

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

LUANA LORCA SARTORIS GIMENES

Efeitos da temperatura e da contaminação de rejeito da mineração no
crescimento e na fisiologia de *Ricciocarpos natans* (L.) Corda

SÃO CARLOS -SP

2020

LUANA LORCA SARTORIS GIMENES

Efeitos da temperatura e da contaminação de rejeitos da mineração no crescimento e na fisiologia de *Ricciocarpos natans* (L.) Corda

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos

Orientador: Marcela Bianchessi da Cunha Santino

Coorientador: Gian Paulo Giovanni Freschi

São Carlos-SP

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Luana Lorca Santoris Gimenes, realizada em 10/06/2020.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Marcela Bianchessi da Cunha Santino (UFSCar)

Prof. Dr. Vinu Bianchini Junior (UFSCar)

Profa. Dra. Adriaine da Silva Mansano Domfeld (UFSCar)

Profa. Dra. Angéla Terumi Fushita (UFABC)

Prof. Dr. Hugo Henrique Lanzí Saulino (EESC/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus orientadores Dr^a. Marcela Bianchessi da Cunha Santino e Dr. Gian Paulo Giovanni Freschi e ao professor Dr. Irineu Bianchini Júnior pelos ensinamentos proferidos a mim durante os 4 anos de doutorado.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais - UFSCar, juntamente com seus professores e técnicos administrativos pela contribuição diária para a formação de novos pesquisadores. Ao Departamento de Hidrobiologia e ao Laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática pelo apoio e infraestrutura necessários para a realização da pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; processo 1618451/2016) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; processo 2018/00348-0) pelo financiamento da pesquisa através da bolsa de estudos, equipamentos e reagentes.

Ao grupo GIAIA (Grupo Independente de Avaliação de Impactos Ambientais), Dr. André Cordeiro Alves dos Santos e Dr^a Flávia Bottino pela coleta e disposição do material para realização da pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório Andresa Lana Thomé Bizzo, Emmanuelle Leite Wanderley, Mariana Soares Grando, Raphael Machado, Roberta Mafra Freitas da Silva, Beatriz Ferraz Buhler, Brayan Pétrick de Souza, Daniele Cristina Schiavone, Yeda Carolina Paccagnella e Ricardo Rafael Ribeiro da Silva pela ajuda e companheirismo.

À minha família, João Francisco Lorca Gimenes (*In memoriam*), Lucia Helena Sartoris, Ordalia do Nascimento Sartoris (*In memoriam*), Diego Lorca Gimenes, Igor Lorca Gimenes e Marcelo Azevedo Diniz Oliveira por estarem do meu lado me dando força nessa jornada acadêmica e por entenderem meu amor a ciência, à vocês eu digo: Muito obrigada!

RESUMO

Nos últimos anos a contaminação dos recursos hídricos do Brasil por metais contidos em rejeitos de mineração tornaram-se frequentes; outro fator ambiental que também deve ser considerado, concomitantemente, é o aumento de temperatura global do planeta provocado pelo aquecimento global. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de três metais (Al, Mn e Zn) em bioensaios contendo distintas concentrações de metais individuais e em combinações no crescimento em biomassa e largura e nas respostas fisiológicas de *Ricciocarpos natans* sob duas temperaturas, além de avaliar o crescimento e as alterações fisiológicas dos indivíduos expostos a água contaminada por rejeito de mineração, e estimar o percentual de eficiência de remoção dos metais da solução-teste. Amostras de água contaminada por rejeitos de mineração advindos do rompimento da barragem em Mariana (MG) em 2015 foram coletadas e os metais determinados. Os tratamentos contemplaram indivíduos saudáveis de *R. natans* ($n = 10$, $\pm 0,5$ cm largura) expostos por 30 dias (5 repetições), fotoperíodo de 12/12, às concentrações de metais encontradas no rejeito (Al = $1,5 \text{ mg L}^{-1}$; Mn e Zn = $0,7 \text{ mg L}^{-1}$) e em duas concentrações superiores (Al = $2,5$ e $5,0 \text{ mg L}^{-1}$; Mn e Zn = $1,5$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$) nas temperaturas de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e $27 \text{ }^\circ\text{C}$. Duas vezes por semana, as plantas de todos os tratamentos tiveram suas massas frescas determinadas gravimetricamente e a largura mensurada. As massas frescas acumuladas das macrófitas durante o período amostral foram ajustadas ao modelo logístico. Foram realizadas análises fisiológicas uma vez por semana de pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b*, carotenoides), antioxidantes (antocianina e flavonoide) e estresse oxidativo (peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos). O crescimento e as respostas fisiológicas da macrófita *R. natans* foi afetado com a exposição as concentrações dos metais Al, Mn e Zn. Os coeficientes de crescimento e o foram alterados com a adição dos metais. A cinética de crescimento para a mistura dos metais indicou que quanto maior as concentrações combinadas maior o prejuízo para o crescimento e fisiologia da macrófita, pois a necrose nos tecidos vegetais ocorreu mais rápido. Na água contaminada pelo rejeito, os indivíduos de *R. natans* também apresentaram seu crescimento prejudicado desde o início dos experimentos. O aumento de temperatura em $2 \text{ }^\circ\text{C}$ ($27 \text{ }^\circ\text{C}$) juntamente com a exposição aos metais influenciou negativamente o crescimento de *R. natans*, pois, para a maioria dos bioensaios não foi possível observar aumento de biomassa ou mesmo largura. De forma geral, os metais inibem o crescimento das plantas em torno de 50% de produção de biomassa. O presente estudo contribui para o entendimento dos impactos que podem ocorrer por metais contidos em rejeitos de mineração e o aumento de temperatura nos ecossistemas aquáticos no crescimento e na fisiologia das macrófitas aquáticas.

Palavras-chave: Metais. Combinação de metais. Toxicidade. Aumento da temperatura da água.

ABSTRACT

In recent years, the contamination of Brazilian water resources by metals contained in mining waste has become frequent and, in addition, another environmental factor that must also be considered, concomitantly, is the increase in the global temperature of the planet caused by global warming. In this context, this work aimed to evaluate the toxicity of three metals (Al, Mn and Zn) in bioassays containing different concentrations of individual metals and in combinations in the growth in biomass and width and in the physiological responses of *Ricciocarpos natans* under two temperatures, in addition to evaluate the growth and physiological changes of individuals exposed to water contaminated by mining waste, and to evaluate the percentage of removal efficiency of metals from the test solution. Samples of water contaminated by mining waste from the dam burst in Mariana (MG) in 2015 were collected and the metals determined. The treatments included healthy individuals of *R. natans* ($n = 10$, ± 0.5 cm wide) exposed for 30 days (5 repetitions), 12/12 photoperiod, to the metal concentrations found in the tailings (Al = 1.5 mg L⁻¹; Mn and Zn = 0.7 mg L⁻¹) and in two higher concentrations (Al = 2.5 and 5.0 mg L⁻¹; Mn and Zn = 1.5 and 3.0 mg L⁻¹) at temperatures of 25 °C and 27 °C. Twice a week, the plants of all treatments had their fresh masses determined gravimetrically and the width measured. The fresh masses accumulated from the macrophytes during the sampling period were adjusted to the logistic model. Physiological analyzes of photosynthetic pigments (chlorophyll-a, chlorophyll-b, carotenoids), antioxidants (anthocyanin and flavonoid) and oxidative stress (lipid peroxidation and electrolyte leakage) were performed once a week. The growth and physiological responses of the macrophyte *R. natans* were affected by exposure to the concentrations of the metals Al, Mn and Zn. The growth coefficients and the doubling time changed with the addition of the metals. The growth kinetics for the mixture of metals indicated that the higher the combined concentrations, the greater the damage to the growth and physiology of the macrophyte, as necrosis in plant tissues occurred faster. In water contaminated by the tailings, the individuals of *R. natans* also showed impaired growth since the beginning of the experiments. The increase in temperature by 2 °C (27 °C) together with exposure to metals negatively influenced the growth of *R. natans*, since for most of the bioassays it was not possible to observe an increase in biomass or even width. In general, metals inhibit plant growth by around 50% of biomass production. The present study contributes to the understanding of the impacts that can occur by metals contained in mining tailings and the increase in temperature in aquatic ecosystems in the growth and physiology of aquatic macrophytes.

Keyword: Metals. Combination of metals. Toxicity. Increased water temperature.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Ricciocarpos natans</i>	25
Figura 2. Reprodução vegetativa de <i>R. natans</i> : (a) indivíduo jovem de <i>R. natans</i> (b) amadurecimento e desprendimento do talo e (c) indivíduos novos.....	26
Figura 3 . Bioensaios de crescimento contendo solução-teste com concentrações de metais e indivíduos de <i>R. natans</i> (n = 10), 5 repetições	35
Figura 4. Bioensaios de crescimento com água contaminada por rejeito e indivíduos de <i>R. natans</i> (n = 10, ± 0,5 cm largura), 5 repetições	37
Figura 5. Determinação gravimétrica e de largura de <i>R. natans</i>	38
Figura 6. Digestão de biomassa seca de <i>R. natans</i> em sistema fechado em bloco digestor.....	43
Figura 7. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de <i>Ricciocarpos natans</i> no controle e em distintas concentrações de Al (Al ₁ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Al ₂ = 2,5 mg L ⁻¹ ; Al ₃ mg L ⁻¹) sobre duas temperaturas (25 °C e 27 °C) durante 30 dias. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.	46
Figura 8. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e nas concentrações de Al (Al ₁ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Al ₂ = 2,5 mg L ⁻¹ ; Al ₃ mg L ⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C).	47
Figura 9. Pigmentos fotossintéticos (clorofila- <i>a</i> , clorofila- <i>b</i> e carotenoides) (mg g ⁻¹ MS) de <i>R. natans</i> expostas ao controle e concentrações de Al (Al ₁ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Al ₂ = 2,5 mg L ⁻¹ ; Al ₃ mg L ⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes (α = 0,05) do controle para cada semana.	49
Figura 10. Antioxidantes: antocianina (mmol g ⁻¹ MF) e flavonoides (Abs g ⁻¹ MF) de <i>R. natans</i> expostas ao controle e concentrações de Al (Al ₁ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Al ₂ = 2,5 mg L ⁻¹ ; Al ₃ mg L ⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes (α = 0,05) do controle para cada semana.	50
Figura 11. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído (mmol g ⁻¹ MF) e percentual de extravasamento de eletrólitos de <i>R. natans</i> expostas ao controle e concentrações de Al (Al ₁ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Al ₂ = 2,5 mg L ⁻¹ ; Al ₃ mg L ⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes (α = 0,05) do controle para cada semana.....	51

Figura 12. Concentração inicial e final de Al ($Al_1 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Al_2 = 2,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Al_3 \text{ mg L}^{-1}$) na solução onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.52

Figura 13. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de *Ricciocarpos natans* no controle e em distintas concentrações de Mn ($Mn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) sobre duas temperaturas (25 °C e 27 °C) durante 30 dias. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.53

Figura 14. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e nas concentrações de Mn ($Mn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C).54

Figura 15. Pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b* e carotenoides) ($\text{mg g}^{-1} \text{ MS}$) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Mn ($Mn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana. O (x) indica que não foi detectado o pigmento pelo limite de detecção do equipamento.56

Figura 16. Antioxidantes: antocianina ($\text{mmol g}^{-1} \text{ MF}$) e flavonoides ($\text{Abs g}^{-1} \text{ MF}$) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Mn ($Mn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.57

Figura 17. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído ($\text{mmol g}^{-1} \text{ MF}$) e percentual de extravasamento de eletrólitos de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Mn ($Mn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.58

Figura 18. Concentração inicial e final de Mn ($Mn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) na solução onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.59

Figura 19. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de *Ricciocarpos natans* no controle e em distintas concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) sobre duas temperaturas (25 °C e 27 °C) durante 30 dias. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.60

Figura 20. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e nas concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C)..... 61

Figura 21. Pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b* e carotenoides) (mg g^{-1} MS) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana..... 63

Figura 22. Antioxidantes: antocianina (mmol g^{-1} MF) e flavonoides (Abs g^{-1} MF) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana. 64

Figura 23. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído (mmol g^{-1} MF) e percentual de extravasamento de eletrólitos de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.....65

Figura 24. Concentração inicial e final de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) na solução onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão. 66

Figura 25. Constante de crescimento (μ em dia^{-1}) e tempo de duplicação da biomassa (td dias) obtidos na cinética de crescimento de largura e biomassa nos bioensaios contendo a concentração de 1,5 mg L^{-1} de Al, Mn e Zn em duas temperaturas (25 e 27 °C). O (x) indica que não houve crescimento. 67

Figura 26. Largura (cm) acumulada de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%..... 68

Figura 27. Biomassa (mg) acumulada de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%..... 69

Figura 28. Clorofila-*a* (mg g^{-1} MS) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco

(*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana..... 71

Figura 29. Clorofila-*b* (mg g⁻¹ MS) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana..... 72

Figura 30. Carotenoides (mg g⁻¹ MS) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana..... 73

Figura 31. Antocianina (mmol g⁻¹ MF) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana..... 74

Figura 32. Flavonoides (Abs g⁻¹ MF) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana..... 75

Figura 33. Malondialdeído (nmol g⁻¹ MF) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana..... 76

Figura 34. Extravasamento de eletrólitos (%) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana..... 77

Figura 35. Concentração inicial e final de Al e Mn (mg L⁻¹) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão. 78

Figura 36. Concentração inicial e final de Al e Zn (mg L⁻¹) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão. 79

Figura 37. Concentração inicial e final de Mn e Zn (mg L^{-1}) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão. 80

Figura 38. Concentração inicial e final de Al, Mn e Zn (mg L^{-1}) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão. 81

Figura 39. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de *Ricciocarpos natans* no controle e na água contaminada por rejeito sob duas temperaturas (25 °C e 27 °C) durante 30 dias. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%..... 82

Figura 40. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e na água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C). 83

Figura 41. Pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b* e carotenoides) (mg g^{-1} MS) de *R. natans* expostas ao controle e na água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha \leq 0,05$) do controle para cada semana..... 84

Figura 42. Antioxidantes: antocianina (mmol g^{-1} MF) e flavonoides (Abs g^{-1} MF) de *R. natans* expostas ao controle e na água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha \leq 0,05$) do controle para cada semana..... 85

Figura 43. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído (mmol g^{-1} MF) e percentual de extravasamento de eletrólitos de *R. natans* expostas ao controle e a água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha \leq 0,05$) do controle para cada semana. 86

Figura 44. Concentração inicial e final de Al, Mn e Zn (mg L^{-1}) no bioensaio contendo água contaminada por rejeito onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C, eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência) e concentração dos metais na biomassa seca. Barras verticais indicam o desvio padrão. A letra x significa que não foi detectado o metal na solução portanto considera-se a concentração como sendo zero. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração de metais na água contaminada pelo rejeito de mineração, padrão de qualidade da água permitido pela Resolução CONAMA N° 357/05, Classe 1, águas doces, padrão da qualidade da água potável do Canadá 2019 (HEALTH CANADA, 2019) e qualidade da água para consumo humano da legislação da Europa 1980 (EUR 80/778/EEC, 1980).....	31
Tabela 2. Elementos químicos da água do reservatório Fazzari.....	33
Tabela 3. Descrição dos bioensaios de crescimento com <i>R. natans</i> em distintas concentrações de Al, Mn, Zn, controle e duas temperaturas (25 e 27 °C).....	36
Tabela 4. Descrição e nomenclatura dos bioensaios de crescimento com <i>R. natans</i> em misturas, controle e duas temperaturas (25 e 27 °C).....	37
Tabela 5. Coeficiente de crescimento (μ dia ⁻¹), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle, concentrações de Al (Al ₁ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Al ₂ = 2,5 mg L ⁻¹ ; Al ₃ mg L ⁻¹) nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.....	48
Tabela 6. Constante de crescimento (μ dia ⁻¹), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle, concentrações de Mn (Mn ₁ = 0,7 mg L ⁻¹ ; Mn ₂ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Mn ₃ = 3,0 mg L ⁻¹) nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.	55
Tabela 7. Constante de crescimento (μ dia ⁻¹), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle, concentrações de Zn (Zn ₁ = 0,7 mg L ⁻¹ ; Zn ₂ = 1,5 mg L ⁻¹ ; Zn ₃ = 3,0 mg L ⁻¹) nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.	62
Tabela 8. Constante de crescimento (μ dia ⁻¹), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle e nas combinações iniciais dos metais Al, Mn e Zn (Al = 1,5 mg L ⁻¹ ; Mn = 0,7 mg L ⁻¹ ; Zn = 0,7 mg L ⁻¹) no parâmetro largura na temperatura de 25 °C.....	70
Tabela 9. Constante de crescimento (μ dia ⁻¹), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle e na água contaminada com rejeito nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.	83
Tabela 10. Média e desvio padrão da concentração do metal Al, Mn e Zn na biomassa seca (mg g ⁻¹ MS) dos indivíduos de <i>R. natans</i> expostos a água contaminada por rejeito nas temperaturas de 25 °C e 27 °C.	88

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Hipótese	18
1.2 Objetivo geral	19
1.2.1 Objetivos específicos	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Contaminação dos recursos hídricos.....	20
2.2 Metais.....	21
2.3 Macrófitas aquáticas	23
2.3.1 <i>Ricciocarpos natans</i>	24
2.4 Avaliação fisiológica de plantas frente ao estresse.....	27
2.4.1 Pigmentos fotossintéticos	28
2.4.2 Antioxidantes.....	28
2.4.3 Estresse oxidativo	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Coleta da água contaminada pelo rejeito e determinação prévia de elementos em sua constituição.....	30
3.2 Escolha dos metais para os bioensaios	32
3.3 Descrição das amostras de água utilizadas nos bioensaios.....	32
3.4 Reagentes	33
3.5 Cultivo da planta.....	34
3.6 Procedimento experimental	34
3.6.1 Cinética de crescimento de <i>R. natans</i>	34
3.6.2 Análises fisiológicas	39

3.6.3	Modelo de crescimento das macrófitas aquáticas nos diferentes tratamentos....	41
3.6.4	Coeficiente de temperatura.....	42
3.6.5	Determinação de metais nos bioensaios e digestão e análise da biomassa	43
3.6.6	Eficiência de remoção	44
3.7	Tratamento Estatístico	44
4.	RESULTADOS	45
4.1	Cinética de crescimento, análises fisiológicas e percentual de eficiência de remoção para os metais individuais	45
4.1.1	Bioensaios com concentrações de Al	45
4.1.2	Bioensaios com concentrações de Mn.....	52
4.1.3	Bioensaios com concentrações de Zn.....	59
4.1.4	Comparação dos metais Al, Mn e Zn para os dados da cinética de crescimento para a concentração de 1,5 mg L ⁻¹	66
4.2	Cinética de crescimento, análises fisiológicas e percentual de eficiência de remoção para combinações de metais	67
4.3	Cinética de crescimento, análises fisiológicas, percentual de eficiência de remoção e determinação de metais nos bioensaios com água contaminada pelo rejeito	81
5.	DISCUSSÃO.....	89
5.1	Cinética de crescimento, análises fisiológicas e percentual de eficiência de remoção para os metais individuais	89
5.2	Cinética de crescimento, análises fisiológicas e percentual de eficiência de remoção para as combinações de metais.....	94
5.3	Cinética de crescimento, análises fisiológicas, percentual de eficiência de remoção e determinação de metais nos bioensaios com água contaminada pelo rejeito	96
5.4	Influência da temperatura no crescimento e fisiologia de <i>R. natans</i>	99
5.5	Variáveis físicas e químicas dos bioensaios	101
	CONCLUSÕES	103

REFERÊNCIAS	104
APÊNDICE A. Variáveis limnológicas dos bioensaios	117

1. INTRODUÇÃO

O aumento das contaminações ambientais ocasionados pelas substâncias tóxicas estão cada vez mais causando preocupação no mundo. Estas substâncias, provenientes do crescimento populacional humano e consequentemente aumento da industrialização, desenvolvimento tecnológico e exploração de recursos naturais, são introduzidas no ambiente aquático, sendo os metais um dos grupos mais perigosos por causa de sua natureza persistente, toxicidade e bioacumulação nos seres vivos (SANKHLA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos a contaminação dos recursos hídricos do Brasil por rejeitos de mineração tornou-se frequente e, com isso os prejuízos tanto a população quanto ao ambiente foram imensuráveis. Uma dessas contaminações ocorreu em 2015, quando houve o rompimento de uma barragem de rejeitos da mineradora Samarco, localizada no subdistrito de Bento Rodrigues, a 35 km do município de Mariana-MG. Nesse rompimento foram liberados ca. 50-60 milhões m³ de lama contendo inúmeros metais (CARVALHO *et al.*, 2017; GIAIA, 2016). O principal ambiente afetado foi o Rio Doce, cuja bacia hidrográfica abrange ca. 230 municípios dos estados de Minas Gerais e Espírito Santo. Ao longo do percurso afetado pela lama, houve perda de biodiversidade e alteração da estrutura física e composição química nos ecossistemas aquáticos e terrestres (IBAMA, 2016; MIRANDA; MARQUES, 2016; NEVES *et al.*, 2016).

Dentre os metais encontrados no rejeito, o alumínio (Al), manganês (Mn) e zinco (Zn), em concentrações elevadas em sistemas biológicos, podem acumular e afetar negativamente todos os processos metabólicos (e.g. produção primária) dos organismos. Nos vegetais, estes metais afetam as membranas celulares, impactando as funções fisiológicas de produção de pigmento e enzimas, proteínas, amido e lipídeos, prejudicando a fotossíntese e inibindo o ciclo de Calvin (DHIR, 2013; SPARLING, 2018).

Além da contaminação dos recursos hídricos por rejeitos de mineração, outro fator que deve ser considerado, concomitantemente, é o aumento de temperatura global do planeta provocado pelo aquecimento global (IPCC, 2018). A concentração de CO₂ na atmosfera vem

aumentando consideravelmente pela queima de combustíveis fósseis como o carvão, petróleo e gás natural. Com isso as temperaturas médias globais estão aumentando a uma taxa de aproximadamente 0,13 °C por década (WATTS, 2007; IPCC, 2018). As medições realizadas ao longo dos anos por satélite mostram que a troposfera e a superfície da Terra estão aquecendo simultaneamente e, sendo inúmeras as consequências para os ecossistemas, como: o derretimento das geleiras, aumento e intensidade de ondas de calor e tempestades tropicais, mudanças no período de florescimento e frutificação das plantas, na migração dos animais e mudanças de direção e altitude das faixas de plantas, declínios de populações, emergência de insetos, branqueamento de corais com o aumento da temperatura do oceano, dentre outros (CASPER, 2010; WATTS, 2007).

Este aumento na temperatura média irá potencialmente incrementar as taxas bioquímicas e metabólicas (i.e. taxa de reações fisiológicas) nos tecidos dos vegetais (MIDGLEY, 2007), podendo ou não, afetar o crescimento desses organismos, e se tratando dos ecossistemas aquáticos, as macrófitas aquáticas, apesar de apresentarem grande tolerância a flutuações de condições ambientais neste ecossistema, seu desenvolvimento é bastante influenciado pela variação da temperatura (CARR; DUTHIE; TAYLOR, 1997).

Portanto, em virtude dos impactos ambientais ocasionados pelo rejeito de mineração aduzidos nos recursos hídricos e o possível aumento de temperatura do planeta (IPCC, 2018), as hipóteses e os objetivos desse estudo foram descritos em seguida.

1.1 HIPÓTESE

Acredita-se que:

- (a) As concentrações dos metais Al, Mn e Zn e suas combinações irão afetar negativamente o crescimento de *R. natans* e o aumento das concentrações dos metais será tóxico para a planta; com a influência negativa no crescimento de *R. natans*, os coeficientes μ , o tempo de duplicação da biomassa (td) o acúmulo de biomassa e a fisiologia da planta também serão afetados;
- (b) A água contaminada pelo rejeito de Mariana irá influenciar negativamente o crescimento, tempo de duplicação, acúmulo de biomassa e a fisiologia da macrófita;
- (c) O aumento de temperatura aumentará a toxicidade dos metais individualmente, combinados e da água contaminada pelo rejeito prejudicando o desenvolvimento de *R. natans*;
- (d) O percentual de eficiência de remoção dos metais nas soluções comprovará a possibilidade de *R. natans* fitorremediar ambientes aquáticos contendo os metais analisados.

1.2 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de três metais (Al, Mn e Zn) em bioensaios contendo distintas concentrações de metais individuais e em combinações no crescimento em biomassa e largura e nas respostas fisiológicas de *Ricciocarpos natans* sob duas temperaturas; além de avaliar o crescimento e as alterações fisiológicas dos indivíduos expostos a água contaminada pelo rejeito de mineração proveniente do rompimento da barragem de Fundão em Mariana-MG em 2015, e avaliar o percentual de eficiência de remoção dos metais nas soluções-teste.

1.2.1 Objetivos específicos

Este trabalho teve como objetivos específicos:

- Avaliar a toxicidade individual dos metais e as respectivas combinações na cinética de crescimento em biomassa e largura bem como na resposta fisiológica de *R. natans* nas temperaturas de 25 e 27 °C;
- Avaliar qual metal, na concentração que possuem em comum (1,5 mg L⁻¹), foi mais tóxico para o crescimento de *R. natans*;
- Avaliar a toxicidade da água contaminada com rejeito na cinética de crescimento em biomassa e largura e na resposta fisiológica da macrófita nas temperaturas de 25 e 27 °C;
- Avaliar o efeito do aumento de temperatura em 2 °C (27 °C) no crescimento e nas respostas fisiológicas de *R. natans*;
- Avaliar o percentual de remoção de cada metal nas soluções testes contendo os metais individuais, metais em combinações e na água com rejeito, nas temperaturas de 25 e 27 °C.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 CONTAMINAÇÃO DOS RECURSOS HÍDRICOS

Os recursos hídricos estão sendo submetidos há décadas à episódios de poluição/contaminação advinda das atividades antropogênicas. A poluição pode ocorrer por duas principais formas: pontual ou difusa. A poluição pontual é proveniente da área urbana, industrial, disposição de resíduos sólidos urbanos ou industriais e atividades de mineração, cujas fontes podem ser identificadas, pois são despejadas em pontos específicos. As fontes difusas de poluição ocorrem de forma indireta, ou seja, os contaminantes/poluentes são provenientes, principalmente, pelas atividades rurais agropastoris que percolam pelo solo até atingirem os recursos hídricos (CETESB, 2018).

Independente da forma da poluição/contaminação, os recursos hídricos recebem substâncias químicas orgânicas (óleos minerais, petróleo e seus derivados, fenóis e alguns compostos de pesticidas) e inorgânicas (metais) (TUNDISI; TUNDISI, 2008) e, dependendo da concentração em que essas substâncias estão dissolvidas na água podem causar efeitos deletérios na saúde humana e dos animais que utilizam deste recurso (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Se tratando de compostos químicos, a mineração funciona como base para outras atividades econômicas (BARRETO, 2001; REZENDE, 2016) e o Brasil possui grandes reservas minerais metálicas e não-metálicas (principais estados: Minas Gerais, Pará, Amazonas e Bahia), estando mundialmente entre os seis mais importantes países do mundo (BARRETO, 2001). Esta atividade, porém, representa umas das possíveis fontes de poluição/contaminação pontuais, pois nos últimos vinte anos (e.g. Nova Lima/MG - 2001, Cataguases/MG - 2003, Alagoa Nova/PB - 2004, Mirai/MG - 2007, Itabirito/MG - 2014, Mariana/MG - 2015, Brumadinho/MG - 2019), o rompimento de barragens de rejeito representou no Brasil um grande episódio de impacto negativo nos ecossistemas aquáticos (FERNANDES *et al.*, 2016; SEDRU, 2016; SUL, 2019; THOMPSON *et al.*, 2020).

As possíveis contaminações ocasionadas por esse tipo de impacto, apontam para a importância dos estudos que avaliam as interações dos metais em rejeitos quando esses são aduzidos no ecossistema aquático. Nesse sentido, o rejeito de mineração está diretamente relacionado à contaminação de águas superficiais e subterrâneas pela drenagem ácida de rejeitos e por conter metais altamente tóxicos como o arsênio. Além disso, esta atividade, aumenta a turbidez dos corpos hídricos, provoca desmatamento, alterações da biodiversidade local, mortalidade da ictiofauna e fuga de animais silvestres, interrupção do abastecimento de água da população, comprometimento dos demais usos, assoreamento dos cursos d'água e alteração da estrutura trófica (ANA, 2019; FARIA; COELHO, 2002).

A longo prazo, a contaminação dos recursos hídricos pelas altas concentrações de metais contidos nos rejeitos de mineração podem ocasionar consequências nos seres vivos pelo processo de biomagnificação dos metais na cadeia trófica. A biomagnificação é o processo de transferência de substâncias químicas de um organismo para outro através da alimentação (BUNGALA; MACHIWA; SHILLA, 2017; GRAY, 2002; SZYNKOWSKA; PAWLACZYK; MAĆKIEWICZ, 2018). Essa transferência e consequente acúmulo de metais nos organismos podem gerar prejuízos na saúde como doenças e alterações genéticas. Portanto, monitorar a concentração dos metais nos ambientes contaminados por rejeitos de mineração e nos seres vivos que ali vivem se faz necessário para o entendimento dos impactos gerados ao longo dos anos na cadeia alimentar.

2.2 METAIS

Nos últimos 200 anos, as emissões de metais tóxicos aumentaram significativamente e excederam as de fontes naturais (CLEMENS, 2006). Os metais com valor econômico (i.e. Fe, Al, Cu, Ni) são extraídos e fundidos para produzir formas mais puras de matéria-prima. Essas atividades têm sido as principais fontes antropogênicas de metais no ambiente e, portanto, por conta da alta disponibilidade de metais, mesmo os biologicamente essenciais podem exercer uma grande variedade de efeitos tóxicos na biota se forem ingeridos em concentrações superiores as necessárias para cada organismo e, os metais que não são essenciais (i.e. Al, As,

Pb, entre outros) (TCHOUNWOU *et al.*, 2012), podem não ter efeito se ingeridos em baixas concentrações, mas poderão exercer a bioacumulação (SPARLING, 2018).

Os metais são elementos que possuem brilho metálico, capacidade de perder elétrons, conduzir calor e eletricidade e são muito reativos (DUFFUS, 2002). Muitos elementos são considerados necessários para o crescimento de plantas, como os macronutrientes carbono (C), nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), hidrogênio (H) e micronutrientes zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), níquel (Ni), cobalto (Co) e ferro (Fe) (WELCH, 1995).

Na água, os metais podem ocorrer sob três formas: dissolvida, coloidal e particulada, e a sua toxicidade vai depender do grau de oxidação e da forma como ele ocorre, pois, a forma iônica geralmente é a mais tóxica. A toxicidade é reduzida quando houver por exemplo, uma complexação dos íons metálicos por matéria orgânica dissolvida (BEZERRA; TAKIYAMA; BEZERRA, 2009; TUNDISI; TUNDISI, 2008).

O alumínio é o metal mais abundante na crosta terrestre. É encontrado na forma de óxidos, hidróxidos e silicatos. Em águas com pH próximo a neutro, o alumínio geralmente é encontrado entre 0,001 e 0,05 mg L⁻¹; em águas mais ácidas ou ricas em matéria orgânica a concentração aumenta para 1 mg L⁻¹ podendo chegar a valores maiores que 90 mg L⁻¹ em águas afetadas por drenagem ácida de mineração (CETESB, 2012). Este metal é utilizado na manufatura de uma variedade de produtos, incluindo latas, painéis, peças automotivos, papel alumínio, antitranspirantes, e compostos de alumínio são usados em tratamento de água e revestimentos de fornos (ATSDR, 2011). O valor permitido pela Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde para consumo humano de alumínio é 0,2 mg L⁻¹ (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O manganês é um metal que compreende cerca de 0,1% da crosta terrestre e ocorre no ambiente combinado com uma variedade de carbonatos, boratos, fosfatos, óxidos, silicatos e sulfetos, podendo ser encontrado dissolvido nas águas superficiais e subterrâneas. Pode apresentar diversos usos como na indústria do aço, ligas metálicas, vidros, baterias, oxidantes para limpeza, vernizes, fertilizantes, suplementos alimentares, fungicidas e combustíveis (BARCELOUX, 1999a; CETESB, 2018). O manganês é um micronutriente essencial para os

seres vivos por participar de processos fisiológicos e bioquímicos para o crescimento e desenvolvimento do organismo (SANTAMARIA, 2008). O padrão de aceitação da Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde para consumo humano do manganês é $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011) e a concentração média encontrada em água potável é de $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (ATSDR, 2012).

O zinco é um metal que na natureza ocorre raramente na forma elementar, pois, a maioria do zinco é resultante de sulfeto de zinco (i.e. esfalerita, wurtzita, marmatita). O metal é usado como revestimento protetor de outros metais, como ferro e aço e ligas de zinco são usadas para fundição e podem ser encontrados em componentes eletroeletrônicos (ATSDR, 2005; BARCELOUX, 1999b). O zinco é um micronutriente essencial que catalisa mais de 100 enzimas no metabolismo humano, além de ajudar a regular a expressão gênica (SAPER; RASH, 2009). A concentração de zinco em água superficial geralmente é menor que $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (SAPER; RASH, 2009) e pela Portaria 2914/2011, o valor médio permitido na água potável é de 5 mg L^{-1} (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.3 MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Macrófitas aquáticas são organismos fotossintéticos que podem ser vistos a olho nu e habitam diversos ecossistemas aquáticos (e.g. áreas alagáveis, ambientes lóticos). Podem crescer submersas, emersas ou na superfície do corpo de água e, variam de tamanho, podendo ter desde $0,5 \text{ mm}$ (*Wolffia* sp. menor angiosperma do mundo) até $2,5 \text{ m}$ de diâmetro como a *Victoria amazônica* (CHAMBERS, *et al.*, 2008).

As macrófitas têm um importante papel na estruturação de comunidades em ambientes aquáticos. Elas aumentam a complexidade e a heterogeneidade de habitats nas zonas litorâneas de ambientes rasos, proporcionam anteparo físico, alterando regimes de circulação de água e absorção de energia cinética de ondas, diminuem o fluxo de água, além de fornecerem abrigo, refúgio e alimento para invertebrados, peixes e aves aquáticas. Além disso, ajudam na melhora

da qualidade da água e dos sedimentos, por absorver/adsorver contaminantes (CHAMBERS, *et al.*, 1999; THOMAZ; CUNHA, 2010).

As áreas colonizadas por macrófitas (i.e. região litorânea) representam no ambiente aquático, as regiões de maior diversidade, produtividade e heterogeneidade de um corpo de água, além de apresentarem um papel chave na manutenção da biodiversidade aquática. Diversas comunidades de macrófitas contribuem para a manutenção do funcionamento dos ecossistemas aquáticos, já que podem servir de substrato para o crescimento de algas filamentosas que potencializam uma maior abundância de peixes e animais selvagens e, conseqüentemente, reduzem as concentrações de fósforo na água (ENGELHARDT; RITCHIE, 2001).

2.3.1 *Ricciocarpos natans*

A macrófita aquática *Ricciocarpos natans* (Figura 1) é uma hepática talosa pertencente a ordem Marchantiales e família Ricciaceae. A família inclui ca. 140 espécies que pertencem a 3 gêneros: *Tesselina* (*Oxymitra*), *Ricciocarpos* e *Riccia*, sendo que os dois primeiros só possuem uma única espécie. Praticamente todas as espécies desta ordem crescem em solos hidromórficos, porém *Riccia fluitans* e *Ricciocarpos natans* são espécies aquáticas (VASHISHTA; SINHA; KUMAR, 2011). *R. natans* tem cerca de 2,5 cm de largura e pode ser encontrada em todas as regiões brasileiras (YANO, 2012), sendo também encontrada em regiões temperadas e tropicais do mundo (RUIZ, 2008) e portanto é uma espécie cosmopolita.



Figura 1. *Ricciocarpos natans*

(Fonte: arquivo pessoal)

Sua estrutura é formada por um talo verde, achatado, com aspecto esponjoso, que em seu ápice é dicotomicamente lobulada (RUIZ, 2008; VASHISHTA; SINHA; KUMAR, 2011). As células epidérmicas formam um tecido de camada única, englobando os órgãos acessórios, sendo, na epiderme dorsal poros estomáticos que permitem as trocas gasosas e na epiderme ventral as escamas e os rizoides que são responsáveis pela absorção de água e nutrientes (KRONESTEDT, 1981). A parte interna do talo é formada por células parenquimáticas que se diferenciam em duas partes: a) câmaras de ar responsáveis pela flutuação da planta (aerênquima), principal parte do talo, que dão o aspecto de esponja, dispostos irregularmente em camadas, contendo numerosos cloroplastos nas paredes das células aerificas, principalmente na região dorsal do talo (clorênquima), sendo responsáveis pela atividade fotossintética da planta, b) células euparenquimáticas, uma fina cama de células ventrais importantes para o armazenamento de nutrientes (KRONESTEDT, 1981).

A reprodução em *R. natans* pode ocorrer por duas vias: a) reprodução vegetativa (Figura 2), por fragmentação dos talos, quando a porção de células da região inferior do talo morrem e se desprendem, a região apical contendo as células jovens se separam dando origem a novos indivíduos, b) reprodução sexual, por união dos gametas (anterozoide e oosfera) dando origem aos esporos que serão disseminados pela água e germinarão dando início ao novo ciclo reprodutivo (RUIZ, 2008; VASHISHTA; SINHA; KUMAR, 2011).

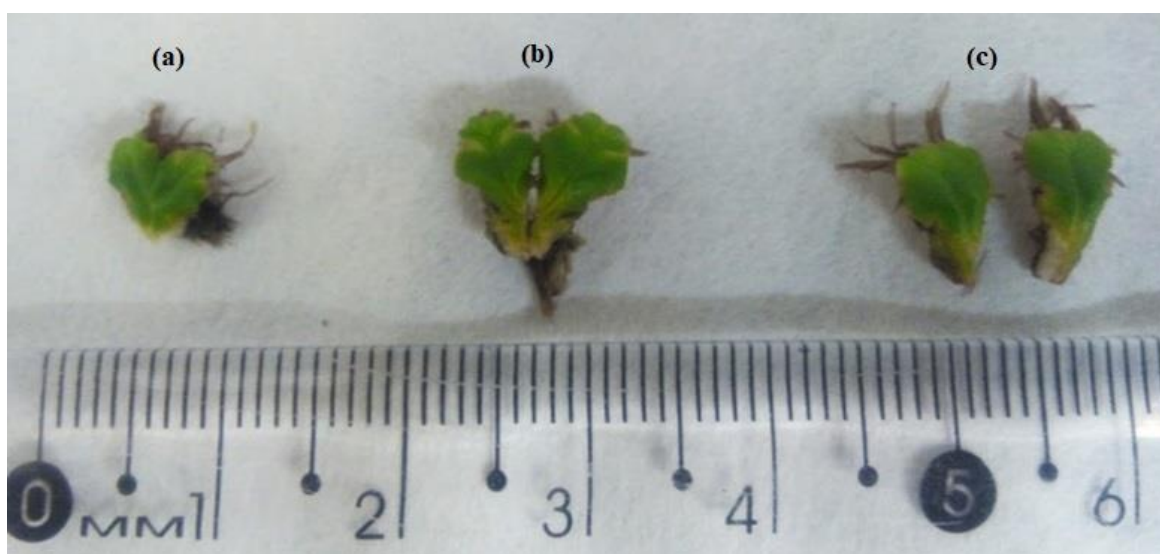


Figura 2. Reprodução vegetativa de *R. natans*: (a) indivíduo jovem de *R. natans* (b) amadurecimento e desprendimento do talo e (c) indivíduos novos

(Fonte: arquivo pessoal)

Estudos publicados utilizando *R. natans* em aplicações ecológicas ainda são escassos na literatura; porém estudos para compreender a toxicidade de contaminantes no desenvolvimento desta espécie já foram realizados com calda bordolesa (ZAGO; CUNHA-SANTINO; BIANCHINI-JR, 2018), benzofenona (ALMEIDA; CUNHA-SANTINO, 2019), parasiticida de peixe (FRANCO; CUNHA-SANTINO; BIANCHINI-JR, 2018), ácido tioglicólico (BRANDÃO; BIANCHINI-JR; CUNHA-SANTINO, 2018), contaminantes emergentes (ZAGO *et al.*, 2018), cádmio (BIZZO *et al.*, 2019) e alguns ainda estão em

andamento (com os metais cobre, cádmio e níquel) no Laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática do Departamento de Hidrobiologia, UFSCar em São Carlos.

A utilização da espécie como bioindicadora de qualidade da água é importante, pois, macrófitas aquáticas em geral, respondem fisiologicamente (através de crescimento ou morte) aos distúrbios antrópicos ocasionados ao meio (LACOUL; FREEDMAN, 2006).

R. natans foi selecionado para realizar os experimentos, porque tem distribuição mundial e é geralmente encontrada em ambientes eutróficos (KRONESTEDT, 1981). Além disso, é uma espécie relativamente pequena, e fácil de manusear em experimentos de laboratório. Briófitas têm habilidades fisiológicas que permitem que essas plantas colonizem diferentes tipos de habitats (de cavernas a regiões polares) com diferentes características de temperatura e pH (GLIME, 2017b, a) fazendo com que este grupo possua a capacidade para lidar com vários estressores.

2.4 AVALIAÇÃO FISIOLÓGICA DE PLANTAS FRENTE AO ESTRESSE

Em um ambiente contaminado por metais, as plantas podem responder de diferentes formas, variando desde sintomas de toxicidade (i.e. clorose, necrose), crescimento rápido ou desordenado até a interrupção de crescimento, modificações no desenvolvimento e morte (RODRIGUES *et al.*, 2016). Por este motivo, nos ecossistemas aquáticos as macrófitas são consideradas bioindicadoras de qualidade, fornecendo informações da qualidade ambiental no recurso hídrico (POMPÊO, 2017). Para monitorar os possíveis danos ocasionados pelo estresse ambiental, vários parâmetros podem ser utilizados para mensurar os danos fisiológicos nos vegetais quando estressados por alterações ocorridas ao ambiente. Dentre esses, determinação de pigmentos, antioxidantes e estresse oxidativo são muito utilizados.

2.4.1 Pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos são importantes para a manutenção da vida pois fornecem informações sobre o crescimento e desenvolvimento da planta. As clorofilas *a* e *b* são pigmentos abundantes nas plantas verdes e se localizam nos cloroplastos. Os carotenoides são pigmentos encontrados nas membranas dos tilacoides e são associados às proteínas que formam o aparelho fotossintetizante. A luz solar é absorvida em forma de energia pelos carotenoides e transferida à clorofila para realização da fotossíntese; em decorrência disso, esses pigmentos são chamados de acessórios (TAIZ *et al.*, 2017). As plantas expostas a contaminação por metais são prejudicadas em relação a fotossíntese, pois, os níveis de clorofila e carotenoides são reduzidos pela inativação das enzimas responsáveis pela biossíntese desses pigmentos (DOS SANTOS *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016).

2.4.2 Antioxidantes

Antioxidantes são substância, que, inibem ou retardam reações de oxidação. São metabólicos extremamente importantes para a sobrevivência das plantas, pois, atraem os polinizadores e animais para dispersão de sementes, estimulam as bactérias na fixação de nitrogênio, auxiliam na reabsorção de nutrientes nas folhas senescentes, promovem o crescimento do tubo de pólen, aumentam a tolerância a uma variedade de estressores abióticos, defendem as plantas contra herbivoria, dentre outros (ANDERSEN; MARKHAM, 2006). Quando há um estresse ambiental, os antioxidantes podem fornecer informações sobre a saúde da planta, pois a atividade antioxidante pode ser aumentada significando uma defesa, como ela pode ser reduzida. Altas concentrações de metais contidos no ambiente podem induzir a redução da atividade antioxidante (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

2.4.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo nas plantas podem ser causados por diversos fatores, um deles é pelo excesso de absorção de metais tóxicos (RODRIGUES *et al.*, 2016) que levam a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ERO), que em níveis elevados geram desequilíbrio celular e estresse (YAMAMOTO; KOBAYASHI; MATSUMOTO, 2001). A peroxidação lipídica é utilizado como um biomarcador fisiológico para avaliar o dano celular induzido pelo estresse ambiental, o que leva a peroxidação lipídica da membrana que é um processo deletério, causando a degradação de proteínas e da capacidade de transporte iônico (AWASTHI *et al.*, 2018). O extravasamento de eletrólitos reflete a liberação dos íons ocorrido pelo rompimento da membrana celular na peroxidação lipídica fruto do estresse ambiental (FOUAD *et al.*, 2014).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DA ÁGUA CONTAMINADA PELO REJEITO E DETERMINAÇÃO PRÉVIA DE ELEMENTOS EM SUA CONSTITUIÇÃO

Amostras de água contaminada por rejeitos de mineração provenientes do rompimento da barragem de Fundão (Mariana – MG) foram coletadas pelo Grupo Independente de Avaliação de Impactos Ambientais – GIAIA em 03 de abril de 2016 (4 meses após o rompimento da barragem) em frasco de polietileno com capacidade de 20 L, previamente lavado com água destilada. A água foi coletada na subsuperfície (15 cm) e preservada com ácido nítrico 1%. As amostras foram coletadas no Rio Gualaxo do Norte no distrito de Paracatu de Baixo (20° 18' 23,2" S; 43° 13' 34,3" O).

As características limnológicas da água contaminada pelo rejeito de mineração no momento da coleta foram: temperatura = $24,57 \pm 0,02^{\circ}\text{C}$; concentração de oxigênio dissolvido = $9,32 \pm 0,25 \text{ mg L}^{-1}$; pH = $6,69 \pm 0,78$; condutividade elétrica = $60 \pm 2 \mu\text{S cm}^{-1}$ e turbidez = $497 \pm 10 \text{ NTU}$ (BOTTINO *et al.*, 2017; GIAIA, 2016).

O carbono orgânico total ($1,61 \text{ mg L}^{-1}$), carbono inorgânico ($5,51 \text{ mg L}^{-1}$) e nitrogênio total ($21,91 \text{ mg L}^{-1}$) foram determinados na água contaminada com rejeito pelo analisador de carbono orgânico total (Shimadzu, modelo TOC-L ASI-L). As concentrações de metais nas amostras de água foram analisadas por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (modelo 300, marca Analytik Jena- HR CS-AAS). A determinação de metais na amostra da água contaminada pelo rejeito indicou a presença de 8 metais: Al, Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Ni e Cr (Tabela 1). Dentre esses, não foi possível determinar a concentração de Ni e Cr devido ao limite de detecção do equipamento.

Tabela 1. Concentração de metais na água contaminada pelo rejeito de mineração, padrão de qualidade da água permitido pela Resolução CONAMA N° 357/05, Classe 1, águas doces, padrão da qualidade da água potável do Canadá 2019 (HEALTH CANADA, 2019) e qualidade da água para consumo humano da legislação da Europa 1980 (EUR 80/778/EEC, 1980)

Metais	Absorbância	Concentração (mg L ⁻¹)	Limite de detecção (mg L ⁻¹)	CONAMA 357/05 (mg L ⁻¹)	Canadá 2019 (mg L ⁻¹)	Europa 1980 (mg L ⁻¹)
Al	0,04679	1,50 ± 0,02	0,046	0,1	0,1	0,2
Fe	0,85833	2,85 ± 0,05	0,006	0,3	0,3	0,2
Mn	0,36661	0,70 ± 0,01	0,003	0,1	0,1	0,05
Cu	0,00724	0,04 ± 0,02	0,003	0,009	2,0	3,0
Zn	0,51507	0,70 ± 0,03	0,003	0,18	5,0	5,0
Pb	0,00143	0,001 ± 0,02	0,026	0,01	0,005	0,05
Ni	0,00114	*	0,006	0,025	-	0,05
Cr	0,00057	*	0,006	0,05	0,05	0,05

* abaixo do limite de detecção do equipamento; - não consta a concentração do metal na lista do Canadá

Os metais acima do limite permitido pela lei brasileira (Resolução CONAMA 357/05) foram Al (15 vezes), Fe (9,5 vezes), Mn (7 vezes), Cu (4,5 vezes) e Zn (4 vezes). Na legislação da Europa (EUR 80/778/EEC, 1980) o valor máximo permitido de Mn para a água de consumo humano é menor do que o permitido para o consumo na legislação brasileira (0,05 e 0,1 mg L⁻¹ respectivamente), isto significa que o Mn estaria 14 vezes acima do permitido quando considerado a legislação europeia. Para a legislação do Canadá e da Europa os valores de Cu e Zn na água contaminada pelo rejeito não estariam acima do permitido. Para a legislação do Canadá, o valor de Cu se refere ao máximo permitido para Cu total e esse valor protege contra exposições de curto e longo prazo. Para o Zn o valor refere-se a objetivos estéticos da água como odor e sabor e o Zn é considerado um elemento essencial e não tóxico até a concentração de 5,0 mg L⁻¹. Já para a legislação da Europa os valores de Cu e Zn são valores de referência que servem de guia; acima deste valor pode ocorrer presença de sabor e corrosão na tubulação.

3.2 ESCOLHA DOS METAIS PARA OS BIOENSAIOS

Dentre os metais que estão acima do permitido pela legislação brasileira (CONAMA 357/05) encontrados na água contaminada pelo rejeito (Al, Fe, Mn, Cu, Zn) foram escolhidos três para a realização dos bioensaios de crescimentos e fisiológicos, sendo estes, Al, Mn e Zn. Estes metais foram selecionados, pois encontram-se na lista prioritária de substâncias perigosas para a saúde humana da Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2017), além de, não possuírem muitos estudos sobre a interferência no crescimento e fisiologia de macrófitas aquáticas, carecendo assim, de informações que agreguem conhecimento para medidas mitigadoras.

3.3 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZADAS NOS BIOENSAIOS

Os bioensaios foram realizados com amostras de água natural do reservatório Fazzari (21° 58' 18,12" S; 47° 53' 15,07" O), localizado em uma área protegida, na área central do estado de São Paulo – Brasil. Esse ambiente possui baixa interferência antrópica, apresentando como características, águas ácidas (pH 6,5) com baixa condutividade (0,03 mS cm⁻¹) e bem oxigenadas (6,15 mg L⁻¹) (SCHIAVONE, 2019).

Para a realização dos bioensaios a água foi filtrada em membrana de acetato de celulose (porosidade de 0,45 µm; marca Unifil). A água filtrada foi submetida a análise de metais (Al, Mn e Zn) (Tabela 2) através de espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (modelo 300, marca Analytik Jena - HR CS-AAS) e foram utilizadas como valores de *background* na composição dos bioensaios. O carbono e nitrogênio total foi determinado (Tabela 2) pelo analisador de carbono orgânico total (Shimadzu, modelo TOC-L ASI-L).

Tabela 2. Elementos químicos da água do reservatório Fazzari

Variável	Valor encontrado
Carbono total	9,85 mg L ⁻¹
Carbono inorgânico	0,78 mg L ⁻¹
Nitrogênio total	0,54 mg L ⁻¹
Al	0,13 mg L ⁻¹
Mn	0,01 mg L ⁻¹
Zn	0,03 mg L ⁻¹

3.4 REAGENTES

Para as determinações dos metais foram utilizadas soluções preparadas a partir de sais de altíssima pureza (99,99% marca Sigma-Aldrich). Soluções estoque de 1000 mg L⁻¹ foram preparadas pela dissolução dos sais em água deionizada de alta pureza obtida pelo sistema Millipore 5, Direct – QTM e acidificados com HCl 1% para preservação. As soluções analíticas intermediárias foram preparadas, diariamente, a partir das soluções estoque. As soluções e os padrões foram armazenados em frascos de polipropileno de alta densidade (Nalgene[®]) sob refrigeração a 4 °C.

Para os bioensaios foram utilizados os sais nitrato de alumínio (Al(NO₃)₃·9H₂O), cloreto de manganês (MnCl₂) e cloreto de zinco (ZnCl₂). As soluções-teste foram preparadas com a adição de alíquotas da solução estoque 1000 mg L⁻¹ (concentrações nominais) dissolvidas em água natural filtrada do reservatório Fazzari.

3.5 CULTIVO DA PLANTA

Exemplares de *Ricciocarpos natans* foram provenientes de cultivos mantidos no Jardim Experimental do Departamento de Botânica, UFSCar, São Carlos, SP (21° 59' 00,37" S; 47° 52' 47,42" O). As plantas foram lavadas em água corrente para a remoção de detritos e colocados durante 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio 0,5% para desinfecção (i.e. redução de microrganismos e algas) (OECD, 2002). Após esse procedimento, uma nova lavagem com água deionizada foi realizada e as plantas foram aclimatadas por um período mínimo de 15 dias antes do início dos experimentos. Para tanto, foram acondicionadas em recipiente contendo água natural filtrada do reservatório Fazzari e cobertas com filme de PVC, com perfurações de cerca de 1 mm de diâmetro para permitir as trocas gasosas e evitar possíveis contaminações. As temperaturas (25 e 27 °C) e o fotoperíodo (12 h claro/12 h escuro) foram controlados em câmara de germinação (modelo CL; marca Coldlab).

3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.6.1 Cinética de crescimento de *R. natans*

Os tratamentos (i.e. bioensaios) foram montados em béqueres de vidro com capacidade de 250 ml (volume da solução-teste = 200 ml) (Figura 3). Indivíduos saudáveis de *R. natans* (n = 10, ± 0,5 cm largura) foram expostos por 30 dias (fase inicial de crescimento) ou até clorose/necrose de mais de 50% dos indivíduos, em 5 repetições às concentrações de metais encontradas na água contaminada pelo rejeito (Al = 1,5 mg L⁻¹; Mn e Zn = 0,7 mg L⁻¹) e em duas concentrações superiores as encontradas na água contaminada pelo rejeitos (Al = 2,5 e 5,0 mg L⁻¹; Mn e Zn = 1,5 e 3,0 mg L⁻¹) (Tabela 3) para avaliar a tolerância de *R. natans* as concentrações elevadas desses metais visto que, em regiões afetadas pela lama as concentrações destes metais foram encontradas em concentrações de até 10,55 mg L⁻¹ de Al em Resplendor/MG e de até 112,9 mg L⁻¹ de Mn em Ipatinga/MG (IGAM, 2015) e como a coleta

foi realizada 4 meses após o rompimento da barragem, as concentrações dos metais contidos na água poderiam ser superiores as que foram encontrados na atual amostra, visto que a lama da mineração estava mais concentrada e com o passar do tempo ela foi diluída com a água dos rios.

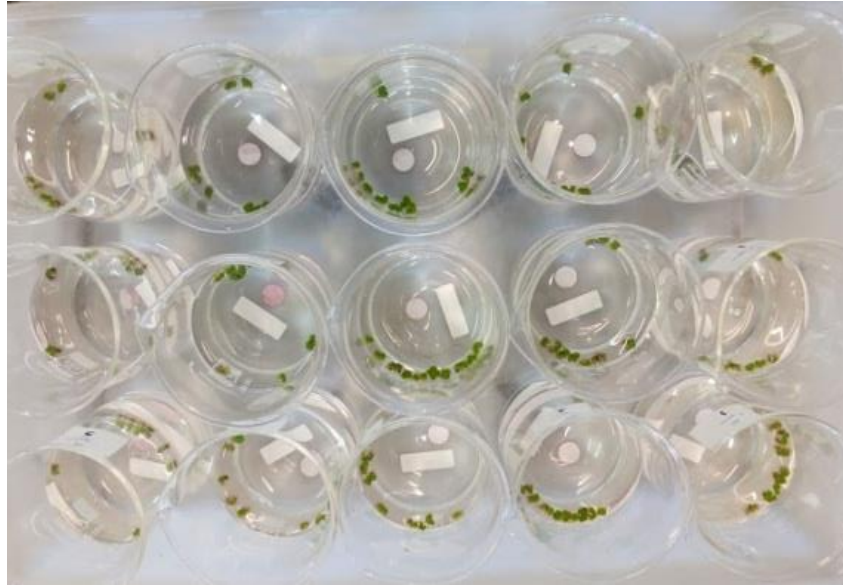


Figura 3 . Bioensaios de crescimento contendo solução-teste com concentrações de metais e indivíduos de *R. natans* (n = 10), 5 repetições

(Fonte: arquivo pessoal)

As temperaturas foram selecionadas por representarem a média dos corpos d'água da região afetada pela lama (25 °C) (GIAIA, 2016) e + 2 °C que é o aumento médio da temperatura do planeta prevista pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2018) = 27 °C. As temperaturas 25 e 27 °C ($\pm 0,2$ °C) e fotoperíodo de 12/12 foram controlados em câmara de germinação (RFA: $47,25 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$). Houve randomização dos frascos para reduzir interferência de luz (1500 à 2000 lux). Os bioensaios foram avolumados com a água do Fazzari no 15º dia (por causa da evaporação) para manter o volume inicial de solução (200 ml).

Os bioensaios controle foram feitos com a adição de 200 ml de água filtrada do reservatório Fazzari em béqueres com capacidade de 250 ml, 10 indivíduos saudáveis de *R.*

natans ± 0,5 cm largura por 30 dias, 5 repetições, em temperatura e fotoperíodo controlado como descrito para os demais experimentos. Os resultados deste controle foram utilizados como comparativo para todos os demais bioensaios.

Tabela 3. Descrição dos bioensaios de crescimento com *R. natans* em distintas concentrações de Al, Mn, Zn, controle e duas temperaturas (25 e 27 °C).

	Al	Mn	Zn
25 °C	Controle 25 °C		
	Al _{1(25°)} - 1,5 mg L ⁻¹	Mn _{1(25°)} - 0,7 mg L ⁻¹	Zn _{1(25°)} - 0,7 mg L ⁻¹
	Al _{2(25°)} - 2,5 mg L ⁻¹	Mn _{2(25°)} - 1,5 mg L ⁻¹	Zn _{2(25°)} - 1,5 mg L ⁻¹
	Al _{3(25°)} - 5,0 mg L ⁻¹	Mn _{3(25°)} - 3,0 mg L ⁻¹	Zn _{3(25°)} - 3,0 mg L ⁻¹
27 °C	Controle 27 °C		
	Al _{1(27°)} - 1,5 mg L ⁻¹	Mn _{1(27°)} - 0,7 mg L ⁻¹	Zn _{1(27°)} - 0,7 mg L ⁻¹
	Al _{2(27°)} - 2,5 mg L ⁻¹	Mn _{2(27°)} - 1,5 mg L ⁻¹	Zn _{2(27°)} - 1,5 mg L ⁻¹
	Al _{3(27°)} - 5,0 mg L ⁻¹	Mn _{3(27°)} - 3,0 mg L ⁻¹	Zn _{3(27°)} - 3,0 mg L ⁻¹

Para o acompanhamento da cinética de crescimento das macrófitas expostas as misturas dos metais utilizou-se o mesmo protocolo descrito acima para volume da solução, quantidade de plantas, tempo de exposição, repetição, temperatura e fotoperíodo.

As misturas dos metais foram realizadas em três tratamentos, no estilo fatorial, sendo realizadas combinações entre todos os metais (Tabela 4):

- 1) misturas entre as concentrações iniciais dos metais Al (1,5 mg L⁻¹), Mn (0,7 mg L⁻¹) e Zn (0,7 mg L⁻¹);
- 2) misturas entre as concentrações medianas dos metais Al (2,5 mg L⁻¹), Mn (1,5 mg L⁻¹) e Zn (1,5 mg L⁻¹);
- 3) misturas entre as concentrações finais dos metais Al (5,0 mg L⁻¹), Mn (3,0 mg L⁻¹) e Zn (3,0 mg L⁻¹).

Tabela 4. Descrição e nomenclatura dos bioensaios de crescimento com *R. natans* em misturas, controle e duas temperaturas (25 e 27 °C)

	Concentrações iniciais	Concentrações medianas	Concentrações finais
25 °C	Controle 25 °C		
	Al+Mn ₁ (25°)	Al+Mn ₂ (25°)	Al+Mn ₃ (25°)
	Al+Zn ₁ (25°)	Al+Zn ₂ (25°)	Al+Zn ₃ (25°)
	Mn+Zn ₁ (25°)	Mn+Zn ₂ (25°)	Mn+Zn ₃ (25°)
	Al+Mn+Zn ₁ (25°)	Al+Mn+Zn ₂ (25°)	Al+Mn+Zn ₃ (25°)
27 °C	Controle 27 °C		
	Al+Mn ₁ (27°)	Al+Mn ₂ (27°)	Al+Mn ₃ (27°)
	Al+Zn ₁ (27°)	Al+Zn ₂ (27°)	Al+Zn ₃ (27°)
	Mn+Zn ₁ (27°)	Mn+Zn ₂ (27°)	Mn+Zn ₃ (27°)
	Al+Mn+Zn ₁ (27°)	Al+Mn+Zn ₂ (27°)	Al+Mn+Zn ₃ (27°)

Para compor os bioensaios contendo água contaminada com o rejeito, os indivíduos saudáveis de *R. natans* (n = 10, ± 0,5 cm largura), foram expostos (até 30 dias – [fase inicial de crescimento] ou até clorose/necrose de mais de 50% dos indivíduos), em béqueres de vidro contendo 200 ml da amostra (Figura 4) em 5 repetições. A temperatura e o fotoperíodo foram mantidos iguais ao descrito acima para os outros tratamentos.

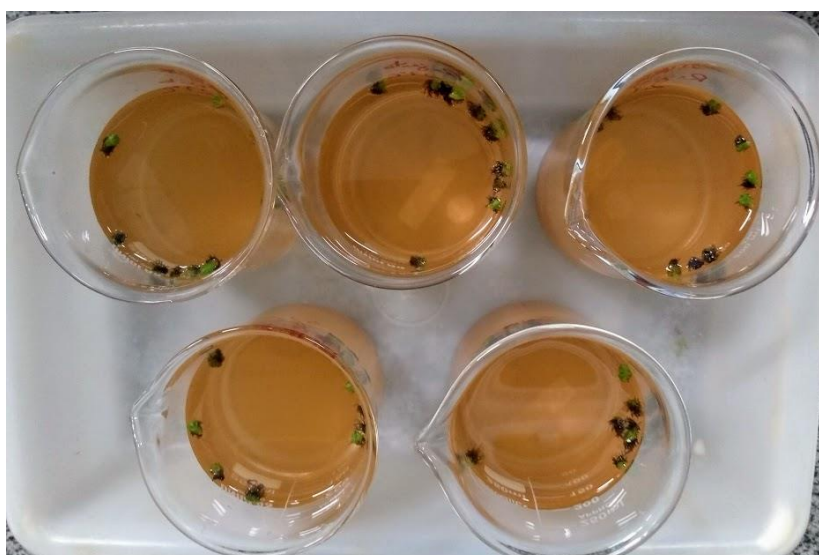


Figura 4. Bioensaios de crescimento com água contaminada por rejeito e indivíduos de *R. natans* (n = 10, ± 0,5 cm largura), 5 repetições
(Fonte: arquivo pessoal)

Duas vezes por semana, as plantas ($n = 10$) de todos os tratamentos tiveram suas massas frescas determinadas gravimetricamente em balança analítica (modelo M214Ai, marca Bel Engineering) e a largura medida através de paquímetro universal (Figura 5). Antes da pesagem e retirada da largura, para reduzir interferência externa de água, os indivíduos de *R. natans* foram colocados sobre papel filtro qualitativo (80 g; 0,16 mm; marca Unifil) para a secagem padronizada (cerca de 2 minutos).

O pH (modelo DMPH-2, marca Digimed), a concentração de oxigênio dissolvido (modelo 58, marca YSI) e a condutividade elétrica (modelo DM3, marca Digimed) dos meios de crescimento de *R. natans* (fase aquosa dos bioensaios) foram determinados semanalmente.



Figura 5. Determinação gravimétrica e de largura de *R. natans*

(Fonte: arquivo pessoal)

Após o tempo de exposição aos metais (30 dias ou até a morte dos indivíduos), as plantas foram secas em estufa (modelo 400 ND/Nova ética) até massa constante, durante 48 h a 50 °C; na sequência, as massas foram determinadas gravimetricamente.

3.6.2 Análises fisiológicas

Para avaliar as possíveis alterações nos indivíduos expostos aos diversos tratamentos ao longo de 30 dias, foram realizadas análises fisiológicas uma vez por semana de pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b*, carotenoides), antioxidantes (antocianina e flavonoide) e estresse oxidativo (peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos). Para as análises fisiológicas foram feitos bioensaios contendo todas as especificações previamente estabelecidas no protocolo para cinética de crescimento (item 3.6.1).

3.6.2.1 Pigmentos fotossintéticos

Para a análise de pigmentos fotossintéticos, clorofila *a*, *b* e carotenoides foi utilizado a metodologia de Lichtenthaler (1987). Os pigmentos foram extraídos com uma solução padrão contendo acetona 80% (v/v), carbonato de magnésio e água deionizada. As amostras de planta (50 mg biomassa fresca) foram adicionadas em tubos contendo 5,0 ml da solução e foram maceradas e homogeneizadas em Ultra turrax (marca Ika). Os tubos foram envolvidos em papel alumínio e foram mantidos em geladeira a 4 °C por 24 h. Após o período de 24 h, o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec: 2100 Pro Pharmacia) nos comprimentos de onda 470, 645, 662 e 710 nm. Para o cálculo da concentração de pigmentos utilizou-se o mesmo peso de biomassa utilizada para extração (50 mg biomassa fresca), porém a mesma foi seca em estufa por 48 h em 45 °C até massa constante e após o período a biomassa foi pesada gravimetricamente e os resultados da determinação de pigmentos foram expressos em mg g⁻¹ MS (massa seca).

3.6.2.2 Antioxidantes

Para determinação de antocianinas, amostras de biomassa fresca de *R. natans* (20 mg) foram colocadas em tubo falcon com solução de 3,0 ml contendo metanol e ácido clorídrico (99:1). As mesmas foram mantidas em temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) por 24h cobertas com papel alumínio para evitar fotoredução. Após esse período foi realizada leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec: 2100 Pro Pharmacia) no comprimento de onda de 550 nm. Para o cálculo de determinação da antocianina, utilizou-se o coeficiente de extinção 33.000 mol⁻¹cm⁻¹ e o resultado foi expresso por mmol g⁻¹ MF (massa fresca) (WAGNER, 1979).

Os flavonoides foram determinados utilizando uma solução de etanol e ácido acético (99:1) (KRIZEK; BRITZ; MIRECKI, 1998). As amostras de plantas frescas (0,02 g) foram adicionadas em tubos falcon com 3 ml da solução e em seguida foram colocadas em banho maria a 80 °C por 10 min para extração. Após o resfriamento, as amostras foram lidas por espectrofotometria de UV-VIS (Ultrospec: 2100 Pro Pharmacia) no comprimento de onda 270 nm e os resultados foram expressos em % de Abs g⁻¹ MF.

3.6.2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo foi medido através da análise de peroxidação lipídica pela determinação de malondialdeído (MDA) (HEATH; PACKER, 1968; MEIR; PHILOSOPH-HADAS; AHARONI, 1992). Amostras frescas de *R. natans* (50 mg) foram trituradas e homogeneizadas em 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% em tubos falcon e centrifugadas a 6200 G (marca Heraeus: Megafuge 3.0 R) à 25 °C por 15 min. O sobrenadante foi adicionado em tubo falcon contendo 3,0 ml de TCA 20% e 0,5% de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). Esta solução foi aquecida a 96 °C em banho maria por 30 min. Após resfriamento, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-VIS (Ultrospec: 2100 Pro Pharmacia) nos comprimentos de onda 532 e 600 nm e os resultados foram expressos em nmol g⁻¹ MF.

Para o extravasamento de eletrólitos, 50 mg da biomassa fresca de *R. natans* foram adicionadas em tubos falcon contendo 10,0 ml de água deionizada de alta pureza obtidas pelo sistema Millipore 5, Direct – QTM. Após 3 h em temperatura ambiente (25 °C aproximadamente), a solução nos tubos foi medida com condutivímetro para medida inicial de condutividade elétrica. Após este procedimento, os tubos foram incubados em banho Dubnoff (marca Tecnal/TE- 053) durante trinta minutos a 96 °C. Após resfriamento a condutividade final foi determinada e os resultados foram expressos pela porcentagem de extravasamento de eletrólitos (RAHMAN; HASEGAWA, 2012).

3.6.3 Modelo de crescimento das macrófitas aquáticas nos diferentes tratamentos

Para a análise da cinética de crescimento, as massas frescas acumuladas das macrófitas durante o período amostral foram ajustados ao modelo logístico (Equação I; (BIANCHINI *et al.*, 2010). O tempo de duplicação (td) da biomassa fresca foi calculado pela Equação II. Os parâmetros cinéticos foram obtidos por regressões não lineares de acordo com o algoritmo iterativo de Levenberg–Marquardt (PRESS *et al.*, 1993).

A partir de teste preliminar, pelo qual determinou-se os valores máximos de biomassa fresca e largura acumulada que os indivíduos podem chegar no frasco do bioensaio, a capacidade suporte (K) de incremento de biomassa de *R. natans* em função da área disponível para o crescimento nos bioensaios foi delimitada em 1250 mg para peso e 35 cm para largura. Esses valores (K) foram adotados como constante no modelo logístico (Equação I) para todos os tratamentos pois, o K não será o limitante no experimento sendo o coeficiente de crescimento (μ) o parâmetro que terá variação.

$$\frac{dN}{dt} = \mu \times \left(1 - \frac{N}{K}\right) \quad \text{(Equação I),}$$

em que: N = peso (mg) ou largura (cm), μ = coeficiente de crescimento (dia⁻¹), K = biomassa máxima ou largura máxima de *R. natans* no frasco do bioensaio e t = tempo (dia⁻¹).

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (\text{Equação II})$$

em que: t_d = tempo de duplicação (dia^{-1}).

Ao final dos experimentos de crescimento, para avaliar quanto foi o crescimento acumulado em largura e biomassa das plantas durante o período amostral (30 dias ou até a morte dos indivíduos) utilizou-se a: [largura final (cm) – largura inicial (cm)] e [biomassa fresca final (mg) – biomassa fresca inicial (mg)] em todos os tratamentos.

3.6.4 Coeficiente de temperatura

O coeficiente de temperatura (Q_{10}) (Equação III) é o fator pelo qual a taxa de uma reação fisiológica (ou processo) aumenta quando a temperatura se eleva em 10 °C. De acordo com a regra de Van't Hoff, um aumento de 10 °C na temperatura acarreta duplicação na velocidade de uma reação química (BOWIN *et al.*, 1985).

Neste estudo o Q_{10} foi obtido através dos valores de coeficiente de crescimento obtidos através da cinética de crescimento (Equação I) em todos os tratamentos.

$$Q_{10} = \left(\frac{\mu_2}{\mu_1} \right)^{\frac{10}{t_2 - t_1}} \quad (\text{Equação III})$$

em que: μ_2 = coeficiente de crescimento (dia^{-1}) da maior temperatura (°C), μ_1 = coeficiente de crescimento (dia^{-1}) da menor temperatura (°C), t_2 = tempo (dia^{-1}) da maior temperatura e t_1 = tempo (dia^{-1}) da menor temperatura.

3.6.5 Determinação de metais nos bioensaios e digestão e análise da biomassa

Para todos os bioensaios houve determinação de metais na solução inicial, dia 0 do experimento e na solução final (dia 30 ou até quando ocorreu a morte dos indivíduos). Foi retirada uma alíquota (30 ml) onde foi adicionada em tubos falcon de polipropileno com capacidade de 50 ml e as amostras foram acidificadas com HCl 0,1% para preservação até determinação.

Ao final os indivíduos de *R. natans* expostos a água contaminada com rejeito, foram secos em estufa e suas massas determinadas; em seguida foram transferidos para tubos de ensaio de vidro com tampa. Nestes tubos foram adicionados 2,0 ml de ácido nítrico; 2,0 ml de água ultra pura e 1,0 ml de peróxido de hidrogênio e depois foram colocados em bloco digestor (Dry block, marca Solab - SL16) com temperatura de 100 °C por cerca de 1 hora para digestão da biomassa (Figura 6) em sistema fechado. Após a digestão, os tubos foram retirados do bloco digestor para resfriar, o digerido foi filtrado em papel filtro qualitativo 80 g m² para retirada dos sobrenadantes. A solução foi avolumada com água ultra pura e a determinação de metais foi realizada por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução (modelo 300, marca Analytik Jena- HR CS-AAS).



Figura 6. Digestão de biomassa seca de *R. natans* em sistema fechado em bloco digestor (Fonte: arquivo pessoal)

3.6.6 Eficiência de remoção

A eficiência de remoção dos metais (absorção ou adsorção) nas soluções-teste foi calculado para todos os tratamentos de acordo com Tanhan *et al.*, 2007 (Equação IV):

$$\% \text{ eficiência} = \frac{C_0 - C_1}{C_0} \times 100 \quad (\text{Equação IV})$$

em que: C0 – concentração inicial do metal na solução e C1 – concentração final do metal na solução

3.7 Tratamento Estatístico

Para testar a normalidade dos dados dos tratamentos controle e concentrações de metais dos experimentos de crescimento e fisiologia foi utilizado o teste Kolmogorov-Smirnov. Como os dados foram paramétricos, a análise de variância Two-way ANOVA com medidas repetidas foram realizadas para determinar se houve diferença significativa ($\alpha = 0,05$) entre as médias dos grupos tratamentos controle e concentrações dos metais durante o tempo de exposição aos metais. Para o estudo, a variável independente foi o tempo de exposição dos tratamentos (dias e semanas) e a variável dependente foram os valores determinados nos parâmetros de crescimento e fisiologia. O teste de comparações múltiplas Tukey foi utilizado para demonstrar onde ocorreu a diferença significativa, considerando nível de significância de 5,0% ($\alpha = 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E PERCENTUAL DE EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO PARA OS METAIS INDIVIDUAIS

4.1.1 Bioensaios com concentrações de Al

As concentrações de oxigênio dissolvido nos bioensaios com distintas concentrações de Al se mantiveram estáveis em torno de $5 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para todos os meios de crescimento, nas duas temperaturas, durante todo o período amostral. Em relação à condutividade elétrica, os valores variaram de 88 ± 22 à $331 \pm 26 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$ dependendo da concentração de Al. Os tratamentos controles (25 e 27 °C) permaneceram com o pH próximo a $7 \pm 0,6$ durante os 30 dias de experimento. Nos demais tratamentos, os meios se acidificaram (pH 4-5) após a adição das concentrações de Al (APÊNDICE A).

A cinética de crescimento nos indivíduos de *R. natans* que ficaram expostos as concentrações de Al (Figura 7) indicaram que, todos os bioensaios foram afetados negativamente com a adição do metal ($p < 0,0001$), pois houve pouco ou nenhum crescimento nesses indivíduos comparado aos controles (25 e 27 °C). Não foi possível ajustar o crescimento com os resultados de largura [$\text{Al}_{2(25^\circ)}$, $\text{Al}_{3(25^\circ)}$, $\text{Al}_{1(27^\circ)}$, $\text{Al}_{2(27^\circ)}$, $\text{Al}_{3(27^\circ)}$] e biomassa [$\text{Al}_{3(25^\circ)}$, $\text{Al}_{1(27^\circ)}$, $\text{Al}_{2(27^\circ)}$ e $\text{Al}_{3(27^\circ)}$].

Observou-se que o crescimento em largura de *R. natans* na temperatura de 25 °C foi mais afetado do que o incremento em biomassa na mesma condição, pois, houve crescimento em largura apenas no tratamento $\text{Al}_{1(25^\circ)}$ até o 15º dia de exposição ao metal.

A 27 °C observou-se efeito negativo em todos os bioensaios com adição das concentrações de Al ($p < 0,0001$), pois, não houve crescimento em largura tampouco em biomassa. Além disso, nos tratamentos em que não foram observados crescimentos, os indivíduos de *R. natans* apresentaram sintomas de fitotoxicidade (clorose e necrose dos tecidos vegetais).

Quando comparado a largura nas duas temperaturas, observou-se que os controles não se diferem ao final do tempo de exposição ao nível de significância de 5% ($p = 0,7651$ para

largura e $p = 0,5919$ para biomassa), porém os mesmos, se diferenciaram dos tratamentos com as distintas concentrações de Al ($p < 0,0001$).

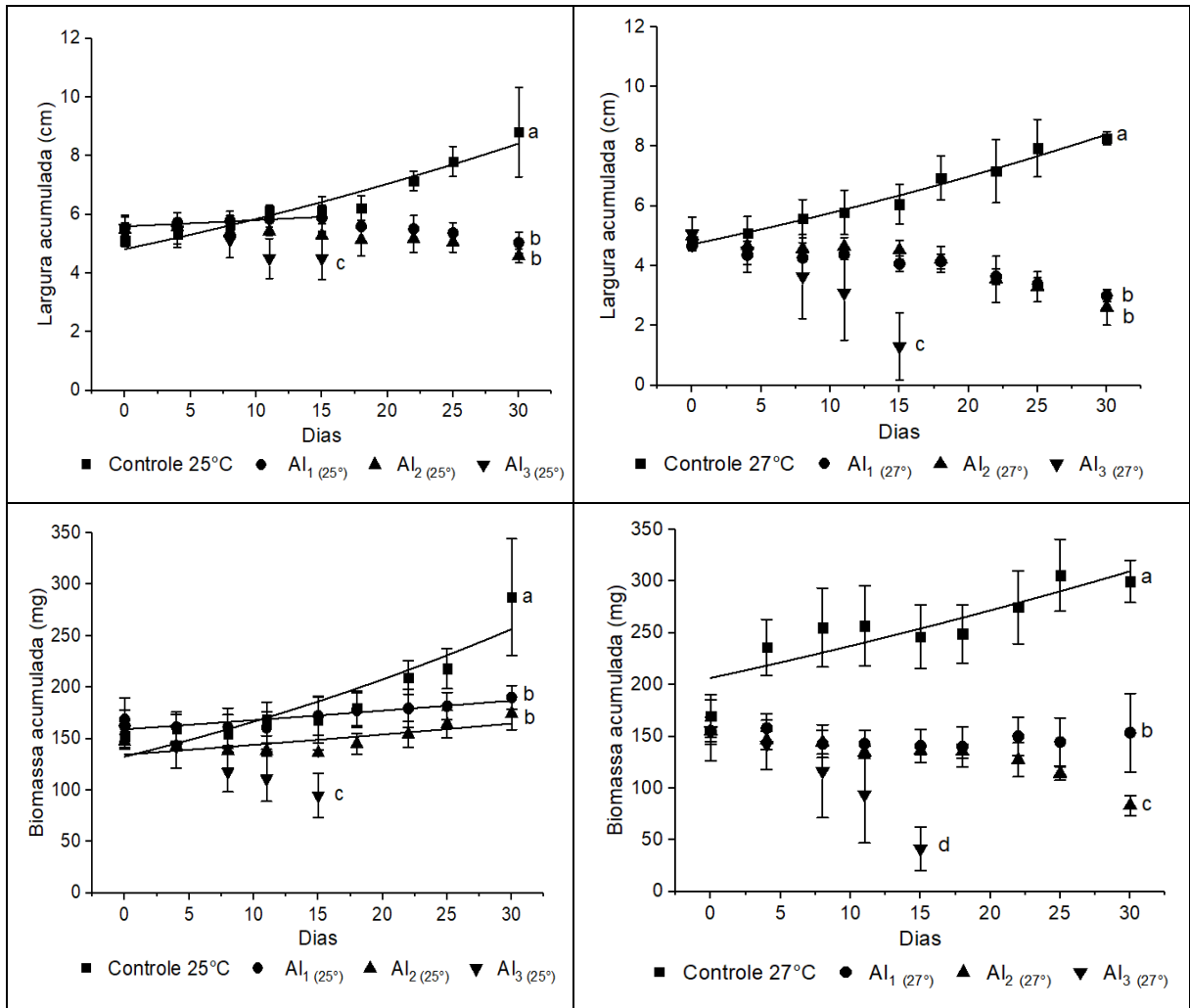


Figura 7. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de *Ricciocarpus natans* no controle e em distintas concentrações de Al (Al₁ = 1,5 mg L⁻¹; Al₂ = 2,5 mg L⁻¹; Al₃ mg L⁻¹) sobre duas temperaturas (25 °C e 27 °C) durante 30 dias. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.

Ao final do período dos experimentos, comparando-se com os controles, houve perda de crescimento em largura (cm) e biomassa (mg) em todos os bioensaios expostos a todas as concentrações de Al (Figura 8). A 27 °C + a adição de Al influenciou negativamente o incremento total tanto na largura quanto na biomassa de *R. natans*. A redução em biomassa e

largura foi crescente com a concentração e com a temperatura, sendo de 12% à 65% biomassa 25 °C e 41% à 76% biomassa 27 °C; 14% à 57% largura 25 °C e 38% à 70% largura 27 °C.

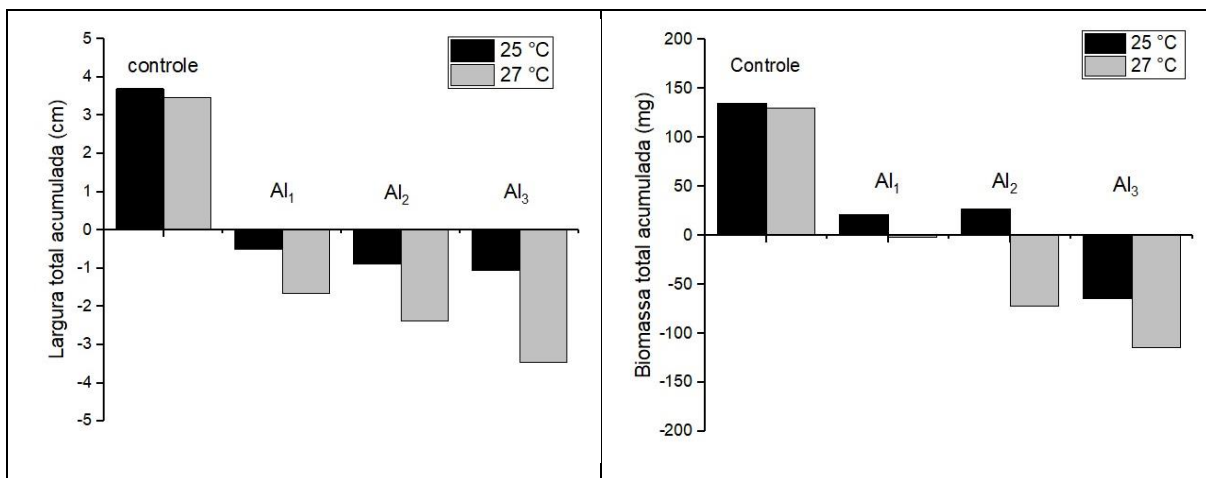


Figura 8. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e nas concentrações de Al (Al₁ = 1,5 mg L⁻¹; Al₂ = 2,5 mg L⁻¹; Al₃ mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C).

Os ajustes cinéticos apresentaram coeficientes de determinação (r^2) acima de 70% para a maioria dos tratamentos (Tabela 5). A parametrização do crescimento de *R. natans* em função da largura e biomassa nos tratamentos com Al indicou que os μ foram cerca de 5 vezes menor do que o controle a 25 °C para largura e cerca de 4 vezes menor do que o controle a 25 °C para biomassa (Tabela 5). Esses baixos μ dia⁻¹ influenciaram no td da biomassa da planta, que foi muito maior que os controles, cerca de 5 vezes para largura e até 4 vezes para biomassa (Tabela 5).

O coeficiente de temperatura (Q_{10}) da biomassa controle foi 0,12 e o Q_{10} da largura controle foi 1,16. Para os tratamentos com adição de Al não foi possível calcular o coeficiente de temperatura (Q_{10}) pois não houve crescimento nos tratamentos à 27 °C.

Tabela 5. Coeficiente de crescimento ($\mu \text{ dia}^{-1}$), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle, concentrações de Al ($\text{Al}_1 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Al}_2 = 2,5 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Al}_3 \text{ mg L}^{-1}$) nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.

Bioensaios	Largura			Biomassa		
	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2
Controle 25°C	$0,02283 \pm 0,00223$	30	0,9	$0,0259 \pm 0,00431$	27	0,8
Al_1 (25°)	$0,00451 \pm 0,00091$	154	0,9	$0,00625 \pm 0,00126$	111	0,7
Al_2 (25°)	-	-	-	$0,00767 \pm 0,00245$	90	0,5
Al_3 (25°)	-	-	-	-	-	-
Controle 27°C	$0,02352 \pm 0,00131$	30	1	$0,01697 \pm 0,00376$	41	0,7
Al_1 (27°)	-	-	-	-	-	-
Al_2 (27°)	-	-	-	-	-	-
Al_3 (27°)	-	-	-	-	-	-

- não houve parametrização do crescimento nestes bioensaios, pois não houve incremento de largura e biomassa

A análise de pigmentos fotossintéticos para os bioensaios de crescimento de *R. natans* com Al (Figura 9) indicaram que as plantas apresentaram diminuição da concentração de pigmentos já na primeira semana ($p < 0,0001$) para todas as análises (clorofila-*a*, *b* e carotenoides).

Além disso, a primeira semana de análise foi significativamente diferente ($p < 0,0001$) entre as temperaturas, sendo que, à 27 °C a concentração de pigmentos foi menor do que à 25 °C, inclusive nos controles. Outro fator que pôde ser observado foi que quanto maior a concentração de Al maior foi o efeito negativo na concentração dos pigmentos. Comparando-se as temperaturas, os controles foram significativamente diferentes entre si ($p < 0,0001$), pois, as concentrações de pigmentos são maiores em 25 °C para praticamente todos os bioensaios.

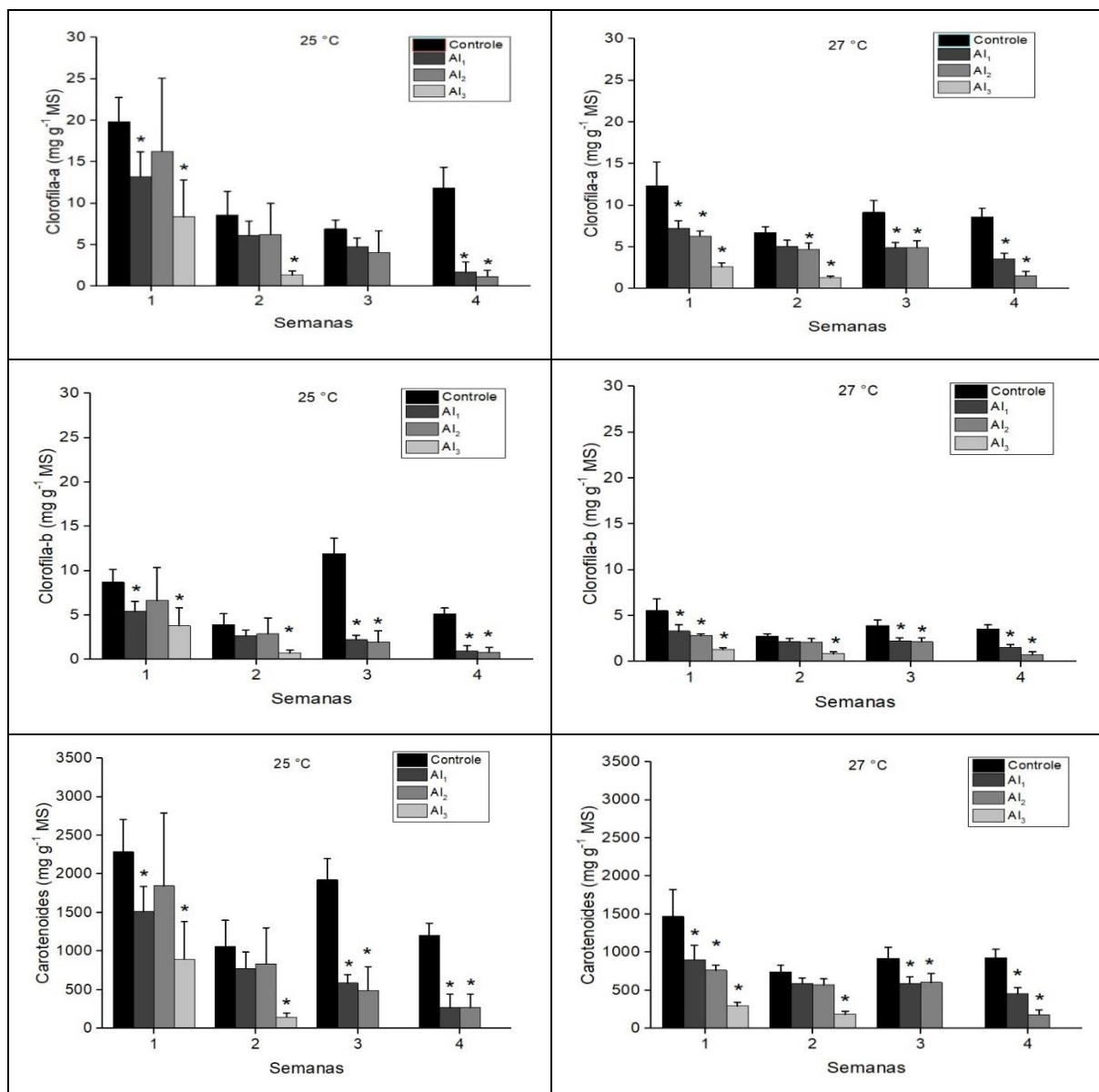


Figura 9. Pigmentos fotossintéticos (clorofila-a, clorofila-b e carotenoides) (mg g⁻¹ MS) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Al (Al₁ = 1,5 mg L⁻¹; Al₂ = 2,5 mg L⁻¹; Al₃ mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

De maneira geral, a atividade antioxidante foi reduzida com a adição das concentrações de Al (Figura 10). A antocianina dos bioensaios com Al à 25 °C foi menor que o controle ($p < 0,0001$) para o tratamento Al₃ na 2^a semana e para todas as concentrações a partir da 3^a semana. A 27 °C, comparando-se aos controles, houve um aumento de antocianina apenas no tratamento

Al₂ na 1ª semana (p = 0,0339), redução no bioensaios Al₃ na 2ª semana (p = 0,0005) e Al₂ na 4ª semana (p = 0,0264).

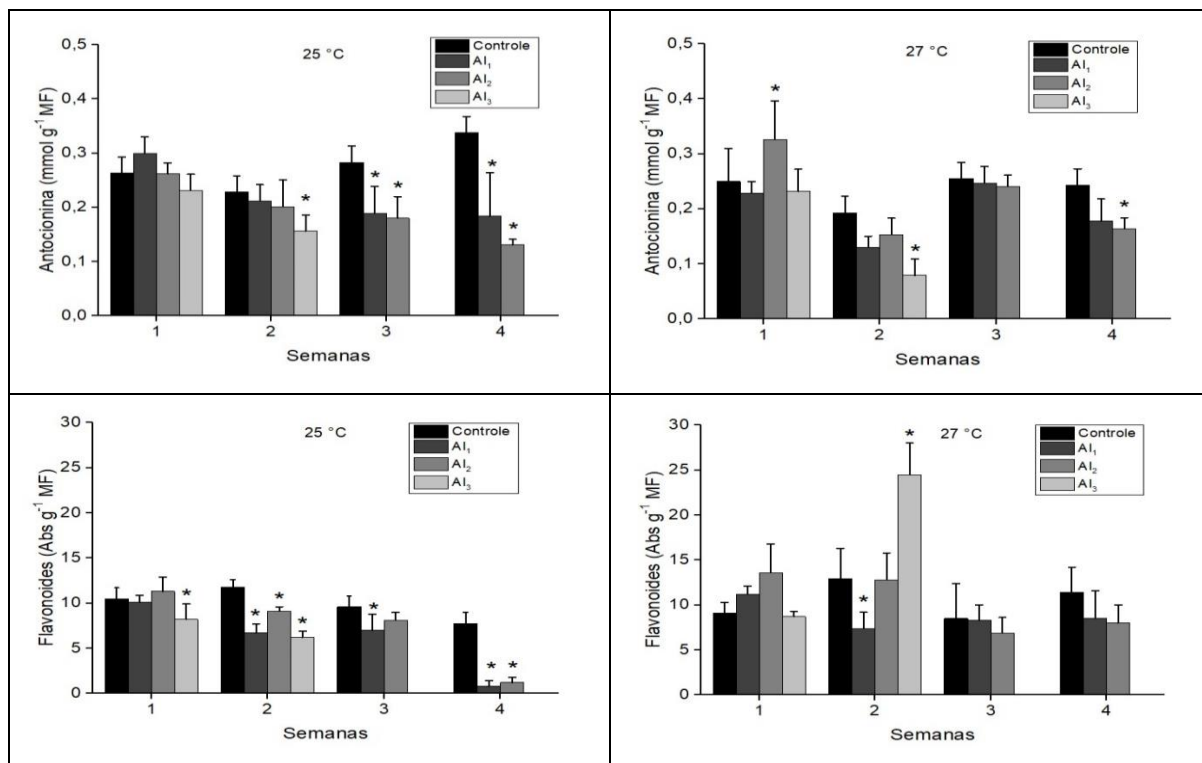


Figura 10. Antioxidantes: antocianina (mmol g⁻¹ MF) e flavonoides (Abs g⁻¹ MF) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Al (Al₁ = 1,5 mg L⁻¹; Al₂ = 2,5 mg L⁻¹; Al₃ mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

Para a análise de flavonoides (Figura 10), houve redução significativa nos bioensaios à 25 °C comparando-se aos controles desde a 1ª semana: Al₃ (p = 0,0144); 2ª semana: Al₁ (p < 0,0001), Al₂ (p = 0,0037), Al₃ (p < 0,0001); 3ª semana: Al₁ (p = 0,0075); 4ª semana: Al_{1,2 e 3} (p < 0,0001). Em 27 °C houve diferenças significativas nos tratamentos apenas na 2ª semana de análise. Houve redução de flavonoides no bioensaio Al₁ (p = 0,0185) e aumento deste antioxidante no tratamento Al₃ (p < 0,0001).

O Al também afetou as membranas celulares dos indivíduos de *R. natans*, pois foi observada a ocorrência de estresse oxidativo (Figura 11). A análise de peroxidação lipídica para os tratamentos com Al à 25 °C indicou um aumento de malondialdeído na 2ª e 3ª semana na

maioria das concentrações (semana 2: Al₁ p = 0,0002, Al₂ p = 0,0003; semana 3: Al₂ p = 0,0007) e uma diminuição na 4ª semana nos bioensaios Al_{1e2} (p < 0,0001). Em 27 °C, a redução do aldeído ocorreu em praticamente todos os tratamentos (p < 0,0001).

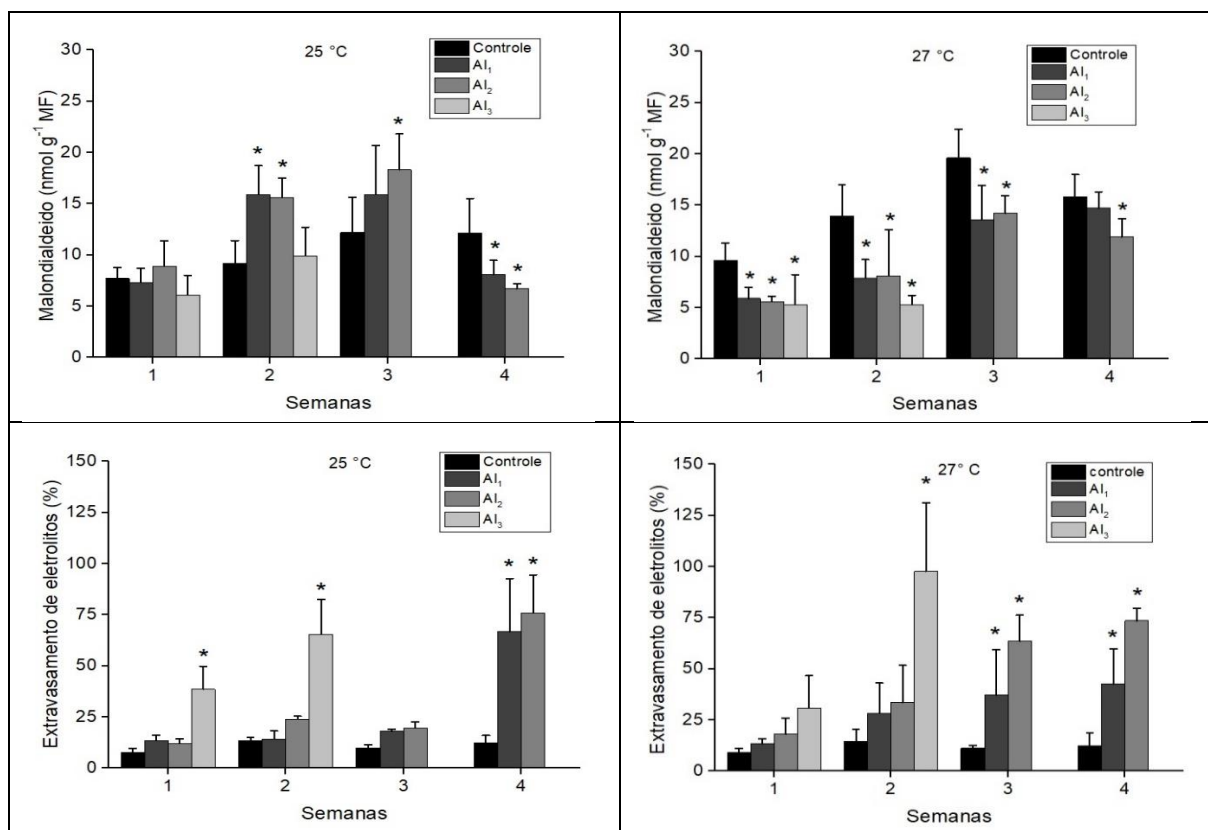


Figura 11. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído (mmol g⁻¹ MF) e percentual de extravasamento de eletrólitos de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Al (Al₁ = 1,5 mg L⁻¹; Al₂ = 2,5 mg L⁻¹; Al₃ mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

O extravasamento de eletrólitos (Figura 11) ocorreu principalmente na maior concentração (Al₃) chegando a 97% no bioensaio à 27 °C. Os tratamentos com a concentração 1 e 2 de Al (Al₁ e Al₂) tiveram até 75% de extravasamentos de eletrólitos apenas na última semana de análise em 25 °C, em 27 °C o extravasamento para essas concentrações foi significativo a partir da 3ª semana (p < 0,0001).

A determinação da concentração inicial e final de Al nos bioensaios mostrou que nas menores concentrações (Al₁) em ambas temperaturas ocorreu uma diminuição de Al no final

dos experimentos, porém, em 25 °C essa diminuição foi significativa ($p = 0,0006$) com 1 mg L⁻¹ de diferença (Figura 12). No bioensaio Al₃ na mesma temperatura a diferença de concentração final também foi significativa ($p = 0,0286$) com uma redução de 0,7 mg L⁻¹. Essa redução na concentração resultou em uma eficiência de remoção de Al chegando a cerca de 83 % na menor concentração testada [Al_{1(25°)}] (Figura 12). Comparando as temperaturas, a concentração de metais na solução final em Al_{1e3} 25 °C são significativamente menores ($p < 0,0001$) que em 27 °C.

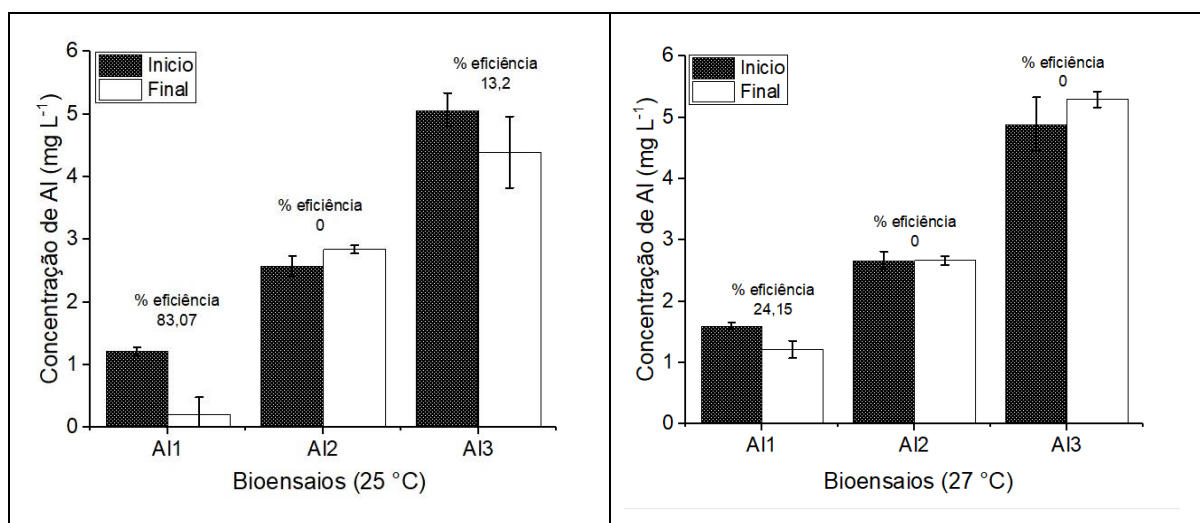


Figura 12. Concentração inicial e final de Al (Al₁ = 1,5 mg L⁻¹; Al₂ = 2,5 mg L⁻¹; Al₃ mg L⁻¹) na solução onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.

4.1.2 Bioensaios com concentrações de Mn

Para os bioensaios contendo Mn, as concentrações de oxigênio dissolvido também se mantiveram estáveis, quando comparados com os tratamentos com adição de Al, em torno de $5 \pm 0,21$ mg L⁻¹, nas duas temperaturas, durante todo o período amostral. A condutividade elétrica variou de $24 \pm 2,2$ à 147 ± 11 $\mu\text{S cm}^{-1}$ dependendo da concentração de Mn adicionada. O pH dos bioensaios com Mn se mantiveram ácidos (4-5) após a adição das concentrações de Mn (APÊNDICE A).

Pelas variáveis de crescimento (largura e biomassa) (Figura 13), observou-se que não houve diferença significativa da menor concentração testada (Mn_1) para os controles dentro das respectivas temperaturas (largura 25 °C $p = 0,0628$; largura 27 °C $p = 0,1898$; biomassa 25 °C $p = 0,8808$; biomassa 27 °C $p = 0,4389$). Porém, a partir do 22º dia de exposição ao metal o crescimento das plantas nessa concentração decaiu, em geral, cerca de 0,10 cm para largura e 57 mg de biomassa. A concentração Mn_2 afetou o crescimento de *R. natans* a partir de 22º dia de exposição em ambas as variáveis analisadas e nas duas temperaturas ($p < 0,0001$), pois houve perda de incremento para os mesmos. Além disso, comparando esta concentração nas temperaturas, 27 °C afetou negativamente ($p < 0,0001$) o crescimento em largura e biomassa nos bioensaios. Não foi possível ajustar os dados na equação de crescimento para os bioensaios contendo a concentração Mn_3 pois houve necrose nos indivíduos expostos a este tratamento.

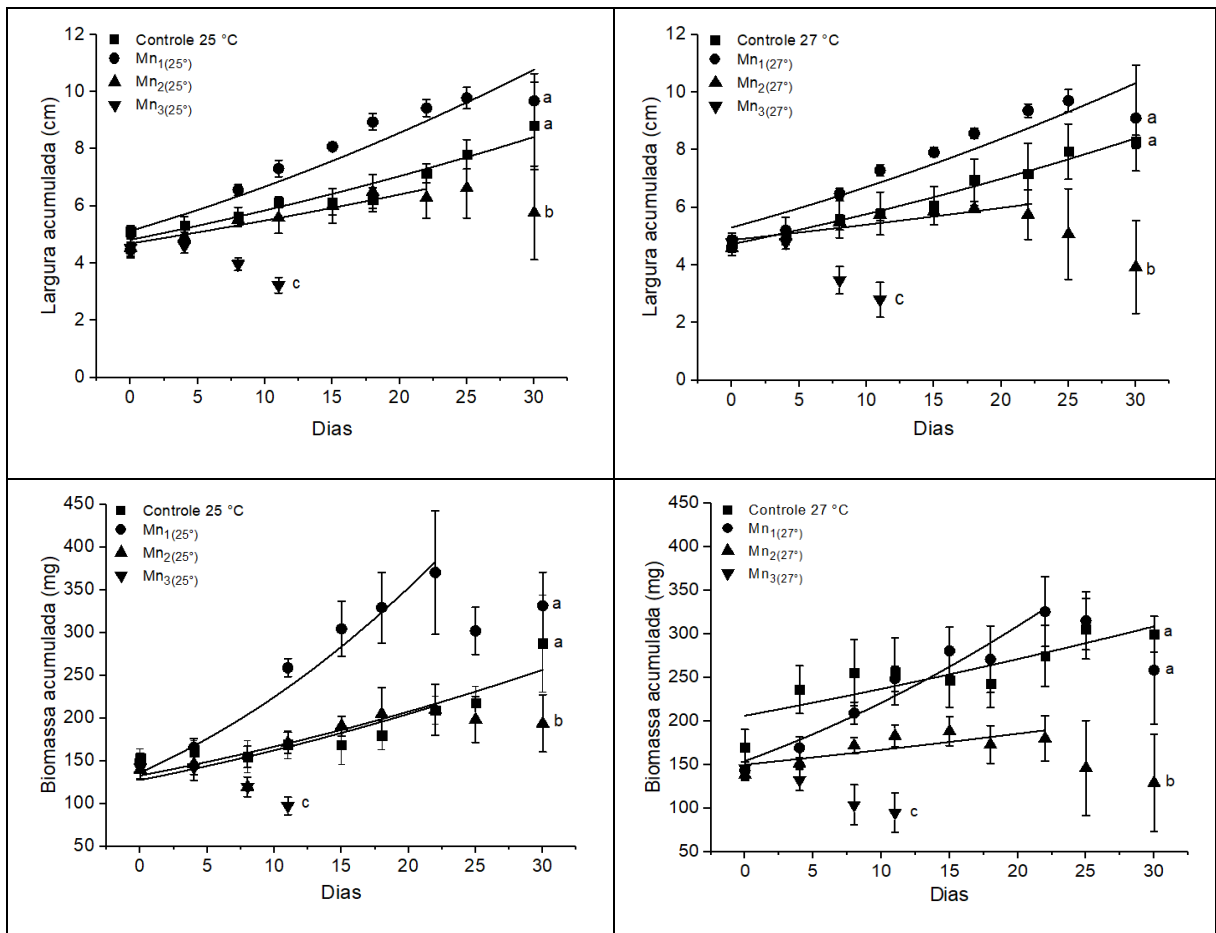


Figura 13. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de *Ricciocarpus natans* no controle e em distintas concentrações de Mn ($Mn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Mn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) sobre duas temperaturas (25 °C e 27 °C) durante 30 dias. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.

O incremento em largura e biomassa (Figura 14) foi maior que os controles na temperatura 25 °C, nos bioensaios contendo a concentração Mn₁ (aumento na largura de 18% na largura em ambas temperaturas e de 33% para biomassa a 25 °C). Este incremento ocorreu mesmo depois de ter sofrido decréscimo no crescimento a partir do 22º dia. Para os demais tratamentos, a concentração de Mn afetou negativamente tanto o incremento em largura, tendo uma perda de 11% (Mn₂) e 71% (Mn₃) em 25 °C; 18% (Mn₂) e 73% (Mn₃) em 27 °C quanto em biomassa, perda de 11% e 72 em 25°C e 36% e 79% em 27 °C respectivamente. Observa-se que a perda de incremento no crescimento é maior na temperatura de 27 °C.

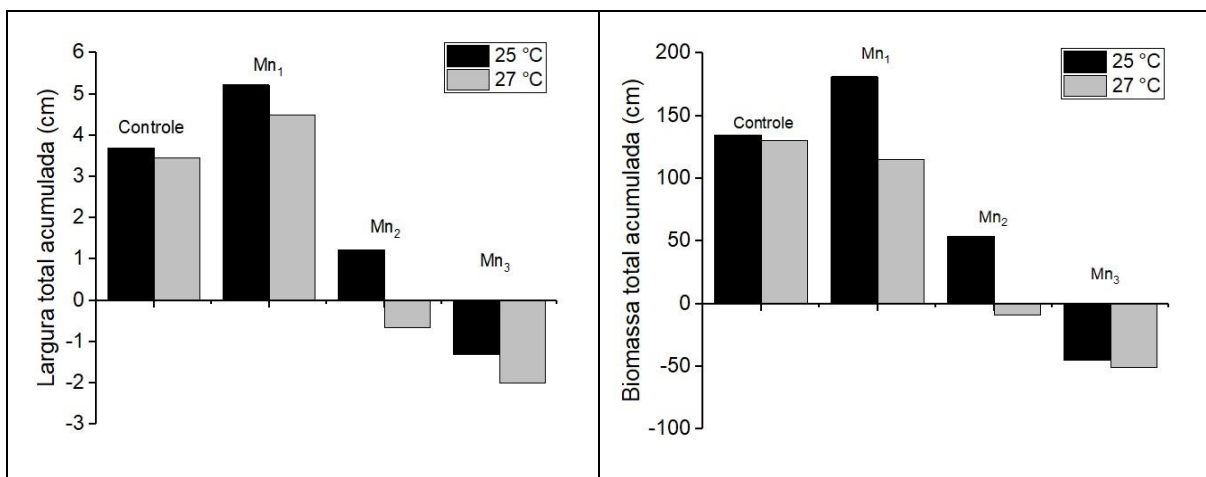


Figura 14. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e nas concentrações de Mn (Mn₁ = 0,7 mg L⁻¹; Mn₂ = 1,5 mg L⁻¹; Mn₃ = 3,0 mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C).

O coeficiente de determinação (r^2) para os ajustes cinéticos de crescimento foram em sua maioria acima de 0,7. O μ (dia⁻¹) (Tabela 6) para o bioensaio Mn₁ foi até 1,4 vezes maior que o controle para a largura e até 2,5 vezes maior no parâmetro biomassa, corroborando com os resultados obtidos no acúmulo total de crescimento demonstrado na Figura 14. Com isso, o t_d (Tabela 6) para estes bioensaios (Mn₁) foi menor que os controles. De maneira geral, os demais bioensaios (Mn_{2e3}) tiveram constante de crescimento menor que os controles e consequentemente t_d de biomassa maior que os controles.

Tabela 6. Constante de crescimento ($\mu \text{ dia}^{-1}$), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle, concentrações de Mn ($\text{Mn}_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Mn}_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Mn}_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.

Bioensaios	Largura			Biomassa		
	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2
Controle 25°C	$0,02283 \pm 0,00223$	30	0,9	$0,0259 \pm 0,00431$	27	0,8
Mn ₁ (25°)	$0,03167 \pm 0,00458$	22	0,8	$0,0582 \pm 0,00080$	12	0,9
Mn ₂ (25°)	$0,01847 \pm 0,00252$	38	0,9	$0,0273 \pm 0,00665$	25	0,7
Mn ₃ (25°)	-	-	-	-	-	-
Controle 27°C	$0,02352 \pm 0,00131$	30	0,9	$0,01697 \pm 0,00376$	41	0,7
Mn ₁ (27°)	$0,02835 \pm 0,00438$	24	0,8	$0,04246 \pm 0,00467$	16	0,9
Mn ₂ (27°)	$0,01221 \pm 0,00312$	57	0,7	$0,01226 \pm 0,00444$	57	0,5
Mn ₃ (27°)	-	-	-	-	-	-

- não houve parametrização do crescimento nestes bioensaios, pois não houve incremento de largura e biomassa

O coeficiente de temperatura (Q_{10}) para as plantas expostas ao Mn, para a largura, Mn₁ foi 0,57; Mn₂ = 0,12 e para biomassa Mn₁ = 0,21; e Mn₂ = 0,02. Comparando com os valores de controle (largura = 1,16; biomassa = 0,12) a largura sofreu mais variação nos valores.

A análise de pigmentos fotossintéticos (Figura 15) demonstrou que na primeira semana de exposição às concentrações de Mn, houve decréscimo na concentração de clorofila-*a*, *b* e carotenoide ($\text{mg g}^{-1} \text{ MS}$), nas duas temperaturas testadas. A maior concentração (Mn₃) foi a que mais interferiu negativamente na concentração dos pigmentos fotossintéticos ($p < 0,0001$). O tratamento Mn₁ apresentou um aumento na concentração de clorofila-*a* comparando com o controle, na 3ª semana de análise na temperatura de 25 °C ($p = 0,0165$) e na 2ª semana na temperatura de 27 °C ($p = 0,0093$). A clorofila-*b* para o mesmo tratamento (Mn₁) foi maior que o controle na 2ª semana à 27 °C ($p = 0,0263$) e o carotenoide também teve aumento na concentração do pigmento na mesma semana (semana 2) e temperatura (27 °C) ($p = 0,0002$), permanecendo estável na terceira semana de análise. A concentração de pigmentos é menor na temperatura de 27 °C durante todo o período de análise.

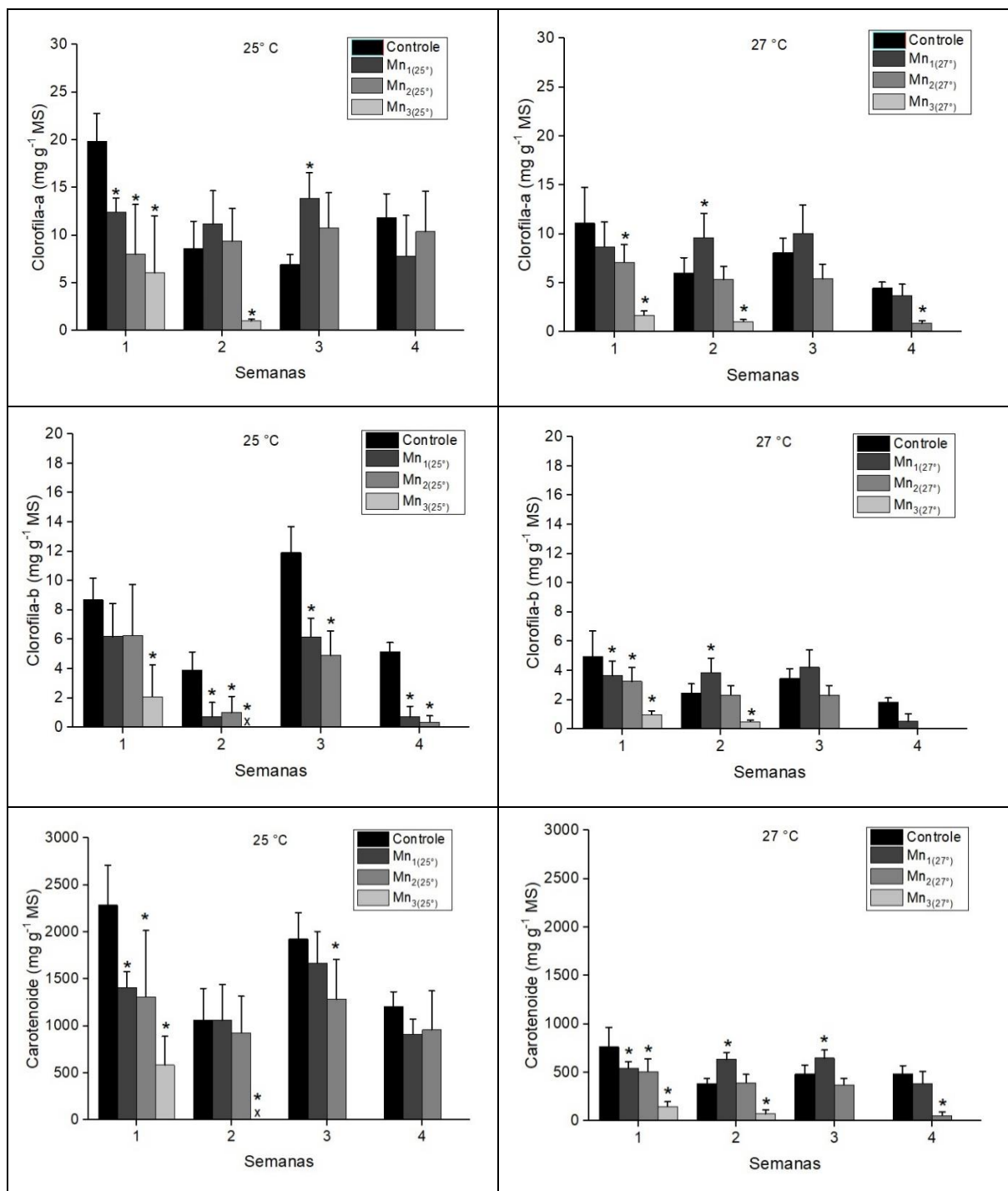


Figura 15. Pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b* e carotenoides) (mg g⁻¹ MS) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Mn (Mn₁ = 0,7 mg L⁻¹; Mn₂ = 1,5 mg L⁻¹; Mn₃ = 3,0 mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana. O (x) indica que não foi detectado o pigmento pelo limite de detecção do equipamento.

Para as análises de antioxidantes (Figura 16), a concentração de antocianina (mmol g^{-1} MF) aumentou significativamente comparando com o controle, na 2ª ($p = 0,0115$) e 3ª ($p = 0,0365$) semana nos bioensaios com concentração $\text{Mn}_{2(25^\circ)}$. A maior concentração apresentou decaimento da atividade antioxidante de antocianina desde a primeira semana de análise ($p < 0,0001$) em ambas temperaturas. Para flavonoides, a absorvância (Abs g^{-1} MF) na concentração $\text{Mn}_{2(25^\circ)}$ aumentou significativamente ($p = 0,0221$) na primeira semana de análise. Na segunda semana, além de $\text{Mn}_{2(25^\circ)}$ a concentração $\text{Mn}_{1(25^\circ)}$ ($p = 0,0047$) também teve aumento significativo e estes dois tratamentos voltaram a subir na 4ª semana de análise.

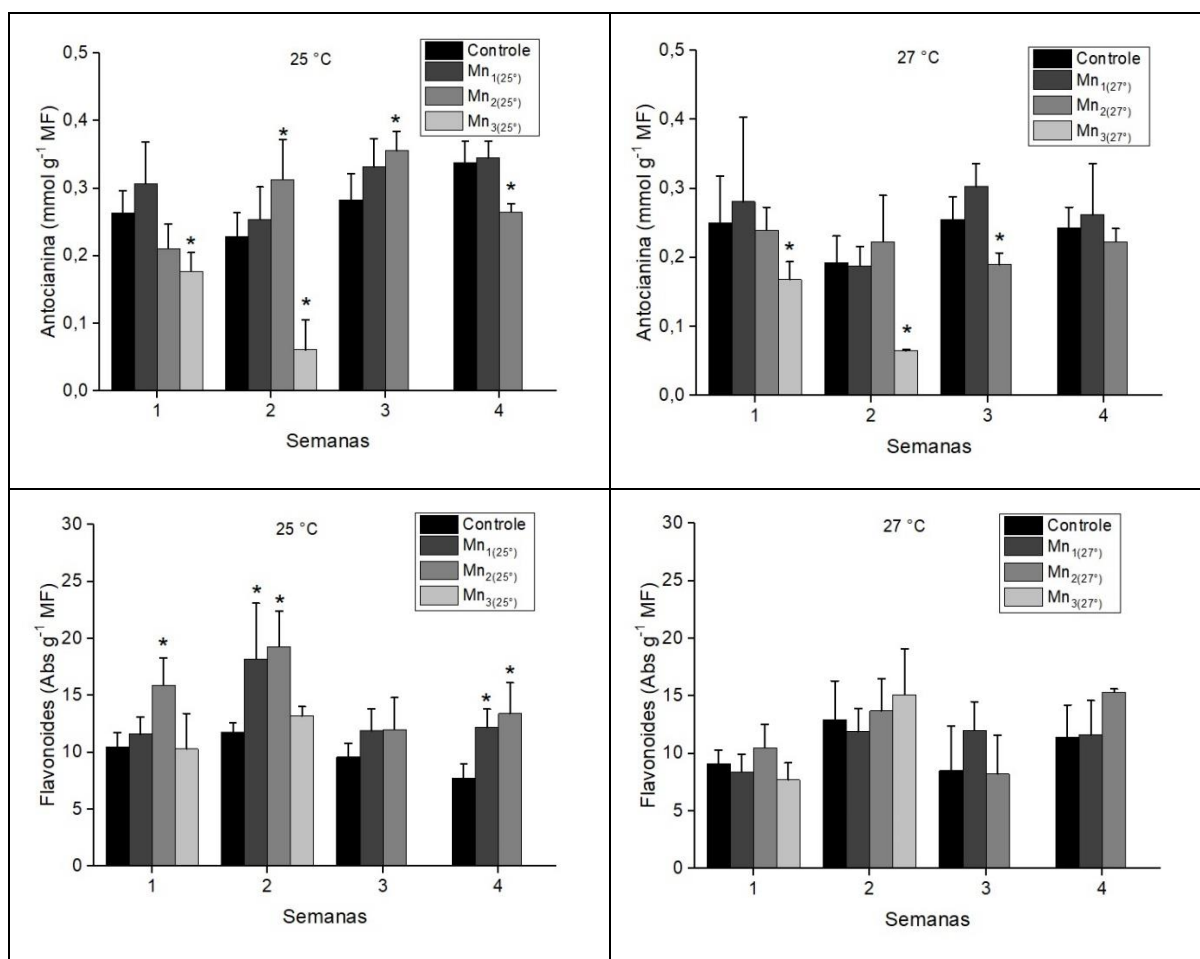


Figura 16. Antioxidantes: antocianina (mmol g^{-1} MF) e flavonoides (Abs g^{-1} MF) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Mn ($\text{Mn}_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Mn}_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Mn}_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

A peroxidação lipídica nos bioensaios submetidos as distintas concentrações de Mn (Figura 17) apenas foi significativamente maior que o controle na temperatura de 25 °C, semana 1, concentração Mn₂ (p < 0,0001). Nos demais tratamentos, houve diminuição da concentração de malondialdeído (nmol g⁻¹ MF) (p < 0,0001) principalmente em 27 °C. Houve extravasamento de eletrólitos (Figura 17) na maior concentração de Mn (Mn₃), já na primeira semana de exposição ao metal, em ambas as temperaturas (p < 0,0001) e, a partir da segunda semana, a concentração Mn₂ provocou o extravasamento de eletrólitos dos indivíduos de *R. natans* nos bioensaios, sendo maior na 4ª semana à 27 °C (p < 0,0001).

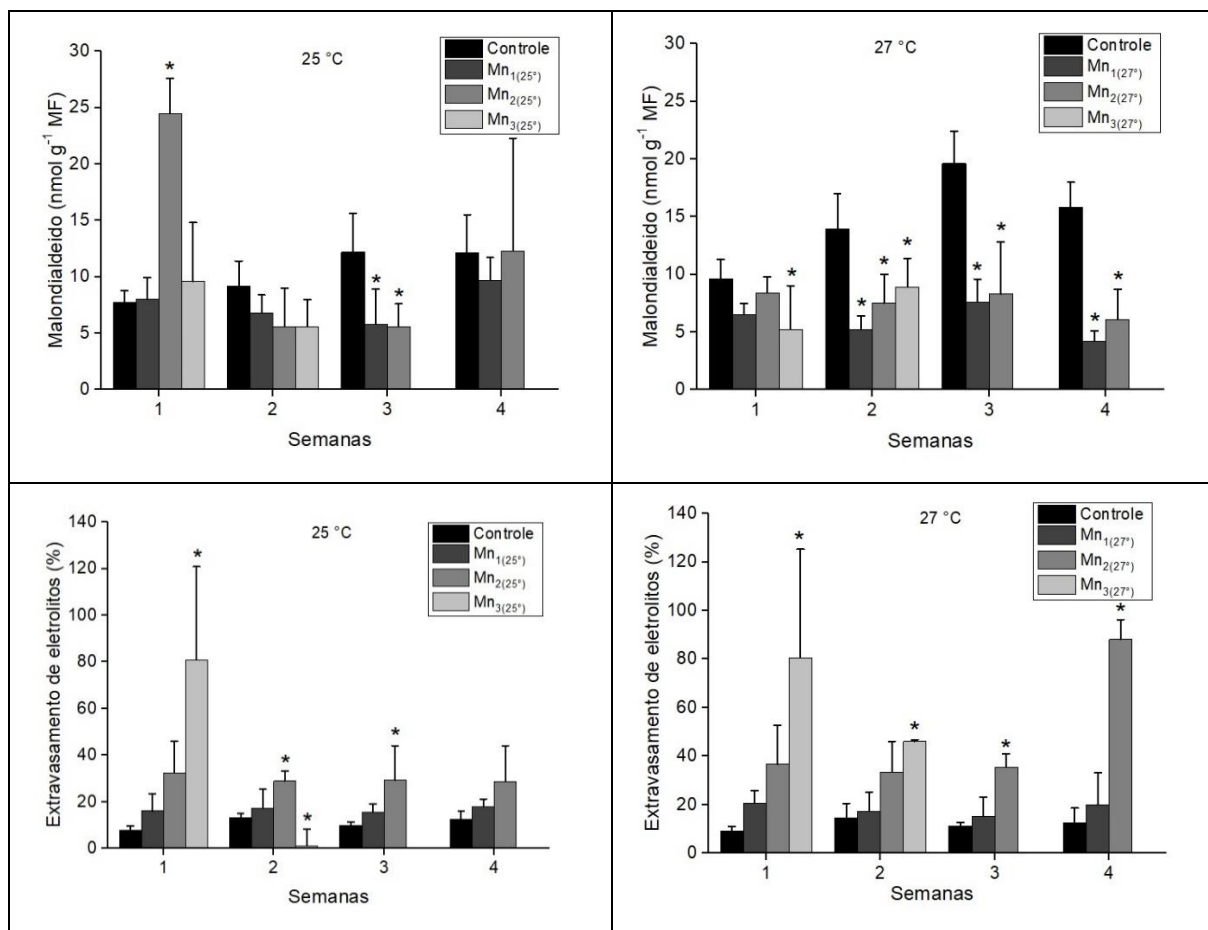


Figura 17. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído (mmol g⁻¹ MF) e percentual de extravasamento de eletrólitos de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Mn (Mn₁ = 0,7 mg L⁻¹; Mn₂ = 1,5 mg L⁻¹; Mn₃ = 3,0 mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

A diferença inicial e final nas soluções contendo as concentrações de Mn (Figura 18) foi significativa para a maior concentração testada em ambas temperaturas ($p < 0,0001$), sendo, cerca de $1,9 \text{ mg L}^{-1}$ a menos de Mn no final do experimento. Esse valor refletiu em um percentual de eficiência de remoção, com mais de 50%. Para o tratamento Mn₁ a eficiência de remoção variou de 15 à 33%. Comparando as temperaturas, não houve diferença significativa entre as concentrações finais das soluções (Mn₁ $p = 0,4334$; Mn₂ $p = 0,9568$; Mn₃ $p = 0,9211$).

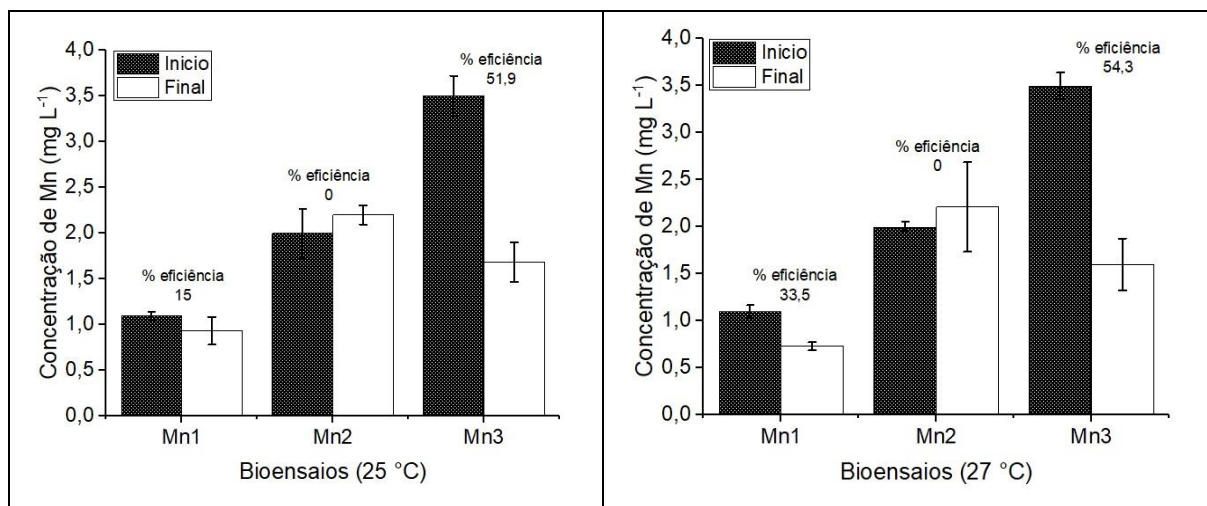


Figura 18. Concentração inicial e final de Mn (Mn₁ = $0,7 \text{ mg L}^{-1}$; Mn₂ = $1,5 \text{ mg L}^{-1}$; Mn₃ = $3,0 \text{ mg L}^{-1}$) na solução onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.

4.1.3 Bioensaios com concentrações de Zn

Nos bioensaios contendo concentrações de Zn, o pH variou de $4 \pm 0,4$ à $7 \pm 0,7$ sendo mais ácido nos meios com as maiores concentrações ($p = 0,0004$). A condutividade elétrica variou $22 \pm 0,7$ à $120 \pm 28 \text{ S } \mu\text{Scm}^{-1}$ ($p < 0,0001$) e o oxigênio dissolvido foi mantido em torno de $7 \pm 0,6 \text{ mg L}^{-1}$ durante todo o período do experimento (APÊNDICE A).

Nos experimentos de crescimento com concentrações de Zn (Figura 19) foi observado que *R. natans* foi afetada negativamente no incremento de largura e biomassa durante o tempo de exposição ao metal ($p < 0,0001$). Os tratamentos Zn₂ e Zn₃ foram igualmente tóxicos para o

crescimento dos indivíduos de *R. natans* ($p < 0,0001$), pois, desde os primeiros dias de exposição à essas concentrações do metal, os indivíduos tiveram perda de crescimento, sobrevivendo até no máximo 12 dias. A concentração Zn_1 obteve crescimento significativamente ($p < 0,0001$) inferior que os controles, sendo que a $27^\circ C$ o crescimento em largura foi interrompido no 22º dia e para o parâmetro biomassa não houve incremento de biomassa.

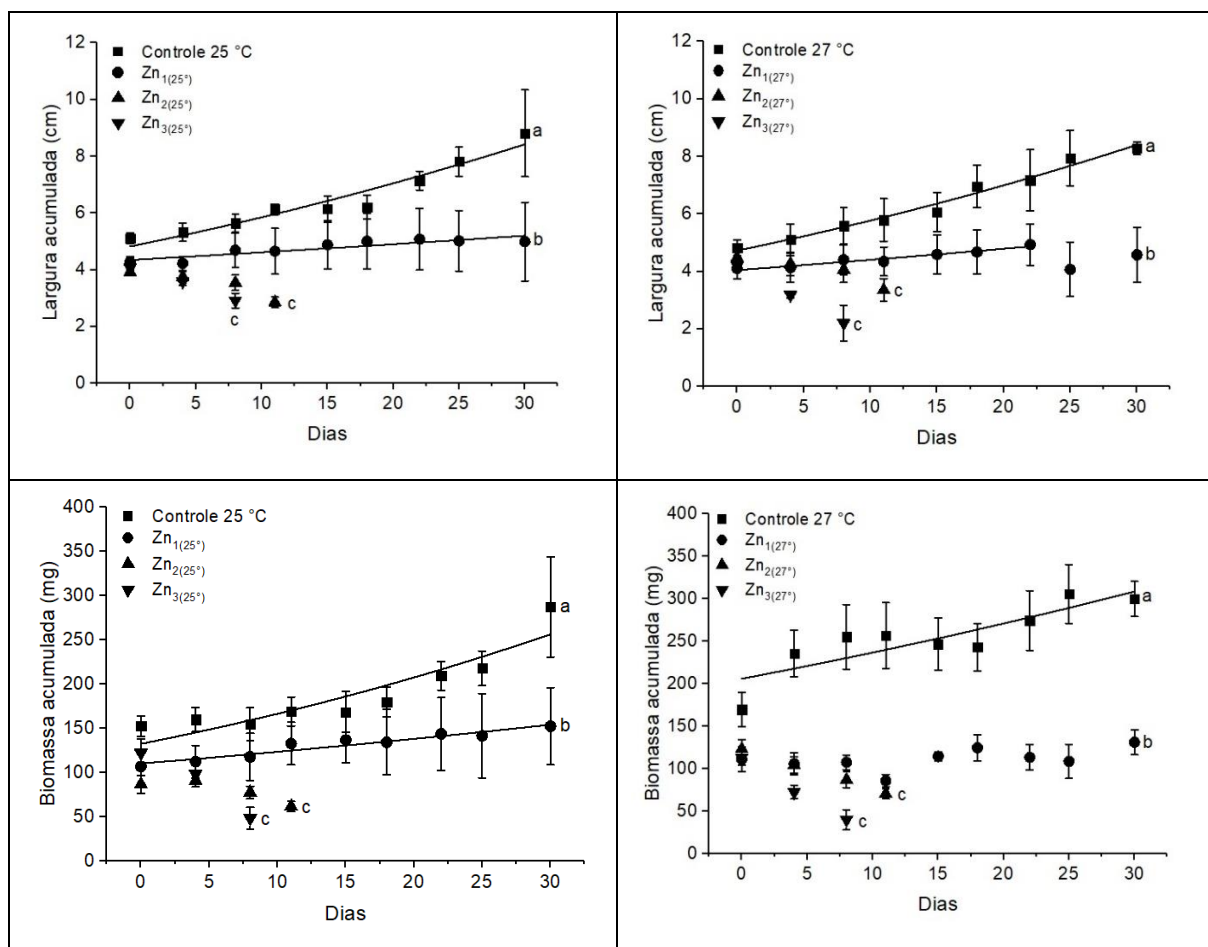


Figura 19. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de *Ricciocarpus natans* no controle e em distintas concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) sobre duas temperaturas ($25^\circ C$ e $27^\circ C$) durante 30 dias. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.

O aumento da largura e biomassa no período de exposição as concentrações de Zn (Figura 20) foi prejudicado, pois quando comparados com os controles, houve um pequeno incremento apenas nos bioensaios Zn₁ (0,7 cm em largura à 25 °C e 20 mg de biomassa em 27 °C). Os demais tratamentos apresentaram perda no crescimento. Essa redução na biomassa foi crescente com o aumento da concentração, de 33%, 82% e 85% 25 °C e 55%, 83% e 90% 27 °C para Zn₁, Zn₂ e Zn₃ respectivamente e para a largura 27%, 76%, 82% em 25 °C e 30%, 72% e 83% em 27 °C.

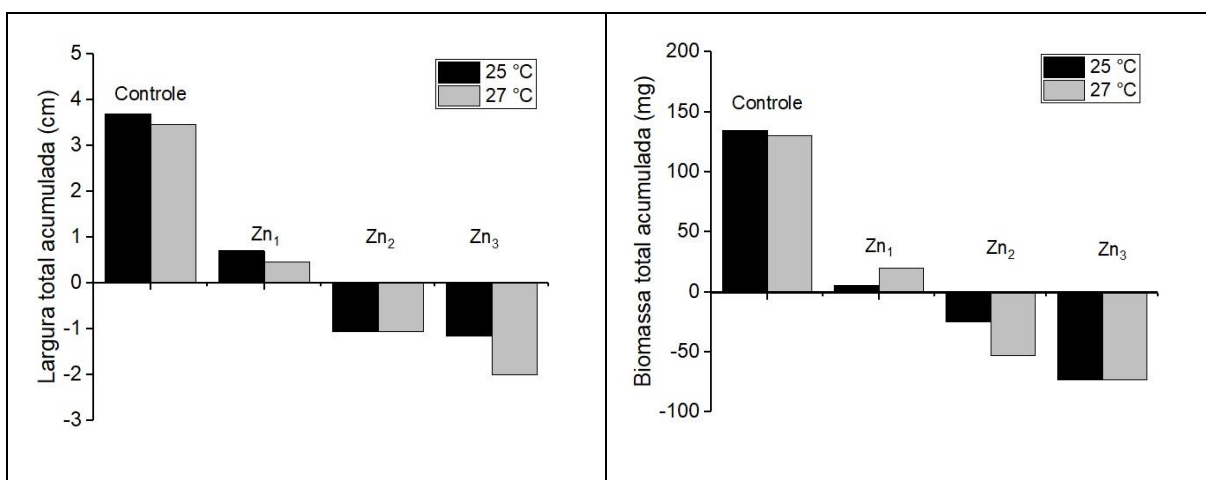


Figura 20. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e nas concentrações de Zn (Zn₁ = 0,7 mg L⁻¹; Zn₂ = 1,5 mg L⁻¹; Zn₃ = 3,0 mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C).

A parametrização de crescimento mostrou que a constante de crescimento (μ dia⁻¹) para Zn₁ foi menor que os controles, sendo, em 25 °C, para largura cerca de 3,2 vezes e para biomassa 2,1 vezes (Tabela 7). Em 27 °C, para largura, cerca de 2,4 vezes. Esses baixos valores implicaram no td da planta que foi bem superior que os controles, chegando ao número de 100 dias. Os coeficientes de determinação para os bioensaios com concentrações de Zn foram adequados, com r^2 acima de 80%.

O coeficiente de temperatura (Q_{10}) só foi possível ser calculado para a largura Zn₁ = 5,18 e este foi 4,5 vezes maior que o controle largura (Q_{10} = 1,16).

Tabela 7. Constante de crescimento ($\mu \text{ dia}^{-1}$), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle, concentrações de Zn ($\text{Zn}_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Zn}_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Zn}_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.

Bioensaios	Largura			Biomassa		
	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2
Controle 25°C	$0,02283 \pm 0,00223$	30	0,9	$0,02590 \pm 0,00431$	27	0,8
Zn_1 (25°)	$0,00695 \pm 0,00136$	100	0,8	$0,01248 \pm 0,00146$	56	0,9
Zn_2 (25°)	-	-	-	-	-	-
Zn_3 (25°)	-	-	-	-	-	-
Controle 27°C	$0,02352 \pm 0,00131$	30	0,9	$0,01697 \pm 0,00376$	41	0,7
Zn_1 (27°)	$0,00966 \pm 0,00098$	78	0,9	-	-	-
Zn_2 (27°)	-	-	-	-	-	-
Zn_3 (27°)	-	-	-	-	-	-

- não houve parametrização do crescimento nestes bioensaios, pois não houve incremento de largura e biomassa

A análise de pigmentos fotossintéticos (Figura 21) indicou uma perda significativa ($p < 0,0001$) de clorofila-*a,b* e carotenoides na primeira semana de exposição ao metal para todos os bioensaios (25 e 27 °C). Na segunda semana de análise, em 25 °C, houve um aumento significativo ($p < 0,0001$) de clorofila-*a* e carotenoides no bioensaio Zn_1 , que nas próximas semanas tenderam-se a voltar à normalidade comparando-se ao controle. O bioensaio Zn_2 manteve-se com baixas concentrações de pigmentos nas duas temperaturas.

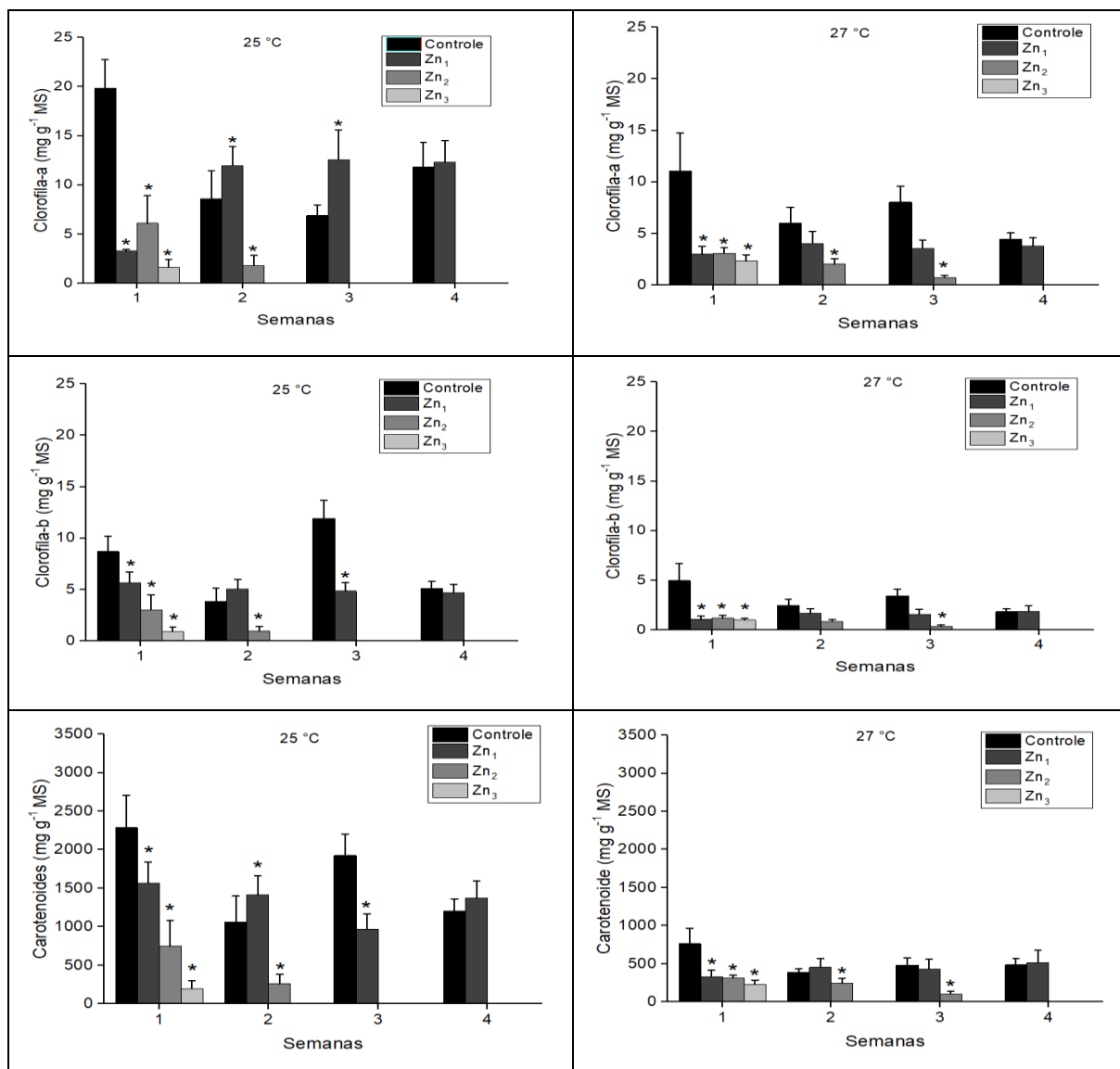


Figura 21. Pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b* e carotenoides) (mg g⁻¹ MS) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Zn (Zn₁ = 0,7 mg L⁻¹; Zn₂ = 1,5 mg L⁻¹; Zn₃ = 3,0 mg L⁻¹) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

A antocianina (Figura 22) se manteve estável, quando comparada ao controle para a maioria dos bioensaios, porem houve perda significativa ($p < 0,0001$) da ação antioxidante na semana 1 de análise no bioensaio Zn₁(25°), mas, este voltou a ter as concentrações próximas ao controle nas semanas seguintes. Já a 27 °C a perda da ação antioxidante da antocianina foi na maior concentração de zinco testada (Zn₃), e este obteve maior redução na 2ª semana de análise.

Para flavonoides (Figura 22), em 25 °C houve aumento significativo da ação antioxidante contra as concentrações iniciais de Zn (Zn_1 e Zn_2), na primeira semana de análise. Nas semanas 2 e 3 observou-se uma estabilidade, comparando-se ao controle. Na semana 4, no único bioensaio que ainda sobreviveu, a ação antioxidante dos flavonoides voltou a subir significativamente ($p < 0,0001$). A 27 °C, a maior concentração de Zn foi mais afetada quanto a ação dos flavonoides, pois esta foi reduzida ($p < 0,0001$).

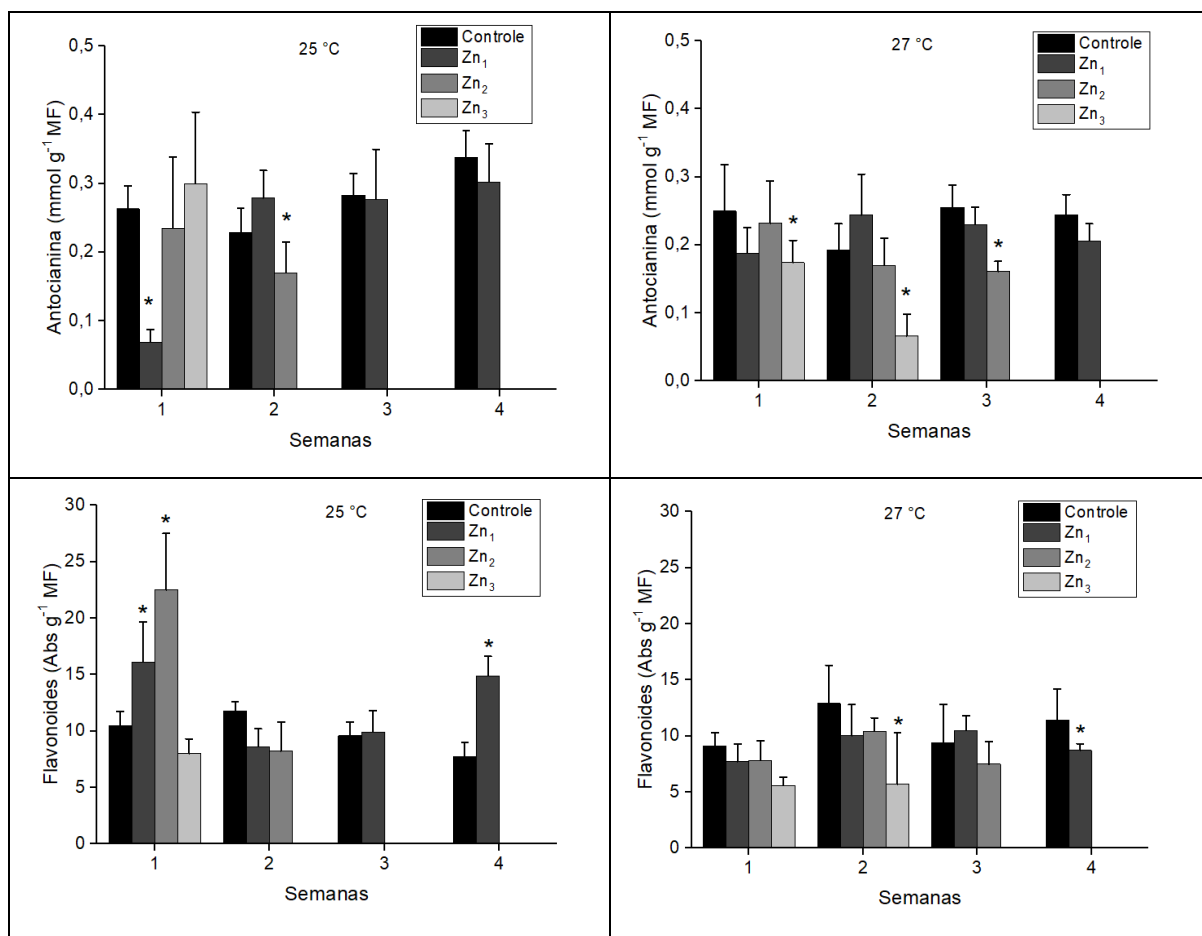


Figura 22. Antioxidantes: antocianina (mmol g⁻¹ MF) e flavonoides (Abs g⁻¹ MF) de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

O estresse oxidativo nos bioensaios de Zn (Figura 23) foi demonstrado principalmente pelo extravasamento de eletrólitos que ocorreu a partir da primeira semana nos bioensaios e principalmente na temperatura de 27 °C ($p < 0,0001$). A peroxidação lipídica ficou mais visível na segunda semana de análise 25 °C, com o aumento significativo de malondialdeído para os tratamentos Zn_{1e2} ($p < 0,0001$).

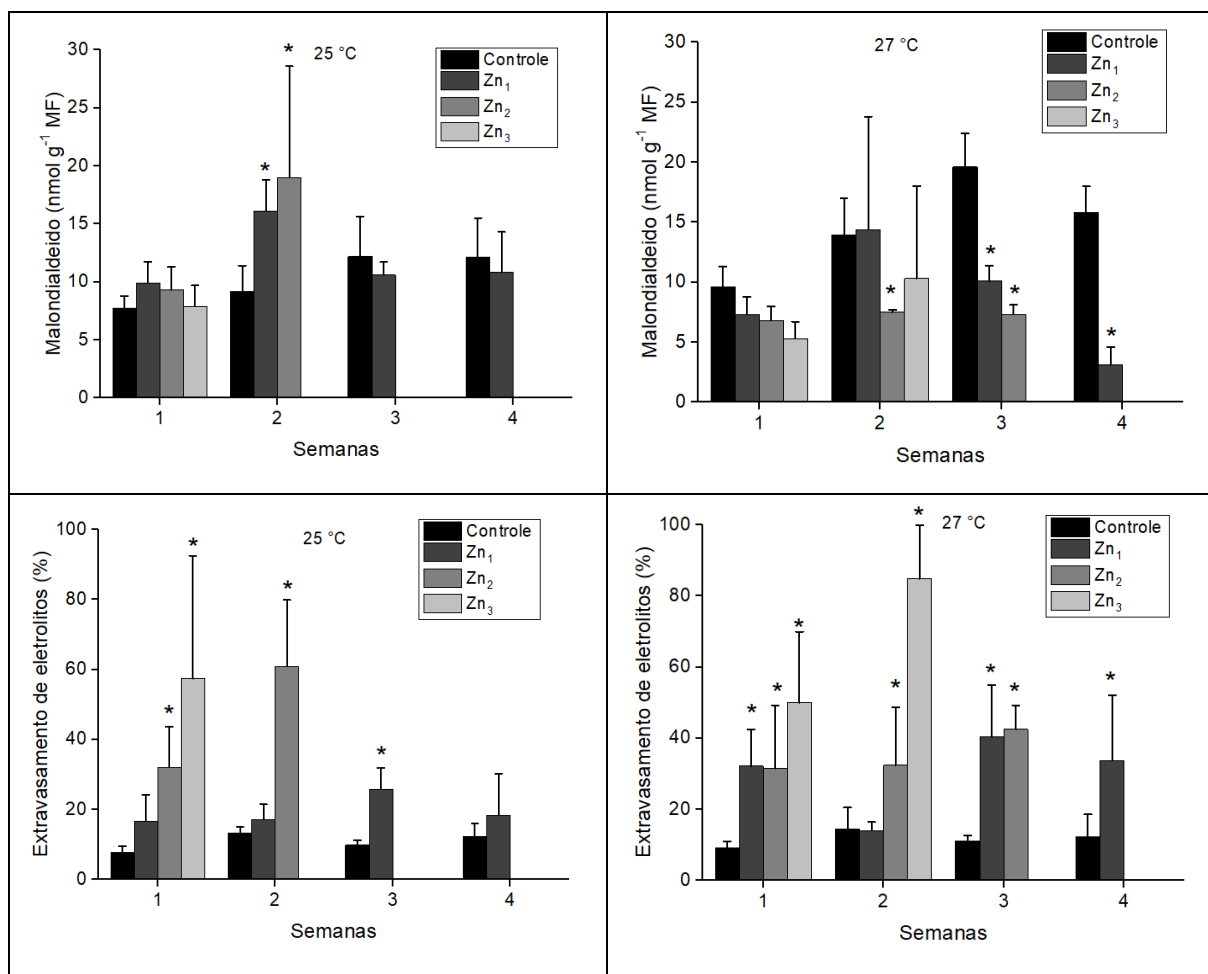


Figura 23. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído (mmol g^{-1} MF) e percentual de extravasamento de eletrólitos de *R. natans* expostas ao controle e concentrações de Zn ($Zn_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $Zn_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha = 0,05$) do controle para cada semana.

Houve variação na concentração inicial de Zn para a concentração final em todos os tratamentos (Figura 24). A 25 °C, o maior valor removido de Zn na solução foi de $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ na maior concentração testada. Em 27 °C foi removido da solução $1,5 \text{ mg L}^{-1}$, também na mesma

concentração, sendo praticamente a metade do que tinha quando adicionado ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$). A eficiência de remoção ocorreu em todos os bioensaios, variando de 24% à 67%. Os bioensaios com as menores concentrações foram as mais eficiências na remoção de Zn na solução. Comparando as temperaturas, não houve diferença significativa na concentração final das soluções ($\text{Zn}_1 p = 0,9024$; $\text{Zn}_2 p = 0,3336$; $\text{Zn}_3 p = 0,0963$).

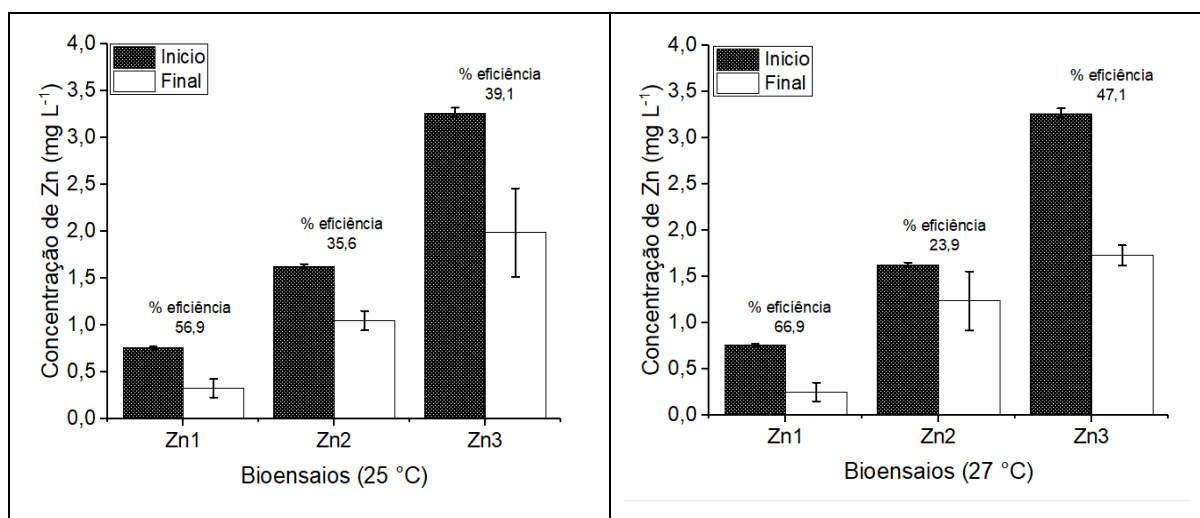


Figura 24. Concentração inicial e final de Zn ($\text{Zn}_1 = 0,7 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Zn}_2 = 1,5 \text{ mg L}^{-1}$; $\text{Zn}_3 = 3,0 \text{ mg L}^{-1}$) na solução onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.

4.1.4 Comparação dos metais Al, Mn e Zn para os dados da cinética de crescimento para a concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$

Comparando os metais Al, Mn e Zn ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) com os dados da cinética de crescimento [μ (dia^{-1}) e td (dias)] de *R. natans* durante o período de exposição nas temperaturas de 25 e 27 °C, observou-se que o Zn foi o metal que foi mais tóxico para a macrófita, pois não houve crescimento nos bioensaios independente da temperatura e do tipo de medição (Figura 25). Em seguida foi o Al, que obteve crescimento apenas na temperatura de 25 °C em ambas medições (largura e biomassa), porém com μ baixo e td de biomassa elevado (>100 dias). O Mn foi o metal que menos prejudicou o crescimento da macrófita nesta concentração. Obteve-

se valores de μ (dia^{-1}) maiores e td (dias) menor, porém, observa-se que a temperatura de 27 °C teve influência negativa se comparado com a temperatura de 25 °C. A toxicidade no crescimento nestas condições estudadas seguiu com na sequência Zn > Al > Mn.

A temperatura de 27 °C influenciou negativamente o crescimento em todos o bioensaios, pois como demonstrado no gráfico, não houve crescimento nesta temperatura, ou o crescimento foi inferior se comparada a temperatura de 25 °C, como foi para Mn.

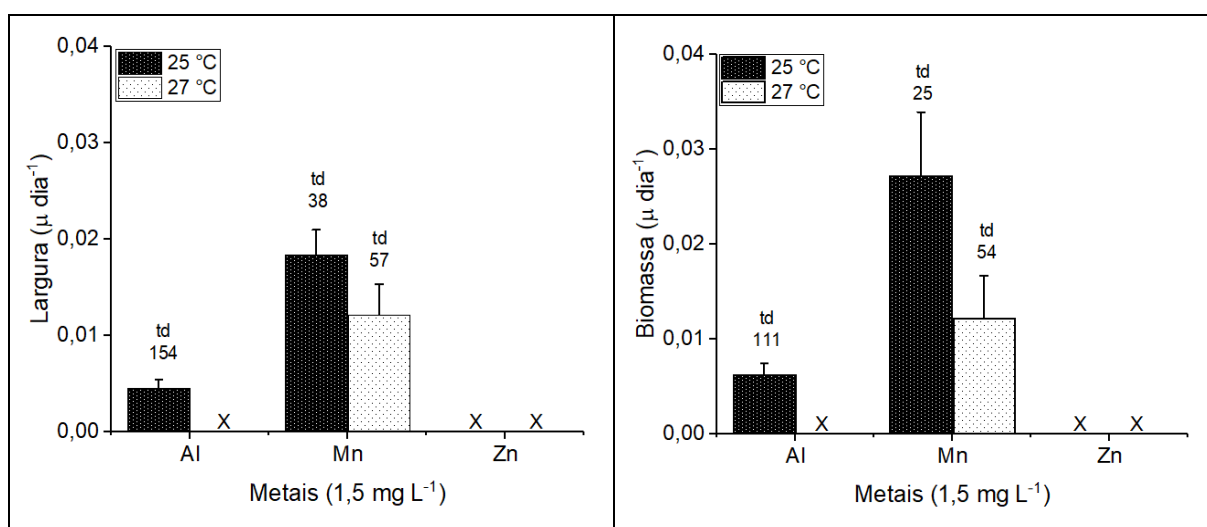


Figura 25. Constante de crescimento (μ em dia^{-1}) e tempo de duplicação da biomassa (td dias) obtidos na cinética de crescimento de largura e biomassa nos bioensaios contendo a concentração de 1,5 mg L^{-1} de Al, Mn e Zn em duas temperaturas (25 e 27 °C). O (x) indica que não houve crescimento.

4.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E PERCENTUAL DE EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO PARA COMBINAÇÕES DE METAIS

Os bioensaios contendo as misturas de metais apresentaram o pH do meio de crescimento ácido ($3 \pm 0,01$ à $5 \pm 0,01$), condutividade elétrica variando entre $47 \pm 4,8$ e $596 \pm 0,3 \mu\text{S cm}^{-1}$ (valor crescente conforme o aumento das concentrações) e oxigênio dissolvido variando de $6 \pm 0,3$ à $11 \pm 2,1 \text{ mg L}^{-1}$ (APÊNDICE A).

A cinética de crescimento de misturas dos metais indicou que quanto maior as concentrações combinadas maior o prejuízo para o crescimento dos indivíduos de *R. natans*, pois a necrose nos tecidos vegetais ocorreu mais rápido nas misturas com as concentrações finais (9 dias) do que nas concentrações iniciais (22 dias) (Figura 26 e 27).

Houve incremento no crescimento apenas na largura na temperatura de 25 °C (Figura 26) nas combinações contendo as concentrações iniciais dos metais Al, Mn e Zn, porém, este incremento foi significativamente menor que o controle ($p < 0,0001$) além de que a combinação Al + Mn + Zn teve uma influência negativa maior no crescimento ($p < 0,0001$) do que as demais combinações.

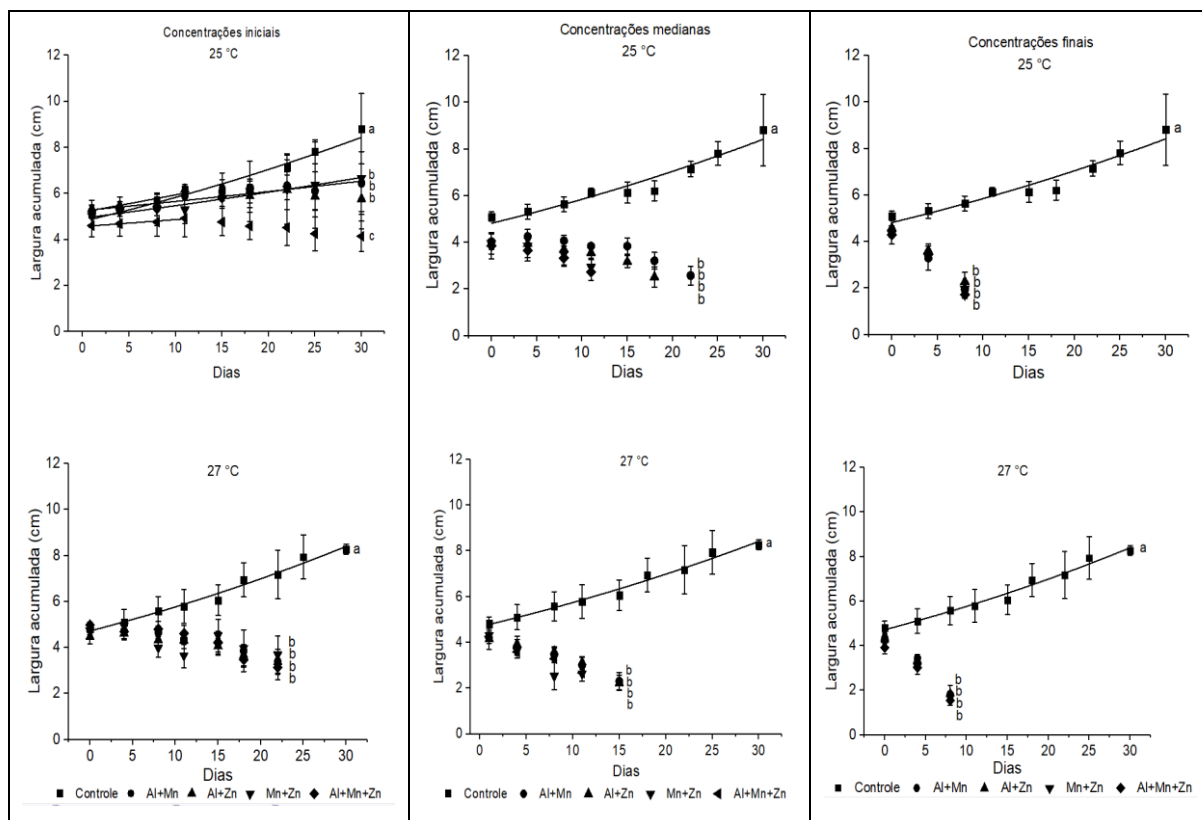


Figura 26. Largura (cm) acumulada de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.

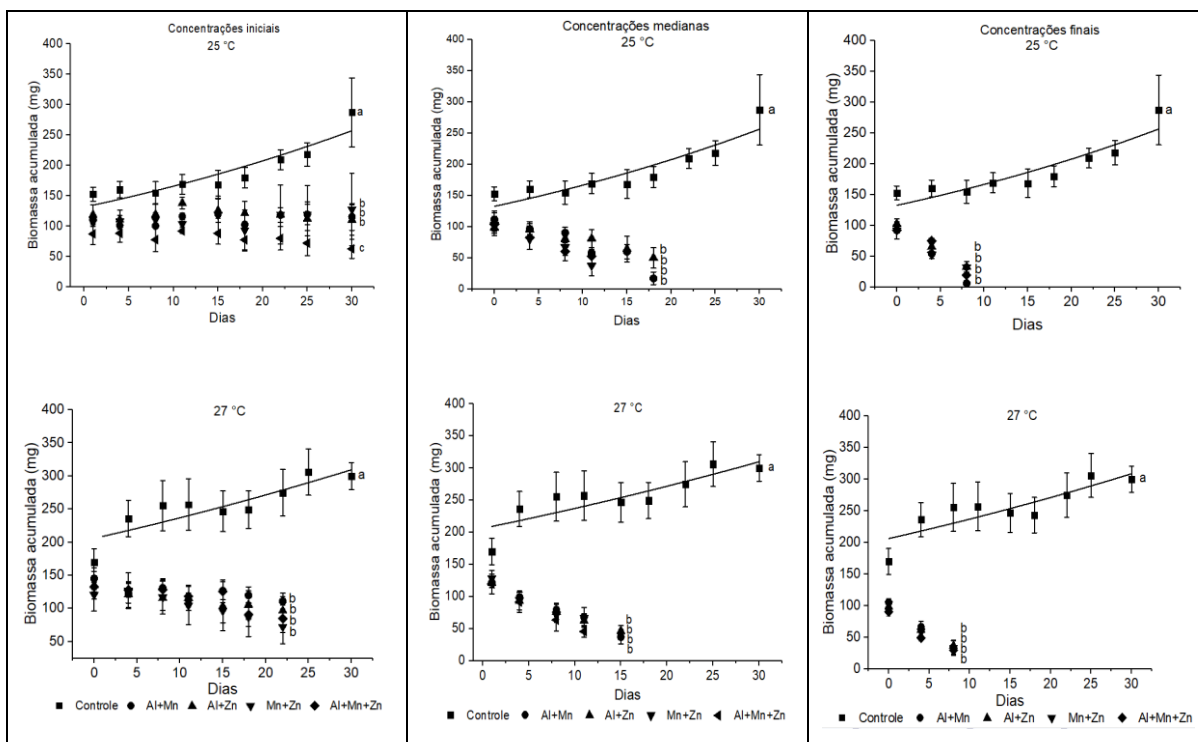


Figura 27. Biomassa (mg) acumulada de *Ricciocarpus natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Linha horizontal indica o ajuste na regressão não-linear. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.

Ao final dos experimentos, apenas houve um pequeno ganho em largura e em biomassa nos bioensaios contendo as concentrações iniciais de Al + Mn (1,23 cm; 1,4 mg) e Mn + Zn (1,65 cm; 21 mg), ambos 25 °C, porém este incremento foi muito inferior frente ao controle, principalmente quanto ao acúmulo de biomassa (3,7 cm; 134,7 mg).

Os tratamentos contendo as concentrações iniciais dos metais Al, Mn e Zn onde ocorreu a parametrização da cinética de crescimento em largura na temperatura de 25 °C, os coeficiente de ajuste tiveram valores acima de 60%, indicando um bom ajuste e os valores da constante de crescimento ($\mu \text{ dia}^{-1}$) foram até 3 vezes menores que o controle (Tabela 8). Como consequência, o t_d da biomassa para estes bioensaios foram maiores, chegando a 95 dias na combinação com os três metais juntos. Para o coeficiente de temperatura, não foi possível obter resultado pois não foi possível parametrizar o crescimento nos bioensaios à 27 °C.

Tabela 8. Constante de crescimento ($\mu \text{ dia}^{-1}$), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle e nas combinações iniciais dos metais Al, Mn e Zn (Al = 1,5 mg L⁻¹; Mn = 0,7 mg L⁻¹; Zn = 0,7 mg L⁻¹) no parâmetro largura na temperatura de 25 °C.

Bioensaios	Largura		
	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2
Controle 25°C	0,02283 ± 0,00223	30	0,9
Al+Mn _{1(25°)}	0,00879 ± 0,00130	79	0,8
Al+Zn _{1(25°)}	0,01588 ± 0,04392	44	0,6
Mn+Zn _{1(25°)}	0,01225 ± 0,00080	57	0,9
Al+Mn+Zn _{1(25°)}	0,00733 ± 0,00115	95	0,9

Nas análises fisiológicas das concentrações médias e finais para os gráficos abaixo (Figura 28 à 34) onde aparece apenas o controle, significa que, não foram feitas análises nos demais bioensaios pois, como demonstrado na cinética de crescimento (Figura 26 e 27) os indivíduos de *R. natans* apresentaram necrose em seus tecidos vegetais.

A análise do pigmento clorofila-*a* nos bioensaios contendo as combinações de metais, observou-se que as maiores concentrações (concentrações finais) foram mais danosas para o sistema fotossintético, pois a concentração de clorofila foi reduzida drasticamente ($p < 0,0001$) em ambas temperaturas (Figura 28). Para as concentrações menores a primeira semana de análise demonstra uma redução de clorofila-*a* ($p < 0,0001$), seguida de uma estabilidade de pigmento na segunda semana ($p = 0,5179$), um aumento significativo no bioensaio Mn+Zn_{1(25°)} ($p = 0,0071$) na semana 3, e uma redução ($p < 0,0001$) na concentração do pigmento na maioria dos bioensaios na quarta e última semana de análise nas temperaturas 25 e 27 °C. As concentrações médias foram afetadas quanto a diminuição da concentração de clorofila-*a* também na semana inicial de análise ($p < 0,0001$).

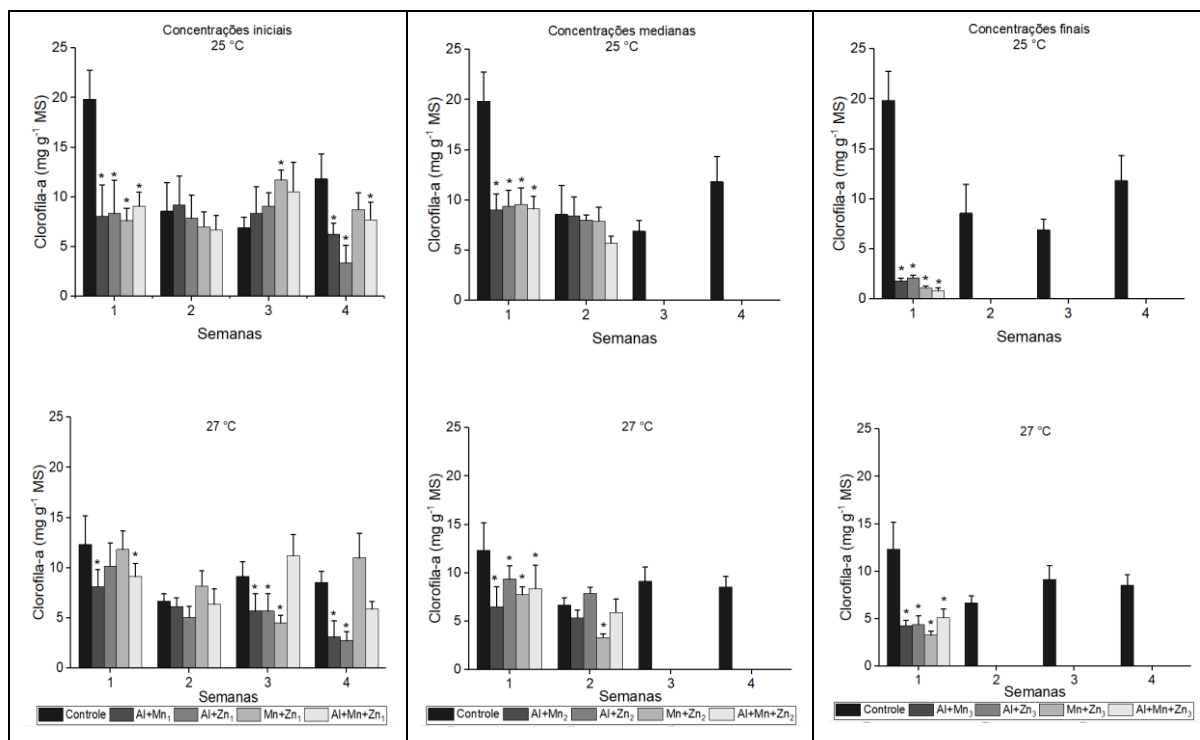


Figura 28. Clorofila-*a* (mg g^{-1} MS) de *Ricciocarpus natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana.

A primeira semana de exposição as combinações de metais foi a que mais se observou a influência negativa dos metais no pigmento clorofila-*b* da macrófita independente da concentração e da temperatura ($p < 0,0001$), como demonstrado nos gráficos abaixo (Figura 29). Para a análise de clorofila-*b* as concentrações finais tiveram o mesmo padrão da clorofila-*a* (Figura 28) em que a redução do pigmento é significativa ($p < 0,0001$) em ambas temperaturas. Para as concentrações iniciais e médias, a segunda semana de análise apresentou uma relativa estabilidade para a maioria dos tratamentos nas temperaturas ($p = 0,2024$), porém a partir daí, comparando com o controle, a redução de pigmentos foi significativa ($p < 0,0001$).

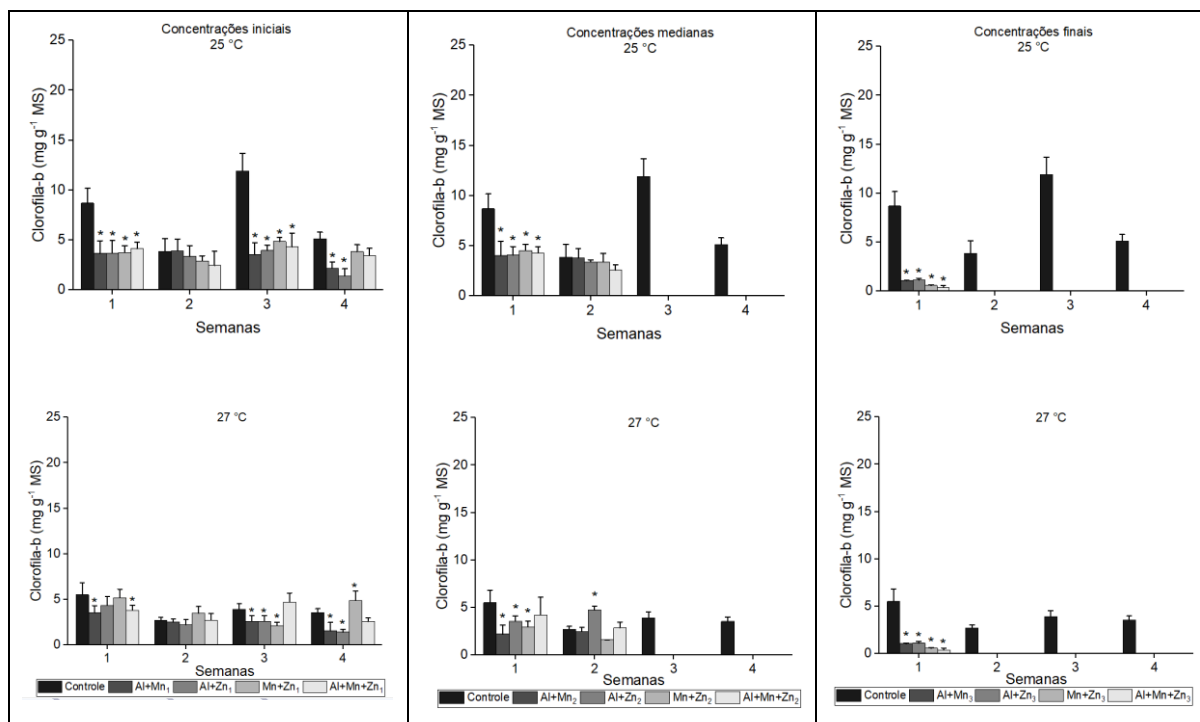


Figura 29. Clorofila-*b* (mg g⁻¹ MS) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana.

O carotenoide (Figura 30) seguiu praticamente o mesmo padrão descrito anteriormente para clorofila-*a* (Figura 28) e clorofila-*b* (Figura 29), onde as concentrações desse pigmento na primeira semana, em ambas combinações de concentrações e temperaturas, tiveram uma redução significativa ($p < 0,0001$), demonstrando a influência negativa dos metais para a planta. A semana seguinte (semana 2) seguiu com uma estabilidade de pigmentos ($p > 0,999$) para a maioria dos tratamentos para as concentrações iniciais e médias. A combinação Al + Mn e Al + Zn foram os metais que mais afetaram *R. natans* na combinação com as concentrações iniciais para a última semana de análise (25 °C: $p = 0,0346$; $0,0002$; 27 °C: $p = 0,0019$; $0,0006$ respectivamente).

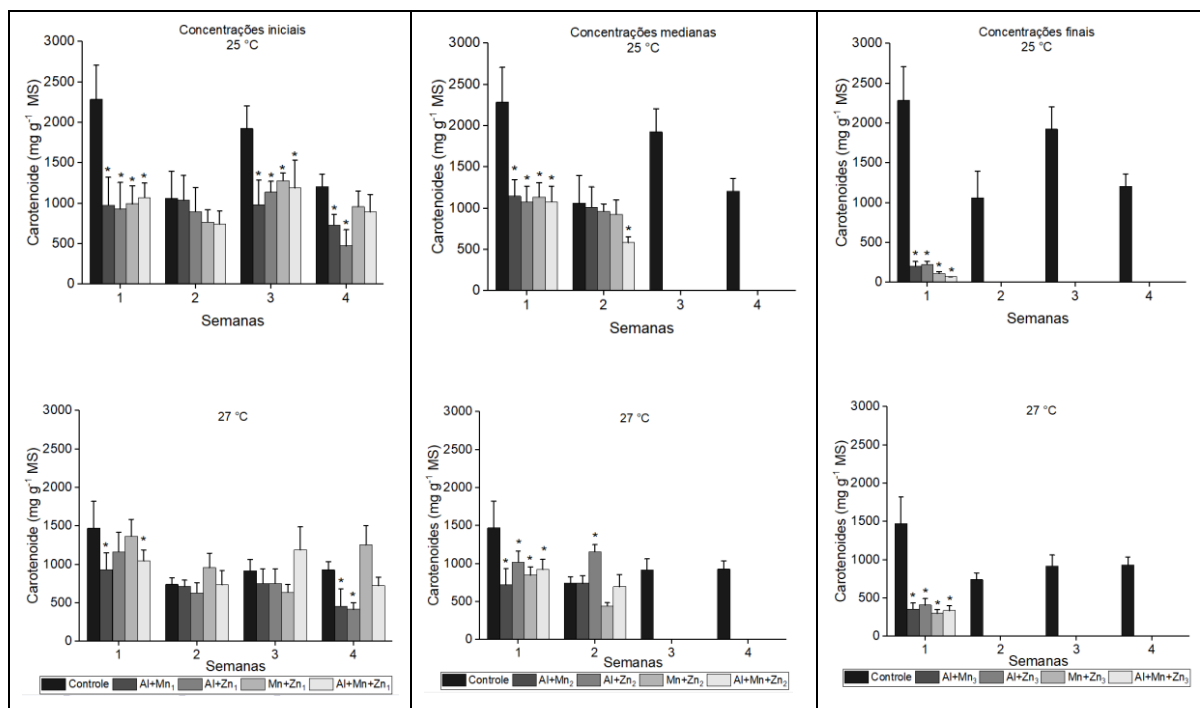


Figura 30. Carotenoides (mg g^{-1} MS) de *Ricciocarpus natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana.

A função antioxidante da antocianina (Figura 31) dos indivíduos de *R. natans* expostos as combinações das concentrações iniciais de Al, Mn e Zn sofreram grande variação entre os tratamentos nas três primeiras semanas de análise em ambas temperaturas, porém, foi significativamente reduzida para Al + Mn + Zn na semana 1, 27 °C ($p = 0,0097$) e houve um aumento da concentração para Mn + Zn 27 °C na semana 2 ($p = 0,0158$). Na 4ª semana de análise a concentração de pigmentos foi relativamente inferior ao controle para a maior parte dos bioensaios ($p < 0,0001$). Para as concentrações médias, em 25 °C a redução da atividade antioxidante foi significativa quando combinados os 3 metais (Al + Mn + Zn) ($p = 0,0004$). Em 27 °C houve redução da concentração de antocianina em todos os tratamentos ($p < 0,0001$). A combinação das concentrações finais reduziu significativamente a atividade antioxidante na macrófita em todos os bioensaios nas duas temperaturas ($p < 0,0001$).

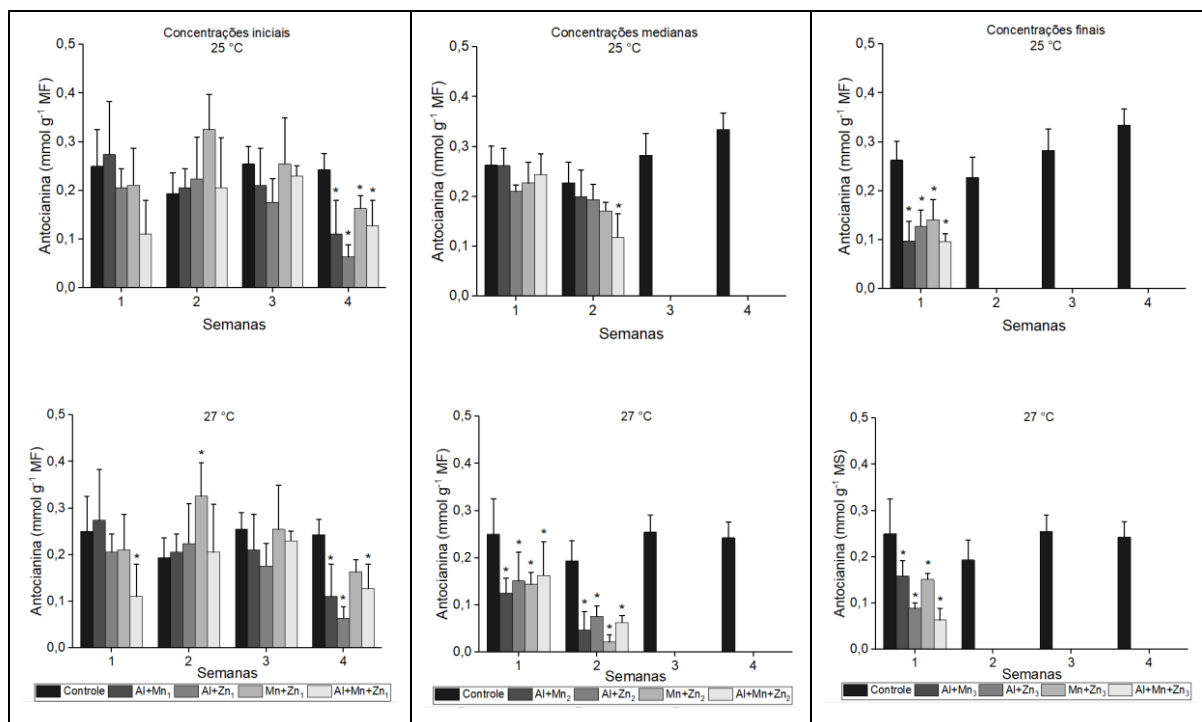


Figura 31. Antocianina ($\text{mmol g}^{-1} \text{MF}$) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $27\text{ }^{\circ}\text{C}$. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana.

Para a atividade antioxidante flavonoides (Figura 32), foi possível inferir que apenas a combinação Al + Mn e Al + Zn das concentrações iniciais não foram prejudicadas na primeira semana de exposição aos metais nas duas temperaturas. Os demais tratamentos apresentaram redução significativa de flavonoides ($p < 0,0001$) e ao longo das semanas a redução da atividade antioxidante permaneceu, principalmente a $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,0001$). Nas concentrações médias e finais logo na primeira semana também teve redução da atividade dos flavonoides ($p < 0,0001$), sendo que essa redução se estendeu para as semanas seguintes.

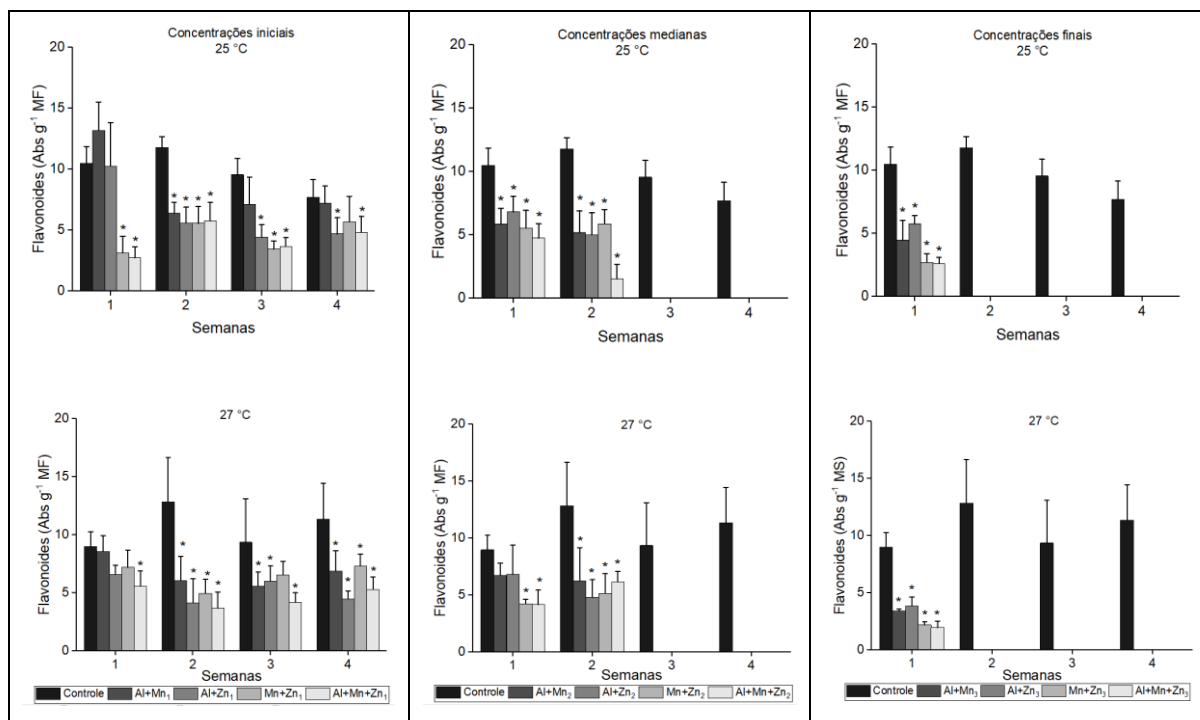


Figura 32. Flavonoides (Abs g⁻¹ MF) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana.

Nas análises de peroxidação lipídica (Figura 33), houve aumento na concentração de malondialdeído nas combinações iniciais em 25 °C ($p = 0,0452$) na semana 1. Nas semanas seguintes, a peroxidação lipídica seguiu estável comparando ao controle, e na última semana a combinação Al + Mn + Zn tiveram a concentração do aldeído reduzido ($p = 0,0390$). Para 27 °C, a estabilidade na concentração do malondialdeído só ocorreu na primeira semana, pois, nas semanas seguintes a concentração foi significativamente reduzida ($p < 0,0001$). Nos tratamentos contendo as concentrações medianas dos metais analisados apenas houve redução significativa na temperatura de 27 °C ($p < 0,0001$). Nas concentrações finais, o aumento de malondialdeído foi significativamente maior que o controle nos tratamentos a 25 °C ($p = 0,8615$), e em 27 °C houve redução dos mesmos ($p < 0,0001$).

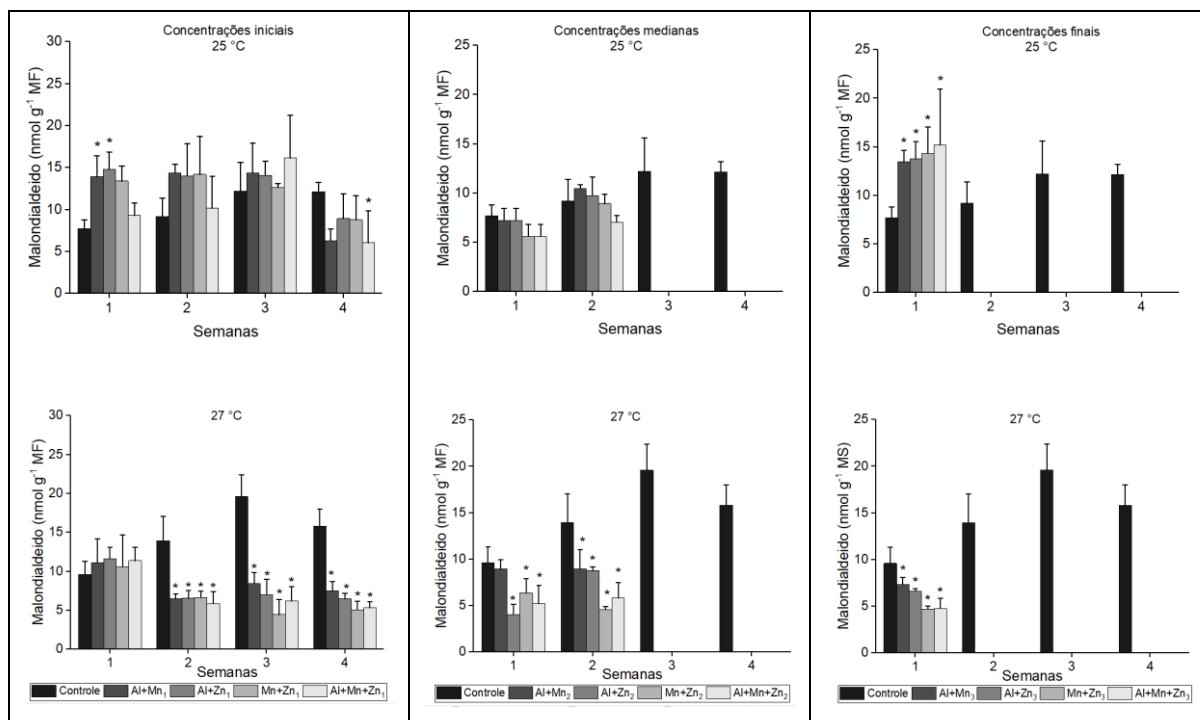


Figura 33. Malondialdeído ($\text{nmol g}^{-1} \text{MF}$) de *Ricciocarpos natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25°C e 27°C . Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana.

O extravasamento de eletrólitos (Figura 34) ocorreu em todos os tratamentos e nas duas temperaturas independentemente do tipo de combinação ($p < 0,0001$), demonstrando que as combinações dos metais interferiram negativamente em *R. natans* durante o período de exposição.

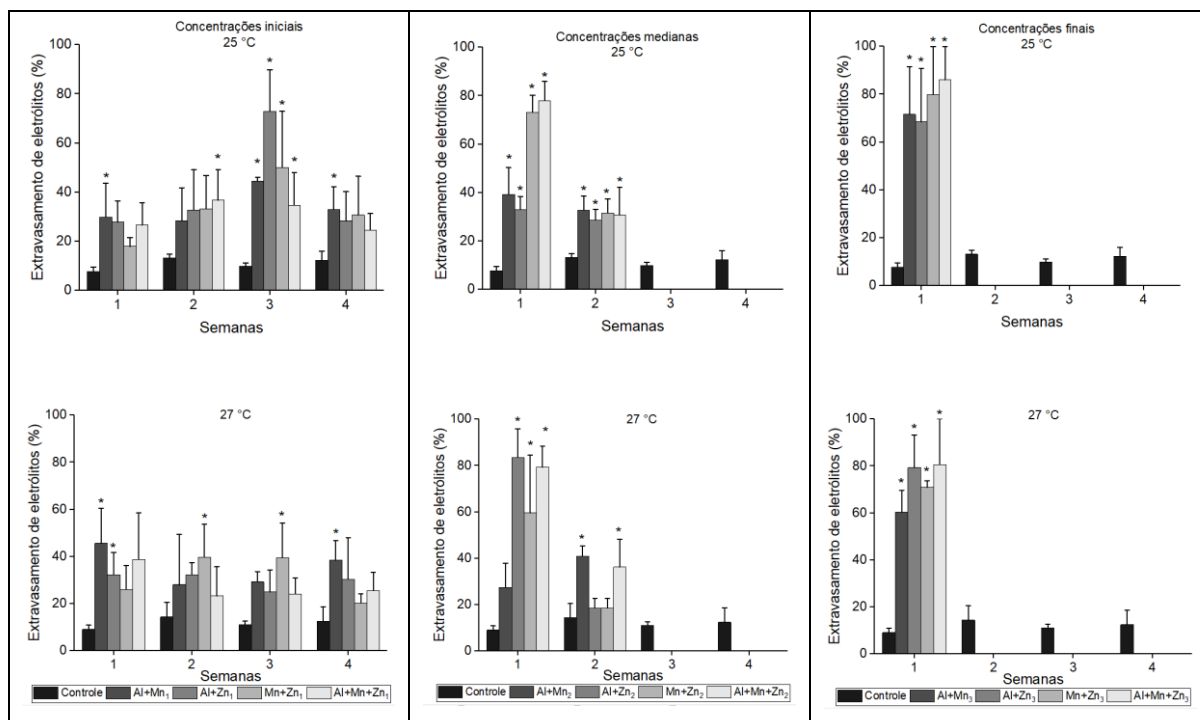


Figura 34. Extravasamento de eletrólitos (%) de *Ricciocarpus natans* nos bioensaios controle e nas combinações de misturas das concentrações iniciais, medianas e finais de Al, Mn e Zn durante 30 dias nas temperaturas 25 °C e 27 °C. Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significam que houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5% comparando-se ao controle para cada semana.

A concentração de Al, nos bioensaios contendo a combinação Al + Mn no final do tempo de exposição foi menor que a concentração inicial em todos os bioensaios nas duas temperaturas ($p < 0,0001$) (Figura 35). Este resultado demonstrou que a adsorção/absorção do Al pela planca ocorreu com uma eficiência variando de 25 à 79,9 %. A maior eficiência de remoção ocorreu no bioensaio contendo a concentração inicial de Al em 25 °C (77,3 %) e no bioensaio contendo a maior concentração do metal (concentrações finais) em 27 °C (79,9 %). Para Mn (Figura 35), nos bioensaios contendo as concentrações menores do metal (concentrações iniciais) apenas teve diferença significativa em 25 °C ($p = 0,0184$), indicando a falta de eficiência de remoção do metal nestas condições. Nas demais combinações (concentrações médias e finais), a concentração de Mn no final do experimento foi menor que a inicial ($p < 0,0001$), e a eficiência de remoção variou de 24,2 a 61,5 %, sendo que a 27 °C a eficiência foi maior.

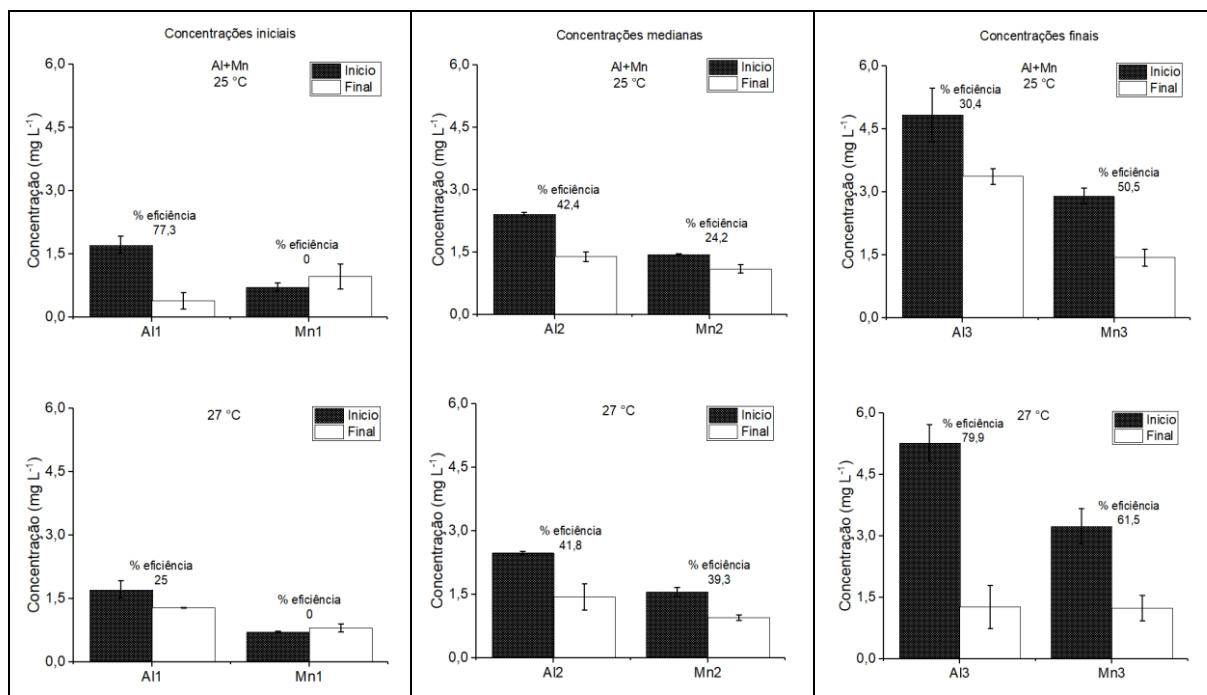


Figura 35. Concentração inicial e final de Al e Mn (mg L^{-1}) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.

Nos bioensaios contendo a combinação Al + Zn (Figura 36), o Al também teve concentração significativamente menor no final dos experimentos ($p < 0,0001$), resultando em uma boa eficiência de remoção do metal pela planta, variando de 32,6 à 77,3 %. A melhor eficiência de remoção de Al ocorreu com a menor concentração ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) em 25 °C. Para as concentrações finais de Al a eficiência foi a mesma, em ambas temperaturas, cerca de 44 %. Para o Zn (Figura 36), na maioria dos bioensaios, a eficiência de remoção do metal na solução não chegou a 20 % ($p > 0,05$). Apenas a 27 °C (concentrações medianas e finais), a remoção de Zn ocorreu de forma significativa eficiência (17,7% $p = 0,0034$ e 32,1% $p < 0,0001$).

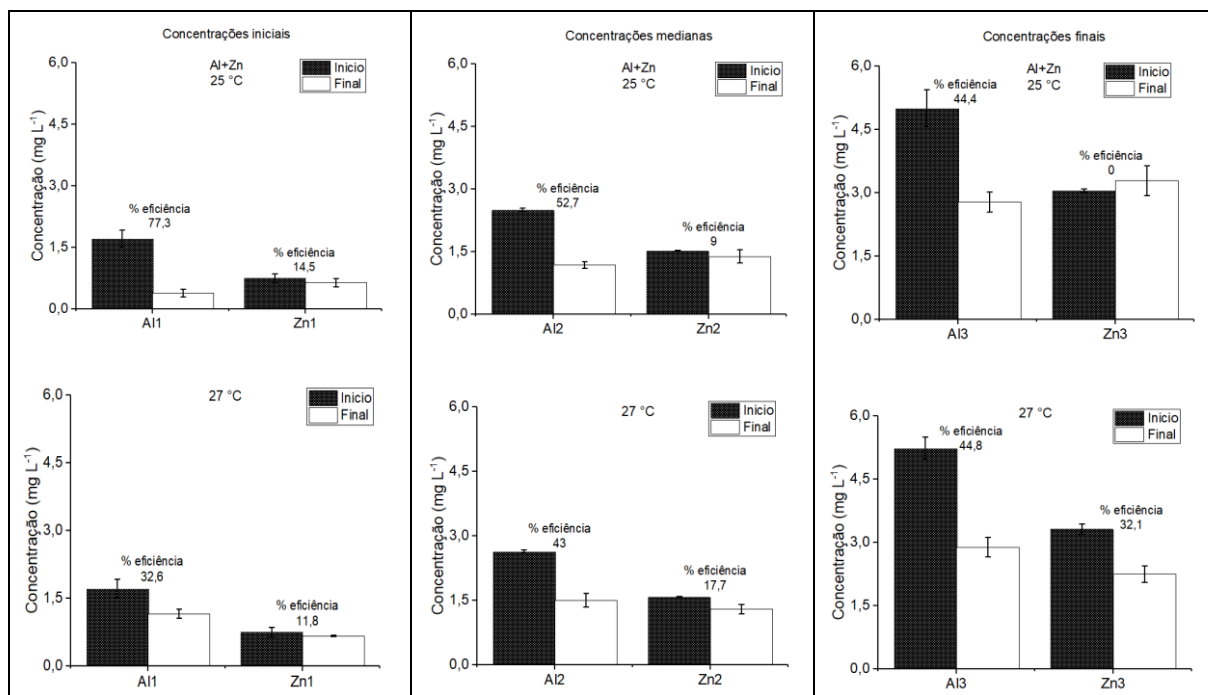


Figura 36. Concentração inicial e final de Al e Zn (mg L^{-1}) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.

Para as combinações de Mn e Zn (Figura 37), a análise das concentrações contidas na solução-teste demonstrou que a eficiência de remoção destes metais do meio não ultrapassou 30% nos bioensaios. As combinações iniciais tiveram as menores diferenças na concentração entre os tempos testados, chegando ao máximo de $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn removido (19,75 % $p = 0,0002$) em 27 °C. Para as combinações medianas o máximo removido do bioensaio foi $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn à 25 °C (30,1 % $p = 0,0041$). Já nas combinações contendo as maiores concentrações de Mn+Zn, a maior remoção foi para o metal Zn à 27 °C (26,9 % $p = 0,0007$).

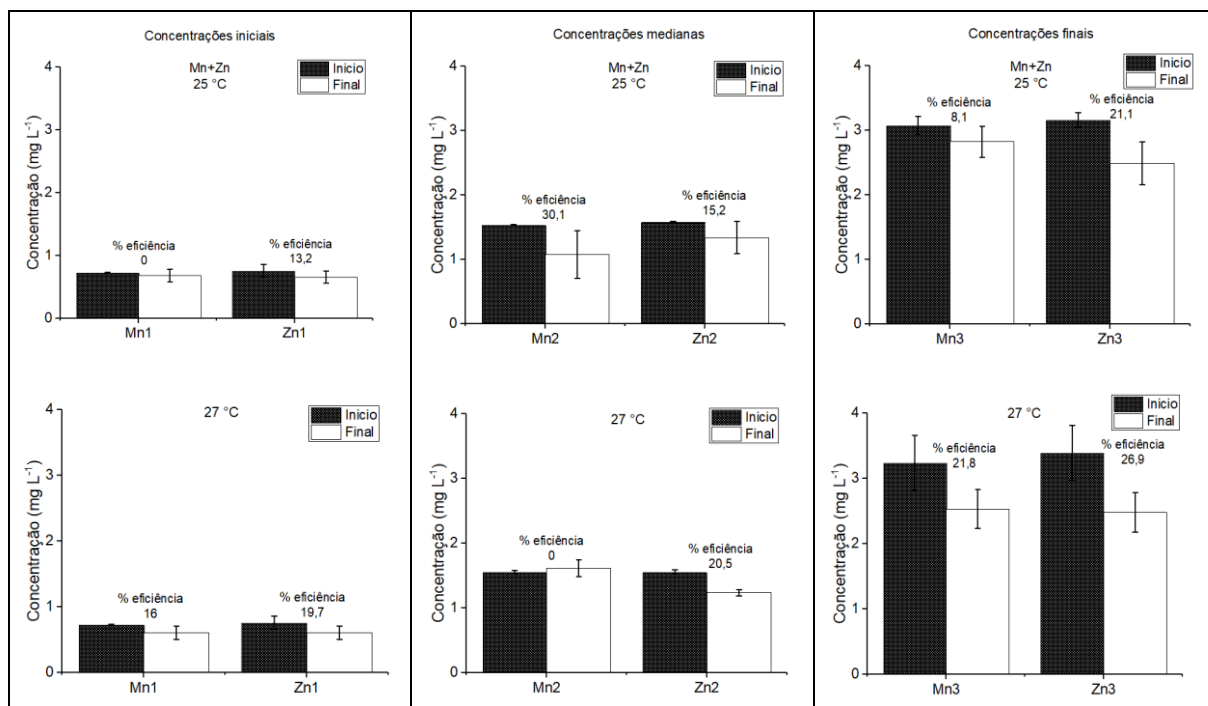


Figura 37. Concentração inicial e final de Mn e Zn (mg L^{-1}) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.

Nos bioensaios onde a ocorrência dos Al, Mn e Zn estão simultâneas, a análise da concentração de metais (Figura 38) demonstrou que no tratamento contendo as concentrações iniciais, o Al foi o metal com maior eficiência de remoção em ambas temperaturas ($p < 0,0001$), porém, em 25 °C essa eficiência foi maior (61%). Já nos bioensaios contendo as concentrações medias a eficiência de remoção dos metais Al e Mn se comportaram igualmente eficientes nas duas temperaturas, com remoção em torno de 50% ($p < 0,0001$). Para as combinações contendo as concentrações finais o Mn foi o metal com maior eficiência de remoção da solução-teste, com até 68,3% ($p < 0,0001$), seguida de Al com até 56% ($p < 0,0001$). O Zn foi o metal com menor eficiência de remoção em todos os tratamentos ($p < 0,0001$), porém, observa-se que a eficiência de remoção deste metal na solução cresceu gradativamente quando a concentração do metal no bioensaio aumentou.

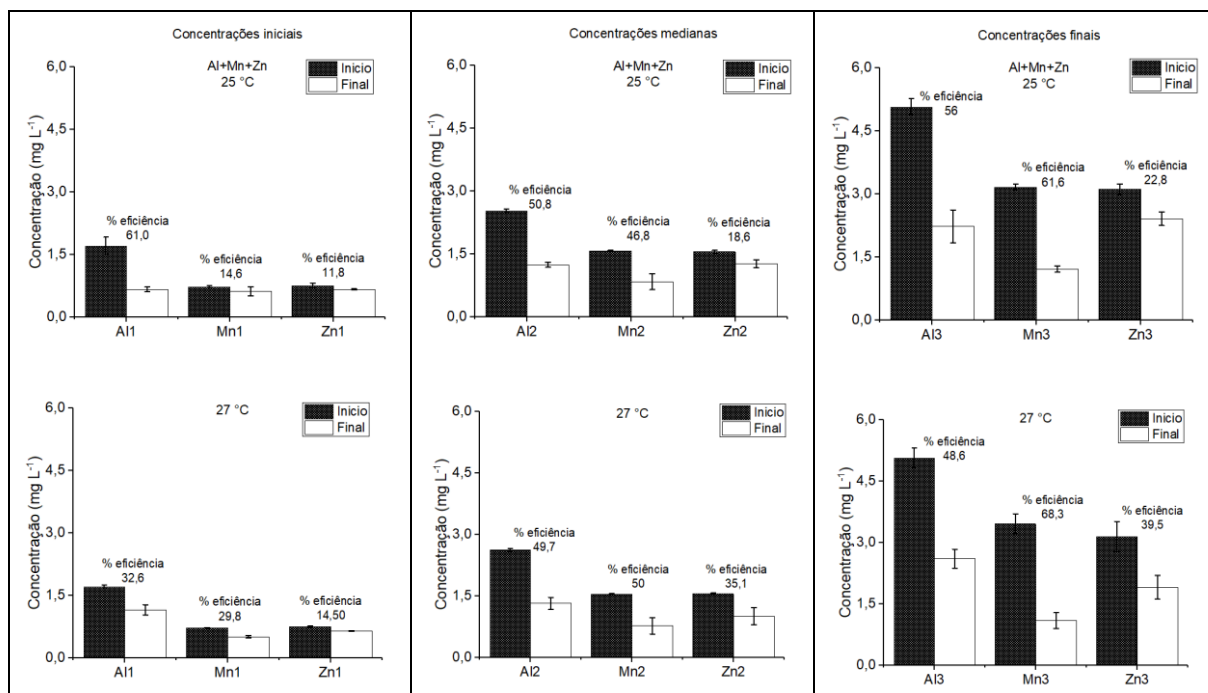


Figura 38. Concentração inicial e final de Al, Mn e Zn (mg L^{-1}) nos bioensaios contendo combinações destes metais (concentrações iniciais, medianas e finais) onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C e eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência). Barras verticais indicam o desvio padrão.

4.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO, ANÁLISES FISIOLÓGICAS, PERCENTUAL DE EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO E DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS BIOENSAIOS COM ÁGUA CONTAMINADA PELO REJEITO

Nos tratamentos com água contaminada pelo rejeito, o meio de crescimento se manteve neutro ($\text{pH } 7 \pm 0,5$) durante o período do experimento, não diferindo ($p = 0,05$) do pH do controle (água natural do reservatório Fazzari). A condutividade elétrica destes bioensaios tiveram sais dissolvidos cerca de 100 vezes a mais do que no controle ($p < 0,0001$). As concentrações de oxigênio dissolvido mantiveram-se em torno de $7 \pm 0,4 \text{ mg L}^{-1}$, sendo superior ao do controle ($p = 0,0025$) (APÊNDICE A).

Indivíduos de *R. natans* expostos a água contaminada pelo rejeito (Figura 39) apresentaram seu crescimento prejudicado desde o início dos experimentos na maior parte dos bioensaios ($p < 0,0001$). Apenas houve a possibilidade de parametrização do crescimento em

largura, na temperatura de 27 °C até o 11º dia, porém, após este dia e em todos os demais tratamentos os indivíduos permaneceram vivos até o dia 18.

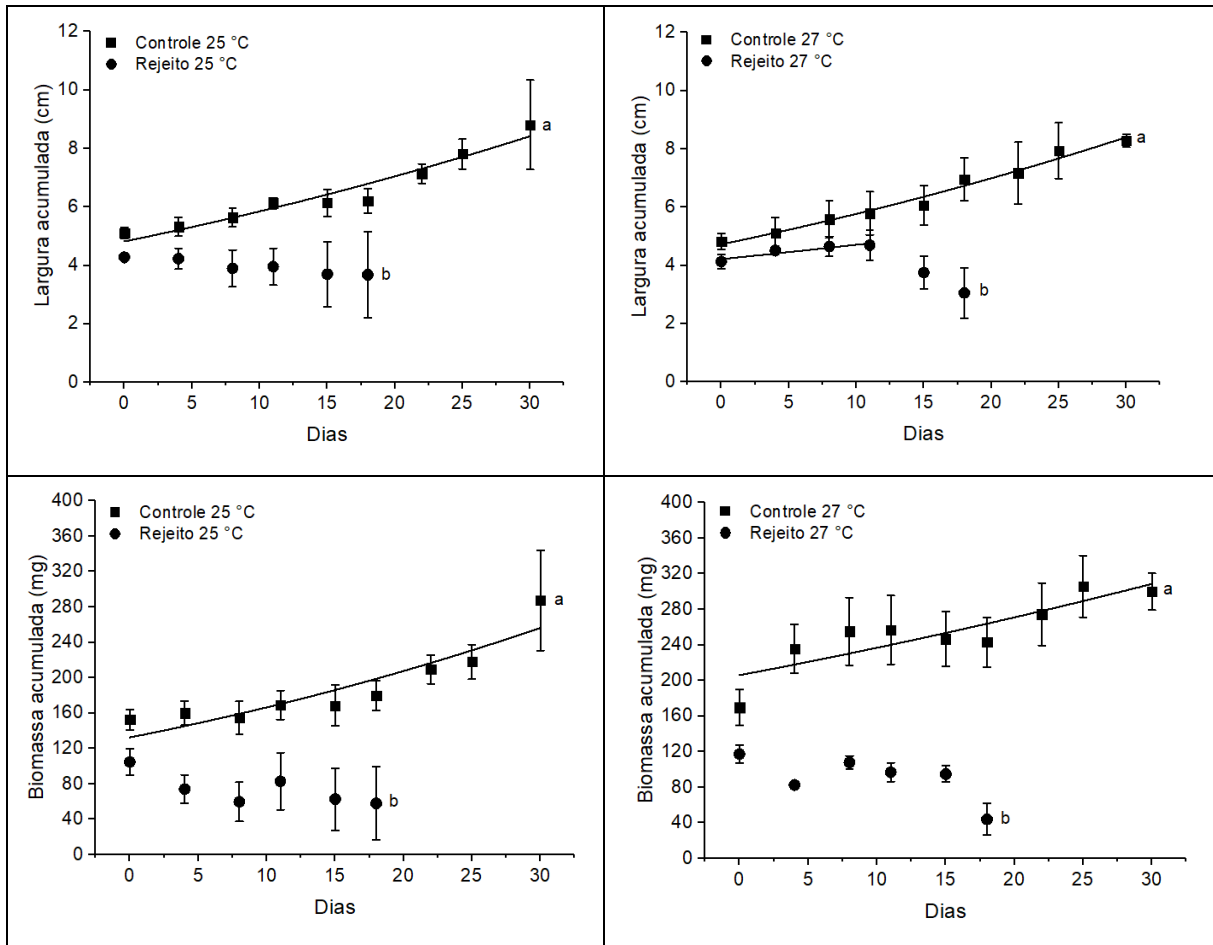


Figura 39. Crescimento acumulado em largura (cm) e biomassa (mg) de *Ricciocarpus natans* no controle e na água contaminada por rejeito sob duas temperaturas (25 °C e 27 °C) durante 30 dias. Barras verticais indicam o desvio padrão. Letras iguais significam que não houve diferença significativa nas médias dos tratamentos ao nível de 5%.

Após o término de exposição à água contaminada pelo rejeito, observou-se que os indivíduos de *R. natans* não aumentaram em largura e em biomassa comparando-se aos controles, nas duas temperaturas (Figura 40). Foram observadas diminuições no crescimento chegando a 1 cm em largura e 73 mg de biomassa. A redução no crescimento na largura foi de 59% em 25 °C e de 58% para 27 °C e para biomassa 75% e 76% respectivamente.

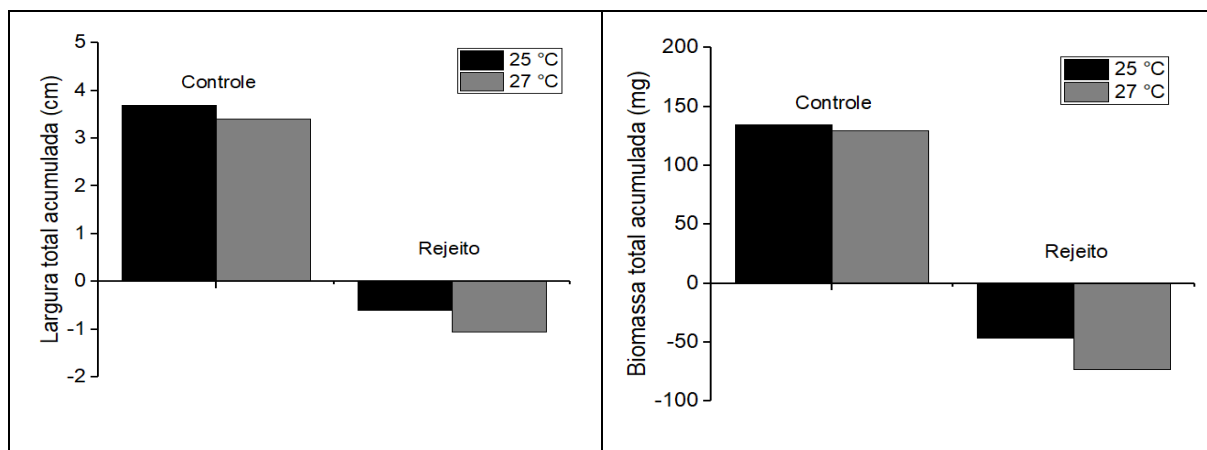


Figura 40. Largura (cm) e biomassa (mg) total acumulada no período de exposição, no controle e na água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C).

No tratamento com água contaminada por rejeito só foi possível obter o μ (dia^{-1}) a 27 °C, sendo este, duas vezes menor que o controle, que resultou em um td de biomassa de 55 dias; 1,8 vezes maior que o td da biomassa do controle (Tabela 9). Como não houve parametrização do crescimento nos demais bioensaios não foi possível obter o coeficiente de temperatura (Q_{10}).

Tabela 9. Constante de crescimento ($\mu \text{ dia}^{-1}$), tempo de duplicação (td dias) e coeficiente de determinação (r^2) dos bioensaios controle e na água contaminada com rejeito nos parâmetros largura e biomassa nas temperaturas de 25 e 27 °C.

Bioensaios	Largura			Biomassa		
	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2	$\mu \text{ dia}^{-1}$	td (dias)	r^2
Controle 25°C	$0,02283 \pm 0,00223$	30	0,9	$0,02590 \pm 0,00431$	27	0,8
Rejeito 25 °C	-	-	-	-	-	-
Controle 27°C	$0,02352 \pm 0,00131$	30	0,9	$0,01697 \pm 0,00376$	41	0,7
Rejeito 27 °C	$0,01269 \pm 0,00345$	55	0,8	-	-	-

- não houve parametrização do crescimento nestes bioensaios, pois não houve incremento de largura e biomassa

As plantas que ficaram expostas à água contaminada por rejeito tiveram diminuição na concentração de clorofila-*a* (Figura 41) na primeira semana de análise em 25 °C ($p < 0,0001$). Em 27 °C o aumento do pigmento clorofila-*a* ocorreu na segunda semana de análise ($p = 0,0319$). Já a clorofila-*b* permaneceu estável em quase todos os bioensaios, nas duas

temperaturas. Houve diminuição do pigmento apenas em 25 °C na semana 3 ($p < 0,0001$). Os carotenoides diminuíram, quando comparados ao controle a 25 °C na 1ª e 3ª semanas. Em 27 °C todos os bioensaios contendo água de rejeito sofreram um aumento na concentração de carotenoides ($p < 0,0001$).

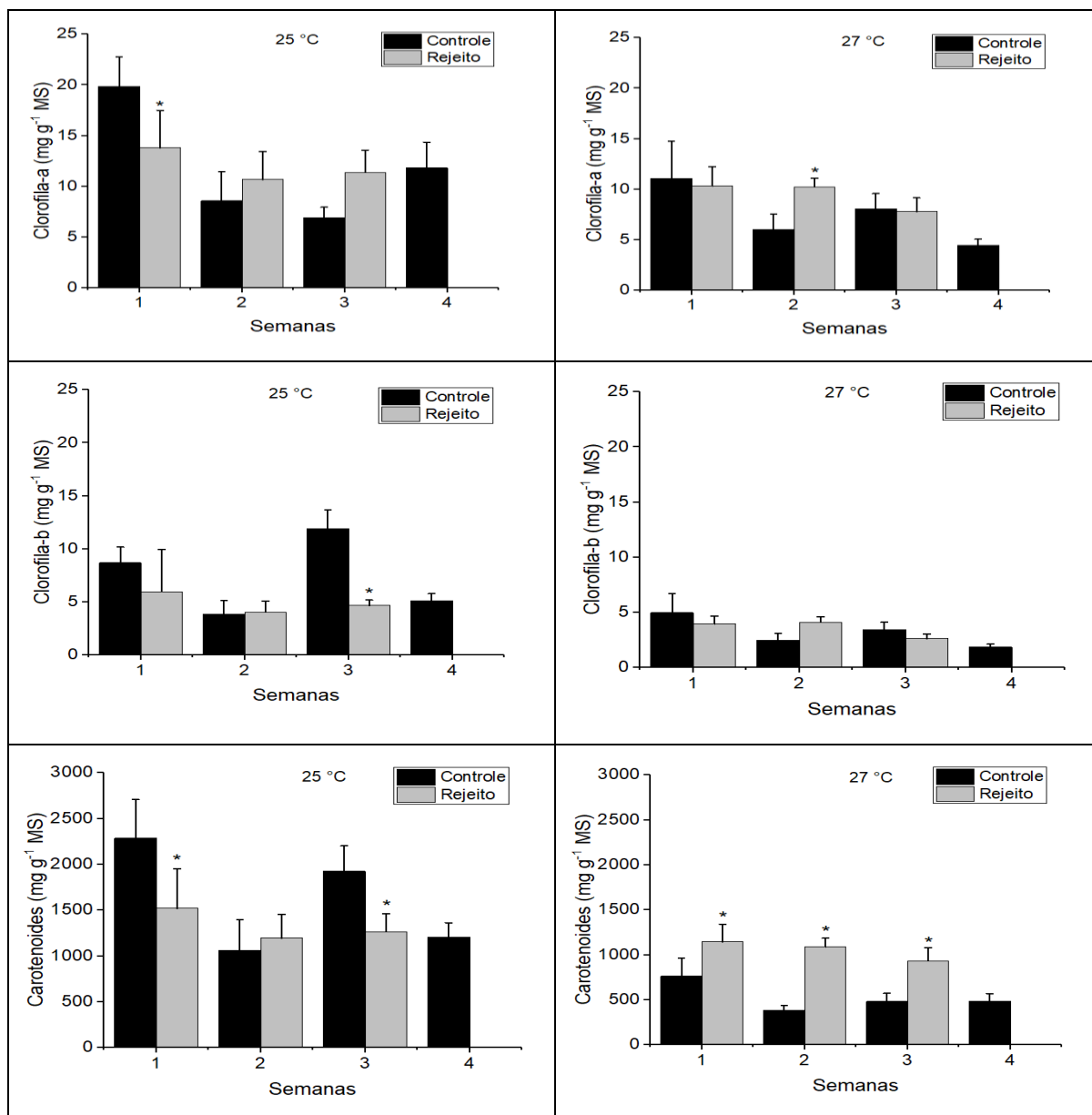


Figura 41. Pigmentos fotossintéticos (clorofila-*a*, clorofila-*b* e carotenoides) (mg g⁻¹ MS) de *R. natans* expostas ao controle e na água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha \leq 0,05$) do controle para cada semana.

O antioxidante antocianina foi significativamente reduzido ($p < 0,0001$) na primeira semana em ambas temperaturas nos bioensaios contendo água contaminada pelo rejeito (Figura

42). Para a análise de flavonoides (Figura 41), a diminuição também iniciou na primeira semana de análise em 25 °C, mantendo assim nas próximas semanas ($p < 0,0001$). Em 27 °C a diferença significativa ocorreu na 2ª semana ($p = 0,0013$). Em geral, os antioxidantes tiveram menor concentração nos tratamentos com água de rejeito.

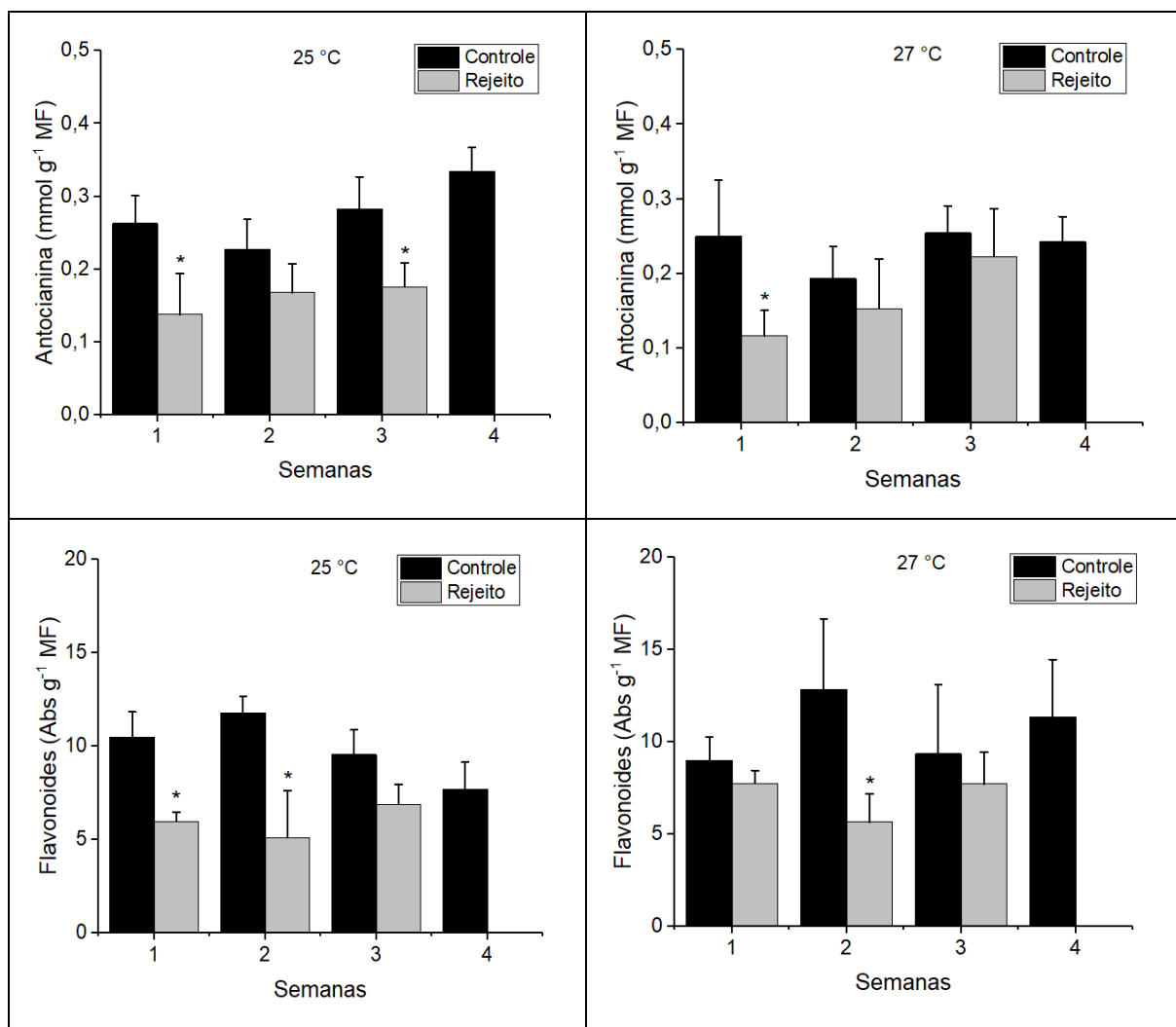


Figura 42. Antioxidantes: antocianina (mmol g⁻¹ MF) e flavonoides (Abs g⁻¹ MF) de *R. natans* expostas ao controle e na água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha \leq 0,05$) do controle para cada semana.

A concentração de malondialdeído (Figura 43) dos indivíduos de *R. natans* nos bioensaios contendo água contaminada por rejeito permaneceu estável à 25 °C durante o período amostral ($p = 0,7905$), porém, em 27 °C a concentração deste aldeído diminuiu a partir da segunda semana ($p = 0,0003$). O extravasamento de eletrólitos (Figura 41) ocorreu em ambas temperaturas na 3ª semana de exposição ao tratamento ($p < 0,0001$), entretanto, a 27 °C o extravasamento foi significativamente maior ($p = 0,0003$) do que a 25 °C.

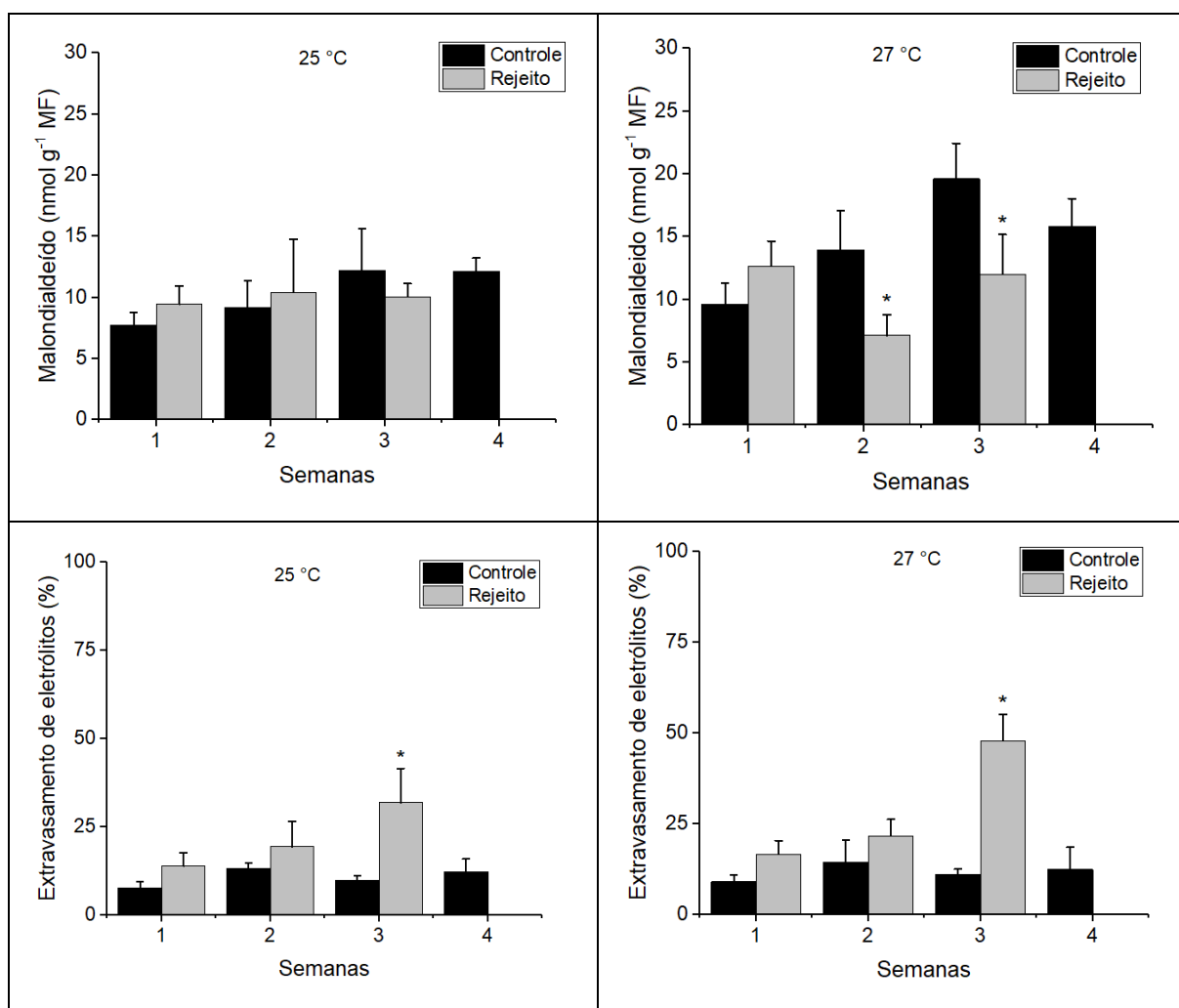


Figura 43. Resposta fisiológica ao estresse oxidativo, malondialdeído (mmol g⁻¹ MF) e percentual de extravasamento de eletrólitos de *R. natans* expostas ao controle e a água contaminada por rejeito em duas temperaturas (25 e 27 °C). Barras verticais indicam o desvio padrão. O asterisco (*) significa que as médias dos tratamentos são significativamente diferentes ($\alpha \leq 0,05$) do controle para cada semana.

A concentração dos metais Al, Mn e Zn ao final dos experimentos com a água contaminada pelo rejeito foi zero em praticamente todos os bioensaios (exceto em 27 °C, Al = 0,06 mg L⁻¹ e Zn = 0,007 mg L⁻¹) (Figura 44). Estes valores refletiram na alta taxa de eficiência de remoção de metal do meio, que foi acima de 95% para todos os bioensaios. Corroborando com estas taxas de eficiência, ao final do tempo de exposição ao bioensaio, a determinação de metais na biomassa seca de *R. natans* demonstrou que os metais reduzidos na solução-teste final foram encontrados na biomassa da macrófita (Figura 44).

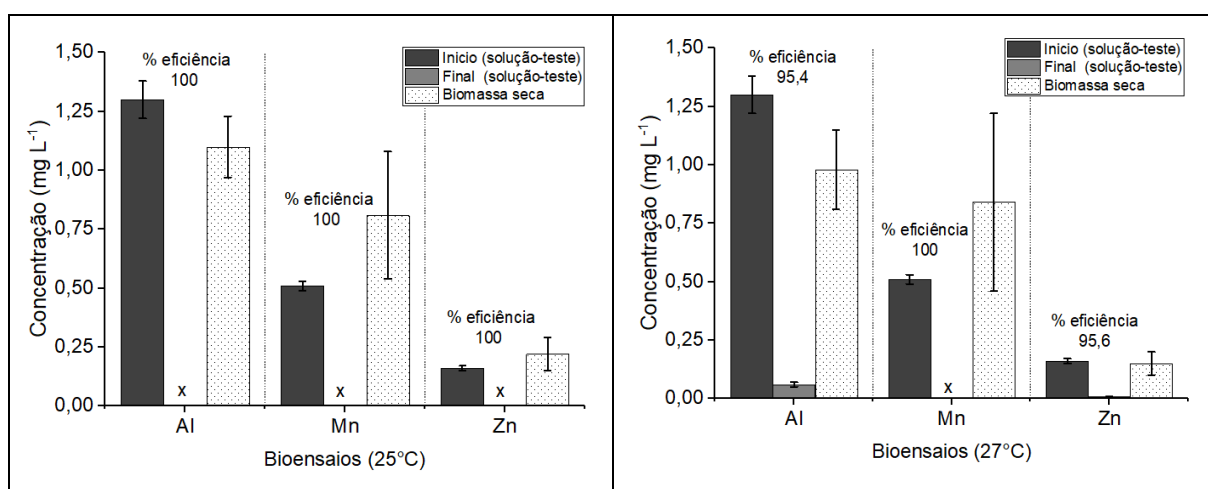


Figura 44. Concentração inicial e final de Al, Mn e Zn (mg L⁻¹) no bioensaio contendo água contaminada por rejeito onde indivíduos de *R. natans* ficaram expostos por até 30 dias nas temperaturas de 25 °C e 27 °C, eficiência de remoção do metal do bioensaio (% eficiência) e concentração dos metais na biomassa seca. Barras verticais indicam o desvio padrão. A letra x significa que não foi detectado o metal na solução portanto considera-se a concentração como sendo zero.

A partir da análise da biomassa seca digerida dos indivíduos de *R. natans* pode-se observar que o Mn foi o metal com maior concentração por mg g⁻¹ de massa seca da planta, seguido do Al (Tabela 10). O Zn foi o metal encontrado em menor concentração por mg g⁻¹ na biomassa seca. Apesar de em 25 °C a concentração dos metais ser maior na maioria das análises, notou-se pouca diferença de concentração entre as temperaturas sendo estatisticamente não diferentes ($p = 0,5974$).

Tabela 10. Média e desvio padrão da concentração do metal Al, Mn e Zn na biomassa seca (mg g^{-1} MS) dos indivíduos de *R. natans* expostos a água contaminada por rejeito nas temperaturas de 25 °C e 27 °C.

Metais (mg g^{-1} MS)	25 °C	27 °C
Al	$1,02 \pm 0,20$	$1,14 \pm 0,31$
Mn	$2,19 \pm 0,54$	$1,97 \pm 0,74$
Zn	$0,53 \pm 0,04$	$0,39 \pm 0,08$

5. DISCUSSÃO

5.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E PERCENTUAL DE EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO PARA OS METAIS INDIVIDUAIS

Tanto o crescimento quanto a fisiologia da macrófita *R. natans* foram afetados pela exposição as concentrações dos metais Al, Mn e Zn. De forma geral, os metais inibem o crescimento das plantas em ca. 50% de produção de biomassa pela diminuição do teor de amido, resultado da alteração do funcionamento da fotossíntese e, consecutivamente, da inibição do ciclo de Calvin (DHIR, 2013). O efeito causado pela presença de metais no meio é ocasionado pelo estresse oxidativo nos cloroplastos que causam rompimento das membranas e impactam nas funções fisiológicas das proteínas e lipídios (DHIR, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2016).

As concentrações de Al afetaram drasticamente o crescimento da planta, pois, na maioria dos bioensaios não houve incremento de largura e biomassa nos indivíduos de *R. natans*. Nos tratamentos com Al que tiveram incremento de biomassa, o μ e o t_d foram alterados indicando prejuízos no crescimento da macrófita. Com o aumento da concentração de Al, no meio de crescimento, houve o aumento da toxicidade nas plantas, e segundo Sparling (2018) os metais têm potencial para se tornarem tóxicos quando alcançam valores acima das concentrações limites para cada organismo. Para *R. natans*, a concentração de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Al aparentou-se limitante para seu desenvolvimento.

A maior parte dos trabalhos com Al foram realizados com plantas terrestres (i.e. BOJÓRQUEZ-QUINTAL *et al.*, 2017; HE; LI; HE, 2019; LUX; CUMMING, 1999; MIGUEL *et al.*, 2010; MOSSOR-PIETRASZEWSKA, 2001). Entretanto, estudo realizado com *Azolla microphylla*, mostrou que quando exposta por 6 dias a 14 mg L^{-1} de Al, a macrófita flutuante apresentou inibição de 50% no crescimento (massa fresca e seca) das plantas, sendo que em 20 mg L^{-1} o comprimento médio de raiz foi drasticamente reduzido (68%) (CHAKRABORTY *et al.*, 2019). Se tratando de inibição de crescimento, este estudo corrobora com os resultados obtidos no presente experimento, pois houve redução significativa no crescimento de *R. natans* principalmente nas maiores concentrações (até 76% para biomassa e até 70% para largura)

testadas. A interferência do Al no crescimento dos vegetais pode ocorrer porque esse metal não possui função biológica estabelecida e, portanto, é considerado um elemento não essencial aos organismos, podendo, causar alterações e efeitos tóxicos, como clorose e necrose (EMAMVERDIAN *et al.*, 2015; TCHOUNWOU *et al.*, 2012), como foi observado no presente trabalho. O Al também interfere no crescimento vegetal uma vez que inibe o crescimento das raízes, bloqueando o mecanismo de divisão celular, tornando-as ineficientes na absorção de água e nutrientes e, consecutivamente, reduz o número de folhas e biomassa (EMAMVERDIAN *et al.*, 2015; LUX; CUMMING, 1999; PANDA; BALUSKA; MATSUMOTO, 2009; ROUT; SAMANTARAY; DAS, 2001; THORNTON; SCHAEDEL; RAYNAL, 1986).

O Al também pode desencadear inúmeras respostas fisiológicas nas plantas, como por exemplo, a peroxidação lipídica da membrana, extravasamento de eletrólitos e apoptose (morte celular programada) (ANJUM *et al.*, 2016; BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2002). Como observado no presente estudo, o Al promoveu o aumento do malondialdeído, nas concentrações de 1,5 e 2,5 mg L⁻¹ na 2ª semana de exposição à temperatura de 25 °C e extravasamento de eletrólitos principalmente na maior concentração testada. Para a concentração de 5 mg L⁻¹ o aumento de malondialdeído não foi detectado nas análises, porém é provável que a peroxidação tenha ocorrido, pois observou-se extravasamento de eletrólitos nesta concentração logo na primeira semana de estudo. Um trabalho com *Glycine max* exposta à 5 mg L⁻¹ de Al, a peroxidação lipídica teve início logo nas primeiras 6 horas de exposição ao metal (CAKMAK; HORST, 1991). *Azolla microphylla* exposta a 100 mg L⁻¹ de Al por 6 dias também teve aumento de malondialdeído e de extravasamento de eletrólitos (CHAKRABORTY *et al.*, 2019).

Outra consequência ocasionada pelo Al é a diminuição da atividade fotossintética pela diminuição de pigmentos, como demonstrado nos resultados obtidos no presente trabalho e corroborado com estudos onde se analisou o teor de pigmentos em folhas de *Oryza sativa* expostas a 7,8 mg L⁻¹ de Al (SAMAD; RASHID; KARMOKER, 2020) e, com *Brassica juncea* exposta a concentrações de Al (50 à 150 mg Kg⁻¹) (KUMARI; YADAV; SHARMA, 2018). A atividade antioxidante em *R. natans*, com a adição das concentrações de Al, também foi reduzida, principalmente para a maior concentração no início da exposição ao metal e ao final de 30 dias nas demais concentrações, indicando que o sistema de proteção da planta foi afetado pela presença do metal. *Drimia elata* crescendo em meio contendo 500 à 1500 mg L⁻¹ de Al

teve o conteúdo de flavonoides em sua biomassa reduzido significativamente indicando um efeito inibitório de Al na síntese de antioxidantes (OKEM *et al.*, 2015). O mesmo comportamento foi observado em *Azolla microphylla* exposta a 100 mg L⁻¹ de Al (CHAKRABORTY *et al.*, 2019).

Entretanto, mesmo que as concentrações de Al causaram efeitos tóxicos para *R. natans*, observou-se uma alta eficiência de remoção de Al na solução-teste na concentração de 1,5 mg L⁻¹ (> 80%). Este comportamento pode ser indicativo da presença/acúmulo deste metal na biomassa da planta, pois na literatura há relatos de acumulação de Al em tecidos vegetais (CHAKRABORTY *et al.*, 2019; MORARI; DAL FERRO; COCCO, 2015; OKEM *et al.*, 2015; SCHMITT; WATANABE; JANSEN, 2016).

Nos bioensaios com Mn foi possível observar que a menor concentração selecionada (0,7 mg L⁻¹) agiu (até o 22º dia de exposição) de forma positiva no incremento em largura e biomassa, pois o td da biomassa foi menor que tratamento controle e ao final dos experimentos, os indivíduos de *R. natans* apresentaram ganho em largura e biomassa. Esta observação pode ser decorrente do fato de que o Mn é um micronutriente necessário para o desenvolvimento dos organismos, sendo um cofator enzimático nos processos biológicos como respiração, síntese de proteínas e carboidratos e fotossíntese (LOPES, 1998; ZORNOZA; SÁNCHEZ-PARDO; CARPENA, 2010). Todavia, altas concentrações de Mn, como por exemplo, a concentração de 3,0 mg L⁻¹ utilizada no bioensaio de crescimento com *R. natans* do presente estudo, causaram toxicidade, como a clorose e necrose, além do retardamento no crescimento (NAJEEB *et al.*, 2009; SHANAHAN *et al.*, 2007).

Macrófitas expostas a concentrações de Mn comprovam que este elemento causa fitotoxicidade nas folhas pela ocorrência de clorose após alguns dias de exposição (ALVES *et al.*, 2017; HUA *et al.*, 2012; LIZIERI; AGUIAR; KUKI, 2011; LIZIERI; KUKI; AGUIAR, 2012). O Mn pode reduzir o crescimento e o acúmulo de biomassa fresca e seca, a concentração de clorofila total, carotenoides, antocianina e atividade de catalase, além de causar um desarranjo na estrutura no aerênquima das folhas e alteração na estrutura celular das células mesofílicas levando a uma deformidade da parede celular através de um afinamento (LIZIERI; KUKI; AGUIAR, 2012; NAJEEB *et al.*, 2009). No presente estudo, muitas destas respostas fisiológicas foram afetadas principalmente com a maior concentração testada (3,0 mg L⁻¹),

diminuindo a concentração dos pigmentos fotossintéticos e a atividade antioxidante e provocando peroxidação lipídica e extravasamento de eletrólitos. A concentração de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ embora tenha sido benéfica para o crescimento, fisiologicamente, alterou em alguns momentos a concentração de pigmentos e, aumentou a resposta antioxidante de flavonoides, significando assim uma tentativa de proteção metabólica frente ao estresse. Corroborando com esse tipo de resposta, *Trapa natans* exposta à $51,7 \text{ mg L}^{-1}$ de Mn por 10 dias não apresentou alteração no crescimento e no acúmulo de biomassa comparado ao controle, porém teve aumento de antocianinas no 5º dia de exposição ao metal, cerca de 3 vezes mais que o controle (BALDISSEROTTO *et al.*, 2004).

Por mais que a maior concentração de Mn testada ($3,0 \text{ mg L}^{-1}$) provocou inúmeros prejuízos para *R. natans*, a remoção deste metal da solução-teste foi eficiente, alcançando valores acima de 50%. Em experimentos onde utilizaram macrófitas *Eichhornia crassipes*, *Salvinia auriculata* e *Vesicularia dubyana* expostas a 20 mg L^{-1} de Mn, observou-se também que estas plantas possuem uma eficiência de remoção de Mn do meio variando de 25% à 85% demonstrando um elevado potencial de aplicabilidade para remediação de Mn em soluções aquosas (MOREIRA *et al.*, 2015). *Pistia stratiotes* removeu acima de 86% das concentrações de Mn em 24 h de exposição (MIRETZKY; SARALEGUI; CIRELLI, 2004).

Nos bioensaios contendo as adições de Zn, o crescimento de *R. natans* também foi afetado, principalmente nas concentrações de $1,5$ e $3,0 \text{ mg L}^{-1}$, quando as plantas perderam massa desde o início da exposição ao metal. Com $0,7 \text{ mg L}^{-1}$, a toxicidade do metal para *R. natans* foi menor, pois observou-se crescimento, embora menor que o controle. Este comportamento pode ter decorrido pelo fato do Zn ser um micronutriente essencial para a realização de funções como síntese de proteínas, ativação enzimática, expressão e regulação de genes, metabolismo de carboidratos, integridade estrutural dos ribossomos, desintoxicação de radicais superóxidos e atividade de fito-hormônios (WELCH, 1995).

Pesquisas demonstram que a toxicidade do Zn pode variar entre as macrófitas. Em testes de toxicidade com macrófitas expostas ao Zn por 7 dias foi observado que *Elodea canadensis* resistiu a concentração máxima de $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ de ZnCl_2 , porém *Leptodictyum riparium* e *Lemna minor* resistem à uma concentração ainda maior ($13,6 \text{ mg L}^{-1}$) pelo mesmo tempo de exposição ao metal (BASILE *et al.*, 2012). *Eichhornia crassipes* teve seu crescimento

inibido em concentrações de 6 à 12 mg L⁻¹ de Zn(NO₃)₂; em concentração mais baixas (2,0 e 4,0 mg L⁻¹) o crescimento aumentou (RUPAINWAR *et al.*, 2004). *Lemna valdiviana* e *Salvinia minima* cresceram na concentração de 1 mg L⁻¹ de Zn, porém a concentração de 10 mg L⁻¹ demonstraram serem tóxicas para o crescimento destas plantas (IHA, 2014). *Ipomoea aquatica* exposta à 0,23 e 2,27 mg L⁻¹ de Zn teve aumento no crescimento das raízes enquanto concentrações de 12,71 e 22,7 mg L⁻¹ de Zn suprimiram o crescimento (CHANU; GUPTA, 2016).

As análises fisiológicas em *R. natans* expostas as concentrações de Zn demonstraram diminuição na concentração de pigmentos e da atividade antioxidante com o aumento da concentração do metal, além de alterações na membrana celular pelo aumento de malondialdeído e extravasamento de eletrólitos. Outros estudos também demonstram que o Zn podem causar alterações na concentração de clorofilas e da peroxidação lipídica em macrófitas aquáticas (CHANU; GUPTA, 2016; HARGUINTEGUY; PIGNATA; FERNÁNDEZ-CIRELLI, 2015) e, os níveis aumentados e/ou diminuídos de antioxidantes nos tecidos vegetais estão geralmente relacionados à tolerância ao estresse vegetal (SANKHLA *et al.*, 2016).

A remoção do Zn da solução-teste foi acima de 20%. A menor concentração testada nos bioensaios (0,7 mg L⁻¹) teve uma eficiência de até 67%. Estes resultados indicaram que *R. natans* pode ser uma boa acumuladora de Zn, corroborando com Chiodi Boudet *et al.* (2011), que observaram a capacidade de *R. natans* acumular Zn em seus tecidos vegetais. Em estudos com a macrófita *Lemna gibba*, a eficiência de remoção de Zn com concentrações variando de 6 à 18 mg L⁻¹ foi acima de 60%, sendo que a concentração do metal na biomassa da lentilha d'água foi de 4,23 à 25,81 mg g⁻¹ de massa seca (KHELLAF; ZERDAOUI, 2009). Várias macrófitas também demonstraram serem boas acumuladoras de Zn em seus tecidos vegetais, como a *Elodea canadensis*, *Leptodictyum riparium* e *Lemna minor* (BASILE *et al.*, 2012), *Myriophyllum aquaticum*, *Egeria densa* (HARGUINTEGUY; PIGNATA; FERNÁNDEZ-CIRELLI, 2015), *Eichhornia crassipes* (FAYED; ABD-EL-SHAFY, 1985; RUPAINWAR *et al.*, 2004) e *Pistia stratiotes* (MIRETZKY; SARALEGUI; CIRELLI, 2004).

Comparando o Al, Mn e Zn analisados no presente estudo, na concentração de 1,5 mg L⁻¹ (comum a todos os metais), Zn foi o metal mais prejudicial para o crescimento de *R. natans*, provavelmente porque esta concentração é tóxica para esta espécie, pois, mesmo o Zn sendo

um nutriente essencial para todos os organismos, em concentrações mais altas tornam-se tóxico (AZEVEDO; LEA, 2005). O Zn em excesso nas plantas inibe a atividade da Rubisco que é uma enzima-chave nas reações de assimilação de CO₂ para a atividade fotossintética (SANKHLA *et al.*, 2016), portanto, desta forma, a planta não consegue realizar a fotossíntese e, consecutivamente, não apresenta crescimento vegetativo.

5.2 CINÉTICA DE CRESCIMENTO, ANÁLISES FISIOLÓGICAS E PERCENTUAL DE EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO PARA AS COMBINAÇÕES DE METAIS

Para os experimentos contendo as combinações das concentrações dos metais, os resultados demonstraram que quando os metais foram adicionados juntos, independentemente da combinação realizada, o efeito tóxico foi intensificado no crescimento de *R. natans*, comparando com os experimentos dos metais individuais. Não houve crescimento e quanto maior a concentração combinada maior a toxicidade no tecido vegetal uma vez que a necrose foi observada com poucos dias de exposição. Apenas nos bioensaios Al + Mn, Al + Zn e Mn + Zn 25 °C, concentrações iniciais (Al 1,5 mg L⁻¹; Mn e Zn 0,7 mg L⁻¹), observou-se um crescimento, mesmo que inferior ao controle.

No ambiente, as emissões de contaminantes químicos raramente consistem em apenas um agente tóxico, geralmente, contêm múltiplos metais (RAI *et al.*, 1995) e dependendo do metal presente, a interação pode ser do tipo antagônica (um metal interfere no efeito do outro diminuindo o efeito final previsto) ou sinérgica (ação combinada entre metais que aumentam o efeito final) (PRASAD; STRZALKA, 2002). Na maioria da combinação de metais no presente estudo, a interação aparenta ter sido sinérgica pela intensificação da toxicidade na macrófita observada pela necrose. Combinações de metais como as utilizadas no presente estudo são escassos na literatura, entretanto pesquisas demonstram que a combinação de metais podem ocasionar inibição de crescimento e lesões necróticas em *Hordeum vulgare* (GUO; ZHANG; ZHANG, 2007), clorose nos brotos de *Callitriche palustris* e *Chara fragilis* (POKLONOV; SHESTAKOVA; OSTROUMOV, 2018), e perda de biomassa seca nas macrófitas *Ceratophyllum demersum*, *Hydrilla verticillata*, *Hydrocharis dubia*, *Salvinia natans* (PARK *et*

al., 2011). Por outro lado, podem apresentar toxicidade diminuída em relação a de metais individuais no crescimento em *Cucumis sativus* (AN *et al.*, 2004) e em *Lemna aequinoctialis* (CHARLES; MARKICH; RALPH, 2006), indicando assim, que a reação da planta depende do tipo e da concentração dos metais, além da tolerância da espécie vegetal ao elemento. Como exemplo, *Lemna minor*, *Typha latifolia*, *Eichhornia crassipes* e *Myriophyllum aquaticum* expostas a diferentes misturas de metais por 7 dias mostrou que a *L. minor* não sobreviveu a mais de 72 horas de exposição e, as demais macrófitas resistiram no máximo a 4 dias de exposição (ROMERO-HERNÁNDEZ *et al.*, 2017).

Os indivíduos de *R. natans* expostos às combinações dos metais apresentaram alterações fisiológicas, de forma geral, com decréscimo na concentração dos pigmentos fotossintéticos, ação antioxidante e aumento de peroxidação lipídica com alto extravasamento de eletrólitos, principalmente, quando expostas à combinações com as maiores concentrações dos metais. Comparando as respostas fisiológicas com outros estudos que contemplaram as combinações de metais, *Hydrilla verticillata* apresentou diminuição no teor de clorofila quando exposta a concentrações maiores de metais combinados, além de ter sofrido perda de biomassa e clorose nas folhas (SINGH; KUMAR; AGARWAL, 2012). *Lupinus albus* teve a concentração de clorofila-*a* reduzida, (ca. 19%) quando exposta a combinação de metais, sua ação antioxidante (concentração de antocianina e flavonoides) foi aumentada em 16% quando comparada ao controle (sem adição de metais) e o malondialdeído aumentou significativamente tanto nas folhas (26%) quanto nas raízes (35%) (SHANAHAN *et al.*, 2007).

Se tratando da eficiência de remoção nos bioensaios com as diferentes combinações dos metais Al, Mn e Zn, nos tratamentos em que o Al esteve presente, independente da concentração ou temperatura, a eficiência de remoção da solução deste metal foi maior do que a de outro metal combinado (com Mn ou Zn ou com Mn + Zn). Zn foi o metal com menor eficiência de remoção nos bioensaios. Romero-Hernández *et al.* (2017) observaram que *E. crassipes* e *M. aquaticum* apresentaram habilidade de remover outros metais (Cu, Hg, Pb) com mais eficiência do que o Zn. O Zn também foi um dos últimos metais (Pb > Cr > Cu > Zn > As) na preferência para a acumulação pelas macrófitas *C. demersum*, *H. verticillata*, *H. dubia* e *S. natans* (PARK *et al.*, 2011). Estes dados demonstram que mesmo a essencialidade de alguns metais para as plantas, como por exemplo o Mn e o Zn (LOPES, 1998; WELCH, 1995; ZORNOZA; SÁNCHEZ-PARDO; CARPENA, 2010) e, também, da não-essencialidade do Al no tecido

vegetal (TCHOUNWOU *et al.*, 2012), as plantas absorvem/acumulam os elementos químicos independentemente de suas necessidades fisiológicas pelos processos de absorção/adsorção. As mesmas não possuem a capacidade de distinguir a essencialidade entre diferentes elementos; assim, a captação de metais pelas plantas não depende da concentração de metais no ambiente, mas é regulada pelos mecanismos fisiológicos das plantas (BRANKOVIĆ *et al.*, 2012). A taxa de absorção e acumulação de metal nas macrófitas depende ainda do tipo de espécie e dos fatores externos como temperatura, pH e dose (DHIR, 2013).

5.3 CINÉTICA DE CRESCIMENTO, ANÁLISES FISIOLÓGICAS, PERCENTUAL DE EFICIÊNCIA DE REMOÇÃO E DETERMINAÇÃO DE METAIS NOS BIOENSAIOS COM ÁGUA CONTAMINADA PELO REJEITO

A água contaminada pelo rejeito interferiu negativamente no crescimento da macrófita *R. natans* durante o período de exposição, pois os indivíduos perderam biomassa e largura na maioria dos bioensaios desde o início de exposição. Em um experimento em que também se utilizou a água contaminada pelo rejeito, *Egeria densa* e *Chara* sp. (espécies submersas) tiveram aumento nas taxas de crescimento, porém o alongamento da planta, o acúmulo de biomassa e o desenvolvimento de brotos vegetativos foram prejudicados (BOTTINO *et al.*, 2017). Células meristemáticas de *Allium cepa* também expostas à água do rio Doce contaminada pelo rejeito resultante do colapso da barragem de Fundão apresentaram alterações cromossômicas e de divisão celular (QUADRA *et al.*, 2019). Testes de citotoxicidade com células HepG2 também expostas a água e lama contaminada pelo rejeito demonstraram inibição de crescimento de 70% além de indicação de mutagenicidade (SEGURA *et al.*, 2016).

Experimentos com macrófitas aquáticas crescendo em drenagem ácida de mina (DAM) relataram perda de produtividade (ganho de biomassa) durante o tempo de exposição (CRUZ, 2011). Entretanto, algumas espécies de plantas são mais tolerantes à presença de rejeitos da mineração como é o caso de *Eleocharis equisetina*, que cresceu na borda (até 0,5 m de profundidade) de um lago ácido (pH 2,45) contendo rejeito rico em Sn, As, Cu, Pb e Zn (LOTTERMOSER; ASHLEY, 2011) e, de *Eichhornia crassipes*, *Lemna minor* e *Spirodella*

polyrrhiza que cresceram em um reservatório de água que recebe rejeito de mina de carvão contendo metais como Hg, Mn, Cd, Cu e Pb (MISHRA *et al.*, 2008).

Os pigmentos fotossintéticos nos indivíduos de *R. natans* expostos a água contaminada pelo rejeito tiveram sua concentração reduzida na primeira semana em 25 °C e aumentada em algumas análises em 27 °C. A variação de pigmentos também ocorreu nas macrófitas *E. crassipes*, *P. stratiotes* e *S. polyrrhiza* nos tratamentos contendo DAM, sendo que em DAM com pH 2,5 as macrófitas tiveram perda de pigmentos fotossintéticos, mas em DAM com pH variando entre 3,5 e 4,5 houve aumento no teor de clorofila total e carotenoides (CRUZ, 2011).

A resposta fisiológica pela exposição à rejeitos de mineração também ocorre em plantas terrestres, como é o caso do arbusto *Erica australis* crescendo em regiões afetadas por rejeito de mineração de pirita, onde teve as concentrações de clorofila-*a* e *b*, bem como a concentração de malondialdeído reduzidas se comparado a espécie crescendo em regiões sem a contaminação (MÁRQUEZ-GARCÍA; CÓRDOBA, 2009). *Taraxacum officinale* crescendo em solos contaminados por rejeito da extração de pirita mostrou um aumento na concentração de malondialdeído ocasionado pelo estresse oxidativo pelo incremento da concentração de metais no solo (WAHSHA *et al.*, 2012). No presente estudo, os indivíduos de *R. natans* apresentaram a concentração de malondialdeído reduzida com a exposição a água contaminada por rejeito, porém o extravasamento de eletrólitos ocorreu a partir da terceira semana de análise indicando um rompimento da membrana da macrófita pela exposição ao rejeito. Não foi encontrado até o momento relatos de análise de extravasamento de eletrólitos em plantas expostas à rejeito de mineração, mas como estes são providos de inúmeros metais, a exposição de macrófitas à metais podem causar rompimento das membranas e consecutivamente extravasamento de eletrólitos como descrito no estudo com *Potamogeton pectinatus* exposta a Cu, Cr, Pb e Zn (UPADHYAY; SINGH; RAI, 2014).

A eficiência de remoção dos metais Al, Mn e Zn no bioensaio contendo a água contaminada com o rejeito foi significativa com 100% de remoção, corroborando com o acúmulo destes metais na biomassa seca da macrófita *R. natans*. Mn foi o metal com maior concentração na biomassa de *R. natans*, com 2,19 mg g⁻¹. *Pistia stratiotes* também teve uma remoção significativa (65%) de Mn e Zn da solução de DAM e essa remoção resultou em acúmulo (Mn: 423,60 mg Kg⁻¹; Zn: 251,78 mg Kg⁻¹) desses metais na biomassa (CRUZ, 2011).

Eichhornia crassipes, *Lemna minor* e *Spirodella polyrrhiza* crescendo em reservatório contendo rejeito de mina de carvão também possuíram grande concentração de Mn em seus tecidos vegetais (MISHRA *et al.*, 2008).

Apesar da água contaminada pelo rejeito apresentar toxicidade para os indivíduos de *R. natans*, a planta acumulou altas concentrações dos metais em seus tecidos vegetais; indivíduos desta mesma espécie crescendo em um lago do Leste da Argentina também apresentaram altos teores de metais (Cu, Cd, Zn e Hg) em sua biomassa corroborando com os resultados obtidos no presente estudo e indicando a capacidade da espécie fitorremediar ecossistemas aquáticos (CHIODI BOUDET *et al.*, 2011). Gomes *et al.* (2018) também indicam que *R. natans* pode ser utilizada para fitorremediar ambientes aquáticos com altas concentrações do antibiótico ciprofloxacina, pois esta espécie acumulou altas concentrações desse medicamento em sua biomassa.

R. natans é uma boa espécie para ser utilizada em bioensaios. A habilidade de absorção de contaminantes de *R. natans* em seus tecidos está relacionada à cutícula fina que as briófitas possuem (HANSON; RICE, 2014; TAIZ *et al.*, 2017), fazendo com que o tecido vegetal permaneça mais exposto e próximo da água contaminada favorecendo assim, a assimilação dos elementos químicos (SAMECKA-CYMERMAN; KOLON; KEMPERS, 2002). Outro fator que contribui para a alta absorção de contaminantes é o fato das briófitas não possuírem tecidos condutores especializados e também um sistema radicular, fazendo com que toda a superfície da planta tenha a capacidade de absorção/adsorção (DEGOLA *et al.*, 2014; ONIANWA, 2001; STANKOVIĆ; SABOVLJEVIĆ; SABOVLJEVIĆ, 2018).

Estudos comprovam a habilidade de acumulação de metais nos tecidos vegetais das briófitas, como exemplo *Scopelophila cataractae*, *Brachythecium plumosum*, *Rhynchostegium riparioides* (SUZUKI *et al.*, 2016), *Thamnobryum alopecurum* e *Brachythecium rivulare* (FAVAS *et al.*, 2018), *Marchantia polymorpha* (VÁSQUEZ *et al.*, 2019) e *Monosolenium tenerum* (SUT-LOHMANN; JONCZAK; RAAB, 2020). Com base nesses resultados, considera-se de suma importância aprimorar os estudos com a macrófita *R. natans* crescendo em águas contaminadas por metais para compreender como a espécie se permanece nesses ambientes sem apresentar prejuízos em seu crescimento e ou fisiologia que possa eliminá-la. Na atual pesquisa, observou-se que a espécie foi afetada negativamente, quando exposta nas

concentrações dos metais estudados, porém, como descrito na literatura essas plantas possuem a capacidade de se manterem em ambientes contendo contaminantes.

5.4 INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NO CRESCIMENTO E FISIOLOGIA DE *R. NATANS*

O aumento de temperatura em 2 °C (27 °C) juntamente com a exposição aos metais Al, Mn e Zn influenciou negativamente o crescimento de *R. natans*, pois, para a maioria dos bioensaios não foi possível obter crescimento da macrófita nestas condições. Nos tratamentos que tiveram crescimento, o incremento foi menor em 27 °C, comparado ao incremento obtido na temperatura de 25 °C. Em relação aos indicadores fisiológicos, os pigmentos fotossintéticos foram os mais afetados com o aumento da temperatura, pois a concentração destes foi menor à 27 °C. O extravasamento de eletrólitos também demonstrou ocorrer com maior percentual nesta temperatura.

Fatores abióticos como a temperatura influenciam as taxas de crescimento das plantas (BORNETTE; PUIJALON, 2011). O aumento da temperatura aumenta exponencialmente as taxas de reações bioquímicas da fotossíntese e das atividades biológicas, além de afetar a integridade da membrana nos cloroplastos (BROWN *et al.*, 2004; CARR; DUTHIE; TAYLOR, 1997; TAIZ *et al.*, 2017), portanto, a toxicidade do metal nas plantas podem acontecer mais rápida com o aumento da temperatura (DHIR, 2013; PRASAD; STRZALKA, 2002).

O coeficiente de temperatura (Q_{10}), nos bioensaios onde foi possível aplicar e calcular esse coeficiente (controles, Mn_{1e2} e Zn_1), valores foram próximos de 1 para a maioria dos tratamentos, apenas em Zn_1 o valor de Q_{10} foi 5,18. Na literatura há poucos trabalhos que aplicaram o Q_{10} em macrófitas aquáticas, principalmente correlacionando temperatura + adição de metais. Se tratando de crescimento em diversas temperaturas, a briófitas aquática submersa *Fontinalis antipyretica* obteve um valor de Q_{10} (relativo a taxa fotossintética bruta máxima) de 2 a 5 em 15 °C e 1,4 quando exposta a 10 e 20 °C, significando uma perda fotossintética devido a uma perda de assimilação de CO₂ pelo aumento da temperatura (MABERLY, 1985). *Egeria najas* crescendo em temperaturas de 15 à 25 °C apresentaram um valor de Q_{10} de 1,85 e *Elodea*

canadensis e *Ranunculus aquatillis* nas temperaturas de 10 e 15 °C de 3,9 (PEZZATO, 2007). *Egeria densa* crescendo em diversos tipos de solo nas temperaturas de 25 e 27 °C obteve Q_{10} de 0,29 à 8,3 variando com o tipo de solo e a turbidez registrados no bioensaio (MACHADO, 2020). Muitos processos bioquímicos são altamente dependentes da temperatura e apresentam Q_{10} variando entre 2 ou 3 e, parâmetros físicos por exemplo, são relativamente independentes da temperatura e os valores de Q_{10} são próximos de 1 (REECE *et al.*, 2015). Os baixos valores de Q_{10} , decorrentes da cinética de crescimento, para o atual estudo, indicam que provavelmente o crescimento de *R. natans* nas condições analisadas não foram exclusivamente dependentes da temperatura, mas sim da adição das concentrações dos metais.

A maioria das briófitas crescem em temperaturas variando entre 5 a 25 °C, e temperaturas superiores a 30 °C podem ser prejudiciais para o crescimento de algumas espécies (DUCKETT *et al.*, 2004; GLIME, 2017b). A faixa ótima de temperatura para o crescimento de *R. natans* não está ainda muito bem definida, porém Gomes *et al.* (2018), observou que a eficiência fotoquímica máxima e o transporte de elétrons (parâmetros relacionados a atividade fotossintética) foram maiores nos indivíduos de *R. natans* mantidas na temperatura de 25 °C do que naquelas mantidas em 20 °C e 30 °C; sendo também observado que a permeabilidade da membrana celular de *R. natans* foi maior que 100% quando exposta a 30 °C, ou seja, a 25 °C parece ser a temperatura ideal para o crescimento de *R. natans*, enquanto que a temperatura de 30 °C causou danos em seus tecidos.

Como plantas C3, as briófitas são adaptadas para apresentar ganho fotossintético líquido sob temperaturas relativamente baixas (i.e. *Racomitrium lanuginosum*, crescendo na Islândia a -10 °C), podendo apresentar uma boa assimilação até 25 °C nas regiões tropicais (GLIME, 2017a). Nas plantas C3, quanto maior for a temperatura, menor é a assimilação fotossintética do gás carbônico (CO₂) (TAIZ *et al.*, 2017), pois, com o aumento das temperaturas, nos ecossistema aquáticos, o CO₂ sai da água mais rápido fazendo com que a respiração das plantas aumentem mais do que a assimilação fotossintética (HANSON; RICE, 2014). De acordo com Wagner *et al.* (2013), 25 °C é uma temperatura ideal para espécies hepáticas tropicais e muitas espécies mostram reduções na fotossíntese e na produtividade sob temperaturas superiores a 27 °C. Essas informações corroboram com o presente estudo, pois, à 25 °C *R. natans* se desenvolveu melhor, e a temperatura de 27 °C pode ter sido um fator limitante para o crescimento de *R. natans* quando expostas aos metais Al, Mn e Zn. Portanto, com o aumento

de temperatura estimado pelo IPCC, (2018) em aproximadamente 1,5 °C entre 2030 e 2052 devido as emissões de gases na atmosfera pelas atividades antropogênicas, meios contaminados com altas concentrações de Al, Mn e Zn poderão afetar a macrófita *R. natans*, alterando negativamente seu crescimento e suas respostas fisiológicas, podendo ocasionar necrose em seus tecidos vegetais ou até o desaparecimento da espécie nestas condições.

Com isso, os resultados obtidos no presente estudo contribuem para o entendimento do crescimento e do funcionamento da fisiologia vegetal das macrófitas aquáticas decorrentes dos impactos ambientais que podem ocorrer com o rompimento das barragens de rejeito de mineração e consequente contaminação dos ecossistemas aquáticos com altas concentrações de metais contidos não apenas nos rejeitos, mas em diversas situações onde os metais utilizados nesse estudo estejam presentes no ambiente aquático. Também, foi possível compreender como o aumento de temperatura da água de ambientes de água doce, como umas das consequências ocasionado pelo aquecimento global, pode afetar, ainda mais, o crescimento das macrófitas expostas a águas contaminadas por grandes concentrações de metais.

5.5 VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DOS BIOENSAIOS

Os bioensaios, em consequência da adição das concentrações de metais tornaram-se ácidos (pH entre 3 à 6,6). Entretanto houve incremento de biomassa no presente estudo em meio com pH 4 e 5. Provavelmente essa faixa de pH não é prejudicial para o crescimento de *R. natans*, nas condições experimentais. Porém, até o momento, não há estudos relatando a faixa de pH ideal para o crescimento dessa espécie, mas, briófitas, toleram diversos tipos de estressores no meio, incluindo a variação de pH (GLIME, 2017a). Algumas espécies de briófitas podem ocorrer em faixas amplas de pH (e.g. *Andreaea rothii* cresce em pH baixo e *Hygrohypnum ochraceum* cresce em pH neutro) (TESSLER *et al.*, 2014). *Calymperes erosum*, por exemplo, apresentou uma taxa de germinação muito boa em pH 2, 3, 4 e 5 e seu crescimento foi retardado em pH 6 e 7 (OGBIMI *et al.*, 2014).

Em águas continentais com presença de Al, pode haver perda de espécies vegetais em pH menor que 4 e maior que 7 (CROWDER, 1991), pois a toxicidade do metal está diretamente relacionado com o pH do meio, sendo que em meio ácido os metais tendem a ser mais tóxicos por estarem como íons hidratados (presença de moléculas de H₂O) (PRASAD; STRZALKA, 2002), e assim ficam biologicamente ativos e são facilmente assimilados pelos seres vivos (SPARLING, 2018), enquanto que em meio alcalino os metais tendem a precipitar como complexos insolúveis (PRASAD; STRZALKA, 2002). Como exemplo deste processo, em *Hydrilla verticillata*, o pH baixo (4,5) aumentou a toxicidade do Cu, enquanto que sob pH alto (9,5) a toxicidade foi consideravelmente reduzida (GUPTA; SINHA; CHANDRA, 1996).

A concentração de sais dissolvidos nos bioensaios, principalmente nas maiores concentrações dos metais e com as maiores combinações, podem ter ocasionado um estresse iônico na planta, pois, altas concentrações de íons causam toxicidade para a maioria das plantas, por afetarem raízes, bloqueando os mecanismos de transporte de água e nutrientes (MIGUEL *et al.*, 2010). O aumento da concentração de sais nos ecossistemas, influenciam na atividade osmótica e na ação dos íons sobre o protoplasma das plantas, provocando um distúrbio iônico nas membranas celulares e como consequência, pouca energia é produzida, influenciando negativamente as taxas de crescimento e produção de biomassa (LARCHER, 2000).

Embora estudos de salinidade sejam voltados principalmente para cloreto de sódio (NaCl), outros sais, bem como sua concentração e disponibilidade no ecossistema, podem influenciar o estresse nas plantas (LARCHER, 2000). Os principais íons relacionados à salinidade são ânions bicarbonato (HCO₃⁻), carbonato (CO₃²⁻), cloreto (Cl⁻), sulfato (SO₄²⁻), e nitrato (NO₃⁻) e os cátions cálcio (Ca²⁺), magnésio (Mg²⁺), sódio (Na⁺), e potássio (K⁺) (RENGASAMY, 2006). Portanto os sais nitrato de alumínio (Al (NO₃)₃.9H₂O), cloreto de manganês (MnCl₂) e cloreto de zinco (ZnCl₂) utilizados no presente estudo, em concentrações elevadas nos bioensaios, podem ter ocasionado estresse salino nos indivíduos de *R. natans* durante o tempo de exposição.

A adição dos metais nos bioensaios não alterou negativamente a concentração de OD na solução (i.e. diminuindo OD). Portanto, essa variável, provavelmente não foi um fator determinante para o desenvolvimento das plantas, nas condições do experimentais adotadas.

CONCLUSÕES

As concentrações dos metais Al, Mn e Zn testados afetaram negativamente o crescimento e as respostas fisiológicas de *R. natans* tanto individualmente (exceto no crescimento contendo Mn 0,7 mg L⁻¹) quanto em combinações, sendo o aumento das concentrações dos metais foi tóxico para a planta. Com isso, o μ e o acúmulo de biomassa foram menores que o controle e consecutivamente o td da biomassa foi maior.

Zn foi o metal mais tóxico para a macrófita, na concentração de 1,5 mg L⁻¹, seguindo de Al e depois Mn.

A água contaminada pelo rejeito, devido ao rompimento da barragem de Mariana em 2015, também interferiu negativamente no crescimento de *R. natans*, pois as plantas permaneceram vivas apenas por 18 dias, perdendo biomassa, pigmentos, capacidade antioxidante e tiveram rompimento da membrana com consequente extravasamento de eletrólitos.

O aumento de temperatura (+2 °C) aumentou a toxicidade dos metais no desenvolvimento de *R. natans* visto que, em muitos bioensaios não houve crescimento nesta temperatura e respostas fisiológicas como as de pigmentos e extravasamento de eletrólitos também foram mais afetadas nesta temperatura. Portanto, o aumento da temperatura ocasionado pelo aquecimento global provavelmente ocasionará impactos negativos para o crescimento de *R. natans* em ambientes contendo metais em concentrações elevadas.

A eficiência de remoção dos metais nas soluções-teste e a concentração de metais na biomassa indicam que *R. natans* é planta bioacumuladora e pode fitorremediar ambientes aquáticos contaminados com metais.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, L. K.; CUNHA-SANTINO, M. B. *Toxicidade da benzofenona no crescimento de Ricciocarpus natans*. São Carlos, SP, Brasil: XXVI Congresso de Iniciação Científica e XI Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2019.

ALVES, I. M. *et al.* *Uso de Ricciocarpus natans (L. Corda) para fitorremediação de ferro e manganês em solução aquosa*. 2017. Encontro dos Saberes - Seminário de Iniciação Científica. Disponível em: http://www.encontrodesaberes.ufop.br/gerar_pdf.php?id=8192. Acesso em: 13 jun. 2019.

AN, Y. J. *et al.* Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. *Science of the Total Environment*, v. 326, n. 1–3, p. 85–93, 2004. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2004.01.002.

ANA. *Conjuntura Recursos Hídricos Brasil - Informe Anual*. Agência Nacional de Águas. Brasília: 2019. Disponível em: <https://www.ana.gov.br/>.

ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Boca Raton, London, New York: Taylor & Francis Group, 2006. v. 45.

ANJUM, S. A. *et al.* Aluminum and chromium toxicity in maize: implications for agronomic attributes, net photosynthesis, physio-biochemical oscillations, and metal accumulation in different plant parts. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 227, n. 9, 2016. DOI: 10.1007/s11270-016-3013-x. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11270-016-3013-x>.

ATSDR. *Substance priority list*. 2017. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/SPL/>. Acesso em: 17 jul. 2019.

ATSDR. Toxic guide for zinc. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, p. 1–2, 2005.

ATSDR, A. Toxic guide for aluminum. *Division of Toxicology and Environmental Medicine Applied Technology*, p. 2, 2011. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp%0Awww.atsdr.cdc.gov>.

ATSDR, A. Toxic guide for manganese. *Department of Health and Human Services, Public Health Services*. Atlanta, GA:US: 2012. Disponível em: www.atsdr.cdc.gov.

AWASTHI, J. P. *et al.* Qualitative analysis of lipid peroxidation in plants under multiple stress through Schiff's reagent: a histochemical approach. *Bio-Protocol*, v. 8, n. 8, 2018. DOI: 10.21769/bioprotoc.2807.

AZEVEDO, R.; LEA, P. J. Toxic metal in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, v. 17, n. 1, p. 1, 2005.

BALDISSEROTTO, C. *et al.* Specific intra-tissue responses to manganese in the floating lamina of *Trapa natans* L. *Plant Biology*, v. 6, n. 5, p. 578–589, 2004. DOI: 10.1055/s-2004-

821089.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: A review. *Environmental and Experimental Botany*, v. 48, n. 1, p. 75–92, 2002. DOI: 10.1016/S0098-8472(02)00013-8.

BARCELOUX, D. G. Manganese. *Clinical Toxicology*, v. 37, n. 2, p. 293–307, 1999a. Disponível em: www.dekker.com.

BARCELOUX, D. G. Zinc. *Clinical Toxicology*, v. 37, n. 2, p. 279–292, 1999b. Disponível em: www.dekker.com.

BARRETO, M. L. *Mineração e Desenvolvimento Sustentável: desafios para o Brasil*. Rio de Janeiro: 2001. Disponível em: <http://www.iied.org>.

BASILE, A. *et al.* Toxicity, accumulation, and removal of heavy metals by three aquatic macrophytes. *International Journal of Phytoremediation*, v. 14, n. 4, p. 374–387, 2012. DOI: 10.1080/15226514.2011.620653.

BEZERRA, P. S. S.; TAKIYAMA, L. R.; BEZERRA, C. W. B. Complexação de íons de metais por matéria orgânica dissolvida: Modelagem e aplicação em sistemas reais. *Acta Amazonica*, v. 39, n. 3, p. 639–648, 2009. DOI: 10.1590/s0044-59672009000300019.

BIANCHINI, I. *et al.* Growth of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle under controlled conditions. *Hydrobiologia*, v. 644, n. 1, p. 301–312, 2010. DOI: 10.1007/s10750-010-0191-1.

BIZZO, A. L. T. *et al.* Avaliação de parâmetros fisiológicos de *Ricciocarpus natans* exposta a cádmio. Florianópolis, SC: XVII Congresso Brasileiro de Limnologia e 2º Congresso Ibero-americana de Limnologia, 2019.

BOJÓRQUEZ-QUINTAL, E. *et al.* Aluminum, a friend or foe of higher plants in acid soils. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, n. October, p. 1–18, 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.01767.

BORNETTE, G.; PUIJALON, S. Response of aquatic plants to abiotic factors: A review. *Aquatic Sciences*, v. 73, n. 1, p. 1–14, 2011. DOI: 10.1007/s00027-010-0162-7.

BOTTINO, F. *et al.* Influence of the residue from an iron mining dam in the growth of two macrophyte species. *Chemosphere*, v. 186, p. 488–494, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.030.

BOWIN, G. L. *et al.* *Rates, constants, and kinetics: Formulations in Surface water quality modeling*. Athens, Georgia: 1985.

BRANDÃO, M. F. S.; BIANCHINI-JR, I.; CUNHA-SANTINO, M. B. *Análise do crescimento da Ricciocarpus natans em meio contaminado com ácido tioglicólico*. São Carlos, SP, Brasil: XXV Congresso de Iniciação Científica e X Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2018.

BRANKOVIĆ, S. *et al.* Metals concentration and accumulation in several aquatic macrophytes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, v. 26, n. 1, p. 2731–2736, 2012. DOI: 10.5504/bbeq.2011.0086.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. Secretaria da Vigilância em Saúde*. [S.l.: s.n.], 2006.

BROWN, J. H. *et al.* Toward a metabolic theory of ecology. *Ecology*, v. 85, n. 7, p. 1771–1789, 2004. Disponível em: https://www.esa.org/history/Awards/papers/Brown_JH_MA.pdf.

BUNGALA, S. O.; MACHIWA, J. F.; SHILLA, D. A. Concentration and biomagnification of heavy metals in biota of the coastal marine areas of Tanzania. *Journal of environmental science and engineering B*, v. 6, n. 8, p. 406–424, 2017. DOI: 10.17265/2162-5263/2017.08.002.

CAKMAK, I.; HORST, W. J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, v. 83, n. 3, p. 463–468, 1991. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x.

CARR, G. M.; DUTHIE, H. C.; TAYLOR, W. D. Models of aquatic plant productivity: A review of the factors that influence growth. *Aquatic Botany*, v. 59, n. 3–4, p. 195–215, 1997. DOI: 10.1016/S0304-3770(97)00071-5.

CARVALHO, M. S. de *et al.* Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. *Acta Brasiliensis*, v. 1, n. 3, p. 37–41, 2017.

CASPER, J. K. *Changing ecosystems: effects of global warming*. U.S.A.: Bang Printing, Brainerd, MN, 2010.

CETESB. *Alumínio*. 2012. Divisão de toxicologia humana e saúde ambiental. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/laboratorios/wp-content/uploads/sites/24/2013/11/Aluminio.pdf>. Acesso em: 5 abr. 2020.

CETESB. *Fundamentos do controle de poluição das águas*. São Paulo: AAAG-CETESB, 2018. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>.

CHAKRABORTY, S. *et al.* Physiological mechanisms of aluminum (Al) toxicity tolerance in nitrogen-fixing aquatic macrophyte *Azolla microphylla* Kaulf: phytoremediation, metabolic rearrangements, and antioxidative enzyme responses. *Environmental Science and Pollution Research*, n. Zheng 2010, 2019. DOI: 10.1007/s11356-019-04408-7.

CHAMBERS, P. A. *et al.* Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, n. 1, p. 9–26, 2008. DOI: 10.1007/s10750-007-9154-6.

CHAMBERS, P. A. *et al.* Management issues in aquatic macrophyte ecology: A Canadian perspective. *Canadian Journal of Botany*, v. 77, n. 4, p. 471–487, 1999. DOI: 10.1139/b99-092.

CHANU, L. B.; GUPTA, A. Toxicity of zinc on growth of an aquatic macrophyte, *Ipomoea*

aquatica Forsk. *Current World Environment*, v. 11, n. 1, p. 218–227, 2016. DOI: 10.12944/CWE.11.1.27.

CHARLES, A. L.; MARKICH, S. J.; RALPH, P. Toxicity of uranium and copper individually, and in combination, to a tropical freshwater macrophyte (*Lemna aequinoctialis*). *Chemosphere*, v. 62, n. 8, p. 1224–1233, 2006. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.089.

CHIODI BOUDET, L. *et al.* Assessment of heavy metal accumulation in two aquatic macrophytes: a field study. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, v. 6, n. 1, p. 57–64, 2011. DOI: 10.5132/jbse.2011.01.009.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie*, v. 88, n. 11, p. 1707–1719, 2006. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.07.003.

CROWDER, A. Acidification, metals and macrophytes. *Environmental Pollution*, v. 71, n. 2–4, p. 171–203, 1991. DOI: 10.1016/0269-7491(91)90032-R.

CRUZ, M. B. da. *Macrófitas aquáticas cultivadas em águas de drenagem ácida de mina*. 2011. 90 f. Tese em Botânica, Universidade Federal de Viçosa -MG, 2011.

DEGOLA, F. *et al.* A Cd/Fe/Zn-responsive phytochelatin synthase is constitutively present in the ancient liverwort *Lunularia cruciata* (L.) dumort. *Plant and Cell Physiology*, v. 55, n. 11, p. 1884–1891, 2014. DOI: 10.1093/pcp/pcu117.

DHIR, B. *Phytoremediation: role of aquatic plants in environmental clean-Up*. New Delhi, India: Springer Science, 2013. Disponível em: www.springer.com.

DOS SANTOS, F. S. *et al.* Resposta antioxidante, formação de fitoquelatinas e composição de pigmentos fotoprotetores em *Brachiaria decumbens* Stapf submetida à contaminação com Cd e Zn. *Química Nova*, v. 34, n. 1, p. 16–20, 2011. DOI: 10.1590/s0100-40422011000100004.

DUCKETT, J. G. *et al.* In vitro cultivation of bryophytes: a review of practicalities, problems, progress and promise. *Journal of Bryology*, v. 26, p. 3–20, 2004. DOI: 10.1179/037366803235001742. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/037366803235001742>.

DUFFUS, J. H. “Heavy metals” - A meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002. DOI: 10.1351/pac200274050793.

EMAMVERDIAN, A. *et al.* Heavy metal stress and some mechanisms of plant defense response. *The Scientific World Journal*, v. 25, n. 4, p. 1–18, 2015. DOI: 10.1155/2015/756120. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/tswj/2015/756120/>.

ENGELHARDT, K. A. M.; RITCHIE, M. E. Effects of macrophyte species richness on wetland ecosystem functioning and services. *Nature*, v. 411, n. 6838, p. 687–689, 2001. DOI: 10.1038/35079573.

EUR 80/778/EEC. *Council directive: relating to the quality of water intended for human*

consumption. *Journal of The European Communities*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1980/778/oj>, 1980

FARIA, C. E. G.; COELHO, J. M. *Mineração e meio ambiente no Brasil - PNUD 2002/001604*. 2002. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Disponível em: https://www.cgee.org.br/documents/10195/734063/mineracao_e_meio_ambiente_no_brasil_1022.pdf/e86e431e-1a03-48d0-9a6e-98655ea257b6?version=1.0.

FAVAS, P. J. C. *et al.* Metal(loid) accumulation in aquatic plants of a mining area: Potential for water quality biomonitoring and biogeochemical prospecting. *Chemosphere*, v. 194, p. 158–170, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.139>.

FAYED, S. E.; ABD-EL-SHAFY, H. I. Accumulation of Cu, Zn, Cd, and Pb by aquatic macrophytes. *Environment International*, v. 11, n. 1, p. 77–87, 1985. DOI: 10.1016/0160-4120(85)90105-9.

FERNANDES, G. W. *et al.* Deep into the mud: ecological and socio-economic impacts of the dam breach in Mariana, Brazil. *Natureza e Conservacao*, v. 14, n. 2, p. 35–45, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncon.2016.10.003>.

FOUAD, M. O. *et al.* Effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in the protection of olive plants against oxidative stress induced by drought. *Spanish Journal of Agricultural Research*, v. 12, n. 3, p. 763–771, 2014. DOI: 10.5424/sjar/2014123-4815.

FRANCO, F. D.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI-JR, I. *Efeito do parasitico de peixes sobre o crescimento de Ricciocarpus natans*. São Carlos, SP, Brasil: V Jornada de gestão e Análise Ambiental, 2018.

GIAIA. *Análises físico-químicas do Rio Doce e afluentes sob influencia dos rejeitos provenientes no rompimento da barragem de Fundão da empresa Samarco*. [S.l.: s.n.], 2016.

GLIME, J. M. Limiting factors and limits of tolerance. *Bryophyte Ecology*. [S.l.]: Michigan Technological University and International Association of Bryologists, 2017a. v. 1. p. 8. Disponível em: <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology/>.

GLIME, J. M. Temperature: Effects. *Bryophyte Ecology*. [S.l.]: Michigan Technological University and International Association of Bryologists, 2017b. v. 1. p. 25. Disponível em: <https://digitalcommons.mtu.edu/bryophyte-ecology/>.

GOMES, M. P. *et al.* Ciprofloxacin vs. temperature: Antibiotic toxicity in the free-floating liverwort *Ricciocarpus natans* from a climate change perspective. *Chemosphere*, v. 202, p. 410–419, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.048>.

GRAY, J. S. Biomagnification in marine systems: The perspective of an ecologist. *Marine Pollution Bulletin*, v. 45, n. 1–12, p. 46–52, 2002. DOI: 10.1016/S0025-326X(01)00323-X.

GUO, T. R.; ZHANG, G. P.; ZHANG, Y. H. Physiological changes in barley plants under combined toxicity of aluminum, copper and cadmium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,

v. 57, n. 2, p. 182–188, 2007. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2007.01.013.

GUPTA, M.; SINHA, S.; CHANDRA, P. Copper-induced toxicity in aquatic macrophyte, *Hydrilla verticillata*: Effect of pH. *Ecotoxicology*, v. 5, n. 1, p. 23–33, 1996. DOI: 10.1007/BF00116321.

HANSON, D. T.; RICE, S. K. *Photosynthesis in bryophytes and early land plants*. 37. ed. [S.l.]: Springer Dordrecht Heidelberg, New York, London, 2014. v. 37. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6988-5>.

HARGUINTEGUY, C. A.; PIGNATA, M. L.; FERNÁNDEZ-CIRELLI, A. Nickel, lead and zinc accumulation and performance in relation to their use in phytoremediation of macrophytes *Myriophyllum aquaticum* and *Egeria densa*. *Ecological Engineering*, v. 82, p. 512–516, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2015.05.039.

HE, H.; LI, Y.; HE, L. F. Aluminum toxicity and tolerance in Solanaceae plants. *South African Journal of Botany*, v. 123, p. 23–29, 2019. DOI: 10.1016/j.sajb.2019.02.008.

HEALTH CANADA. *Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Summary Table*. Water and Air Quality Bureau. Healthy Environments and Consumer Safety Branch. Ottawa, Ontario: [s.n.], 2019

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 125, n. 1, p. 189–198, 1968. DOI: 10.1016/0003-9861(68)90654-1.

HUA, J. *et al.* Phytoremediation potential of three aquatic macrophytes in manganese-contaminated water. *Water and Environment Journal*, v. 26, n. 3, p. 335–342, 2012. DOI: 10.1111/j.1747-6593.2011.00293.x.

IBAMA. *Parecer técnico sobre os resultados obtidos nas coletas de amostras de águas e sedimento no rio Doce e na região da foz, no estado do Espírito Santo*. [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/phocadownload/barragemdefundao/relatorios/2016-01-relatorio_analise_agua_janeiro.pdf.

IGAM INSTITUTO MINEIRO DE GESTÃO DAS ÁGUAS. *Relatório Técnico de Acompanhamento da Qualidade das Águas do Rio Doce*. Belo Horizonte: [s.n.], 2015. Disponível em: <http://200.198.57.118:8080/jspui/handle/123456789/473>. Acesso em: 12 set. 2019.

IHA, D. S. *Bioacumulações de Cd, Ni, Pb e Zn durante os crescimentos de Salvinia minima e Lemna valdiviana*. 2014. 119 f. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, UFSCar - Universidade Federal de São Carlos, 2014.

IPCC. Global warming of 1.5°C: Summary for Policymakers. *Intergovernmental Panel on climate change*, p. 3–26, 2018. Disponível em: https://report.ipcc.ch/sr15/pdf/sr15_spm_final.pdf.

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 23, p. 6137–6140, 2009. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.06.043.

KRIZEK, D. T.; BRITZ, S. J.; MIRECKI, R. M. Inhibitory effects of ambient levels of solar UV-A and UV-B radiation on growth of cv. new red fire lettuce. *Physiologia Plantarum*, v. 103, n. 1, p. 1–7, 1998. DOI: 10.1034/j.1399-3054.1998.1030101.x.

KRONESTEDT, E. Anatomy of *Ricciocarpus natans* (L.) Corda, studied by scanning electron microscopy. *Annals of Botany*, v. 47, n. 6, p. 817–827, 1981. DOI: 10.1093/oxfordjournals.aob.a086081.

KUMARI, N.; YADAV, M.; SHARMA, V. Differential response of *Brassica juncea* cultivars to Al; consequences for chlorophyll a fluorescence, antioxidants and psb A gene. *Journal of Plant Interactions*, v. 13, n. 1, p. 496–505, 2018. DOI: 10.1080/17429145.2018.1526980.

LACOUL, P.; FREEDMAN, B. Environmental influences on aquatic plants in freshwater ecosystems. *Environmental Reviews*, v. 14, n. 2, p. 89–136, 2006. DOI: 10.1139/a06-001.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos, Brasil: RIMA, 2000.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, v. 148, n. C, p. 350–382, 1987. DOI: 10.1016/0076-6879(87)48036-1.

LIZIERI, C.; AGUIAR, R.; KUKI, K. N. Manganese accumulation and its effects on three tropical aquatic macrophytes: *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* and *Spirodela polyrhiza*. *Rodriguesia*, v. 62, n. 4, p. 909–917, 2011. DOI: 10.1590/S2175-78602011000400016.

LIZIERI, C.; KUKI, K. N.; AGUIAR, R. The morphophysiological responses of free-floating aquatic macrophytes to a supra-optimal supply of manganese. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 223, n. 5, p. 2807–2820, 2012. DOI: 10.1007/s11270-011-1068-2.

LOPES, A. S. *Manual Internacional de fertilidade do solo*. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1998. Disponível em: [http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/0/40A703B979D0330383257FA80066C007/\\$FILE/Manual Internacional de Fertilidade do Solo.pdf](http://brasil.ipni.net/ipniweb/region/brasil.nsf/0/40A703B979D0330383257FA80066C007/$FILE/Manual%20Internacional%20de%20Fertilidade%20do%20Solo.pdf).

LOTTERMOSER, B. G.; ASHLEY, P. M. Trace element uptake by *Eleocharis equisetina* (spike rush) in an abandoned acid mine tailings pond, northeastern Australia: Implications for land and water reclamation in tropical regions. *Environmental Pollution*, v. 159, n. 10, p. 3028–3035, 2011. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.04.014.

LUX, H. B.; CUMMING, J. R. Effect of aluminum on the growth and nutrition of tulip-poplar seedlings. *Canadian Journal of Forest Research*, v. 29, n. 12, p. 2003–2007, 1999. DOI: 10.1139/x99-172.

MABERLY, S. C. Photosynthesis by *Fontinalis antipyretica*: interaction between photon

irradiance, concentration of carbon dioxide and temperature. *The New Phytologist*, v. 100, p. 127–140, 1985. DOI: 0028-646X/85/060127. Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/j.1469-8137.1985.tb02765.x>.

MACHADO, R. *Efeitos da temperatura e da turbidez no crescimento de Egeria densa Planch.* 2020. 119 f. Tese de Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Ufscar, São Carlos, Sp, 2020.

MÁRQUEZ-GARCÍA, B.; CÓRDOBA, F. Antioxidative system and oxidative stress markers in wild populations of *Erica australis* L. differentially exposed to pyrite mining activities. *Environmental research*, v. 109, n. 8, p. 968–974, 2009. DOI: 10.1016/j.envres.2009.08.001.

MEIR, S.; PHILOSOPH-HADAS, S.; AHARONI, N. Ethylene-increased accumulation of fluorescent lipid-peroxidation products detected during senescence of parsley by a newly developed method. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v. 117, n. 1, p. 128–132, 1992. DOI: 10.21273/jashs.117.1.128.

MIDGLEY, G. F. Plant physiological responses to climate and environmental change. *Encyclopedia of life Sciences*, p. 1–12, 2007. DOI: 10.1002/9780470015902.a0003205.pub2.

MIGUEL, P. S. B. *et al.* Efeitos tóxicos do alumínio no crescimento das plantas: mecanismos de tolerância, sintomas, efeitos fisiológicos, bioquímicos e controles genéticos. *CES Revista*, v. 24, p. 12–30, 2010.

MIRANDA, L. S.; MARQUES, A. C. Hidden impacts of the Samarco mining waste dam collapse to Brazilian marine fauna - an example from the staurozoans (Cnidaria). *Biota Neotropica*, v. 16, n. 2, 2016. DOI: 10.1590/1676-0611-bn-2016-0169.

MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; CIRELLI, A. F. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). *Chemosphere*, v. 57, n. 8, p. 997–1005, 2004. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.07.024.

MISHRA, V. K. *et al.* Concentrations of heavy metals and aquatic macrophytes of Govind Ballabh Pant Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 141, n. 1–3, p. 49–58, 2008. DOI: 10.1007/s10661-007-9877-x.

MORARI, F.; DAL FERRO, N.; COCCO, E. Municipal wastewater treatment with *Phragmites australis* L. and *Typha latifolia* L. for irrigation reuse. Boron and heavy metals. *Water, Air, and Soil Pollution*, v. 226, n. 3, 2015. DOI: 10.1007/s11270-015-2336-3.

MOREIRA, A. J. *et al.* Avaliação da remoção de Mn em efluente sintético através do processo de fitorremediação utilizando plantas aquáticas. 2015, *Anais [...]* Poços de Caldas - MG: XII Congresso Nacional de Meio Ambiente, 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Ailton_Moreira3/publication/304499050.

MOSSOR-PIETRASZEWSKA, T. Effect of aluminium on plant growth and metabolism. *Acta Biochimica Polonica*, v. 48, n. 3, p. 673–686, 2001.

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*, v. 170, n. 2–3, p. 1156–1163, 2009. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.05.084.

NEVES, A. C. de O. *et al.* Neglect of ecosystems services by mining, and the worst environmental disaster in Brazil. *Natureza e Conservacao*, v. 14, n. 1, p. 24–27, 2016. DOI: 10.1016/j.ncon.2016.03.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ncon.2016.03.002>.

OECD. *Lemna* sp. growth inhibition test. *Guidelines for the Testing of Chemicals*, n. July, p. 22, 2002. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1948054.pdf>.

OGBIMI, A. Z. *et al.* Effects of pH, photoperiod, and nutrient on germination and growth of *Calymperes erosum* C. Muell. gemmaling. *Journal of Botany*, p. 5, 2014. DOI: 10.1155/2014/159457.

OKEM, A. *et al.* Effect of cadmium and aluminum on growth, metabolite content and biological activity in *Drimia elata* (Jacq.) Hyacinthaceae. *South African Journal of Botany*, v. 98, p. 142–147, 2015. DOI: 10.1016/j.sajb.2015.02.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2015.02.013>.

ONIANWA, P. C. Monitoring atmospheric metal pollution: A review of the use of mosses as indicators. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 71, n. 1, p. 13–50, 2001. DOI: 10.1023/A:1011660727479.

PANDA, S. K.; BALUSKA, F.; MATSUMOTO, H. Aluminum stress signaling in plants. *Plant Signaling and Behavior*, v. 4, n. 7, p. 592–597, 2009. DOI: 10.4161/psb.4.7.8903.

PARK, S. *et al.* Biosorption and growth inhibition of wetland plants in water contaminated with a mixture of arsenic and heavy metals. *Engineering in Life Sciences*, v. 11, n. 1, p. 84–93, 2011. DOI: 10.1002/elsc.201000024.

PEZZATO, M. M. *Macrófitas aquáticas submersas: fotossíntese, crescimento e variáveis abióticas da água*. 2007. 136 f. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Ufscar-Universidade Federal de São Carlos, 2007.

POKLONOV, V.; SHESTAKOVA, T. V.; OSTROUMOV, S. A. Phytotoxic effect of heavy metal mixture on macrophytes. *Russian Journal of General Chemistry*, v. 88, n. 13, p. 2879–2883, 2018. DOI: 10.1134/S107036321813008X.

POMPÊO, M. *Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios brasileiros*. São Paulo: Instituto de Biociências da USP, 2017.

PRASAD, M. N. V; STRZALKA, K. *Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants*. [S.l.]: Springer Science and Business Media, B.V., 2002.

PRESS, W. H. *et al.* *Numerical recipes in C: The art of scientific computing*. 2. ed. New York, U.S.A: [s.n.], 1993. v. 16.

QUADRA, G. R. *et al.* Far-reaching cytogenotoxic effects of mine waste from the Fundão dam disaster in Brazil. *Chemosphere*, v. 215, p. 753–757, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.10.104.

RAHMAN, I. M. M.; HASEGAWA, H. *Water stress*. Croatia: InTech, 2012.

RAI, U. N. *et al.* Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: Removal of heavy metals. *Ecological Engineering*, v. 5, n. 1, p. 5–12, 1995. DOI: 10.1016/0925-8574(95)00011-7.

REECE, J. B. *et al.* *Biologia de Campbell*. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.

RENGASAMY, P. World salinization with emphasis on Australia. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 5, p. 1017–1023, 2006. DOI: 10.1093/jxb/erj108.

RESOLUÇÃO CONAMA Nº 357. *Classificação de corpos d'água e padrão de lançamento de efluentes*. Brasil: [s.n.]. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. , 2005

REZENDE, V. L. A mineração em Minas Gerais: uma análise de sua expansão e os impactos ambientais e sociais causados por décadas de exploração. *Revista Sociedade & Natureza*, v. 28, n. 3, p. 375–384, 2016.

RODRIGUES, A. C. D. *et al.* Mecanismos de respostas das plantas à poluição por metais pesados: possibilidade de uso de macrófitas para remediação de ambientes aquáticos contaminados. *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 1, p. 262–276, 2016. DOI: 10.5935/1984-6835.20160017. Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br>.

ROMERO-HERNÁNDEZ, J. A. *et al.* Tolerance and hyperaccumulation of a mixture of heavy metals (Cu, Pb, Hg, and Zn) by four aquatic macrophytes. *International Journal of Phytoremediation*, v. 19, n. 3, p. 239–245, 2017. DOI: 10.1080/15226514.2016.1207610.

ROUT, G.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. Aluminium toxicity in plants : a review. *Agronomie*, v. 21, n. 1, p. 3–21, 2001. Disponível em: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00886101/document>.

RUIZ, A. M. *Ricciocarpus natans* (Marchantiophyta), una hepatica acuatica en Mexico. *Contactos*, n. January, p. 67–70, 2008. Disponível em: <http://www2.izt.uam.mx/newpage/contactos/anterior/n70ne/ricciocarpus.pdf>.

RUPAINWAR, D. C. *et al.* Uptake of zinc from water and wastewater by a commonly available macrophyte. *International Journal of Environmental Studies*, v. 61, n. 4, p. 395–401, 2004. DOI: 10.1080/0020723042000211259.

SAMAD, R.; RASHID, P.; KARMOKER, J. Effects of aluminium toxicity on some biochemical components of rice (*Oryza sativa* L.). *Journal Biology Science*, v. 29, n. 1, p. 125–132, 2020.

SAMECKA-CYMERMAN, A.; KOLON, K.; KEMPERS, A. J. Heavy metals in aquatic bryophytes from the Ore Mountains (Germany). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 52, n. 3, p. 203–210, 2002. DOI: 10.1006/eesa.2002.2175.

SANKHLA, M. S. *et al.* Heavy metals contamination in water and their hazardous effect on human health - A Review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 5, n. 10, p. 759–766, 2016. DOI: 10.20546/ijcmas.2016.510.082.

SANTAMARIA, A. B. Manganese exposure, essentiality and toxicity. *Indian Journal of Medical Research*, v. 128, n. 4, p. 484–500, 2008.

SAPER, R. B.; RASH, R. Zinc: An essential micronutrient. *American Family Physician*, v. 79, n. 9, p. 768–772, 2009.

SAÚDE, M. da. Portaria 2914/2011. *Diário Oficial da União*, v. 2011, p. 1–16, 2011. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html.

SCHIAVONE, D. C. *Decomposição in situ de macrófitas aquáticas: influências das características de diferentes ecossistemas, atividade celulolítica e interação de macroinvertebrados*. 2019. 118 f. Tese de Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Ufscar - São Carlos/SP, 2019.

SCHMITT, M.; WATANABE, T.; JANSEN, S. The effects of aluminium on plant growth in a temperate and deciduous aluminium accumulating species. *AoB Plants*, v. 8, p. plw065, 2016. DOI: 10.1093/aobpla/plw065.

SEDRU. *Relatório: Avaliação dos efeitos e desdobramentos do rompimento da Barragem de Fundão em Mariana - MG. Secretaria de estado de desenvolvimento regional, politica urbana e gestão metropolitana*. Belo Horizonte: [s.n.], 2016.

SEGURA, F. R. *et al.* Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). *Environmental Pollution*, v. 218, p. 813–825, 2016. DOI: 10.1016/j.envpol.2016.08.005.

SHANAHAN, J. O. *et al.* Manganese and zinc toxicity thresholds for mountain and Geyer willow. *International Journal of Phytoremediation*, v. 9, n. 5, p. 437–452, 2007. DOI: 10.1080/15226510701606323.

SINGH, A.; KUMAR, C. S.; AGARWAL, A. Physiological study of combined heavy metal stress on *Hydrilla verticillata* (l.f.) Royle. *International Journal of Environmental Sciences*, v. 2, n. 4, p. 2234–2242, 2012. DOI: 10.6088/ijes.

SPARLING, D. W. *Basics of Ecotoxicology*. [S.l.]: Taylor & Francis Group, 2018.

STANKOVIĆ, J. D.; SABOVLJEVIĆ, A. D.; SABOVLJEVIĆ, M. S. Bryophytes and heavy metals: A review. *Acta Botanica Croatica*, v. 77, n. 2, p. 109–118, 2018. DOI: 10.2478/botcro-2018-0014.

SUL, R. o. *Desde 2000, o Brasil tem um rompimento de barragem a cada dois anos*. 2019. O Sul. Disponível em: <https://www.osul.com.br/desde-2000-o-brasil-tem-um-rompimento-de-barragem-a-cada-dois-anos-veja-lista/>. Acesso em: 2 fev. 2020.

SUT-LOHMANN, M.; JONCZAK, J.; RAAB, T. Phytofiltration of chosen metals by aquarium liverwort (*Monosoleum tenerum*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 138, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109844>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147651319311753?via%3Dihub>.

SUZUKI, Y. *et al.* Accumulation of arsenic and copper by bryophytes growing in a aquatic environment near copper mine tailing. *Mine Water and the Environment*, v. 35, n. 3, p. 265–272, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10230-015-0335-7>.

SZYNKOWSKA, M. I.; PAWLACZYK, A.; MAĆKIEWICZ, E. Bioaccumulation and biomagnification of trace elements in the environment. In: SAEID, K. C. AND A. (Org.). *Recent Advances in Trace Elements*. [S.l.]: John Wiley & Sons Ltd, 2018. v. First Edit. p. 251–276.

TAIZ, L. *et al.* *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6. ed. [S.l.]: Artmed, 2017. v. 6 ed.

TANHAN, P. *et al.* Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere*, v. 68, n. 2, p. 323–329, 2007. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.12.064.

TCHOUNWOU, P. B. *et al.* Heavy metals toxicity and the environment. *Experientia supplementum*, v. 101, p. 133–164, 2012. DOI: 10.1007/978-3-7643-8340-4_6.

TESSLER, M. *et al.* Diversity and distribution of stream bryophytes: does pH matter? *Freshwater Science*, v. 33, n. 3, p. 778–787, 2014. DOI: 10.1086/676996.

THOMAZ, S. M.; CUNHA, E. R. da. The role of macrophytes in habitat structuring in aquatic ecosystems: methods of measurement, causes and consequences on animal assemblages' composition and biodiversity. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 22, n. 02, p. 218–236, 2010. DOI: 10.4322/actalb.02202011.

THOMPSON, F. *et al.* Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. *Science of the Total Environment*, v. 705, p. 135914, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135914>.

THORNTON, F. C.; SCHAEDELE, M.; RAYNAL, D. J. Effect of aluminum on the growth of sugar maple in solution culture. *Canadian Journal of Forest Research*, v. 16, p. 892–896, 1986.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de Textos, 2008.

UPADHYAY, A. K.; SINGH, N. K.; RAI, U. N. Comparative metal accumulation potential of *Potamogeton pectinatus* L. and *Potamogeton crispus* L.: Role of enzymatic and non-enzymatic antioxidants in tolerance and detoxification of metals. *Aquatic Botany*, v. 117, p. 27–32, 2014. DOI: 10.1016/j.aquabot.2014.04.003.

VASHISHTA, B. R.; SINHA, A. K.; KUMAR, A. Marchantiales - Ricciaceae: *Riccia*. *Botany for Degree Students Bryophyta*. [S.l.]: S Chand & Company, 2011. p. 517.

VÁSQUEZ, C. *et al.* Bryophyte communities along a tropical urban river respond to heavy metal and arsenic pollution. *Water (Switzerland)*, v. 11, n. 4, p. 2–12, 2019. DOI: 10.3390/w11040813.

WAGNER, G. J. Content and vacuole/extravacuole distribution of neutral sugars, free amino acids, and anthocyanin in protoplasts. *Plant Physiology*, v. 64, n. 1, p. 88–93, 1979. DOI: 10.1104/pp.64.1.88.

WAGNER, S. *et al.* Altitudinal changes in temperature responses of net photosynthesis and dark respiration in tropical bryophytes. *Annals of Botany*, v. 111, n. 3, p. 455–465, 2013. DOI: 10.1093/aob/mcs267.

WAHSHA, M. *et al.* Toxicity assessment of contaminated soils from a mining area in Northeast Italy by using lipid peroxidation assay. *Journal of Geochemical Exploration*, v. 113, p. 112–117, 2012. DOI: 10.1016/j.gexplo.2011.09.008.

WATTS, R. G. *Global warming and the future of the Earth*. [S.l.]: Morgan & Claypool Publishers series, 2007. v. 1.

WELCH, R. M. Micronutrient Nutrition of Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v. 14, n. 1, p. 49–82, 1995. DOI: 10.1080/07352689509701922.

YAMAMOTO, Y.; KOBAYASHI, Y.; MATSUMOTO, H. Lipid peroxidation is an early symptom triggered by aluminum, but not the primary cause of elongation inhibition in Pea roots. *Plant Physiology*, v. 125, n. 1, p. 199–208, 2001. DOI: 10.1104/pp.125.1.199.

YANO, O. Catálogo das briófitas (antóceros, hepáticas e musgos) do estado do Espírito Santo, Brasil. *Pesquisas, Botânica*, v. 63, n. 1985, p. 55–140, 2012.

ZAGO, C. F. S. *et al.* Efeito de contaminantes emergentes no crescimento e reprodução de *Ricciocarpus natans* (L.) Corda. São Carlos, SP, Brasil: XXV Congresso de Iniciação Científica e X Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação, 2018.

ZAGO, C. F. S.; CUNHA-SANTINO, M. B.; BIANCHINI-JR, I. *Crescimento de Ricciocarpus natans em meio contaminado com calda bordolesa*. São Carlos, SP, Brasil: V Jornada de Gestão e Análise Ambiental. Anais da V Jornada de Gestão e Análise Ambiental, 2018.

ZORNOZA, P.; SÁNCHEZ-PARDO, B.; CARPENA, R. O. Interaction and accumulation of manganese and cadmium in the manganese accumulator *Lupinus albus*. *Journal of Plant Physiology*, v. 167, n. 13, p. 1027–1032, 2010. DOI: 10.1016/j.jplph.2010.02.011.

APÊNDICE A. Variáveis limnológicas dos bioensaios

Potencial hidrogeniônico (pH), condutividade elétrica (CE; $\mu\text{S cm}^{-1}$) e oxigênio dissolvido dos tratamentos controle, concentrações de metais individuais, metais combinados e na água contaminada por rejeito, nas temperaturas 25 °C e 27 °C.

Bioensaios	pH		CE ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		OD (mg L^{-1})	
	25 °C	27 °C	25 °C	27 °C	25 °C	27 °C
Controle	6,8 ± 0,6 ^a	6,8 ± 0,1 ^a	24,7 ± 2,1 ^a	15,7 ± 1,07 ^e	5,0 ± 0,3 ^a	5,2 ± 0,5 ^a
Al ₁	4,4 ± 0,5 ^b	4,4 ± 0,05 ^b	88,3 ± 22,6 ^b	83,6 ± 5,8 ^b	5,1 ± 0,3 ^a	5,7 ± 0,4 ^a
Al ₂	3,9 ± 0,3 ^b	4,1 ± 0,17 ^b	153,8 ± 28,9 ^c	142,8 ± 9,6 ^c	4,8 ± 0,7 ^a	5,3 ± 0,6 ^a
Al ₃	3,4 ± 0,01 ^c	3,7 ± 0,05 ^c	331,0 ± 26,6 ^d	314,0 ± 7,5 ^d	5,1 ± 0,6 ^a	5,2 ± 0,4 ^a
Mn ₁	5,2 ± 0,21 ^b	5,0 ± 0,01 ^b	24,4 ± 2,2 ^a	25,8 ± 4,3 ^a	4,7 ± 0,4 ^a	4,9 ± 0,3 ^a
Mn ₂	4,5 ± 0,01 ^b	4,4 ± 0,24 ^b	60,1 ± 1,7 ^b	61,5 ± 6,6 ^b	5,1 ± 0,4 ^a	4,9 ± 0,2 ^a
Mn ₃	4,0 ± 0,01 ^c	4,0 ± 0,01 ^c	141,9 ± 1,3 ^c	146,8 ± 11,2 ^c	5,0 ± 0,5 ^a	4,7 ± 0,1 ^a
Zn ₁	6,6 ± 0,4 ^a	7,0 ± 0,7 ^a	22,5 ± 0,7 ^a	30,0 ± 5,4 ^a	7,6 ± 0,6 ^b	7,3 ± 0,6 ^b
Zn ₂	4,8 ± 0,4 ^b	5,1 ± 0,06 ^b	41,38 ± 0,1 ^b	44,5 ± 2,6 ^b	6,7 ± 0,5 ^c	6,8 ± 0,1 ^b
Zn ₃	4,3 ± 0,3 ^b	4,4 ± 0,4 ^b	98,7 ± 0,6 ^c	120,0 ± 28,6 ^c	7,0 ± 0,1 ^c	6,8 ± 0,3 ^b
Rejeito	6,9 ± 0,5 ^a	6,7 ± 0,3 ^a	1724 ± 72,1 ^b	1676 ± 100 ^b	6,7 ± 0,2 ^b	7,2 ± 0,4 ^b
Al+Mn ₁	4,7 ± 0,2 ^b	4,7 ± 0,1 ^b	60,1 ± 13,6 ^b	58,3 ± 10,2 ^b	8,3 ± 0,4 ^b	8,1 ± 0,6 ^b
Al+Zn ₁	4,9 ± 0,3 ^b	4,9 ± 0,1 ^b	136,0 ± 6,2 ^c	109,4 ± 1,0 ^c	6,0 ± 0,3 ^b	8,2 ± 0,7 ^b
Mn+Zn ₁	5,1 ± 0,4 ^b	5,4 ± 0,1 ^c	47,0 ± 4,8 ^d	54,6 ± 3,0 ^b	8,8 ± 0,4 ^b	7,8 ± 0,8 ^b
Al+Mn+Zn ₁	4,3 ± 0,3 ^c	4,7 ± 0,1 ^b	102,7 ± 5,4 ^e	114,2 ± 2,8 ^d	9,3 ± 0,3 ^b	8,0 ± 0,8 ^b
Al+Mn ₂	3,8 ± 0,01 ^b	3,6 ± 0,01 ^b	223,4 ± 3,1 ^b	286,7 ± 3,1 ^b	10,5 ± 1,4 ^b	11,0 ± 2,1 ^b
Al+Zn ₂	3,8 ± 0,01 ^b	3,6 ± 0,01 ^b	203,1 ± 1,2 ^c	281,7 ± 10,6 ^b	11,0 ± 1,0 ^b	10,5 ± 0,7 ^b
Mn+Zn ₂	4,1 ± 0,01 ^b	3,9 ± 0,01 ^b	123,1 ± 0,1 ^d	169,8 ± 6,8 ^c	11,2 ± 2,2 ^b	10,1 ± 0,3 ^b
Al+Mn+Zn ₂	3,7 ± 0,01 ^b	3,6 ± 0,01 ^b	283,2 ± 3,1 ^e	335,8 ± 5,1 ^d	11,4 ± 2,0 ^b	9,6 ± 0,4 ^b
Al+Mn ₃	3,1 ± 0,01 ^b	3,1 ± 0,01 ^b	507,8 ± 15,3 ^b	497,7 ± 0,7 ^b	7,2 ± 0,3 ^a	7,7 ± 0,1 ^a
Al+Zn ₃	3,2 ± 0,01 ^b	3,2 ± 0,01 ^b	443,1 ± 10,0 ^c	435,4 ± 17,3 ^c	7,4 ± 0,1 ^a	7,6 ± 0,1 ^a
Mn+Zn ₃	3,4 ± 0,01 ^b	3,4 ± 0,01 ^b	271,1 ± 10,3 ^d	260,8 ± 2,8 ^d	6,8 ± 0,2 ^a	7,9 ± 0,1 ^a
Al+Mn+Zn ₃	3,0 ± 0,01 ^b	3,0 ± 0,01 ^b	596,6 ± 0,3 ^e	591,2 ± 2,5 ^e	8,7 ± 3,4 ^a	7,7 ± 0,1 ^a

Letras iguais indicam que as médias dos tratamentos não diferem estatisticamente dos controles ($\alpha = 0,05$)