UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

BIOACUMULAÇÃO DE COBRE POR TRÊS ESPÉCIES DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS: IMPLICAÇÕES PARA MANEJO DE EFLUENTES

JANAINA CASSINS VON DER OSTEN

Sinop, Mato Grosso
Fevereiro, 2015

JANAINA CASSINS VON DER OSTEN

BIOACUMULAÇÃO DE COBRE POR TRÊS ESPÉCIES DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS: IMPLICAÇÕES PARA MANEJO DE EFLUENTES

Prof. Dr. Rafael Soares de Arruda
Prof. Dr. Ricardo Lopes Tortorela de Andrade

Artigo apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Ambientais, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Federal do Mato Grosso - UFMT, Campus Universitário de Sinop.

Sinop, Mato Grosso
Fevereiro, 2015

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP – CUS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS NATURAIS HUMANAS E SOCIAIS - ICNHS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS

PPGCAM

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : Comparação da Bioacumulação de Cobre por três Macrófitas Aquáticas: Implicações para Manejo de Efluentes

AUTOR : Janaina Saiz Cassins von der Osten

Dissertação defendida e aprovada em 23/02/2015.

Composição da Banca Examinadora:

CPF: 609.477.301 – 25

Presidente Banca / Orientador: Prof. Dr. Rafael Soares de Arruda

UFMT/ Campus Sinop - CUS

CPF: 027.033.049 - 60

Examinador Interno. Profª. Drª Roselene Maria Schneider

UFMT/ Campus Sinop - CUS

CPF: 048.905.279 - 74

Examinador Externo. Prof. Dr. Cornélio Alberto Zolin

EMBRAPA Agrossilvipastoril

SINOP, 23/02/2015.

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S158b Saiz Cassins von der Osten, Janaina.
Bioacumulação de cobre por três espécies de macrófitas aquáticas: implicações para manejo de efluentes / Janaina Saiz Cassins von der Osten. -- 2015
x, 20 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Rafael Soares de Arruda.
Co-orientador: Ricardo Lopes Tortorela de Andrade.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Sinop, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. bioacumulação. 3. metais pesados. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

SINOPSE

Estudou-se a bioacumulação de cobre em três espécies de macrófitas aquáticas em condições experimentais. A concentração do metal acumulado e desempenho das espécies foram avaliadas.

Palavras-Chaves: Fitorremediação, bioacumulação, metais pesados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de todos a Deus pelas oportunidades, alegrias e dificuldades encontradas em meu caminho e por nunca estar sozinha em momento algum, pois todas as pessoas que me acompanham nesta jornada não estão comigo por acaso.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rafael Soares de Arruda, que sempre me apoiou, incentivando-me e mostrando-me que tanto na pesquisa, quanto na vida, "não há porque dificultar as coisas que são simples".

Ao Prof. Dr. Ricardo Lopes Tortorela de Andrade pela co-orientação, paciência e humildade no compartilhamento de seus conhecimentos, sendo meu maior exemplo de amor pela docência.

Ao Prof. Dr. Leandro Dênis Battirola pelo companheirismo, conselhos e dedicação ao nosso projeto.

À Profª. Drª. Roselene Schneider pelos conselhos, risadas e momentos de alegria no laboratório.

À querida Luciana Vieira Mattos, sempre com as palavras certas, na hora certa, pelo companheirismo e ombro amigo em todas as horas e também pelo apoio na utilização do Laboratório de Química Inorgânica - Lipeq, da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop.

Ao querido amigo Marcos Venícios pelas incansáveis horas de trabalho e pela dedicação à pesquisa.

Aos amigos Bruno Beber e Remi Silva e Sá por não medirem esforços para que nossas pesquisas se realizassem, sempre com carinho e boa vontade em ajudar.

Às minhas "meninas" Sabrine Lunardi, Franciele Freitas e Larissa Braun, agradeço pela companhia agradável, alegria e por tudo o que passamos juntas.

Às minhas amigas Hocelayne Fernandes e Débora Linsbinski, que sempre estiveram ao meu lado desde o início desta jornada e por dividirem comigo as alegrias e tristezas da vida acadêmica.

À minha querida bailarina Rafaelly Nardino, pela amizade e companheirismo sempre.

Aos amigos que fiz na UFMT: Mariana, Roberto, Joelson, Pedro, Iracema, Vilma, Dulce e Cintia.

Aos colegas Clóvis Kitagawa pelo apoio e dedicação na realização das coletas.

Ao meu marido Pedro Luiz von der Osten pelo apoio, incentivo e paciência em todos os momentos.

Aos meus amados filhos, Pedro Henrique e Letícia, que sempre tinham um abraço apertado e carinhoso para me dar forças.

Ao meu pai Jades Cassins "*in memorian*" por ter-me feito prometer que iria estudar sempre.

Aos meus familiares pelo carinho e incentivo para que este projeto se realizasse.

À minha “irmã” de coração, Carla Nishimura, pela amizade e apoio, sempre me incentivando e me fornecendo seu ombro amigo nas horas difíceis.

À minha amiga Deise Martins Uriu, pela amizade, carinho e paciência em todos os momentos, fossem de alegria ou tristeza, sempre ao meu lado, nunca me deixando desistir.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todos que não foram citados, mas que estavam ao meu lado, me apoiando e torcendo, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A poluição causada pela industrialização e pelo crescimento populacional tem diminuído a qualidade da água para consumo humano. Para contribuir com a melhoria da qualidade das águas de efluentes domésticos e industriais, tem sido muito estudado o uso da fitorremediação. Este estudo teve como objetivo comparar experimentalmente as espécies de macrófitas aquáticas *Eichhornia crassipes*, *Salvinia natans* e *Salvinia auriculata* na acumulação de cobre em condições laboratoriais. Os materiais vegetais foram coletados na cidade de Alta Floresta, estado de Mato Grosso. O experimento foi conduzido com controle de pH da água e luminosidade. Amostras das três espécies de macrófitas foram cultivadas com solução de nutriente em concentrações de 1, 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$ de cobre e a solução controle, sem contaminação. A cada sete dias foram analisadas as concentrações de cobre em três amostras. As concentrações do íon cobre foram determinadas por espectrometria de absorção atômica em chama de ar/acetileno. Para as análises estatísticas foram utilizados modelos de ANOVA no ambiente R. Com a análise dos dados pode-se inferir que as três espécies analisadas no experimento acumularam o cobre em suas estruturas havendo diferenças no desempenho de acumulação entre as mesmas. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios, indicando a necessidade de prosseguimento nas pesquisas tendo em vista a ampla aplicação de fitorremediadores.

Palavras-Chave: Fitoremediação, bioacumulação, metais pesados, macrófitas aquáticas.

ABSTRACT

The pollution caused by industrialization and population growth has decreased the quality of water for human consumption. To contribute to improving the quality of water for domestic and industrial effluents, has been extensively studied the use of phytoremediation. This study aimed to experimentally compare the species of aquatic macrophytes *Eichhornia crassipes*, *Salvinia natans* and *Salvinia auriculata* in copper accumulation in laboratory conditions. The plant material was collected in the city of Alta Floresta, Mato Grosso. The experiment was carried out with pH control of water and light. Samples of three species of weeds were cultivated with the nutrient solution at concentrations of 1, 3 and 5 $\mu g.mL^{-1}$ of copper and the control solution without contamination. Every seven days were analyzed copper concentrations in three samples. The copper ion concentrations were determined by atomic absorption spectrometry flame air / acetylene. For statistical analysis we used ANOVA models in R. environment with data analysis can be inferred that the three species analyzed in the experiment accumulated copper in their structures were no differences in the performance of accumulation between them. The results were satisfactory, indicating the need for further research in considering the wide application of phytoremediation.

Descriptors: Phytoremediation, bioacumulation, heavy metals, aquatic weeds

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
2 MATERIAL E MÉTODOS 2
2.1 Coleta de Amostras 2
2.2 Preparo de soluções e instrumentação 2
2.3 Determinação da concentração de cobre bioacumulado 3
2.4 Análises Estatísticas 5
3 RESULTADOS 6
3.1 Bioacumulação em *Eichhoria crassipes* 6
3.2 Bioacumulação em *Salvinia natans* 8
3.3 Bioacumulação em *Salvinia auriculata* 10
4 DISCUSSÃO 11
4.1 Comparações interespecíficas 11
4.2 Bioacumulação em *Eichhornia crassipes* 12
4.3 Bioacumulação em *Salvinia natans* 12
4.4 Bioacumulação em *Salvinia auriculata* 13
4.5 Implicações para fitorremediação 14
5 CONCLUSÕES 15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 16
APÊNDICE A – Tabela ANOVA *Eichhornia crassipes* 18
APÊNDICE B – Tabela ANOVA *Salvinia natans* 19
APÊNDICE C – Tabela ANOVA *Salvinia auriculata* 20
ANEXO – Normas da Revista Environmental and Experimental Botany 21

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Bateria1 do Experimento contendo quatro recipientes com concentrações de 1, 3 e 5 μg.mL^{-1} de cobre na forma de $CuSO_4.5H_2O$, bem como um recipiente controle sem adição de cobre. 4
FIGURA 2 - Teor de cobre acumulado na parte vegetativa e raízes de *E. crassipes* nos tratamentos 1, 3 e 5 μg.mL^{-1} e controle nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias. 6
FIGURA 3 - Fases do experimento de bioacumulação de cobre por *E. crassipes* - (a) 1º dia, (b) 7º dia, (c) 14º dia, (d) 21º dia. 8
FIGURA 4 - Teor de cobre acumulado nas folhas e raízes de *S. natans* nos tratamentos 1, 3 e 5 μg.mL^{-1} e controle nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias. 9
FIGURA 5 - Fases do experimento no tratamento de 3 μg.mL^{-1} - bioacumulação de cobre por *S. natans* – diferenças na coloração e vitalidade das plantas (a) 1º dia, (b) 7º dia, (c) 14º dia, (d) 21º dia. 9
FIGURA 6 - Teor de cobre acumulado na *S. auriculata* nos tratamentos 1, 3 e 5 μg.mL^{-1} e controle nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias. 10
FIGURA 7 - Fases do experimento de bioacumulação de cobre por *S. auriculata* – alteração na cor e vitalidade das plantas no decorrer do experimento - (a) 1º dia, (b) 7º dia, (c) 14º dia, (d) 21º dia. 11

1 INTRODUÇÃO[1]

Nos últimos 50 anos, devido ao elevado crescimento populacional associado à busca por melhor qualidade de vida, ocorreram significativos aumentos na produção industrial e agrícola. Seja de maneira natural ou antrópica, os resíduos gerados por esses processos quando lançados nos corpos hídricos resultam em consequente alteração da qualidade da água (Rosa *et al*., 2012). Das diversas formas de contaminação de ambientes aquáticos decorrentes de resíduos industriais e agrícolas, os metais pesados são considerados os principais poluentes e potencialmente citotóxicos, carcinogênicos e mutagênicos, embora alguns sejam essenciais em processos metabólicos vitais aos organismos, a exemplo do cobre (Hadjiliadis, 1997). Segundo Rosa *et al.* (2012), a toxicidade do metal está diretamente relacionada à dose ou tempo de exposição, à forma físico-química do elemento e da via de administração, podendo esses metais serem classificados de acordo com o grau de toxicidade em metais essenciais ou potencialmente tóxicos.

Muitos processos químicos, físicos ou biológicos são empregados para a redução ou remoção de íons metálicos de soluções aquosas, porém, apresentam inconvenientes como alto consumo de energia e produtos químicos, o que desfavorece o custo/benefício de muitos métodos convencionais. A fitorremediação é uma tecnologia ambiental baseada na remoção de substâncias tóxicas ou não do meio ambiente (água, solo e ar) utilizando plantas enraizadas no solo, sedimento ou flutuantes, a fim de degradar, transformar, imobilizar ou estabilizar vários poluentes orgânicos e inorgânicos presentes no solo, lama ou águas residuais (Barbafieri & Tassi, 2011). O processo de fitorremediação é fundamentado na adsorção de metais pelas raízes e sua translocação para a parte aérea (folhas). O processo de remediação utilizando plantas aquáticas vivas contém dois processos de captação: a biossorção que é um processo reversível e rápido quanto à adsorção de nutrientes e de substâncias tóxicas (metais) e a bioacumulação que é um processo lento, irreversível, que requer a energia viva da planta (Keskinkan *et al*.,2003; César & Marco, 2004; Wang *et al.*, 2008; Khellaf & Zerdaoui, 2009).

É comum o uso de macrófitas como um componente de tratamento biológico de águas residuais contaminadas com metais pesados. Para o tratamento de efluentes de suinocultura e a prevenção da contaminação de córregos, a Embrapa Suínos e Aves

[1] Manuscrito formatado segundo as normas da revista Environmental and Experimental Botany, anexo I.

(Concórdia, SC) desenvolveu um sistema que termina com um tanque de *Eichhornia crassipes* (Pott & Pott, 2000), pois os dejetos líquidos de suínos contêm alta concentração de metais pesados como zinco e cobre, o que os torna uma fonte poluidora com alto potencial de contaminação ambiental (Smanhotto, 2010). Estudos com cromo (Prado *et al.*, 2010) têm demonstrado que várias macrófitas aquáticas são capazes de reduzir Cr VI para a forma menos tóxica Cr III durante o processo de biossorção desse metal nas raízes.

A capacidade filtradora e despoluidora das plantas aquáticas por si só justifica sua importância e seu estudo (Pott & Pott, 2000). Neste sentido, o presente estudo teve a finalidade de avaliar comparativamente a eficiência de três espécies de macrófitas aquáticas, *Eichhornia crassipes* Mart (Pontederiaceae), *Salvinia natans* All (Salvinaceae) e *Salvinia auriculata* Aubl (Salviniceae), como bioacumuladoras de metais pesados, analisando experimentalmente seu potencial acumulativo de cobre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta de Amostras

As amostras das macrófitas aquáticas utilizadas para o estudo foram coletadas em diferentes em três corpos de água no município de Alta Floresta, norte do Estado do Mato Grosso: Local 1, *E. crassipes*: 9°53'54,9" S 56°03'38,5" W; Local 2, *S. natans*: 9°51'11,81" S 56°4'50,61" W; Local 3, *S. auriculata*: 09°87´66,5” S 56°09`82,3” W.

2.2 Preparo de soluções e instrumentação

Foi realizado um pré-tratamento de todo o instrumental de laboratório utilizado nos experimentos visando à eliminação de traços de metais que pudessem interferir nas determinações de cobre. Antes da utilização, todos os materiais foram lavados com detergente neutro, enxaguados em água corrente e água destilada para posterior imersão em solução de 10% HNO_3 por um período de 24 horas. Depois os materiais foram enxaguados com água destilada e secos em estufa a 60 ^{0}C ou, no caso dos tubos falcon e demais materiais que não podem ser secos em estufa, a secagem foi realizada à temperatura ambiente. Os reagentes utilizados foram os de grau analítico e a solução estoque do cátion cobre 1.000 mg.L^{-1},

utilizada para a curva de calibração foi padrão rastreável ao NIST (National Institute of Standards and Technology).

2.3 Determinação da concentração de cobre bioacumulado

O experimento foi conduzido em condições laboratoriais, com controle de luminosidade e de pH da água utilizada para o cultivo das macrófitas. Para o controle da luminosidade foram usadas luminárias duplas com lâmpadas fluorescentes tubulares 20W T8 a uma distância de 30 cm de cada bacia de cultivo, acesas por um período de 10 horas/dia, das 7h00 às 17h00 horas. Doze recipientes contendo 30 litros de água potável receberam a adição de 240 mL de solução 1 $mol.L^{-1}$ de $(NH_4)_2CO_3$ e 90 mL de solução 1 $mol.L^{-1}$ de K_2HPO_4. O pH foi ajustado entre 6,5 e 7,0 com HNO_3 1 $mol.L^{-1}$ e solução 1 $mol.L^{-1}$ de KH_2PO_4 sempre que o pH ultrapassava o valor de 7,0 (faixa de pH dos locais de coleta).

As espécies *E. crassipes*, *S. natans* e *S. auriculata* foram analisadas separadamente, após cada período de 21 dias de tratamento para cada uma das espécies. Para o experimento foram preparadas três baterias, cada uma contendo quatro recipientes, onde cada um representou uma concentração de 1, 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$ de cobre na forma de $CuSO_4.5H_2O$, bem como um recipiente controle sem contaminação por cobre. Para o experimento com *E. crassipes*, cada recipiente recebeu nove amostras das macrófitas aquáticas, previamente lavadas em água corrente e selecionadas quanto à uniformidade de tamanho, para manter uma homogeneidade das amostras. No caso das espécies *S. natans* e *S. auriculata*, devido à biomassa ser menor, foram utilizadas 45 amostras. Os recipientes foram posteriormente fechados com plástico transparente para controlar a perda de água por evaporação e evitar a contaminação por poeira ou insetos (Figura 1).

FIGURA 1 – Bateria1 do Experimento contendo quatro recipientes com concentrações de 1, 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$ de cobre na forma de $CuSO_4.5H_2O$, bem como um recipiente controle sem adição de cobre.

Trinta e seis indivíduos da espécie *E. crassipes* que não foram adicionados aos recipientes do experimento foram separados em raiz e parte vegetativa e secos em estufa a uma temperatura de 70 ^{0}C por sete dias. Estas plantas representaram o tempo zero, ou seja, serviram para avaliar a presença de traços de contaminação por cobre oriundos do local de coleta. Nas espécies *S. natans* e *S. auriculata*, foram utilizados dez exemplares representando o tempo zero.

Em três intervalos de sete dias foram retirados aleatoriamente três indivíduos de cada recipiente, lavados em água corrente, separados em raiz e parte vegetativa e secos em estufa a uma temperatura de 70 ^{0}C por sete dias. No caso da *S. auriculata*, não foi possível realizar a separação das partes da planta.

Após a secagem, as amostras foram trituradas em triturador rotativo para posterior digestão. O método utilizado para a digestão foi descrito por Jones & Case (1990) e Hseu (2004), com modificações que se fizeram necessárias devido às características das amostras. Foram digeridas 0,200 g de amostra com uma mistura de H_2SO_4 P.A. e H_2O_2 35%. Foram adicionados 7 ml de H_2SO_4 P.A. a cada amostra e os tubos contendo as amostras e o ácido foram agitados para melhor homogeneização. Após 1 hora em repouso à temperatura ambiente foram adicionados lentamente em parcelas de 0,5 mL até atingir o volume de 3 mL de H_2O_2 35%, agitando vigorosamente e levando ao bloco digestor a 250 ^{o}C por 2 horas. Após este período, as amostras foram retiradas do bloco digestor, resfriadas por 30 minutos e adicionados lentamente em parcelas de 0,5 mL, 4 mL de H_2O_2 35%, agitando vigorosamente

até clareamento das mesmas. Este procedimento de adição fracionada de 0,5 mL foi adotado para impedir o transbordamento das amostras durante a reação. Após repouso de doze horas, as amostras foram transferidas para balão volumétrico de 25 mL, sendo completado o volume com água destilada e o volume final transferido para tubos falcon para a determinação das concentrações do íon cobre.

As concentrações de cobre presentes nas amostras das macrófitas aquáticas foram determinadas por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama de ar/ acetileno, utilizando espectrômetro Varian AA 140. O cálculo da massa de cobre bioacumulada em cada amostra analisada foi obtido pela fórmula:

$$Cu_{\mu g.g^{-1}} = \frac{L\ x\ 25\ x\ d}{m}$$

Em que: L é a concentração de Cu na amostra digerida; d é o fator de diluição; m é a massa da amostra pesada para a digestão.

2.4 Análises Estatísticas

Para determinar se existiam diferenças médias significativas entre os tratamentos de bioacumulação com as três espécies de macrófitas nos três tratamentos de 1, 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$ e o controle (sem contaminação) nos quatro períodos analisados (0, 7, 14 e 21 dias), foram construídos modelos de ANOVA para cada espécie, considerando estes dois fatores como efeitos fixos. A variável dependente do modelo foi a concentração de cobre bioacumulado nas espécies analisadas, quantificadas a cada sete dias. Para a construção do modelo foi utilizado o pacote vegan (Oksanen *et al.*, 2013) no ambiente R (R Core Team, 2014).

3 RESULTADOS

3.1 Bioacumulação em *Eichhoria crassipes*

Os resultados encontrados em relação à concentração de cobre nas amostras de *E. crassipes* no tempo zero, não submetidas ao tratamento, apresentaram a presença de cobre em concentrações de 3 a 11 µg na parte vegetativa e 1 a 24 µg nas raízes. A concentração de Cu nas amostras de *E. crassipes* aumentou com o tempo de exposição e com o aumento do grau de contaminação. As raízes da planta apresentaram um aumento do teor de cobre nos tratamentos 1 e 3 $\mu g.mL^{-1}$ em todos os períodos, apresentando maior variação nos níveis de cobre encontrados na última amostragem do tratamento 5 $\mu g.mL^{-1}$ (Figura 2). Na análise do acúmulo de cobre durante os 21 dias de experimento, as amostras do controle apresentaram uma variação de concentração mínima e máxima de 7 a 21 µg na parte vegetativa e 16 a 56 µg nas raízes. Em todos os tratamentos ao longo de todos os dias, ocorreu diferença média significativa na bioacumulação de Cu tanto para as folhas quanto para as raízes (Tabela 1, Apêndice A).

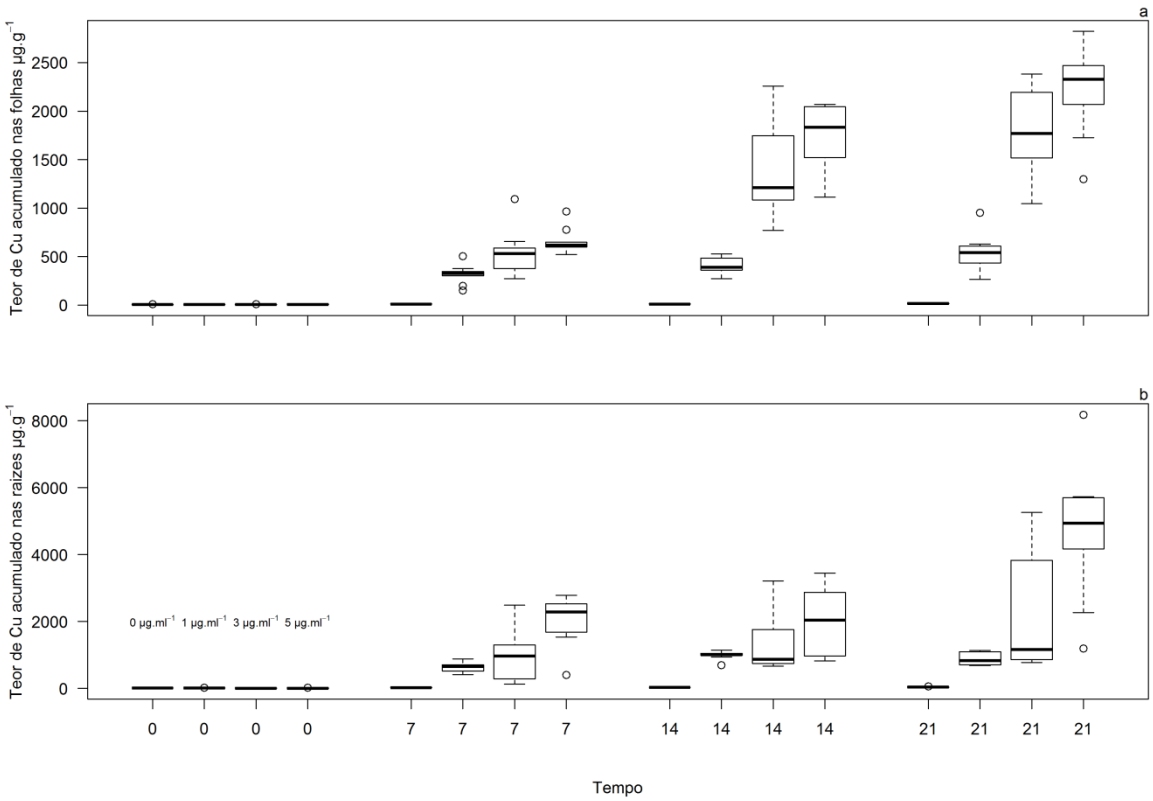

FIGURA 2 - Teor de cobre acumulado na parte vegetativa e raízes de *E. crassipes* nos tratamentos 1, 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$ e controle nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias.

Tabela 1 – Valores totais de bioacumulação de cobre nas espécies *E. crassipes*, *S. natans* e *S. auriculata* nos três períodos de coleta de amostras.

Concentração de Cobre	Espécies	Dias do experimento		
		7 dias (µg)	**14 dias (µg)**	**21 dias (µg)**
1 µg.mL^{-1}	***E.* crassipes**	8.513^{A,a}	12.610^{A,b}	12.916^{A,c}
	S. natans	6.320^{B,a}	4.733^{B,b}	1.686^{B,c}
	S. auriculata	6.169^{C,a}	5.153^{C,b}	
3 µg.mL^{-1}	***E. crassipes***	14.033^{A,a}	25.737^{A,b}	36.456^{A,c}
	S. natans	40.429^{B,a}	35.519^{B,b}	2.100^{B,c}
	S. auriculata	23.336^{Ca}	48.705^{C,b}	
5 µg.mL^{-1}	***E. crassipes***	24.313^{A,a}	33.455^{A,b}	61.885^{A,c}
	S. natans	46.181^{B,a}	44.468^{B,b}	34.030^{B,c}
	S. auriculata	30.228^{C,a}	75.281^{C,b}	
Controle (sem contaminação)	***E. crassipes***	336^{A,a}	371^{A,b}	469^{A,c}
	S. natans	608^{B,a}	302^{B,b}	100^{B,c}
	S. auriculata	177^{C,a}	875^{C,b}	

Letras maiúsculas diferentes na vertical representam médias com diferença significativa. Letras minúsculas na horizontal representam médias com diferença significativa.

Durante os 21 dias de experimento, as amostras das concentrações de 1, 3 e 5 µg.mL^{-1} apresentaram variações de concentração mínima e máxima de cobre na parte vegetativa de 150 a 952 µg, 272 a 2382 µg e 520 a 2823 µg, respectivamente. Nas raízes, as variações na concentração mínima e máxima de cobre nos tratamentos 1, 3 e 5 µg.mL^{-1} foram, respectivamente, de 408 a 1133 µg, 132 a 5258 µg e 405 a 8180 µg. Em todos os tratamentos, os exemplares de *E. crassipes* apresentaram aparentes sinais de perda de vitalidade no decorrer do experimento (Figura 3).

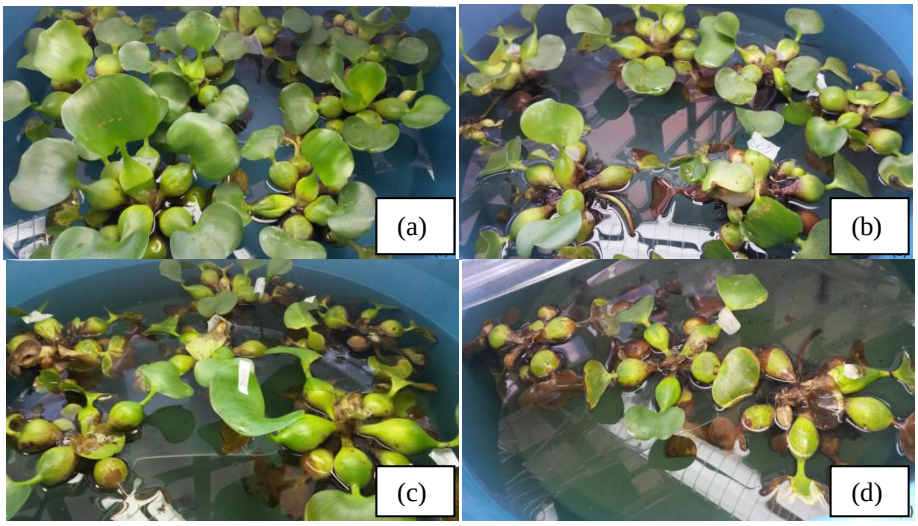

FIGURA 3 - Fases do experimento de bioacumulação de cobre por *E. crassipes* - (a) 1º dia, (b) 7º dia, (c) 14º dia, (d) 21º dia.

3.2 Bioacumulação em *Salvinia natans*

Os resultados encontrados nas análises das amostras para a determinação da concentração de cobre na macrófita *S. natans* no tempo zero, não submetidas ao tratamento, apresentaram a presença de cobre variando de 7,49 a 48,58 μg na parte vegetativa e 19,0 a 60,0 μg nas raízes. Na parte vegetativa e nas raízes da *S natans,* o teor de cobre bioacumulado foi crescente até o 7º dia de experimento nos três tratamentos de 1, 3, e 5 $\mu g.mL^{-1}$. Na parte vegetativa, no tratamento de 1 $\mu g.mL^{-1}$ iniciou-se um decréscimo na concentração de cobre a partir da coleta do 14º dia, enquanto nos tratamentos de 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$, as amostras apresentaram concentrações com pequenas alterações em relação ao 7º dia. As amostras coletadas no 21º dia, exceto as do tratamento 5 $\mu g.mL^{-1}$ apresentaram queda na concentração de cobre. Em todos os tratamentos ao longo de todos os dias, ocorreu diferença média significativa na bioacumulação de Cu tanto para as folhas quanto para as raízes (Tabela 1, Apêndice B).

Nas raízes da *S. natans*, a partir do 7º dia, os tratamentos de concentração de 1 e 3 $\mu g.mL^{-1}$ apresentaram queda na absorção do metal até o final do experimento. Na concentração 5 $\mu g.mL^{-1}$, do 7º ao 14º dia, a absorção manteve-se praticamente constante e a partir do 14º dia, iniciou-se uma significativa queda na bioacumulação do metal até o final do experimento.

A concentração de cobre bioacumulado no período de 21 dias na parte vegetativa nos tratamentos de 1, 3 e 5 µg.mL^{-1} apresentaram variações mínimas e máximas de 65 a 839,99 µg, 237,38 a 1261,24 µg e 126,19 a 6275 µg, respectivamente. Nas raízes, as variações mínimas e máximas na concentração de cobre nos tratamentos 1, 3 e 5 µg.mL^{-1} foram, respectivamente, de 80 a 1110 µg, 1430 a 7880 µg e 530 a 9570 µg (Figura 4).

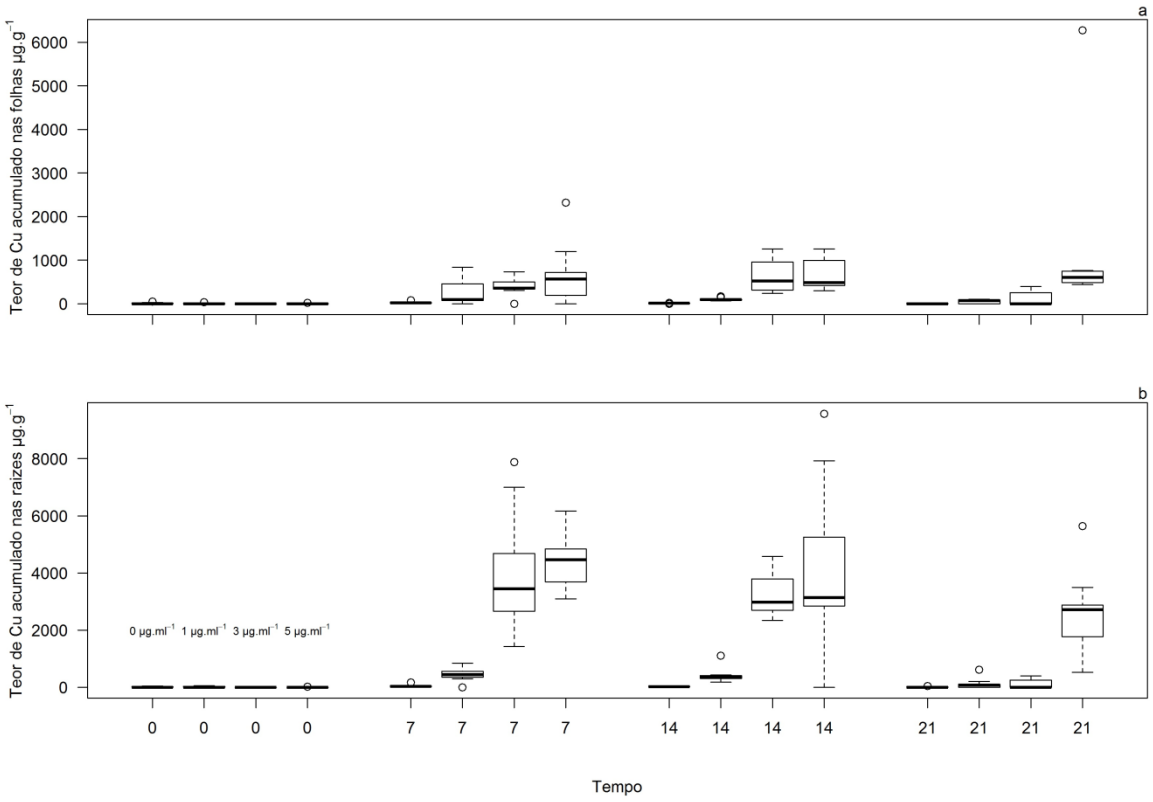

FIGURA 4 - Teor de cobre acumulado nas folhas e raízes de *S. natans* nos tratamentos 1, 3 e 5 µg.mL^{-1} e controle nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias.

Durante o experimento, os indivíduos da macrófita *S. natans* apresentaram mudanças na coloração, que passou à cor acastanhada e durante as coletas foi observada uma crescente fragilidade na estrutura das plantas, que se despedaçavam ao contato manual (Figura 5).

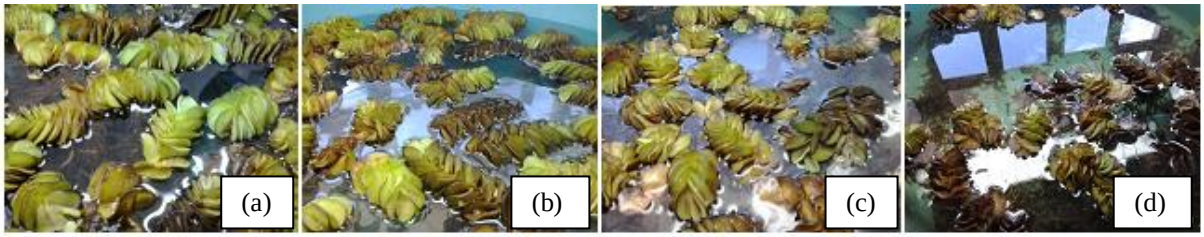

FIGURA 5 - Fases do experimento no tratamento de 3 µg.mL^{-1} - bioacumulação de cobre por *S. natans* – diferenças na coloração e vitalidade das plantas (a) 1º dia, (b) 7º dia, (c) 14º dia, (d) 21º dia.

3.3 Bioacumulação em *Salvinia auriculata*

Os resultados encontrados nas análises de Cu nas amostras de *S. auriculata* no tempo zero, não submetidas ao tratamento, apresentaram a presença de cobre variando entre 7,0 e 61,0 µg. Ao final dos 21 dias de experimento, nos tratamentos de 1, 3 e 5 µg.mL^{-1} a variação mínima e máxima da concentração de Cu bioacumulado foi de 526,64 a 814,65 µg, 1941,95 a 9039,09 µg e 2764,60 a 11861,26 µg, respectivamente. Em todos os tratamentos ao longo de todos os dias, ocorreu diferença média significativa na bioacumulação de Cu (Tabela 1, Apêndice C).

Nas amostras analisadas no 14º dia de experimento, a bioacumulação de Cu nos tratamentos de 3 e 5 µg.mL^{-1} teve um aumento considerável (Figura 6).

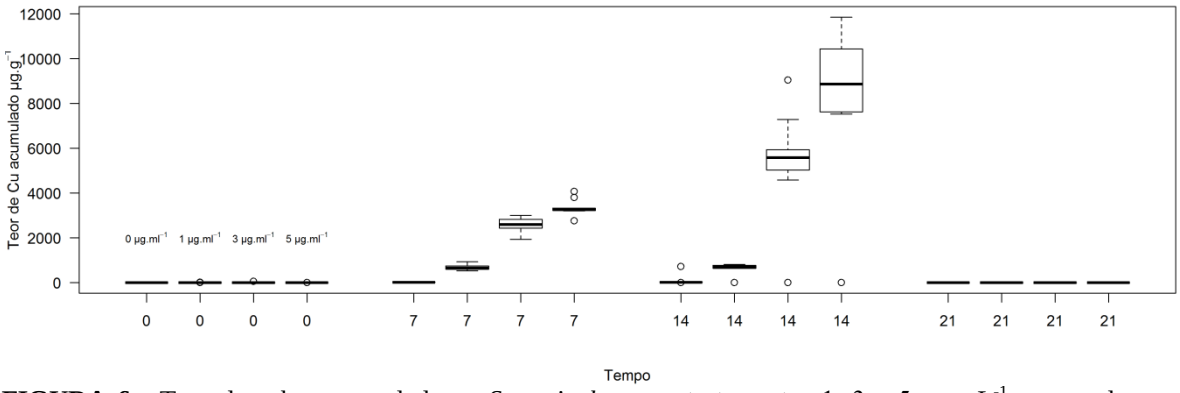

FIGURA 6 - Teor de cobre acumulado na *S. auriculata* nos tratamentos 1, 3 e 5 µg.mL^{-1} e controle nos períodos de 0, 7, 14 e 21 dias.

Durante o experimento, os indivíduos da macrófita *S. auriculata* apresentaram mudanças na coloração, que passou à cor acastanhada e durante as coletas foi observada uma crescente fragilidade na estrutura das plantas, que se despedaçavam ao contato manual, havendo elevado nível de mortandade, o que impossibilitou a coleta após o 14º dia do experimento (Figura 7).

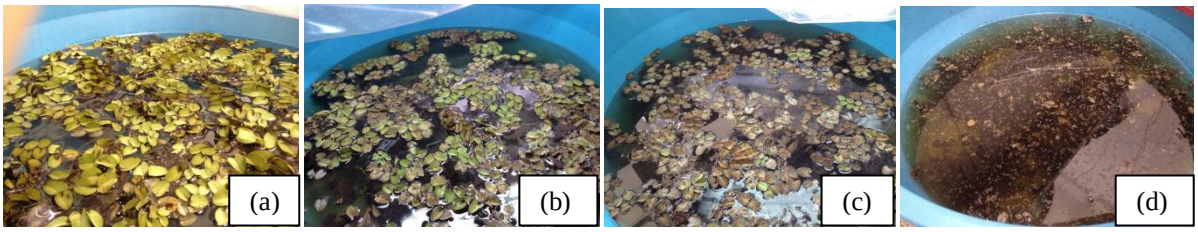

FIGURA 7 - Fases do experimento de bioacumulação de cobre por *S. auriculata* – alteração na cor e vitalidade das plantas no decorrer do experimento - (a) 1º dia, (b) 7º dia, (c) 14º dia, (d) 21º dia.

4 DISCUSSÃO

4.1 Comparações interespecíficas

As análises de concentração de cobre realizadas nas amostras do tempo zero (não submetidas ao experimento) nas macrófitas *E. crassipes*, *S. natans* e *S. auriculata*, mostraram baixos níveis de cobre em suas estruturas. De acordo com Kamal *et al*. (2004) e Soares (2006) íons de metais pesados como Cu^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+} e Co^{2+} são essenciais para as plantas, participando de processos fisiológicos, como fotossíntese, cadeia respiratória e fixação do nitrogênio.

Segundo Rosa *et al.* (2012), a toxicidade do metal está diretamente relacionada à dose ou tempo de exposição, à forma físico-química do elemento e da via de administração, podendo esses metais serem classificados de acordo com o grau de toxicidade em metais essenciais ou potencialmente tóxicos. Como o cobre faz parte dos metais essenciais aos processos metabólicos dos seres vivos, conclui-se que pequenas quantidades do metal encontradas nas amostras do tempo zero podem ser devido à atividade metabólica das plantas, idade de cada indivíduo, tempo de exposição ao contaminante, ou ainda por concentração em possíveis fontes poluidoras.

Na análise do teor de cobre bioacumulado pelas macrófitas aquáticas *E. crassipes, S. natans e S. auriculata* durante o experimento, foi observado um aumento na concentração de Cu tanto nas folhas, quanto nas raízes para um mesmo período nos tratamentos de 1, 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$. Dessa forma, verificou-se que o nível de bioacumulação do metal aumentou em função do grau de contaminação e do tempo de exposição. Malik (2007) e Oliveira (2012) afirmam que a eficiência de remoção do metal pelas macrófitas é maior para maiores concentrações do metal, porém, paralelamente a isso, pronunciam-se os sintomas de

toxicidade. Foram verificadas diferenças visuais na vitalidade das plantas durante o experimento. Na fase inicial do experimento, as três espécies *E. crassipes, S. natans* e *S. auriculata* apresentavam coloração esverdeada e no decorrer do experimento, notou-se que os exemplares apresentaram características como alteração na coloração das folhas, de esverdeadas para castanho escuro, uma provável reação da planta quanto à quantidade de metal bioacumulado, indicando seu efeito tóxico em maiores concentrações, de acordo com o que foi observado por Malik (2007) e Oliveira (2012).

Hou *et al.* (2007) em estudo com *Lemna minor* verificou que 0,5 $mg.L^{-1}$ de Cu^{+2} foi suficiente para induzir uma diminuição de pigmentos na planta, o que indica que, embora o cobre seja um micronutriente essencial para o crescimento e desenvolvimento de plantas em baixos níveis, pode ser um potente inibidor da fotossíntese quando em excesso, o que pode justificar a mudança de coloração e perda de vitalidade apresentadas em *E. crassipes, S. natans* e *S. auriculata*.

4.2 Bioacumulação em *Eichhornia crassipes*

Os indivíduos de *E. crassipes* tiveram um desempenho de bioacumulação bastante significativo, sendo o acúmulo de cobre nas amostras analisadas no tratamento de 1 $\mu g.mL^{-1}$de 11.428 μg na parte aérea e 22.611 μg nas raízes. No tratamento de 3 $\mu g.mL^{-1}$ o acúmulo nas amostras analisadas foi de 33.671 μg na parte aérea e 42.555 μg nas raízes e no tratamento de 5 $\mu g.mL^{-1}$ foi de 41.372 μg na parte aérea e 78.281 μg nas raízes. Segundo Lasat (2002) a retenção de Cu nas raízes é um mecanismo de tolerância ao excesso do metal, ocorrendo, por exemplo, a imobilização do metal na parede celular por carboidratos extracelulares, e consequentemente, a reduzida presença de íons livres para transporte à parte aérea, o que pode explicar a diferença de concentração de cobre na parte aérea e nas raízes.

4.3 Bioacumulação em *Salvinia natans*

O total de cobre bioacumulado nas amostras analisadas no tratamento de 1 $\mu g.mL^{-1}$ foi de 3759,96 μg na parte vegetativa e 8980 μg nas raízes. Nos tratamentos de 3 $\mu g.mL^{-1}$ o total de cobre bioacumulado na parte vegetativa foi de 10.498,70 e 67.550 μg nas raízes. No tratamento de 5 $\mu g.mL^{-1}$ o total de cobre bioacumulado na parte vegetativa foi de 23.018,82 e

101.660 μg nas raízes. A bioacumulação foi crescente até o 14º dia e na última semana do experimento, apesar de ainda apresentarem sinais de vitalidade, os indivíduos apresentaram diminuição nos níveis de Cu bioacumulado. Segundo Cruz (2004) esse comportamento, com sorção inicial rápida, seguida de um período mais lento, é típico para a biossorção de metais que não envolvem nenhuma reação de energia, mas, com uma interação puramente físico-química, entre a biomassa e a solução do metal.

4.4 Bioacumulação em *Salvinia auriculata*

Os indivíduos de *S. auriculata* ao serem submetidos ao mesmo tratamento de *E. crassipes* e *S. natans,* apresentaram uma resposta rápida na bioacumulação do Cu, em especial nos tratamentos com concentrações de 3 e 5 $\mu g.mL^{-1.}$ O total de cobre bioacumulado nos tratamentos de 1, 3 e 5 $\mu g.mL^{-1}$ foi de 11.322, 72.041 e 105.509 μg, respectivamente. Alterações na coloração das plantas também foram observadas, passando de verde oliva para verde acastanhado, destacando-se que a partir do 14º dia do experimento, observou-se a morte dos exemplares de *S. auriculata*. Em trabalho realizado por Wolff *et al*. (2009), sobre os efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *S. auriculata* cultivadas em solução nutritiva, indivíduos de *S. auriculata* introduzidas em solução nutritiva com diferentes níveis de contaminação com zinco apresentaram coloração amarelada e manchas avermelhadas em torno na nervura central das folhas, indicando o surgimento de clorose.

Em estudo feito por Oliveira *et al.* (2001) comparando o acúmulo de cádmio em *E. crassipes* e *S. auriculata*, concluiu-se que a espécie *E. crassipes*, em razão da presença de estruturas que favorecem sua flutuação na água e da distribuição de suas folhas, mesmo em condições naturais, o contato das folhas com a solução de cultivo é muito pequeno e, portanto, a participação das folhas na bioacumulação de íons do meio de nutrição também é pequena. Nas plantas de *S. auriculata*, ao contrário, a maior parte da face axial das folhas entra em contato com a solução nutritiva contendo o metal e parece haver uma participação significativa desta parte da planta no acúmulo deste elemento.

4.5 Implicações para fitorremediação

Muitos métodos convencionais como precipitação, filtração, troca iônica, tratamento eletroquímico e outros, são utilizados para tratamento de efluentes contaminados com metais pesados, especialmente os resultantes de atividades agrícolas e industriais. Porém, esses métodos têm algumas limitações, como o alto custo e utilização de produtos químicos para atuar no tratamento. Com isto, estudos com macrófitas aquáticas como fitorremediadoras em locais contaminados e efluentes industriais têm sido alvo de interesse de muitos pesquisadores, pois estas espécies são encontradas em abundância na natureza, são recursos renováveis, de fácil acesso e apresentam potencial de remoção de metais.

Nesse sentido, a continuidade desses estudos é de suma importância para responder questões como a especificidade de cada planta na bioacumulação de poluentes, níveis de poluentes que cada planta suporta bioacumular, pH ideal para um bom desempenho na bioacumulação e tempo de exposição a determinados contaminantes, pois o tipo de macrófita aquática utilizada em cada processo de fitorremediação pode ter uma diferença significativa para a remoção de diferentes poluentes.

5 CONCLUSÕES

Os resultados das análises de concentração de cobre nas condições experimentais indicaram que as três espécies *E. crassipes, S. natans* e *S. auriculata* tiveram bom desempenho na bioacumulação do metal nas concentrações analisadas. Para a *E. crassipes*, acredita-se que estudos com maior tempo de exposição e maiores concentrações do metal possam ser realizados para atestar o limite de bioacumulação nas condições estabelecidas no experimento. A espécie *S. auriculata* demonstrou ser uma planta de grande potencial na bioacumulação de cobre nas condições do experimento no tempo máximo de 14 dias, podendo bioacumular níveis de cobre muito próximos ao da espécie *E. crassipes*, que teve um tempo diferente de resposta na bioacumulação. As espécies *S. natans* e *S. auriculata* comparadas à espécie *E. crassipes*, tiveram melhor desempenho na bioacumulação de cobre nas condições do experimento devido ao maior contato das plantas com a solução nutritiva.

Devido às condições apresentadas de perda de vitalidade ao longo do experimento nas três espécies estudadas, mesmo no tratamento controle, sugere-se a continuidade do projeto para verificar se as condições do experimento como nutrição, iluminação artificial, condições de pH e oxigenação podem ter interferido na sobrevivência das plantas. Outro resultado que sugere continuidade dos experimentos é o fato das plantas no tratamento controle apresentarem uma pequena taxa de bioacumulação de cobre no decorrer do tempo de exposição, podendo ser uma resposta em relação à água utilizada no experimento que poderia conter baixos teores de cobre, ou até mesmo ser devido à variação entre indivíduos de uma mesma espécie de macrófita.

Contudo, os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, motivando a continuidade das pesquisas, buscando respostas para as hipóteses levantadas com estes experimentos que possam contribuir com o objetivo proposto de buscar alternativas de fitorremediação com macrófitas aquáticas com eficiência e especificidade no desempenho da bioacumulação, colaborando para a melhoria e reaproveitamento das águas residuais, sejam de uso doméstico ou industrial, buscando soluções economicamente viáveis, utilizando recursos renováveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barbafieri, M., Tassi, E., 2011. **Brassinosteroids for phytoremediation application. In: Hayat S, Ahamad a (eds) Brassinosteroids: A Class of Plant Hormone**. Springer, Netherlands, p. 403-437.

César, R.T.T., Marco, A.Z.A., 2004. **Biosorption of heavy metals using rice milling by-products. Characterization and application for removal of metals from aqueous effluents**. Chemosphere 54, 987–995.

Cruz, C. C. V., Costa, A. C. A., Henriques, C. A.,Luna, A. S., 2004. **Kinetic modeling and equilibrium studies during cadmium biosorption by dead Sargassum sp. Biomass.** Bioresource Technology, v. 91, p. 249-257.

Hadjiliadis, N. D., 1997**. Cytotoxicity, mutagenic and carcinogenic potential of heavy metals related to human environment**. Dordrecht: Kluwer, 629 p. (Natoasi Séries, 2; Environment, v. 26).

Hseu, Z.Y., 2004. **Evaluating heavy metal contents in nine composts using four digestion methods**. Bioresource Technology, Department of Environmental Science and Engineering, National Pingtung University of Science and Technology, Taiwan, 55p.

Jones, J. B., Case, V. W., 1990. **Sampling handling and analyzing plant tissue samples.** In: Westerman, R. L. (Ed.), Soil Testing and Plant Analysis, third ed. Soil Science Society of America, Books Series nº 3. Madison, Wisconsin, pp 389 – 427.

Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Côté R., 2004. **Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants**, Environment International, 29, 1029-1039.

Keskinkan, O., Goksu, M.Z.L., Yuceer, A., Basibuyuk, M., Forster, C.F., 2003. **Heavy metal adsorption characteristics of a submerged aquatic plant (Myriophyllum spicatum)**. Process Biochem. 39, 179–183.

Khellaf, N., Zerdaoui, M., 2009. **Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L.**; Bioresource Technology; v. 100; p. 6137–6140.

Lasat, M.M., 2002. **Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms**. Journal of Environmental Quality, v.31, p.109-120.

Malik, A., 2007. **Environmental challenge vis a vis opportunity: The case of water hyacinth**. Environment International; v. 33; p. 127.

Oksanen, J., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin P. R, O'Hara, R. B., Simpson, G. L., Solymos, P., Stevens M. R. H., Wagner, H.,2013. Vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10. http://CRAN.R-project.org/package=vegan

Oliveira , J. A. , Cambraia, J. , Cano, M. A. O., Jordão, C. P., 2001. **Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvínia**. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal, 13(3): 329-341.

Oliveira, A. P., 2012. **Avaliação da influência dos macronutrientes na bioacumulação do chumbo pela *Eichhornia crassipes***. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Toledo-PR.

Pott, V. J., Pott, A., 2000. **Plantas Aquáticas do Pantanal**. Embrapa Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá, MS., p. 28-30.

Prado, C., Montelongo L. R., González, J. A., Pagano, E. A., Hilal, M., Prado, F. E., 2010. **Uptake of chromium by Salvinia minima: effect on plant growth, leaf respiration and carbohydrate metabolism**. Journal of Hazardous Materials., v. 177, n. 1-3, p. 546-553.

Rosa, H.; Fraceto, L. F.; Moschini-Carlos, Viviane; 2012. **Meio Ambiente e Sustentabilidade**. Porto Alegre, p. 17-73.

R Core Team, 2014. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL http://www.R-projt.org/.

Smanhotto, A., Sousa, A. de P., Sampaio, S. C., Nóbrega, L. H. P., Prior, M., 2010. **Cobre e zinco no material percolado e no solo com a aplicação de água residuária de suinocultura em solo cultivado com soja.** Revista de Engenharia Agrícola, Jaboticabal, v.30, n.2, p.346-357.

Soares, R. A. S., 2006. **Concentração de Metais Pesados em Sedimento, Água e Macrófitas Aquáticas em duas represas do Município de Viçosa**. Tese de Mestrado, Viçosa, MG.

Wang S, Jin X, Zhao H., Wu F.,2008. **Phosphate biosorption characteristics of a submerged macrophyte Hydrilla verticillata,** Aquatic Botany 89, 23-26.

Wolff, G. A., Pereira, G. C., Castro, E. M., Louzada, J., Coelho, F. F, 2009. **The use of Salvinia auriculata as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium .** Journal Biology, v.72,p.75.

Wolff, G. A, Assis, L.R., Pereira, G. C., Carvalho, J. G., Castro, E.M., 2009. **Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva**. Planta Daninha, Viçosa-MG, v. 27, n. 1, p.133-137.

APÊNDICE A – Tabela ANOVA *Eichhornia crassipes*

Probabilidade associada aos fatores de concentração do poluente cobre e os dias de exposição ao poluente, bem como na interação entre eles para os resultados de bioacumulação de cobre por folhas e raízes de *Eichhornia crassipes* sob condições laboratoriais.

Folha			
Fonte de variação	Gl	F	P
Concentrações (C)	3	161,97	< 0,001
Dias (D)	3	148,53	< 0,001
C x D	9	32,54	< 0,001
Resíduo	128		
Raiz			
Fonte de variação	Gl	F	P
Concentrações (C)	3	44,44	< 0,001
Dias (D)	3	34,41	< 0,001
C x D	9	9,48	< 0,001
Resíduo	128		

Gl: grau de liberdade, F: valor crítico, P: nível de significância, C x D: interações (concentrações x dias).

APÊNDICE B – Tabela ANOVA *Salvinia natans*

Probabilidade associada aos fatores de concentração do poluente cobre e os dias de exposição ao poluente, bem como na interação entre eles para os resultados de bioacumulação de cobre por folhas e raízes de *Salvinia natans* sob condições laboratoriais.

Folha			
Fonte de variação	Gl	F	P
Concentrações (C)	3	21,898	< 0,001
Dias (D)	3	5,106	0,01
C x D	8	2,438	0,05
Resíduo	96		
Raiz			
Fonte de variação	Gl	F	P
Concentrações (C)	3	73,842	< 0,001
Dias (D)	3	17,925	0,001
C x D	8	7,634	0,001
Resíduo	98		

gl: grau de liberdade, F: valor crítico, P: nível de significância, C x D: interações (concentrações x dias).

APÊNDICE C – Tabela ANOVA *Salvinia auriculata*

Probabilidade associada aos fatores de concentração do poluente cobre e os dias de exposição ao poluente, bem como na interação entre eles para os resultados de bioacumulação de cobre por folhas e raízes de *Salvinia auriculata* sob condições laboratoriais.

Fonte de variação	Gl	F	P
Concentrações (C)	3	245,74	< 0,001
Dias (D)	2	155,20	< 0,01
C x D	6	50,28	< 0,05
Resíduo	66		

Gl: grau de liberdade, F: valor crítico, P: nível de significância, C x D: interações (concentrações x dias).

ANEXO – Normas da Revista Environmental and Experimental Botany