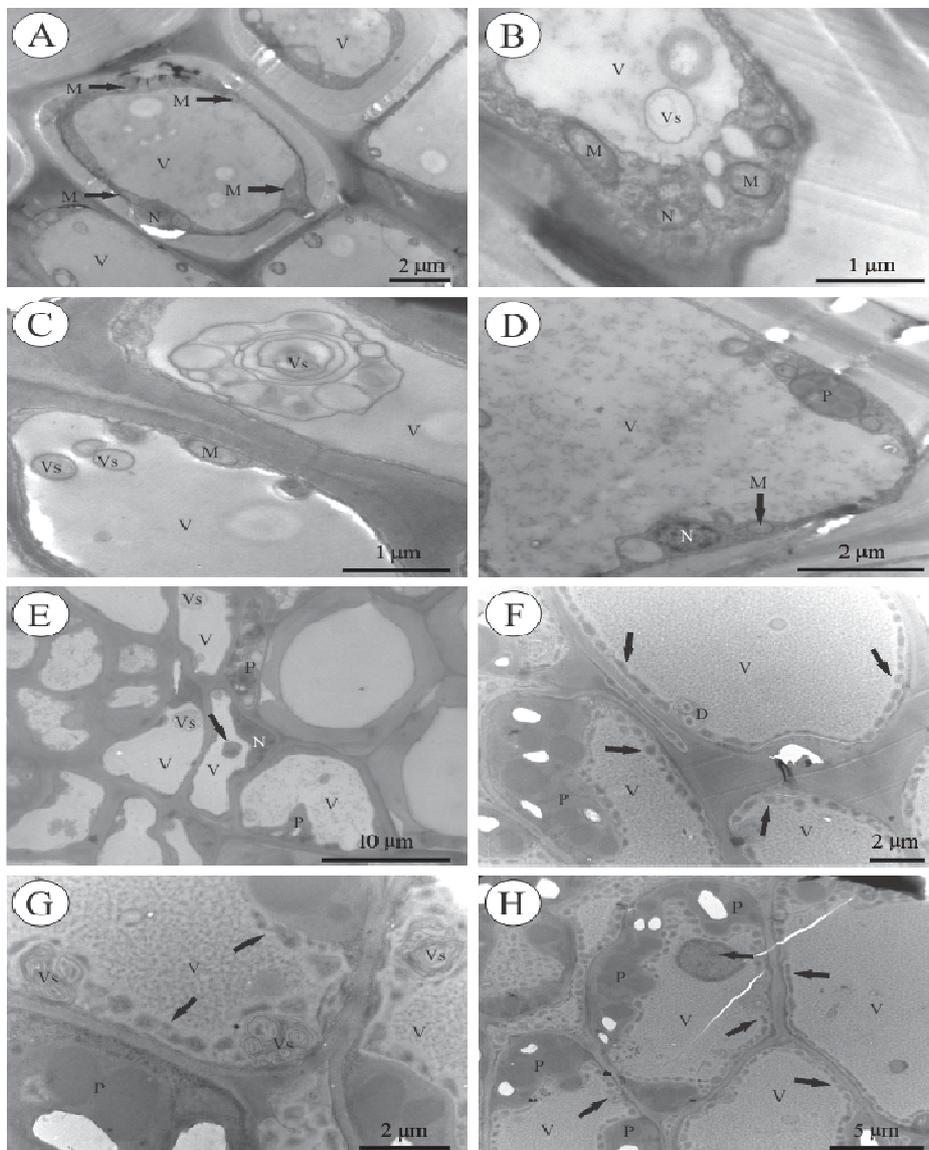


Figura 7 Eletromicrografia de transmissão de *Gomphrena clausenii* Moq. mostrando alterações celulares na possível adaptação à elevada concentração de elementos tóxicos. (A) a (D), raiz; (E) a (H), parte aérea. V = Vacúolo, Vs = Vesícula, M = Mitocôndria, N = Núcleo, P = Plastídio, PC = Parede celular, Setas = Material eletro-denso

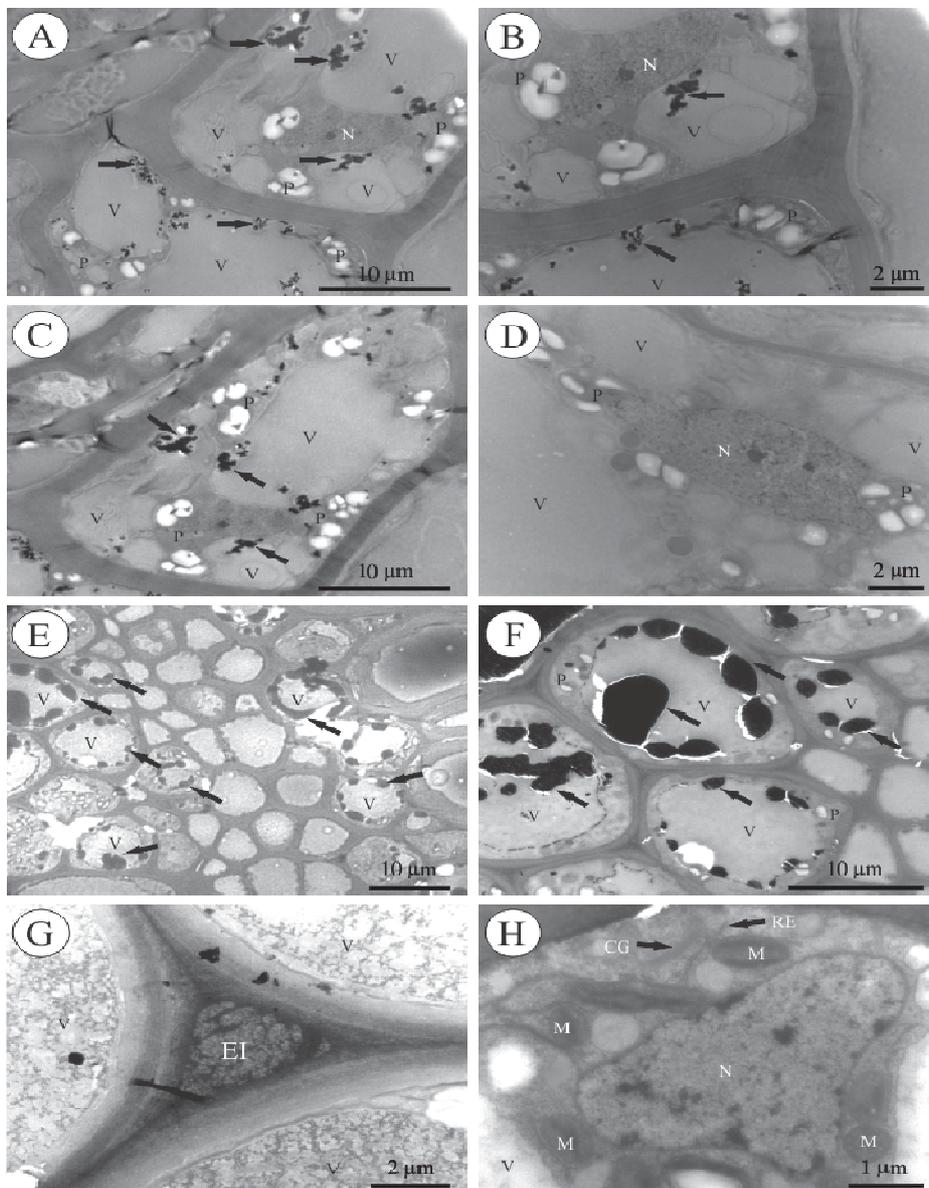


Figura 8 Eletromicrografia de transmissão de *Pteris* sp. mostrando alterações celulares na possível adaptação à elevada concentração de elementos tóxicos. (A) a (D), raiz; (E) a (H), parte aérea. V = Vacúolo, M = Mitocôndria, N = Núcleo, P = Plastídio, EI = Espaço intercelular, CG = Complexo de Golgi, RE = Retículo endoplasmático, Setas = Material eletro-denso

4 CONCLUSÕES

Os resultados revelam que as espécies em estudo mostraram grande habilidade, especialmente, no que diz respeito à organização celular, em tolerar altas concentrações de Zn, Cd e Pb, por meio do uso de complexos mecanismos de captura destes elementos em estruturas particulares como espaços intercelulares e vacúolos, ou pela formação de cristais de oxalato que são capazes de reter estes elementos como forma de regulação de íons e, ainda, auxiliar na proteção mecânica da planta.

REFERÊNCIAS

- ALLOWAY, B. J. The origin of heavy metals in soils. In: _____. **Heavy metals in soils**. New York: J. Wiley, 1990. p. 29-39.
- AZZARELLO, E. et al. Ultramorphological and physiological modifications induced by high zinc levels in *Paulownia tomentosa*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 81, p. 11-17, Sept. 2012.
- BAKER, A. M. J.; BROOKS, R. R. Terrestrial higher plants with hyperaccumulate metallic elements: a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, Berkhamsted, v. 1, p. 81-126, 1989.
- BASILE, A. et al. Effects of heavy metals on protonemal development and ultrastructure in populations of the moss *Funaria hygrometrica* Hedw (Bryophyta) from a mine and an unpol-luted site. **Fresenius Environmental Bulletin**, Berlin, v. 17, n. 11, p. 1956-1963, 2008.
- BLODGETT, J. T. et al. Soil amendments and watering influence the incidence of endophytic fungi in *Amaranthus hybridus* in South Africa. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 2, p. 311-318, Feb. 2007.
- CHOI, Y. E. et al. Detoxification of cadmium in tobacco plants: Formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 1, p. 45-50, May 2001.
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, p. 1707-1719, July 2006.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução N° 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 27 jan. 2013.
- DOU, C. et al. Accumulation and interaction of calcium and manganese in *Phytolacca americana*. **Plant Science**, Shannon, v. 177, n. 6, p. 601-606, Dec. 2009.

FAHEED, F.; MAZEN, A.; ELMOHSEN, S. A. B. D. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. **Turkish Journal of Botany**, Sohag, v. 37, n. 1, p. 139-152, 2013.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos**. Lavras: UFLA, 2003. Software.

FOSTER, A. S. Plant idioblasts: remarkable examples of cell specialization. **ProtoPlasma**, Karlsruhe, v. 46, p. 184-193, 1956.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 41-71, 2005.

GUNNING, B. E. S.; STEER, M. W. **Plant cell biology an ultrastructural approach**. Ann Arbor: E. Arnold, 1975. 280 p.

HA, N. T. H. et al. Uptake of metals and metalloids by plants growing in a lead-zinc mine area, Northern Vietnam. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 186, n. 2/3, p. 1384-1391, Feb. 2011.

ISAURE, M. P. et al. Calcium promotes cadmium elimination as vaterite grains by tobacco trichomes. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, London, v. 74, n. 20, p. 5817-5834, Oct. 2010.

_____. Localization and chemical forms of cadmium in *Arabidopsis thaliana*. **Spectrochimica Acta B**, London, v. 61, n. 12, p. 1242-1252, 2006.

KRAMER, U. Metal hyperaccumulation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 517-534, 2010.

LANG, I.; WERNITZNIG, S. Sequestration at the cell wall and plasma membrane facilitates zinc tolerance in the moss *Pohlia drummondii*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 74, p. 186-193, Dec. 2011.

LAPERCHE, V. et al. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 31, n. 10, p. 2745-2753, Oct. 1997.

LEFÈVRE, I. Chloride salinity reduces cadmium accumulation by the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus* L. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 65, n. 1, p. 142-152, Jan. 2009.

MA, J. F. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 5, p. 731-736, Mar. 2005.

MAZEN, A. M. A.; EL MAGHRABY, O. M. O. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. **Biology Plantarum**, Copenhagen, v. 40, n. 3, p. 411-417, 1997.

NAJEEB, U. et al. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effusus* L. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 170, n. 2/3, p. 1156-1163, Oct. 2009.

PENG-JIE, H. U. et al. Cellular tolerance, accumulation and distribution of cadmium in leaves of Hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Pedosphere**, Bethesda, v. 22, n. 4, p. 497-507, 2012.

RODRIGUEZ, R. J.; REDMAN, R. S. Fungal life-styles and ecosystem dynamics: biological aspects of plant pathogens, plant endo-phytes and saprophytes. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 24, p. 169-193, 1997.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-668, 1998.

SARRET, G. et al. Chemical forms of calcium in Ca, Zn- and Ca, Cd-containing grains excreted by tobacco trichomes. **Canadian Journal of Chemistry**, Ottawa, v. 85, n. 10, p. 738-746, Oct. 2007.

_____. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 130, n. 4, p. 1815-1826, Dec. 2002.

_____. Trichomes of tobacco excrete zinc as Zn-substituted calcium carbonate and other Zn-containing compounds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 141, n. 3, p. 1021-1034, July 2006.

SARRET, G. et al. Zinc distribution and speciation in Arabidopsis halleri Arabidopsis lyrata progenies presenting various zinc accumulation capacities. **New Phytologist**, Cambridge, v. 184, n. 3, p. 581-595, 2009.

TIAN, S. K. et al. Cellular sequestration of cadmium in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 157, p. 1914-1925, Dec. 2011.

_____. Spatial imaging and speciation of lead in the accumulator plant *Sedum alfredii* by microscopically focused synchrotron x-ray investigation. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 44, n. 15, p. 5920-5926, Aug. 2010.

TURNAU, K. et al. Metal uptake and detoxification mechanisms in *Erica andevalensis* growing in a pyrite mine tailing. **Environmental and Experimental Botany**, London, v. 61, n. 2, p. 117-123, Nov. 2007.

TURNAU, K.; KOTTKE, I. Fungal activity as determined by micro-scale methods with special emphasis on interactions with heavy metals. In: DIGHTON, J. (Ed.). **The fungal community**. New York: M. Dekker, 2005. p. 287-305.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3051a**: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Washington, 1998. 30 p.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyper-accumulation in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 181, n. 4, p. 759-776, Mar. 2009.

VERKLEIJ, J. A. C. et al. Dualities in plant tolerance to pollutants and their uptake and translocation to the upper plant parts. **Environmental and Experimental Botany**, London, v. 67, n. 1, p. 10-22, Nov. 2009.

YANG, Y. Y. et al. Identification of rice varieties with high tolerance or sensitivity to lead and characterization of the mechanism tolerance. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, n. 3, p. 1019-1026, Nov. 2000.

YING, R. et al. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplastin Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 81-87, Jan. 2010.