

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

DANILO SINHEI IHA

**Bioacumulações de Cd, Ni, Pb e Zn durante os
crescimentos de *Salvinia minima* e *Lemna valdiviana***

**SÃO CARLOS
2014**

EM BRANCO

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

DANILO SINHEI IHA

**Bioacumulações de Cd, Ni, Pb e Zn durante os
crescimentos de *Salvinia minima* e *Lemna valdiviana***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de concentração Ecologia e Recursos Naturais.

Orientação: Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr.

**SÃO CARLOS
2014**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

I25bc

Iha, Danilo Sinhei.

Bioacumulações de Cd, Ni, Pb e Zn durante os
crescimentos de *Salvinia minima* e *Lemna valdiviana* /
Danilo Sinhei Iha. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
99 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2014.

1. Limnologia. 2. Macrófitas aquáticas. 3. Bioacumulação.
4. Fitorremediação. 5. Ecologia. I. Título.

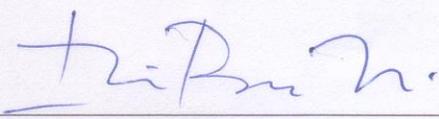
CDD: 574.52632 (20^a)

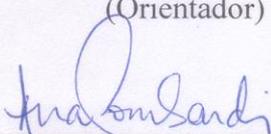
DANILO SINHEI IHA

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovada em 31 de julho de 2014

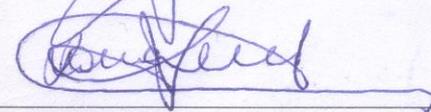
BANCA EXAMINADORA

Presidente 
Prof. Dr.. Irineu Bianchini Júnior
(Orientador)

1º Examinador 
Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
PPGERN/UFSCar

2º Examinador 
Prof. Dr. Sidinei Magela Thomaz
PPGERN/UFSCar

3º Examinador 
Prof. Dr. João Antonio Galbiatti
UNESP/Jaboticabal-SP

4º Examinador 
Prof. Dr. Donato Seiji Abe
IIE/São Carlos-SP

EM BRANCO

Dedico esta tese à minha família
À minha mãe Célia Laguardia Iha Chioda
Ao meu pai Antonio Sinsuke Iha
À minha irmã Liriane Laguardia Iha
Ao meu irmão Jonathan Willian da Silva Iha

EM BRANCO

AGRADECIMENTOS

Este trabalho, mais que uma obra do autor, resulta de uma conspiração de pessoas amigas que ouvem, apoiam, abastecem de ideias e contribuem de mil maneiras para o sucesso daquele que a escreve. Se este trabalho é obra de um autor, um autor é o resultado de muitas influências e de muitas mentes. Por essa razão, é justo lembrar, reconhecer e agradecer as pessoas e instituições a seguir citadas, que de alguma forma e em algum momento contribuíram para a realização desta pesquisa.

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Irineu Bianchini Jr. e à Universidade Federal de São Carlos, que através do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais forneceram suporte intelectual e material para a realização deste trabalho. Ao CNPq, pela bolsa de estudo concedida (projeto n. 556092/2010-4; processo n. 144436/2010-8). À FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa, sem o qual, o desenvolvimento deste em tempo hábil seria impossível (processo n. 2010/15728-1). À empresa “Zincagem e Cromação São Carlos” por disponibilizar amostras de seu efluente.

À Tatiana Priscila Justino que esteve comigo neste período e tornou a minha vida mais colorida, cheia de vida e alegrias. Aos meus avós, Adelina e Leri; minhas tias, Lídia, Irene, Ivanice, Seila e Teresinha; aos meus tios, Eduardo, Paulo e Luciano; à todos os meus primos e primas; ao Fábio Chioda, a Telma e Rafael Stink.

Ao Prof. Dr. João Antônio Galbiatti e ao Prof. Dr. José Galizia Tundisi que me incentivaram e apoiaram em diversos momentos da minha vida. À Profa Dra. Marcela B. Cunha-Santino.

Aos meus amigos, sem os quais a vida seria muito difícil, Juliana Cordeiro, Douglas Paixão Assado, Francine Venturini, Rubens Tabile, Joice, Érick, Rafael Marini, Márcio, Natalia Aike, Gabriela, Claudinei, Matheus Picolino, Jack Peixe, Karen, Paulo Tato, Cátia, Regina, Arnaldo e Zilmara.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Bioensaios e Modelagem Matemática, Argos, Brayan, Flávia, Fernanda Foca, Ieda, Mari e Marcel.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta me auxiliaram a desenvolver este projeto de doutorado o meu muito obrigado.

Resumo

Os metais são dispersos com facilidade nos ambientes e podem ser bioconcentrados nos tecidos de diversos organismos causando riscos à saúde e à estabilidade do ecossistema aquático, mesmo em baixas concentrações. Diversos trabalhos têm avaliado o uso de plantas para fitorremediar contaminações ambientais causadas por metais, uma vez que elas têm elevada capacidade de adsorver e acumular esses elementos. Neste trabalho foram avaliados o crescimento e a fitorremediação de *Salvinia minima* e de *Lemna valdiviana* cultivadas em diferentes concentrações de Cd, Pb, Ni e Zn. Os crescimentos foram determinados através das medidas das áreas foliares por imagens fotográficas. Os cultivos foram realizados em sistema de fluxo contínuo (tempo de residência = 2 dias), em condições controladas de temperatura (23°C) e fotoperíodo (12/12h; intensidade de radiação: $4,31 \times 10^{-3} \mu\text{mol seg}^{-1} \text{cm}^{-2}$). As concentrações selecionadas foram 0,003 0,030 0,300 e 0,600 mg L⁻¹ de Cd; 0,020 0,200 e 0,400 mg L⁻¹ de Ni; 0,01 0,10 e 1,00 mg L⁻¹ de Pb e 0,10 1,00 10,0 100,0 e 1.000,0 mg L⁻¹ de Zn. A seleção dos metais baseou-se na dificuldade de remoção utilizando métodos convencionais e a seleção das concentrações baseou-se nos valores que são tóxicos para seres humanos e nos valores máximos permitidos pela legislação brasileira (BRASIL, 2011) para o lançamento de efluentes. Não foram observados crescimentos de *S. minima* em concentrações de 0,300 mg L⁻¹ de Cd e 10,0 mg L⁻¹ de Zn. *L. valdiviana* não apresentou crescimentos quando cultivadas em concentrações de 0,600 mg L⁻¹ de Cd; 0,10 e 1,00 mg L⁻¹ de Pb e em concentrações maiores que 100,0 mg L⁻¹ de Zn. Os indivíduos de *S. minima* bioacumularam no máximo 0,803 mg g⁻¹ de Cd; 0,677 mg g⁻¹ de Ni; 1,786 mg g⁻¹ de Pb e 10,464 mg g⁻¹ de Zn. *L. valdiviana* bioacumulou no máximo 1,15 mg g⁻¹ de Cd; 0,045 mg g⁻¹ de Ni e 62,465 mg g⁻¹ de Zn. Os teores de metais nos tecidos das plantas aumentaram e os coeficientes de crescimento diminuíram quando cultivadas em concentrações progressivamente aumentadas de Cd, Pb e Ni. Conclui-se que, dependendo da concentração, as duas espécies de macrófitas podem ser utilizadas para fitorremediar efluentes com metais e que *S. minima* é mais eficiente na remoção de Ni, Pb e Zn e *L. valdiviana* na remoção de Cd. As concentrações de Cd e Ni permitidas pela legislação brasileira para o lançamento de efluentes são tóxicas para as duas espécies de macrófitas e a concentração permitida de Pb é tóxica para *Lemna valdiviana*.

Abstract

Metals are dispersed easily in environments and are bioconcentrated in tissues of many organisms causing risks to the health and stability of aquatic ecosystems even at low concentrations. The use of plants in phytoremediation has been evaluated in order to mitigate environmental contamination since it has large capacity to adsorb and/or accumulate metals. This study evaluated the growth and phytoremediation of *Salvinia minima* and *Lemna valdiviana* grown in different concentrations of Cd, Pb, Ni and Zn. The growths were determined through measurements of leaf area by photographic images. The cultures were performed in a continuous flow (residence time = 2 days), under controlled temperature (23 °C) and photoperiod (12/12h; radiation intensity: $4.31 \times 10^{-3} \mu\text{mol sec}^{-1} \text{cm}^{-2}$). The selected concentrations were 0.003 0.030 0.300 and 0.600 mg L⁻¹ Cd; 0.020 0.200 and 0.400 mg L⁻¹ Ni; 0.01 0.10 and 1.00 mg L⁻¹ Pb and 0.10 1.00 10.0 100.0 and 1,000.0 mg L⁻¹ Zn. The metals selection derived from the difficulty of its removal by conventional methods, and the selection of concentrations was based on values toxic to humans and on the maximum values allowed by Brazilian legislation for effluent discharge. None *S. minima* growth in concentrations of 0.300 mg L⁻¹ Cd and 10.0 mg L⁻¹ Zn were observed. *L. valdiviana* showed no growth when cultured at concentrations of 0.600 mg L⁻¹ Cd; 0.10 and 1.00 mg L⁻¹ Pb; and greater than 100.0 mg L⁻¹ Zn. Individuals of *S. minima* bioaccumulated maximum 0.803 mg g⁻¹ Cd; 0.677 mg g⁻¹ Ni; 1.786 mg g⁻¹ Pb and 10.464 mg g⁻¹ Zn. *L. valdiviana* bioaccumulated maximum 1.15 mg g⁻¹ de Cd; 0.045 mg g⁻¹ de Ni e 62.465 mg g⁻¹ de Zn. The metals content in plant tissues increased and the growth coefficients decreased when progressively increased the Cd, Pb and Ni concentrations. We conclude that, depending on the concentration, the two species of macrophytes can be used to phytoremediate effluents with metals and *S. minima* is more efficient on Ni, Pb and Zn removal and *L. valdiviana* on Cd removal. The Cd and Ni concentrations allowed by Brazilian law were toxic for both species and the allowed Pb concentration were toxic for *Lemna valdiviana*.

Lista de ilustrações

Figura 1 - Solubilidades de metais na presença de hidróxido e sulfeto (fonte: ECKENFELDER, 2000).....	4
Figura 2 – Diagrama esquemático da disposição dos recipientes de cultivo dentro da incubadora.....	16
Figura 3 - Disposição dos recipientes de cultivos (dentro da incubadora), da bomba peristáltica (acima), dos tanques com meio de cultivo (à esquerda) e dos tanques com efluentes (dentro e a baixo da incubadora).	16
Figura 4 - Representação da curva da função sigmóide e sua derivada.....	17
Figura 5 – Médias das áreas foliares (\pm DP) e ajustes das curvas de crescimento de <i>S. minima</i> e <i>L. valdiviana</i> cultivadas em 15% de solução Hoagland-Arnon sem adição de metais (tratamentos controle).	25
Figura 6 - Crescimentos de <i>S. minima</i> (\pm DP) cultivada em diferentes concentrações de Cd. .	28
Figura 7 - Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de <i>S. minima</i> cultivadas em diferentes concentrações de Cd.....	29
Figura 8 – Ajuste da curva exponencial às variações dos coeficientes de crescimento (\pm DP) de <i>S. minima</i> em função da concentração de Cd no meio de cultivo (eixo das abscissas em escala logarítmica).	30
Figura 9 - Taxa de crescimento diário (Crd) de <i>S. minima</i> em função da área do tanque coberta pela macrófita (%) de acordo com a concentração de Cd na solução.	30
Figura 10 - Teores de Cd em <i>S. minima</i> (\pm DP) em função da concentração desse metal no cultivo.....	31
Figura 11 - Teores de Cd nos tecidos de <i>S. minima</i> (\pm DP) em função das concentrações do metal na solução (eixo das abscissas em escala logarítmica).	32
Figura 12- Áreas foliares de <i>L. valdiviana</i> (\pm DP) cultivadas em diferentes concentrações de Cd.....	35
Figura 13- Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de <i>L. valdiviana</i> , quando cultivadas em diferentes concentrações de Cd.....	36
Figura 14 - Ajuste da curva exponencial às variações dos coeficientes de crescimento (\pm DP) de <i>L. valdiviana</i> em função da concentração de Cd no meio de cultivo (eixo das abscissas em escala logarítmica).	36
Figura 15 – Teores de Cd nos tecidos de <i>L. valdiviana</i> de acordo com a concentração de metal em que foi cultivada.....	37

Figura 16 - Teores de metal no tecido de <i>L. valdiviana</i> em função das concentrações de metal na solução.	38
Figura 17 – Crescimentos de <i>S. minima</i> (\pm DP) cultivada em diferentes concentrações de Pb.	42
Figura 18 – Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de <i>S. minima</i> cultivadas em diferentes concentrações de Pb.	42
Figura 19 – Teores de Pb em <i>S. minima</i> (\pm DP) em função da concentração do metal na solução de cultivo.	44
Figura 20 - Teores de Pb em <i>S. minima</i> (\pm DP) em função da concentração desse metal no cultivo.	44
Figura 21 - Taxa diária de crescimento de <i>S. minima</i> em função da área do tanque coberta pela macrófita de acordo com a concentração de Pb na solução.	45
Figura 22 – Crescimentos de <i>S. minima</i> (\pm DP) em diferentes concentrações de Ni.	50
Figura 23 – Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de <i>S. minima</i> cultivadas em diferentes concentrações de Ni.	50
Figura 24- Teores de Ni em <i>S. minima</i> (\pm DP) em função das concentrações desse metal no cultivo.	51
Figura 25 - Taxa diária de crescimento de <i>S. minima</i> em função da área do tanque coberta pela macrófita de acordo com as concentrações de Ni na solução.	52
Figura 26- Áreas foliares de <i>L. valdiviana</i> (\pm DP) cultivadas em diferentes concentrações de Ni.	54
Figura 27 - Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de <i>L. valdiviana</i> , quando cultivadas em diferentes concentrações de Ni.	55
Figura 28 – Teores de Ni nos tecidos de <i>L. valdiviana</i> em função das concentrações de metal no meio de cultivo.	56
Figura 29 - Crescimentos de <i>S. minima</i> (\pm DP) em diferentes concentrações de zinco.	59
Figura 30 – Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de <i>S. minima</i> , quando cultivadas em diferentes concentrações de Zn.	60
Figura 31 - Teores de Zn em <i>S. minima</i> (\pm DP) em função das concentrações de Zn na solução de cultivo.	61
Figura 32 – Teores de Zn em <i>S. minima</i> (\pm DP) em função das concentrações deste metal no meio de cultivo (eixo das abscissas em escala logarítmica).	61
Figura 33 – Taxa diária de crescimento de <i>S. minima</i> em função da área do tanque coberta pela macrófita de acordo com as concentrações de Zn na solução.	63

Figura 34 - Crescimentos de <i>L. valdiviana</i> (\pm DP) cultivadas em diferentes concentrações de zinco.....	65
Figura 35 - Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de <i>L. valdiviana</i> em função de diferentes concentrações de Zn.....	65
Figura 36 – Taxa diária de crescimento de <i>L. valdiviana</i> cultivada em diferentes concentrações de Zn em função da área ocupada (%).	66
Figura 37 – Teores de Zn nos tecidos de <i>L. valdiviana</i> em função das concentrações de metal na solução de cultivo.....	67
Figura 38 – Coeficientes de crescimento relativo (\pm DP) de <i>S. minima</i> em função das concentrações de metais no meio.....	69
Figura 39 – Coeficientes de crescimento relativo (\pm DP) de <i>L. valdiviana</i> em função das concentrações de metais no meio.....	73
Figura 40 – Crescimento de <i>Salvinia minima</i> cultivadas em efluente de galvanoplastia.	77
Figura 41 - Plataforma fotográfica.....	95
Figura 42 – Determinação da área foliar de <i>S. minima</i> com papel milimetrado em baixo do recipiente.....	96
Figura 43 – Correlação entre área foliar e massa seca de <i>S. minima</i>	97
Figura 44 - Correlação entre área foliar e massa seca de <i>L. valdiviana</i>	97
Figura 45 - Coeficientes de crescimento de <i>S. minima</i> (rm) em função das diluições do meio Hoagland-Arnon.....	99

EM BRANCO

Lista de tabelas

Tabela 1 – Concentrações de elementos em 15% de solução Hoagland-Arnon.....	14
Tabela 2 – Concentração de metais, condutividade e pH das soluções utilizadas.....	22
Tabela 3 – Teores de metais nos tecidos de <i>S. minima</i> e <i>L. valdiviana</i> cultivadas em solução Hoagland-Arnon 15% sem adições de metais.....	26
Tabela 4 – Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Cd no efluente do tanque de cultivo (mg L^{-1}).....	34
Tabela 5 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Cd no efluente dos tanques de cultivo com <i>L. valdiviana</i> (mg L^{-1}).....	39
Tabela 6 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Pb no efluente dos tanques de cultivo com <i>S. minima</i> (mg L^{-1}).....	46
Tabela 7 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Ni no efluente dos tanques de cultivo com <i>S. minima</i> (mg L^{-1}).....	53
Tabela 8 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Ni no efluente dos tanques de cultivo com <i>L. valdiviana</i> (mg L^{-1}).....	57
Tabela 9 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Zn no efluente dos tanques de cultivo com <i>S. minima</i> (mg L^{-1}).....	64
Tabela 10 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Zn no efluente dos tanques de cultivo com <i>L. valdiviana</i> (mg L^{-1}).....	68
Tabela 11 – Valores do coeficiente de crescimento (r_m), teor (R), taxa máxima de remoção de metais (T_x), área mín. necessária (A) e fator de bioacumulação (BCF) da <i>S. minima</i> de acordo com as concentrações de metais na solução.....	70
Tabela 12 - Valores do coeficiente de crescimento (r_m), teor (R), taxa máxima de remoção de metais (T_x), área mín. necessária (A) e fator de bioacumulação (BCF) da <i>L. valdiviana</i> de acordo com as concentrações de metais na solução.....	74
Tabela 13 – Teor de metais nos tecidos de <i>S. minima</i> após 40 dias de cultivo em solução controle (tecido-controle) e com efluente diluído (tecido-diluído).....	78
Tabela 14 – Concentrações de metais nos efluentes dos experimentos e porcentagens de remoção dos metais em relação às concentrações iniciais de metais.....	79

Lista de abreviaturas e siglas

- a – área ocupada pela macrófita (cm^2)
- A – área total disponível (cm^2)
- BCF – fator de bioacumulação
- C – concentração de metal na solução de cultivo (mg L^{-1})
- Crd – taxa de crescimento ($\text{cm}^2 \text{ dia}^{-1}$)
- D – coeficiente de decréscimo de rm (C^{-1})
- DP – desvio padrão
- IC – carbono inorgânico (mg L^{-1})
- K – valor teórico da área máxima ocupada pela macrófita (cm^2)
- MF – massa fresca
- MS – massa seca
- p – probabilidade
- R – teor de metal no tecido da macrófita (mg g^{-1})
- R² – coeficiente de determinação
- rm – coeficiente de crescimento (dia^{-1})
- rm_{controle} – coeficiente de crescimento do tratamento controle (dia^{-1})
- R_{máx} – teor máximo de metal no tecido da macrófita (mg g^{-1})
- S – área ocupada por 1g de macrófita (cm^2)
- TC – carbono total (mg L^{-1})
- TOC – carbono orgânico total (mg L^{-1})
- Txa – taxa de remoção de metais (mg dia^{-1})

Sumário

1. Introdução	1
1.1 Enunciado do problema	1
1.2 Revisão bibliográfica	4
1.2.1 Principais formas de remoção de metais de efluentes	4
1.2.2 Fitorremediação por macrófitas aquáticas	5
1.3 Metais e seus riscos à saúde	7
1.3.1 Cádmio	7
1.3.2 Chumbo	8
1.3.3 Níquel	9
1.3.4 Zinco	10
1.4 Objetivos	12
2. Desenvolvimento	13
2.1 MATERIAIS E MÉTODOS	13
2.1.1 Seleção e coleta das macrófitas	13
2.1.2 Avaliação do crescimento	14
2.1.3 Meio de cultivo	14
2.1.4 Concentrações de metais	15
2.1.5 Fatores abióticos dos cultivos	15
2.1.6 Modelagem matemática	17
2.1.7 Cultivo de <i>S. minima</i> visando à remoção de metais de efluente de galvanoplastia	21
2.1.8 Disposição final dos resíduos	23
2.2 Resultados e Discussão	24
2.2.1 Tratamento Controle	24
2.2.2 Tratamento com Cádmio	27

2.2.3	Tratamento com Chumbo	41
2.2.4	Tratamento com Níquel	49
2.2.5	Tratamento com Zinco	58
2.2.6	Comparações entre as toxicidades dos metais	69
2.2.7	Cultivo de <i>S. minima</i> visando à remoção de metais de efluente de galvanoplastia	77
2.3	Considerações finais.....	81
3.	Conclusões.....	83
4.	Referências bibliográficas	84
5.	Anexos	94
5.1	Avaliação do crescimento por imagens fotográficas.....	94
5.2	Melhor concentração do meio de cultivo	98

1. Introdução

1.1 Enunciado do problema

O termo poluição pode ser definido como alterações nas condições naturais de um sistema, tanto por entrada de energia ou substâncias (ART, 2001), de origem antrópica, em que ocorre a degradação das condições naturais desse sistema, de forma que se torne prejudicial à fauna, flora ou a saúde do Homem (DAJOZ, 1983).

Entre os principais elementos que podem causar riscos à saúde humana e aos ecossistemas estão os metais. Os metais possuem características de se dispersarem amplamente nos ambientes e se acumularem seletivamente em tecidos vegetais e animais, apresentando potencial tóxico mesmo em baixos níveis de exposição. As vias de exposição aos metais são através do ar, do contato com a pele e da ingestão de alimentos e água, sendo que, a principal forma de exposição é através da ingestão (WHO, 2007).

Nas últimas décadas, observaram-se aumentos das concentrações de metais em diversas áreas e uma das origens da contaminação da água são os efluentes industriais, domésticos e agropecuários (HUANG et al., 2005; SALT et al., 1995; WOOLHOUSE, 1983). No Brasil e na maioria dos países em desenvolvimento, a maior parte do esgoto é lançada sem tratamento prévio nos cursos d'água (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

Entre as principais ações para minimizar os impactos negativos que os recursos hídricos brasileiro vêm sofrendo está a implantação de estações de tratamento de esgoto. Essas devem ser planejadas para devolver a água utilizada pela população nas mesmas condições em que foi retirada do ambiente. Atualmente, a legislação brasileira (BRASIL, 2011) exige que as estações de tratamento de esgoto (ETE) mantenham as concentrações de metais dos efluentes abaixo dos valores máximos permitidos em resolução e assim estejam aptos a serem devolvidos ao ambiente.

Para que concentrações baixas de metais sejam obtidas na estação de tratamento de esgoto é comum o uso das seguintes técnicas químicas: precipitação comum, precipitação forçada, troca de íons e adsorção. Os processos de precipitação, que envolvem adição de diversos elementos químicos, geralmente são executados na fase secundária do tratamento de esgotos (ECKENFELDER, 2000).

Entre as técnicas biológicas para remoção de metais, o uso de plantas (fitorremediação) tem se apresentado como uma alternativa promissora (MOSHIRI, 1993). Quando as variáveis

abióticas, como a concentração de metais dissolvidos, encontram-se acima ou abaixo dos limites de tolerância para uma determinada espécie, impedem-na de alcançar plenamente seus potenciais bióticos, diminuindo as suas taxas de crescimento (ODUM, 2012). Conhecer tais fatores condicionantes é de extrema relevância em estudos sobre produção primária de macrófitas aquáticas. Em condições próximas aos limites de tolerância, esses vegetais podem realizar o processo fotossintético apenas o suficiente para sobrevivência (GOPAL, 1990).

As remoções de metais através de *wetlands* (pântanos) e lagoas de cultivo geralmente acontecem no tratamento terciário do esgoto, nesta fase ocorre remoção significativa de diversos elementos (SPERLING; CHERNICHARO, 2005). Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm comprovado as eficiências das macrófitas aquáticas no tratamento de efluentes (CASABIANCA, 1995; ENNABILI; ATER; RADOUX, 1998; FARAHBAKHSHAZAD; MORRISON; SALATI FILHO, 2000; HENRY-SILVA, 2001; KARPISCAK et al., 1996; MOSHIRI, 1993). Apesar de existirem diversos estudos sobre a utilização de macrófitas aquáticas como fitorremediadoras em estações de tratamento de esgoto, poucos consideraram o modelo matemático de crescimento das plantas diante de diferentes concentrações de metais e outros fatores abióticos, como radiação luminosa, temperatura e disponibilidade de nutrientes. Também não foram encontrados trabalhos que relatam a liberação de exsudados como resposta da macrófita a concentrações tóxicas de metais. Alguns estudos (JONES, 1998; MUCHA et al., 2005) afirmam que exsudados de diferentes espécies de macrófitas (e.g. *Juncus maritimus*) diminuem a dissolução de metais como o Cd, Pb, Ni e Zn e, portanto, afetam a dispersão destes no ambiente.

Modelos de crescimento de plantas são representações matemáticas de processos fisiológicos associados ao metabolismo das plantas (BEST, 1990). Em geral, eles contêm elementos descritivos e de previsão. Os elementos descritivos usualmente são equações descrevendo um sistema existente e com base nessas equações é possível a previsão de resultados e suas extrapolações. O grau com que as macrófitas influenciam os sistemas aquáticos é proporcional à biomassa, depende da espécie e de fatores físicos e químicos do ambiente (BIANCHINI JR. et al., 2010). Desse modo, os modelos têm se constituído em importantes ferramentas para a compreensão de vários processos específicos de ecossistemas aquáticos e, principalmente, para a elaboração de prognósticos sobre o comportamento desses sistemas frente ao desenvolvimento e manutenção de plantas aquáticas (THOMAZ; BINI, 2003).

Diante do exposto evidencia-se a importância de estudos que abordem o desenvolvimento de macrófitas, com o intuito de utilizá-las como extratoras de metais, e que contemplem as variáveis bióticas e abióticas. A partir destes dados podem ser desenvolvidos modelos matemáticos que auxiliem gestores de estações de tratamento de esgoto a identificarem qual a melhor espécie e quando estas devem ser utilizadas como ferramenta para a redução da concentração de metais de efluentes líquidos.

Os procedimentos adotados neste trabalho assemelham-se à situação real de uma estação de tratamento de efluentes na qual o sistema é mantido em fluxo contínuo, passando por lagoas de estabilização e sedimentação (última fase do tratamento), que eventualmente poderiam ser utilizadas como *wetlands* para aumentar a eficiência e reduzir custos do sistema de tratamento de esgoto. Além disso, trás informações sobre as variações dos coeficientes de crescimento destes organismos de acordo com a concentração de metais no meio, dados importantes para manejar corretamente as macrófitas visando aumentar a eficiência no tratamento de efluentes contaminados por metais.

1.2 Revisão bibliográfica

1.2.1 Principais formas de remoção de metais de efluentes

Em estações de tratamento de esgoto a precipitação química é a técnica mais utilizada para a remoção de metais. Geralmente eles são precipitados com hidróxidos até atingir o pH de solubilidade mínimo que varia para cada metal, como mostra a Figura 1. Os metais também podem ser precipitados utilizando sulfeto e em alguns casos carbonato (ECKENFELDER, 2000).

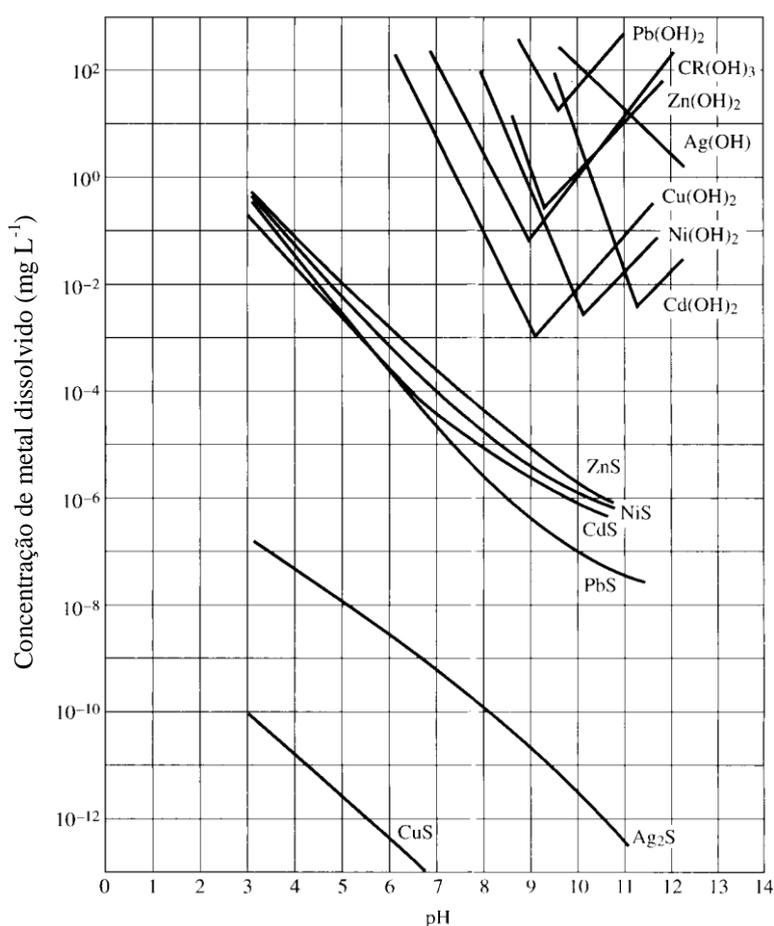


Figura 1 - Solubilidades de metais na presença de hidróxido e sulfeto (fonte: ECKENFELDER, 2000).

Observando a Figura 1, nota-se que a técnica que utiliza sulfeto é mais eficaz na remoção de metais e que, utilizando esta técnica, a solubilidade dos metais diminui com o aumento do pH. Os metais que atingem o ideal de precipitação em pH mais altos são os mais difíceis e mais caros de serem removidos do sistema, pois exigem maiores quantidades de reagentes. Entre os metais que apresentam menor eficiência, utilizando a técnica do sulfeto, estão o chumbo, cádmio, níquel e zinco (ECKENFELDER, 2000).

1.2.2 Fitorremediação por macrófitas aquáticas

Macrófitas aquáticas são plantas e suas partes fotossintéticas ativas estão permanentemente ou por alguns meses do ano submersas ou flutuantes na superfície da água (COOK et al., 1974). Esse termo, macrófitas aquáticas, refere-se às formas macroscópicas de vegetação aquática, englobando macroalgas, algumas espécies de musgos, pteridófitas e angiospermas (WETZEL, 2001). Com exceção das macroalgas, estes vegetais são originários de ambientes terrestres, se adaptaram e se especializaram ao ambiente aquático, portanto, possuem plasticidade de estruturas e de morfologias em relação às condições ambientais a que estão sujeitas, sendo classificadas em cinco grupos ecológicos: as emergentes (emersas), as com folhas flutuantes, as flutuantes, as submersas fixas e submersas livres (ESTEVES, 1998). São importantes componentes dos ecossistemas aquáticos, pois fazem parte do primeiro nível trófico da cadeia alimentar, protegem as margens dos corpos d'água, retiram o excesso de substâncias tóxicas e elementos que tornam o ambiente eutrófico, retém o material carregado pela erosão dos ambientes terrestres, promovem heterogeneidade espacial e sazonal do ambiente contribuindo para a maior biodiversidade do sistema aquático (TUNDISI; TUNDISI, 2008).

Nas últimas décadas, diversos trabalhos têm discutido a eficiência das macrófitas aquáticas no tratamento de efluentes (CASABIANCA, 1995; ENNABILI; ATER; RADOUX, 1998; FARAHBAKHSHAZAD; MORRISON; SALATI FILHO, 2000; HENRY-SILVA, 2001; KARPISCAK et al., 1996), no biomonitoramento de áreas eutrofizadas (HENRY-SILVA; FERNANDO; CAMARGO, 2006; PETRUCIO; ESTEVES, 2000) e como bioindicadoras de ecossistemas degradados por metais e pesticidas (KLUMP et al., 2002).

Teores elevados de metais foram encontrados em algumas macrófitas aquáticas, indicando que esses organismos podem acumulá-los (JONES; EATON; HARDWICK, 2000; SAMECKA-CYMERMAN; KEMPERS, 2001). As raízes de diversas macrófitas, geralmente, constituem o principal órgão envolvido na absorção e, portanto, quase sempre, as maiores concentrações de metais são, também, encontradas nesta parte (GRANT et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2001).

O uso de plantas na extração de metais (fitorremediação) tem se apresentado como uma alternativa promissora na recuperação de ecossistemas aquáticos e terrestres degradados pelo acúmulo de diversas substâncias tóxicas (CHANEY et al., 1997; MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001; RASKIN; ENSLEY, 2000). A utilização desta técnica pode ser uma maneira de reduzir os impactos negativos ocasionados por atividades de produção de energia,

mineração, agropecuárias, aquicultura e indústrias (GENSEMER; PLAYLE, 1999; STOTTMEISTER et al., 2003).

THIÉBAUT et al. (2010) concluíram que *Elodea canadensis*, é uma boa alternativa para a fitorremediação de ecossistemas aquáticos degradados pelo acúmulo de Cr, Ni, Fe, Pb, Zn e Cu. *Azolla filiculoides* (Lam.), quando exposta a diferentes concentrações de cádmio, cobre, níquel e zinco foi capaz de absorver e concentrar estes metais (KAY; HALLER; GARRARD, 1984). Outra macrófita aquática, *Eichhornia crassipes* (Mart.), concentrou mais de 6 g kg⁻¹ de cádmio e chumbo, e mais de 8 g kg⁻¹ de cobre quando exposta em soluções com concentrações de 5 mg L⁻¹ destes metais (SELA; GARTY; TEL-OR, 1989).

ZHU et al. (1999) também usando *Eichhornia crassipes* para o tratamento de água contaminada com 10 mg L⁻¹ de cobre observaram a retirada desse metal da água e a presença de 130 mg kg⁻¹ de cobre nas folhas e de 2.800 mg kg⁻¹ nas raízes das plantas. *Lemna minor*, outra espécie flutuante, removeu 76% de chumbo e 82% de níquel de soluções aquosas com 10 e 5 mg L⁻¹ destes metais, respectivamente (WANG; CUI; DONG, 2002). Em outros estudos, a espécie flutuante *Pistia stratiotes*, apresentou taxas altas de colonização, reprodução, crescimento e grande capacidade de remover metais da coluna d'água (AXTELL; STERNBERG; CLAUSSEN, 2003; CARDWELL; HAWKER; GREENWAY, 2002; DIRILGEN; DOĞAN, 2002; KLUMP et al., 2002; MAINE; DUARTE; SUÑÉ, 2001; MIRETZKY; SARALEGUI; CIRELLI, 2004).

1.3 Metais e seus riscos à saúde

Os metais constituem um grupo de elementos poluidores que apresentam ampla dispersão ambiental e têm sido extraídos e utilizados há milênios. São potencialmente tóxicos mesmo em níveis baixos de exposição, pois alguns são acumulados seletivamente nos órgãos de diversos animais e plantas. Mesmo aqueles essenciais à vida têm potencial de tornarem-se nocivos em níveis muito elevados de exposição, um princípio básico da toxicologia - "a dose faz o veneno". Um reflexo dos riscos à exposição de metais é indicado pela Agência Norte Americana de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (ATSDR). Esta agência desenvolveu um ranking das substâncias orgânicas e inorgânicas que mais ameaçam a saúde humana de acordo com a sua prevalência e severidade de sua toxicidade. De acordo com o ranking de 2011 o primeiro, segundo, terceiro e sétimo colocados na lista de substâncias que mais ameaçam a saúde são os metais: arsênio, chumbo, mercúrio e cádmio, respectivamente (ATSDR, 2011).

1.3.1 Cádmio

O cádmio é o sétimo colocado na lista da ATSDR que apresenta maior risco a saúde humana e o terceiro metal mais difícil para remoção em uma ETE usando sulfeto e o segundo usando hidróxido (ATSDR, 2011; ECKENFELDER, 2000). As principais fontes antrópicas de cádmio incluem a produção de metais não ferrosos, a queima de combustíveis fósseis, a incineração de resíduos e a produção de ferro, aço e cimento (WHO, 2007).

Os rins e os ossos são os órgãos alvos em relação à exposição. Os principais efeitos crônicos devido ao Cd incluem aumento da excreção de proteínas de baixo peso molecular na urina (como resultado de danos às células tubulares proximais) e aumento no risco de osteoporose e câncer de pulmão. A margem de segurança entre a ingestão diária de cádmio e o consumo que podem resultar em efeitos nocivos é muito estreita. A Organização Mundial da Saúde recomenda o valor máximo de $3 \mu\text{g L}^{-1}$ de cádmio para água potável (WHO, 2008). No Brasil a concentração máxima de cádmio permitida para o lançamento de efluentes de estações de tratamento de esgoto é $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL, 2011).

A alimentação é a principal forma de exposição ao cádmio. O cádmio é acumulado nos solos e em bacias hidrográficas sob certas condições (e.g. pH, precipitação pluviométrica, composição química do solo, atividades agrícolas), aumentando o risco de exposição futura por alimentos devido a biomagnificação. Tendo em vista a estreita margem de segurança,

todos os esforços devem ser feitos para reduzir as concentrações de cádmio no ambiente (WHO, 2007).

1.3.2 Chumbo

O chumbo é um elemento neurotóxico bem conhecido. Danos ao desenvolvimento neural de crianças é o seu efeito mais crítico. Em geral, a ingestão de chumbo através de alimentos e da água são as principais rotas de exposição em adultos (GUSTAVSSON; GERHARDSSON, 2005). Acumula-se no esqueleto, e sua mobilização a partir dos ossos durante a gravidez e lactação provoca a exposição do feto e da criança amamentada (WHO, 2007).

As principais fontes de emissões antropogênicas de chumbo incluem a queima de combustíveis fósseis, a produção de metais não ferrosos e a produção de ferro e aço (PACYNA; PACYNA, 2001). Esse elemento é o segundo colocado na lista da ATSDR de 2011 e, portanto, apresenta grande risco a saúde humana (ATSDR, 2011). O chumbo é também o quarto metal mais difícil de remover de efluentes contaminados quando se utiliza métodos químicos convencionais, o que, conseqüentemente, aumenta também seu custo de remoção (ECKENFELDER, 2000).

No que diz respeito à água potável, a contaminação de reservatórios por chumbo é de grande importância. Essa contaminação pode ocorrer, por exemplo, de descargas industriais ou de escoamentos de rodovias. Além disso, a água potável pode ser contaminada por canos de chumbo, tubos de cobre soldados com chumbo, ou através de qualquer articulação ou parte do sistema de distribuição e coleta de água que contenham chumbo. A água doce, em particular, tem grande potencial para a dissolução de chumbo. O nível de contaminação por chumbo, portanto, pode depender do tempo durante o qual a água permanece na tubulação (WHO, 2007).

O valor máximo de chumbo permitido para águas potáveis no Brasil e na Europa é $5 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2004; EU, 1998). Entretanto, a Organização Mundial da Saúde recomenda que o valor máximo seja $3 \mu\text{g L}^{-1}$ (WHO, 2008). No Brasil a concentração máxima permitida de chumbo para o lançamento de efluentes é $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, de acordo com a resolução CONAMA 430/11 (BRASIL, 2011).

1.3.3 Níquel

O níquel puro é um metal duro, branco prateado, que possui propriedades que o tornam muito conveniente para combinar com outros metais para formar misturas chamadas ligas (XAVIER, 2010). Essas ligas são usadas para fazer moedas, joias e na indústria de confecção de peças como válvulas e trocadores de calor. Há também os compostos de níquel que são combinados com diversos elementos, como cloro, enxofre e oxigênio; muitos desses compostos são solúveis em água e tem cor verde característica; eles podem ser utilizados para revestimentos, coloração de cerâmicas, produção de algumas baterias e como catalisadores de reações químicas (ATSDR, 2005a).

O níquel é o segundo colocado entre os metais de menor eficiência em remoção utilizando a técnica do sulfeto e o terceiro utilizando o hidróxido (ECKENFELDER, 2000). Ocupa a 53ª colocação na lista das substâncias tóxicas de maior risco à saúde humana (ATSDR, 2011).

As concentrações de níquel nas águas dos rios e lagos são normalmente baixas, os corpos d'água apresentam concentração média geralmente inferior a $10 \mu\text{g L}^{-1}$. Exposições à níveis mais elevados de níquel na água potável podem ocorrer perto de indústrias que processam ou usam níquel. Efluentes de esgotos domésticos são as principais fontes antropogênicas da contaminação de rios por níquel (NRIAGU; PACYNA, 1988). Nos EUA, as concentrações de níquel nos efluentes de 203 estações de tratamento de esgoto municipais (9461 observações) variaram de 2 a $111.400 \mu\text{g L}^{-1}$, o valor médio foi de aproximadamente $300 \mu\text{g L}^{-1}$ (MINEAR et al., 1981). A partir de um levantamento de efluentes de estações de tratamento de esgotos, em Estocolmo, foi determinado que os esgotos de residências e de empresas são responsáveis por 29% da contaminação de córregos por níquel. Outros 31% de níquel nos córregos são adicionados na estação de tratamento de esgoto através do uso de produtos químicos para o tratamento da água (SÖRME; LAGERKVIST, 2002).

Em geral, a principal fonte de exposição ao níquel na população é através de alimentos contaminados; em média, são consumidos cerca de $170 \mu\text{g}$ de níquel diariamente por pessoa; o níquel é absorvido principalmente pelo estômago e intestino através da alimentação; acumula-se principalmente nos rins e é eliminado através da urina; doenças de pulmão em cães e ratos e no estômago, sangue, fígado, rins e no sistema imune de ratos e camundongos, bem como em sua reprodução e desenvolvimento têm sido relatadas como alguns dos efeitos à alta exposição de níquel através da ingestão de alimentos e água (ATSDR, 2011). Outros estudos demonstraram que ocorreram reduções significativas no peso corporal e do peso do

fígado de ratos expostos a $75 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de sulfato de níquel em suas dietas; observou-se também redução do peso corporal, aumento do peso do fígado, e efeitos renais e pulmonares adversos em cães para doses de $62,5 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (ATSDR, 2005a). Diminuição da mobilidade e do número de espermatozoides de ratos e anormalidades foram observadas em $1,9 \text{ mg Ni kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (PANDEY; SRIVASTAVA, 2000; PANDEY et al., 1999) e diminuição da fertilidade foi observada em estudos em que machos e fêmeas de ratos foram expostos a $3,6 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ de cloreto de níquel (KÄKELÄ; KÄKELÄ; HYVÄRINEN, 1999). No Brasil a concentração máxima permitida de níquel em efluentes de estações de tratamento de esgoto é 2 mg L^{-1} de acordo com a resolução CONAMA 430/11 (BRASIL, 2011).

1.3.4 Zinco

O zinco é um dos elementos mais comuns na crosta da Terra; é encontrado no ar, solo e água e está presente em todos os alimentos. O zinco metálico é utilizado em galvanizações e quando misturado com outros metais formam ligas, como o latão e o bronze. Este metal entra no ambiente como resultado de processos naturais e principalmente através de atividades humanas; níveis altos de zinco no ambiente são resultado de atividades como a mineração, purificação de zinco, chumbo, cádmio, produção de aço, combustão do carvão e queima de resíduos (ATSDR, 2005b).

Utilizando a técnica de remoção química por sulfeto o zinco é o que apresenta menor eficiência de remoção (ECKENFELDER, 2000). No *ranking* das substâncias tóxicas de maior risco à saúde humana, elaborado pela ATSDR, o zinco ocupa a 74ª colocação (ATSDR, 2011).

Os efluentes de indústrias químicas que utilizam zinco e outros metais, esgotos domésticos, e a lixiviação de solos contendo zinco podem contaminar os rios. O uso de lodo de esgotos e fertilizantes contribui para aumento dos níveis de zinco no solo (ATSDR, 2005b). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) recomenda que os níveis de água potável para o zinco não sejam superiores a $0,7 \text{ mg L}^{-1}$ (EPA, 2012). No Brasil a concentração de zinco em efluentes de esgotos não deve ser superior a 5 mg L^{-1} (BRASIL, 2011).

Em ratos, após a exposição em longo prazo de doses baixas de compostos de zinco ($0,5-2,0 \text{ mg kg}^{-1} \text{ dia}^{-1} \text{ Zn}$) observou-se diminuição na capacidade de absorção de cobre da dieta; o sintoma mais evidente decorrente da diminuição dos níveis de cobre no organismo é a anemia, manifestando-se pela diminuição do número de eritrócitos; altas doses de administração de zinco também resultam em reduções no número e na atividade dos leucócitos de diversas espécies (BROUN et al., 1990; GYORFFY; CHAN, 1992; PATTERSON; WINKELMANN; PERRY, 1985; PRASAD, 1984; RAMADURAI et al., 1993; SUMMERFIELD; STEINBERG; GONZALEZ, 1992).

1.4 Objetivos

Considerando os efeitos tóxicos dos metais, a dificuldade no tratamento químico de águas residuais e as concentrações máximas permitidas pela legislação brasileira para o lançamento de efluentes de estações de tratamento de esgotos, nesse estudo, avaliou-se alternativas biológicas para o tratamento de água contaminada com metais, pressupondo-se, como hipótese principal, que o cultivo de *S. minima* e *L. valdiviana* em efluentes contaminados diminuem as emissões de Cd, Pb, Ni e Zn através dos processos de bioacumulação e fitorremediação. Nesse contexto este estudo visou:

i) determinar o crescimento de duas espécies de macrófitas aquáticas frente a diferentes concentrações de metais (Cd, Pb, Ni e Zn) em condições experimentais controladas de radiação luminosa, temperatura e disponibilidade de nutrientes;

ii) selecionar e relacionar um modelo matemático de crescimento de macrófitas com as eficiências na remoção de metais em diversas fases de crescimento e a partir destes, estabelecer diretrizes que auxiliem gestores de estações de tratamento de esgoto a identificar qual a melhor espécie e quando estas devem ser utilizadas como ferramenta para a redução da concentração de metais de efluentes líquidos;

iii) avaliar se os estresses causados pela presença dos elementos Cd, Pb, Ni e Zn e pelos aumentos das suas concentrações geram alterações nas taxas de exsudados (i.e. metabólitos excretados) das macrófitas aquáticas e nas eficiências de remoção dos elementos;

iv) avaliar o cultivo de *S. minima* como ferramenta adicional para remover metais de efluentes industriais.

2. Desenvolvimento

2.1 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Seleção e coleta das macrófitas

Para o desenvolvimento dos experimentos de crescimento, foram selecionadas duas espécies de macrófitas (*Salvinia minima* e *Lemna valdiviana*) baseadas nas suas capacidades de acumular metais e na adequação de suas estruturas à avaliação das áreas foliares e ao tamanho do tanque de cultivo.

Lemna valdiviana Phil. é uma monocotiledônea aquática, flutuante e de porte pequeno. Possui crescimento rápido e é amplamente distribuída em diversas regiões por se adaptar facilmente as condições aquáticas, mesmo que adversas e desempenham um importante papel na bioacumulação de metais (GALIULIN et al., 2001; HU et al., 2010; INGH, 2005; ZAYED; GOWTHAMAN; TERRY, 1998). Neste estudo foram identificadas utilizando a chave taxonômica de PROCTOR (2005) e POTT; CERVI (1999).

Salvinia minima Baker (1886) é uma pteridófita aquática flutuante. Os ramos consistem de duas folhas flutuantes opostas, unidas por um caule central (rizoma); a terceira folha submersa é modificada, formando um sistema semelhante a uma raiz; os indivíduos podem se conectar por rizomas apicais; possui crescimento rápido e é encontrada em diversas partes do mundo (TRYON; TRYON, 1982). É uma planta que apresenta grande potencial para ser utilizada na remoção de metais de áreas contaminadas e alta capacidade para absorver cádmio e chumbo (ESPINOZA-QUIÑONES et al., 2005; ESTRELLA-GÓMEZ et al., 2009; NICHOLS; COUCH; AL-HAMDANI, 2000; OLGUÍN; HERNÁNDEZ; RAMOS, 2002; OLGUÍN et al., 2005; SANTOS, 2009, 2006). As plantas utilizadas neste estudo foram identificadas de acordo com POTT; POTT (2000).

No total, foram selecionados 720 indivíduos de *S. minima* e 9.600 de *L. valdiviana* de tamanho e estágios de desenvolvimento similares, coletados no Departamento de Botânica da UFSCar (21°59'17" S e 47°53'2" O; datum WGS84). Após coletados, os indivíduos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio (NaClO 0,5%) por 5 min. Para os estudos com *S. minima* 15 indivíduos (c. 33 cm²) foram colocados em cada recipiente de cultivo no dia inicial e para os estudos com *L. valdiviana* (c. 43 cm²) foram colocados 100 indivíduos. Doze tratamentos controles (sem adição de metal) foram conduzidos com *S. minima* (180 indivíduos) e 9 com *L. valdiviana* (900 indivíduos) durante o período experimental.

2.1.2 Avaliação do crescimento

Para determinar o crescimento dos indivíduos de *S. minima* e *L. valdiviana* as áreas foliares foram determinadas utilizando imagens fotográficas e o software Spring[®] (Anexo - 5.1). As relações entre as áreas foliares (cm²) e as massas secas (g) são descritas pelas seguintes equações:

$$\textit{Salvinia minima}: \quad \text{massa seca} = 0,001888 \times \textit{área foliar}$$

$$\textit{Lemna valdiviana}: \quad \text{massa seca} = 0,001704 \times \textit{área foliar}$$

2.1.3 Meio de cultivo

Foram realizados estudos preliminares para identificar a concentração do meio de cultivo Hoagland-Arnon (HOAGLAND; ARNON, 1950) que permitia um crescimento adequado das macrófitas (Anexo - 5.2). Com base nesses testes, utilizaram-se 15% da concentração de nutrientes do meio de cultivo, com pH ajustado para 6,5 utilizando soluções de hidróxido de sódio (NaOH 50%) ou ácido clorídrico (HCl 18%). As concentrações dos elementos da solução utilizada são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações de elementos em 15% de solução Hoagland-Arnon.

Elemento	mg L ⁻¹
Ca	30,040
Cl	0,039
Cu	0,003
Fe	0,021
H	10,596
K	35,155
Mg	7,278
Mn	0,076
Mo	0,001
N	31,491
Na	0,001
O	218,597
P	4,805
S	9,651
Zn	0,008

2.1.4 Concentrações de metais

Para avaliar os efeitos nos crescimentos e nos potenciais de bioacumulação e fitorremediação das macrófitas foram selecionados quatro metais: cádmio (Cd), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn). As diferentes concentrações de metais foram adicionadas ao meio de cultivo e os testes foram realizados com cada metal separadamente. Para cada concentração foram preparados 30 L de solução e acondicionados em tanques de polietileno de alta densidade.

Para preparar o meio com Cd foi utilizado o cloreto de cádmio pentahidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e os meios de cultivo possuíam as seguintes concentrações de Cd: 0,003; 0,030; 0,300 e 0,600 mg L^{-1} . Os meios de cultivo com Ni foram preparados utilizando $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e as concentrações de Ni no meio de cultivo foram: 0,020; 0,200 e 0,400 mg L^{-1} . O cloreto de chumbo (PbCl_2) foi utilizado para preparar os meios com Pb nas seguintes concentrações: 0,01; 0,10 e 1,00 mg L^{-1} . O último metal foi o Zn, as preparações utilizaram o sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e as concentrações de Zn no meio foram: 0,01; 0,10; 1,00; 10,00; 100,0 e 1.000,0 mg L^{-1} .

As seleções das concentrações mais baixas basearam-se na toxicidade do metal para humanos e nas concentrações máximas permitidas para água potável (WHO, 2008); as concentrações mais altas foram escolhidas baseando-se nos valores máximos permitidos pela legislação brasileira (resolução CONAMA n. 430/2011) para o lançamento de efluentes de estações tratamento de esgoto (BRASIL, 2011).

Para que a quantidade de Zn, presente normalmente na solução nutritiva Hoagland-Arnon, não interferisse nos experimentos que avaliaram o crescimento da macrófita cultivada com esse metal, apenas para os experimentos com Zn, o meio de cultivo Hoagland-Arnon foi preparado sem adição $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

2.1.5 Fatores abióticos dos cultivos

Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e o meio de cultivo foi bombeado do tanque principal para os recipientes de cultivo através de uma bomba peristáltica (MasterFlex, 07524-40, 12 canais) que permitiu que o abastecimento contínuo dos 12 recipientes de cultivo alocados no interior das câmaras de germinação (COLDLAB).

As plantas foram cultivadas em média por 55 dias em recipientes de polietileno (217 x 145 x 70 mm, $A = 314,65 \text{ cm}^2$), em condições controladas (20 °C, fotoperíodo: 12h e intensidade de radiação: $4,31 \times 10^{-3} \text{ } \mu\text{mol seg}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). A luz se distribuía uniformemente dentro

da incubadora. O sistema de cultivo foi mantido sob fluxo contínuo (volume: 1,0L; vazão: 0,35 mL min⁻¹; tempo de residência: 2 dias) através de bomba peristáltica (MasterFlex, 07524-40, 12 canais).

O diagrama esquemático apresentado na Figura 2 ilustra a disposição dos recipientes e dos tratamentos no interior da câmara de germinação. Os recipientes denominados por números (1 a 4) representam o número do tratamento e as letras (A, B e C) representam as repetições. Na Figura 3 é possível observar os recipientes no interior da câmara de germinação, a bomba peristáltica instalada em cima da incubadora, os tanques com estoques dos meios de cultivos localizados à esquerda da incubadora, os tanques que recebem os efluentes dos recipientes instalados na região inferior e a disposição das 4 lâmpadas fluorescentes (Ziron®, 20W, 6500K) instaladas na porta.

1.A	1.B	1.C	Tratamento 1
2.A	2.B	2.C	Tratamento 2
3.A	3.B	3.C	Tratamento 3
4.A	4.B	4.C	Tratamento 4

Figura 2 – Diagrama esquemático da disposição dos recipientes de cultivo dentro da incubadora.



Figura 3 - Disposição dos recipientes de cultivos (dentro da incubadora), da bomba peristáltica (acima), dos tanques com meio de cultivo (à esquerda) e dos tanques com efluentes (dentro e a baixo da incubadora).

2.1.6 Modelagem matemática

Os parâmetros das equações utilizadas neste estudo (crescimento logístico; função de decréscimo do coeficiente de crescimento em função da concentração de metais e teor de metal no tecido da planta em função da concentração de metal no meio) foram obtidos por regressões não lineares, calculados com o algoritmo iterativo de Levenberg–Marquardt (PRESS et al., 1993), utilizando o software Origin.

2.1.6.1 Avaliação do crescimento

Para avaliar as diferenças entre os valores médios das áreas foliares em função do tempo foi utilizado o Teste-t com nível de significância de 5% (ZAR, 2010). Para as determinações dos coeficientes de crescimento (rm), os valores das áreas foliares *versus* o tempo foram utilizados para ajustar as curvas de crescimento sigmóide (Eq. 1, Figura 4). Para avaliar as diferenças entre os coeficientes de crescimento foi empregado o Teste-t específico para comparação de coeficientes angulares (ZAR, 2010).

$$N = \frac{K}{1+e^{(i-rmt)}} \quad \text{Eq. 1,}$$

em que: N = área foliar (cm²); t = tempo (dia); K = área máxima de ocupação (cm²); i = constante de integração e rm = coeficiente de crescimento (dia⁻¹).

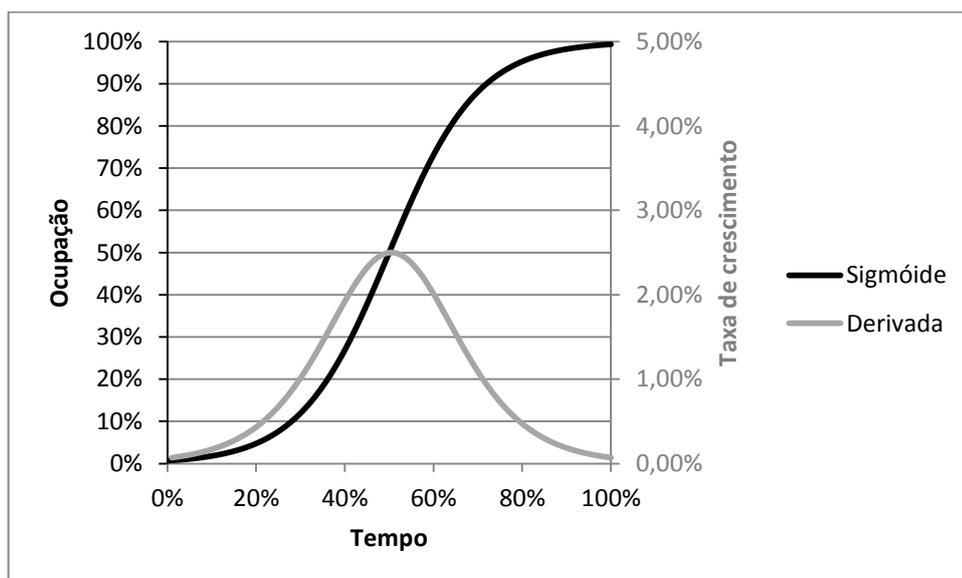


Figura 4 - Representação da curva da função sigmóide e sua derivada.

Na Figura 4, além da curva sigmóide, apresenta-se a sua derivada (taxas diárias de crescimento), a análise desta curva indica que os crescimentos das macrófitas são influenciados pela área máxima de ocupação. Observa-se que maior taxa de crescimento é atingida quando há ocupação de 50% da área disponível. Espera-se que quanto mais macrófitas maior a assimilação de metais em seus tecidos e, portanto, quanto maior a taxa de crescimento diária maior a capacidade de assimilação de metais pelas plantas e remoção de metais da solução.

Considera-se portanto que, visando à remoção de metais do sistema, a ocupação do tanque próxima a 50% proporciona maiores taxas diárias de crescimento e maiores taxas de assimilação ou remoção de metais. A derivada da curva sigmóide em função da área total coberta em porcentagem, adaptado de GUTIÉRREZ et al. (2001) e MAHUJCHARIYAWONG; IKEDA (2001), é expressa pela seguinte equação:

$$\text{Crd} = (\text{rma} - \text{rma}^2) \quad \text{Eq. 2,}$$

em que, Crd = taxa de crescimento diário relativo à área total do tanque (%); rm= coeficiente de crescimento (dia^{-1}); a= porcentagem da área do tanque ocupada.

2.1.6.2 Efeito da concentração de metal no crescimento

Para avaliar o efeito das concentrações de metais nos valores dos coeficientes de crescimento (rm) a curva de decaimento exponencial foi selecionada para ser ajustada aos dados, essa curva é expressa pela seguinte equação:

$$rm = rm_{\text{controle}} \times e^{-D \times C} \quad \text{Eq. 3,}$$

em que: rm = coeficiente de crescimento (dia^{-1}); C= concentração do metal no meio de cultivo (mg L^{-1}); rm_{controle} = coeficiente de crescimento da macrófita (dia^{-1}) quando cultivada em meio sem metal (C= 0); D= coeficiente de decréscimo de rm (C^{-1}).

Os gráficos correspondentes à Eq. 3 foram apresentados quando a probabilidade estatística dos dados estarem correlacionados ao acaso foi menor que 5% ($p < 0,05$, teste-F).

2.1.6.3 Remoção e assimilação de metais (fitorremediação)

Os cálculos das taxas de remoção de metais podem ser utilizados para determinar as eficiências fitorremediadoras de *S. minima* e de *L. valdiviana* em diversas fases de seus crescimentos em função das áreas dos tanques de cultivo, das densidades populacionais e das concentrações de metais na solução. É possível também estabelecer o melhor tamanho do tanque de cultivo e determinar a porcentagem da área coberta para remover determinada quantidade de metal do efluente líquido. A partir desses cálculos podem ser sugeridas diretrizes para identificar quando essas plantas podem ser utilizadas como ferramenta para reduzir as concentrações de metais em efluentes. A taxa de remoção de metais (mg dia^{-1}) é dada pela Eq. 4, adaptada da Eq. 2 de acordo com GUTIÉRREZ et al. (2001) e MAHUJCHARIYAWONG; IKEDA (2001):

$$Txa = \frac{R}{S} \times (rma - rma^2) \times A \quad \text{Eq. 4,}$$

em que, Txa = taxa de remoção de metais (mg dia^{-1}); R= concentração de metal presente na planta (mg g^{-1}); S = área (cm^2) ocupada por 1 g de macrófita (*S. minima*= 529,7 cm^2 e *L. valdiviana*= 586,92 cm^2); rm= coeficiente de crescimento (dia^{-1}); a= porcentagem da área do tanque coberta por *S. minima* (%); A = área máxima que pode ser ocupada (cm^2).

2.1.6.4 Teor de metais nas plantas

Ao final do período de cultivo as plantas foram retiradas das soluções, lavadas com água deionizada e secas em estufa (45 °C), até massa constante. Os materiais secos foram digeridos e posteriormente as análises dos teores de metais nas plantas foram realizadas. Considera-se os metais assimilados pela macrófita o adsorvido e o acumulado (que encontra-se na região intracelular ou intersticial). O método utilizado foi o de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, utilizando o equipamento ICP-OES, modelo Optima 8000 da marca Perkin Elmer[®] (ref. SMEWW 21 3030 E - ABNT, 1997). As concentrações de metais nos efluentes dos recipientes de cultivo também foram determinadas através do mesmo método e equipamento. As coletas para as determinações das concentrações de metais nos efluentes foram realizadas aproximadamente a cada 10 dias durante o período experimental.

Para avaliar a bioacumulação de metais no tecido da planta o fator de bioconcentração (BCF) foi calculado de acordo com a Eq. 5 (ZAYED; GOWTHAMAN; TERRY, 1998).

$$BCF = \frac{\text{concentração do tecido da planta (mg kg}^{-1}\text{)}}{\text{concentração inicial do elemento no meio de cultivo (mg L}^{-1}\text{)}} \quad \text{Eq. 5,}$$

Para estimar a quantidade de metal presente na planta de acordo com a concentração de metal no meio foi utilizada a Eq. 6 (MONOD, 1949).

$$R = R_K \frac{C}{C_1 + C} \quad \text{Eq. 6,}$$

em que, R = concentrações de metais presentes nas plantas (mg g⁻¹); C= concentrações de metais nas soluções de cultivo (mg L⁻¹); R_K = concentrações máximas de metais nas plantas (mg g⁻¹); C₁= concentrações de metais para 50% de R_K.

Os gráficos correspondentes à Eq. 6 foram apresentados quando a probabilidade estatística dos dados estarem correlacionados ao acaso foi menor que 5% (p<0,05, teste-F).

2.1.6.5 Concentração de carbono

Os efluentes dos recipientes de cultivo foram coletados por períodos de 7 dias e armazenados em tanques de 10 L de polietileno. Amostras destes tanques foram coletadas e as concentrações de carbono total (TC) e suas frações orgânicas (TOC) e inorgânicas (IC) foram determinadas por combustão controlada e detecção no infravermelho. O equipamento utilizado foi o TOC-L (Shimadzu[®]).

2.1.7 Cultivo de *S. minima* visando à remoção de metais de efluente de galvanoplastia

Coletou-se o efluente da indústria de galvanização “Zincagem e Cromação São Carlos” (São Carlos, SP). A amostra coletada foi utilizada para lavar peças de metal que passaram pelo processo de galvanização. Apesar da indústria possuir um sistema de tratamento da água residual, foi coletada amostra não tratada, ou seja, o efluente bruto. As características químicas do efluente (Tabela 2) foram avaliadas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, utilizando o equipamento ICP-OES, modelo Optima 8000 da marca Perkin Elmer[®] (ref. SMEWW 21 3030 E - ABNT, 1997).

Foram preparadas 4 soluções para o cultivo das macrófitas, as concentrações de metais de cada solução são apresentadas na Tabela 2 e foram preparados da seguinte forma:

1. Controle: 15% de solução Hoagland-Arnon.
2. Efluente Diluído: 20 mL do efluente bruto foram diluídos em 20 L de solução Hoagland 15%.
3. Efluente Tratado NaOH: Antes de utiliza-lo no cultivo o efluente bruto foi: 1º) misturado com carvão mineral e filtrado em papel filtro qualitativo; 2º) alcalinizado com NaOH (50%; m:v) (ponto final pH 9,0) e filtrado em papel filtro qualitativo; 3º) alcalinizado com NaOH (50%; m:v) (ponto final pH 11,0) e filtrado em papel filtro qualitativo; 4º) acidificado com ácido clorídrico até o pH 7,5 e filtrado em papel filtro qualitativo.
4. Efluente Tratado CaOH: Antes de utiliza-lo no cultivo o efluente bruto foi: 1º) misturado com carvão mineral e filtrado em papel filtro qualitativo; 2º) alcalinizado com CaOH (ponto final pH 9,0) e filtrado em papel filtro qualitativo; 3º) alcalinizado com CaOH (ponto final pH 11,0) e filtrado em papel filtro qualitativo; 4º) acidificado com gás carbônico até o pH 7,5 e filtrado em papel filtro qualitativo.

Selecionaram-se 60 indivíduos de *S. minima* de tamanho e estágio de desenvolvimentos parecidos. Estes indivíduos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio (0,5% por 5 min.) e separados em 4 grupos de 15 indivíduos (grupos 1, 2, 3 e 4). Cada grupo foi dividido em 3 recipientes com 5 indivíduos. O grupo 1 não foi exposto à metais (controle). O grupo 2 foi exposto ao efluente diluído, o grupo 3 à solução tratada com NaOH e o grupo 4 à solução tratada CaOH.

Tabela 2 – Concentração de metais, condutividade e pH das soluções utilizadas.

Parâmetro	Unidade	Efluente bruto	Tratado NaOH	Tratado CaOH	Diluído	Controle
Alumínio	mg.L ⁻¹	2,220	0,011		0,0022	
Antiônio	mg.L ⁻¹	0,378	<0,005		0,0004	
Arsênio	mg.L ⁻¹	0,040	<0,008		0,0000	
Bário	mg.L ⁻¹	0,130	0,088		0,0001	
Berílio	mg.L ⁻¹	<0,025				
Bismuto	mg.L ⁻¹	0,099	<0,025		0,0001	
Boro	mg.L ⁻¹	7,140	5,420		0,0071	
Cádmio	mg.L ⁻¹	0,006	<0,005		0,00001	
Cálcio	mg.L ⁻¹	23,370	26,710		30,0629	30,0395
Chumbo	mg.L ⁻¹	5,880	<0,008		0,0059	
Cobalto	mg.L ⁻¹	0,066	<0,008		0,0001	
Cobre	mg.L ⁻¹	11,900	7,290		0,0153	0,0034
Cromo	mg.L ⁻¹	22,220	<0,010		0,0222	
Estanho	mg.L ⁻¹	15,010	<0,025		0,0150	
Estrôncio	mg.L ⁻¹	0,142	0,163		0,0001	
Ferro	mg.L ⁻¹	224,700	0,098		0,2452	0,0205
Lítio	mg.L ⁻¹	<0,05				
Magnésio	mg.L ⁻¹	3,350	2,389		7,2808	7,2775
Manganês	mg.L ⁻¹	1,610	<0,011		0,0772	0,0756
Mercurio	mg.L ⁻¹	<0,0001				
Molibdênio	mg.L ⁻¹	0,042	<0,025		0,0012	0,0012
Níquel	mg.L ⁻¹	20,240	1,527		0,0202	
Prata	mg.L ⁻¹	0,125	0,048		0,0001	
Selênio	mg.L ⁻¹	<0,005				
Sódio	mg.L ⁻¹	246,100	740,000		0,2461	
Urânio	mg.L ⁻¹	<0,008				
Vanádio	mg.L ⁻¹	<0,05				
Zinco	mg.L ⁻¹	136,800	0,074		0,1443	0,0075
Condutividade	μS cm ⁻¹		6450	3190	372	300
pH			7,50	7,60	7,50	7,50
Carbono Total	mg.L ⁻¹	111,500	11,330	9,970	<1,000	<1,000
Carbono Inorgânico	mg.L ⁻¹	0,265	5,830	6,769	<1,000	<1,000
Carbono Orgânico	mg.L ⁻¹	111,300	5,501	3,201	<1,000	<1,000
Nitrogênio Total	mg.L ⁻¹	14,470	9,260	10,400	<1,000	31,491

As plantas foram cultivadas por 40 dias em recipientes de polietileno com volume de 1,0 L. As incubações foram mantidas em câmara de germinação (20°C, fotoperíodo: 12h e intensidade de radiação: $4,31 \times 10^{-3} \mu\text{mol seg}^{-1} \text{cm}^{-2}$). O sistema de cultivo foi mantido em fluxo contínuo (vazão: $0,35 \text{ mL min}^{-1}$; tempo de residência: 2 dias).

Os crescimentos das macrófitas foram determinados através das medidas das áreas foliares por imagens fotográficas e do software Spring®. Para a determinação do coeficiente de crescimento (rm) os valores das áreas foliares *versus* o tempo foram utilizados para ajustar a curva de crescimento sigmóide (Eq. 1).

Após 40 dias as plantas foram retiradas da solução, lavadas com água deionizada e secas em estufa (45°C), até massa constante. O material seco foi digerido e realizadas as análises dos teores de metais por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente, utilizando o equipamento ICP-OES, modelo Optima 8000 da marca Perkin Elmer®.

Também foram realizadas análises de metais dos efluentes do grupo controle e do grupo cultivado no efluente diluído após o período de 40 dias. Estas análises foram realizadas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente utilizando o equipamento ICP-OES, modelo Optima 8000 da marca Perkin Elmer®.

2.1.8 Disposição final dos resíduos

Nenhuma substância ou material potencialmente tóxico ao ambiente ou que ameaçasse a saúde humana foram dispostos de forma irregular. Foram gerados aproximadamente 5.000L de resíduos com metais durante o experimento. Estes resíduos foram tratados de acordo com os procedimentos exigidos pela Unidade de Gestão de Resíduos (UGR) da UFSCar. Os metais foram concentrados através da precipitação com hidróxidos de cálcio e sódio e metassilicato de sódio.

Todas as metodologias e atividades desenvolvidas neste estudo foram aprovados previamente pela Comissão de Ética Ambiental da Universidade Federal de São Carlos – CEA/UFSCar (Parecer 001/2011 de 28 de março de 2011).

2.2 Resultados e Discussão

2.2.1 Tratamento Controle

Para cada metal selecionado foram conduzidos (em triplicata) cultivos sem adição de metais (controle). No total, 12 cultivos para *S. minima* e 9 para *L. valdiviana* foram realizados durante o período experimental e os resultados são apresentados na Figura 5.

Em relação aos cultivos com *S. minima*, observou-se no grupo controle que a área média ocupada pelas plantas após 54 dias de cultivos foi $183 \pm 23 \text{ cm}^2$. Ajustando o modelo de crescimento sigmoidal (Eq. 1, Figura 5) aos dados do tratamento controle, obteve-se o valor médio do coeficiente de crescimento $rm = 0,0567 \pm 0,0100 \text{ dia}^{-1}$ (distribuição normal) e o valor médio da área máxima de ocupação (K) foi $225,50 \pm 61,20 \text{ cm}^2$ (72% da área total do tanque; $0,426 \pm 0,116 \text{ g MS}$). Os valores máximo e mínimo do rm de *S. minima* foram, respectivamente, 0,0998 e $0,0371 \text{ dia}^{-1}$. Para ajustar o modelo de crescimento sigmoidal aos valores das áreas foliares dos cultivos com adição de metais a área de ocupação máxima (K) do modelo foi fixada em $225,5 \text{ cm}^2$, já que este foi o valor de ocupação máximo teórico observado para o tratamento controle de *S. minima*.

Em relação aos cultivos com *L. valdiviana*, observou-se que a área foliar média ocupada pelas macrófitas no último dia amostral (46º dia) foi $259,50 \pm 13,07 \text{ cm}^2$. O ajuste do crescimento sigmoidal (Eq. 1) resultou em um valor médio de $rm = 0,1145 \pm 0,0059$ (distribuição normal) e o valor médio de ocupação máxima teórica (K) foi $286,14 \pm 5,23 \text{ cm}^2$ (91% da área total do tanque; $0,488 \pm 0,009 \text{ g MS}$). Os valores máximo e mínimo do rm de *L. valdiviana* foram, respectivamente, 0,1303 e $0,0984 \text{ dia}^{-1}$. Para os ajustes da Eq. 1 aos dados das áreas foliares de *L. valdiviana* quando cultivada com metais o valor de K do modelo foi fixado em 286 cm^2 , já que este foi o valor médio máximo teórico da área ocupada pelos indivíduos de *L. valdiviana*.

Quando comparados os coeficientes de crescimento com outras espécies de macrófitas (e.g. *Azolla filiculoides*, *Salvinia herzogii* e *Salvinia molesta*), observa-se que as duas espécies selecionadas estão entre as que apresentam o crescimento mais rápido (BIANCHINI JR. et al., 2010). Os valores dos coeficientes de crescimento calculados para as espécies selecionadas justificam a seleção destas espécies para a execução deste experimento, uma vez que, o crescimento rápido permite que o tempo experimental seja abreviado. Este fato também propicia incrementos de metais nos tecidos das macrófitas em períodos mais curtos, corroborando com o uso destas espécies para o tratamento de efluentes contaminados com

metais, pois espera-se uma taxa de remoção de metais maior. Além disso, por serem macrófitas aquáticas flutuantes tanto o manejo em laboratório quanto em estações de tratamento de esgotos pode ser realizado de maneira mais fácil e eficiente.

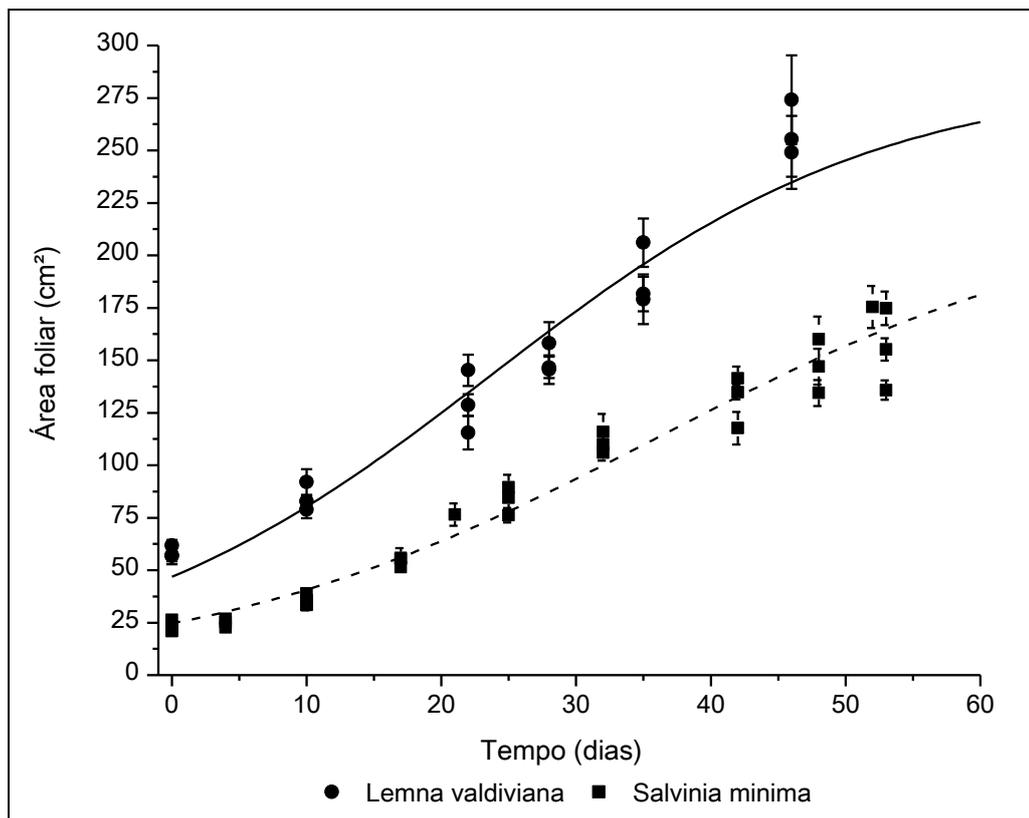


Figura 5 – Médias das áreas foliares (\pm DP) e ajustes das curvas de crescimento de *S. minima* e *L. valdiviana* cultivadas em 15% de solução Hoagland-Arnon sem adição de metais (tratamentos controle).

Na Tabela 3 são apresentados os teores de metais nos tecidos de *S. minima* e *L. valdiviana* após os períodos experimentais dos tratamentos controle. Em outro estudo os teores de Ni, Pb e Zn em *S. minima* coletadas no reservatório de Salto Grande no município de Americana-SP foram respectivamente 0,101; 0,00 e 0,250 mg g⁻¹ (MARTINS et al., 2003). Os valores de Ni e Zn observados neste estudo estão abaixo dos observados em amostras de *S. minima* do reservatório de Salto Grande, enquanto que o teor de Pb está acima. Estas diferenças provavelmente estão associadas a diferenças nos locais de coleta e ao meio de que foram originalmente retiradas. Não foram encontrados estudos que avaliaram concentrações de metais em *L. valdiviana*. Entretanto, outros estudos avaliaram concentrações de Ni e Zn para *Lemna aequinoctialis* quando estas macrófitas foram capazes de assimilar 0,203 mg g⁻¹ Ni e 0,010 mg g⁻¹Zn (PIO; SOUZA; SANTANA, 2013). No geral, as diferenças nas concentrações são associadas a diferenças específicas entre as espécies e aos locais onde as plantas foram coletadas.

Tabela 3 – Teores de metais nos tecidos de *S. minima* e *L. valdiviana* cultivadas em solução Hoagland-Arnon 15% sem adições de metais.

Espécie	Teor de metais do tratamento controle (mg g ⁻¹)			
	Cd	Ni	Pb	Zn
<i>Salvinia minima</i>	0,0000	0,0021	0,0028	0,1574
<i>Lemna valdiviana</i>	0,0001	0,0290	*ND	0,3200

*ND - Não determinado

2.2.2 Tratamento com Cádmio

O excesso de Cd interfere na síntese de compostos ricos em grupos tiol que complexam e impedem a sua ação tóxica; esse elemento provoca o decréscimo da fotossíntese, redução na absorção e no transporte de nutrientes, danos às membranas, distúrbios hormonais e alteração na atividade de várias enzimas resultando em eventual morte das plantas (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1990; OLIVEIRA et al., 2001). Na maioria dos casos, as inibições exercidas por Cd e Pb resultam da interação entre os metais e enzimas do grupos sulfídricos (-SH), os bloqueios destas enzimas inibem as atividades de mais de 100 enzimas; essas interações afetam negativamente a função dessas enzimas, pois alteram a estabilidade de sua estrutura terciária, além de afetar a absorção de nutrientes essenciais como N, K, entre outros (SEREGIN; IVANOV, 2001).

Em experimentos com *Lemna gibba* foram observadas degradações rápidas de clorofilas e aumento de prolina (o aminoácido prolina tem sua concentração aumentada no tecido da planta quando esta é submetida a estresses), quando cultivadas em concentrações de 0,001 a 0,10 mg L⁻¹ de Cd (MEGATELI; SEMSARI; COUDERCHET, 2009).

2.2.2.1 *Salvinia minima*

Na Figura 6 são apresentadas as variações temporais das áreas foliares de *S. minima* cultivadas em meio com diferentes concentrações de Cd e as curvas de crescimento ajustadas em função do tempo (Eq. 1). Não foi observado crescimento da macrófita na concentração de 0,300 mg L⁻¹ de Cd indicando que essa concentração afetou as atividades biológicas responsáveis pelo crescimento e reprodução desta macrófita. Como não ocorreu crescimento da macrófita em 0,300 mg L⁻¹ o tratamento com 0,600 mg L⁻¹ não foi realizado. Após 15 dias de cultivo, não foi observado crescimento significativo no cultivo em 0,030 mg L⁻¹ de Cd. A maior área ocupada pelas macrófitas cultivadas em 0,003 mg L⁻¹ de Cd foi no ultimo dia de cultivo (60), quando ocuparam 143,29 cm² (46%) do tanque.

Em outro estudo também foram encontrados efeitos negativos quando macrófitas foram expostas ao Cd (WOLFF et al., 2012). Após 5 dias de cultivo, indivíduos de *Salvinia auriculata* expostos à 0,562 e 1,124 mg L⁻¹ de Cd apresentaram danos nas folhas, como necrose e clorose, além de estômatos deformados e tricomas danificados; também foi observado menor número de rametes e diminuição da biomassa seca com o aumento da concentração de Cd na solução. Em nível ultraestrutural, as folhas expostas ao Cd apresentaram má formação dos cloroplastos e deterioração da parede celular. Todos os

sintomas de toxicidade foram diretamente proporcionais à concentração de Cd na solução (WOLFF et al., 2012).

Os crescimentos de *S. minima* cultivadas em 0,030 e 0,003 mg L⁻¹ foram mais rápidos nos primeiros dias de cultivo em relação ao controle. Entretanto, esses crescimentos não foram observados nos dias subsequentes. Apesar do crescimento inicial menor, ao final dos 60 dias de cultivo, as macrófitas do grupo controle ocuparam uma área maior do tanque em relação às áreas ocupadas pelos grupos cultivados com Cd.

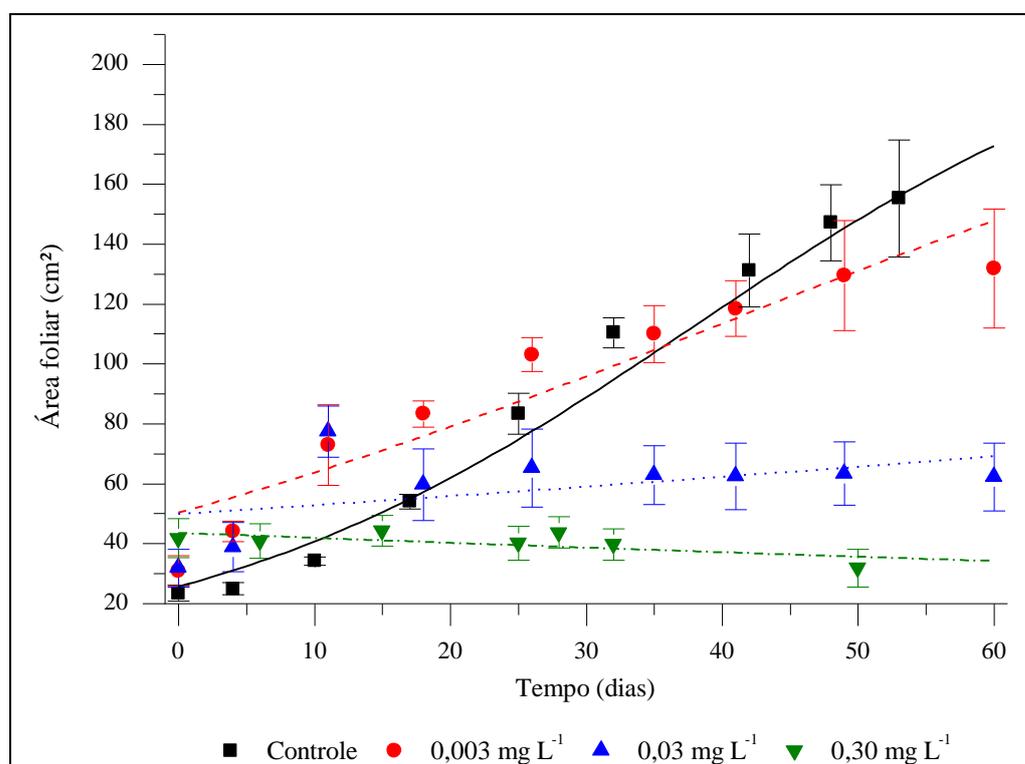


Figura 6 - Crescimentos de *S. minima* (\pm DP) cultivada em diferentes concentrações de Cd.

Na Figura 7 são apresentados os valores do coeficiente de crescimento (rm) de *S. minima* cultivadas em meio com Cd. Verifica-se que nos cultivos nos quais se adicionou Cd os rm foram menores em relação ao grupo controle. Além disso, ocorreu decréscimo dos valores de rm conforme aumentaram as concentrações de Cd. Quando cultivadas em 0,003 e 0,030 mg L⁻¹ de Cd, os valores de rm foram respectivamente $0,0257 \pm 0,0027$ e $0,0067 \pm 0,0031 \text{ dia}^{-1}$.

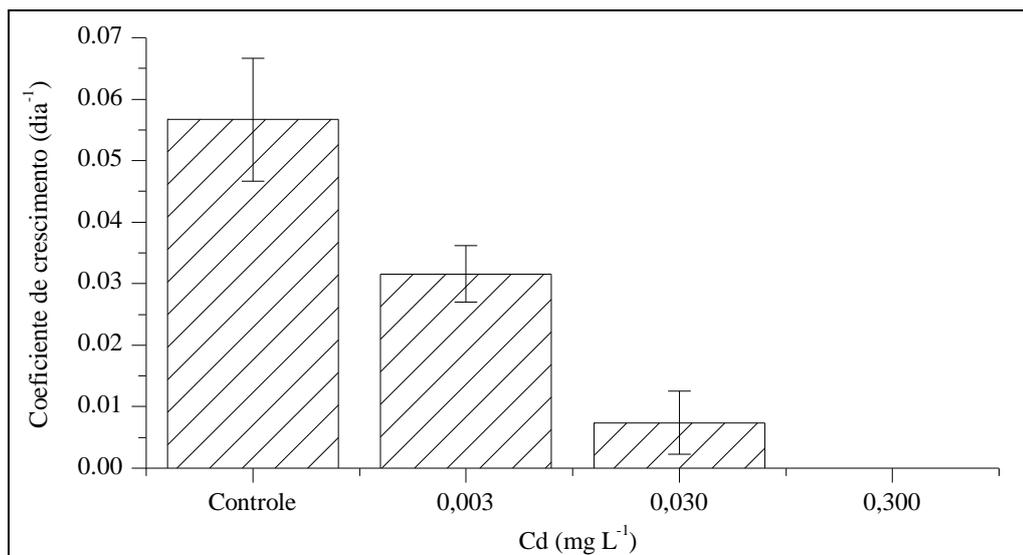


Figura 7 - Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de *S. minima* cultivadas em diferentes concentrações de Cd.

Na Figura 8 é apresentado o ajuste do decaimento do coeficiente de crescimento (rm) em função do incremento da concentração de Cd no meio de cultivo. Os parâmetros da Eq. 3 ajustados aos resultados deste trabalho foram: $D = 172,55 \pm 53,54$; $R^2 = 0,98$ ($rm_{\text{controle}} = 0,0567$; $N = 12$). Estes valores indicam que o modelo exponencial explicou os resultados observados e que existiu uma forte correlação ($p_{\text{teste-F}} = 0,01$) entre os dados e a curva da Eq. 3. Não foram encontrados trabalhos que utilizaram as mesmas equações de crescimento da área foliar e de decaimento exponencial do rm .

Na Figura 9 apresentam-se as taxas de crescimento por dia de *S. minima* quando cultivada em meio com Cd (Eq. 2). A taxa máxima de crescimento (Cr_d) de *S. minima* quando cultivada em $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ foi 0,65% da área total do tanque e a maior Cr_d quando cultivada em $0,030 \text{ mg L}^{-1}$ foi 0,18%.

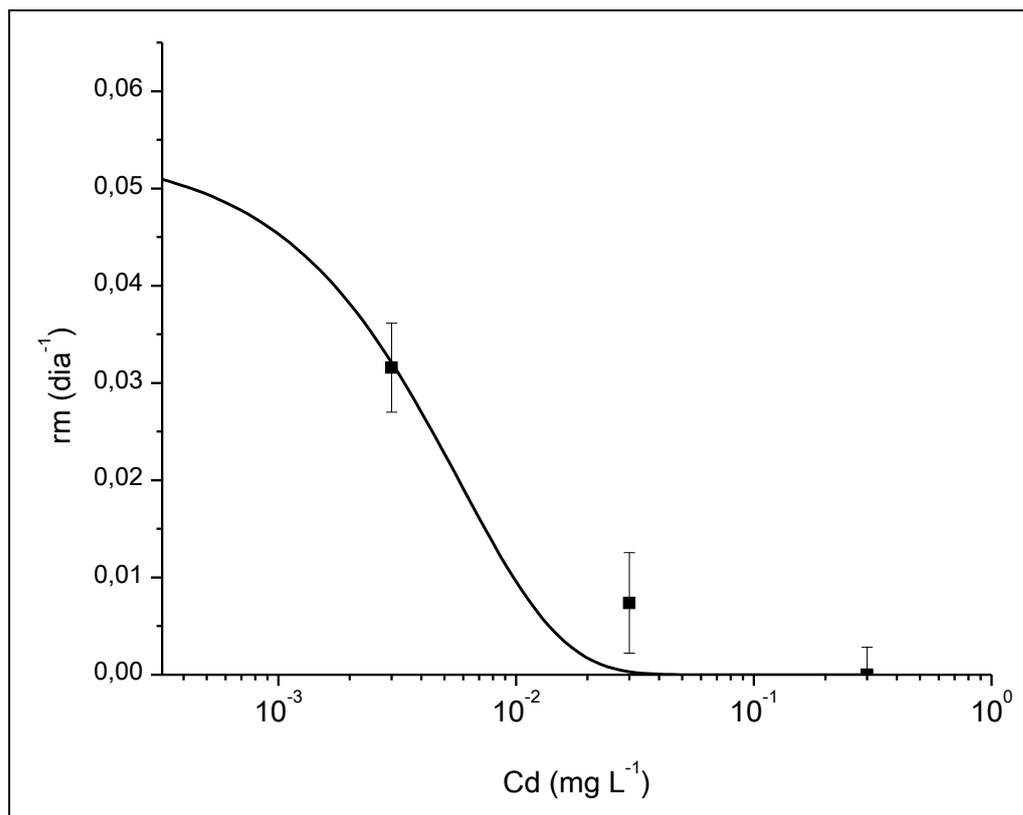


Figura 8 – Ajuste da curva exponencial às variações dos coeficientes de crescimento (\pm DP) de *S. minima* em função da concentração de Cd no meio de cultivo (eixo das abscissas em escala logarítmica).

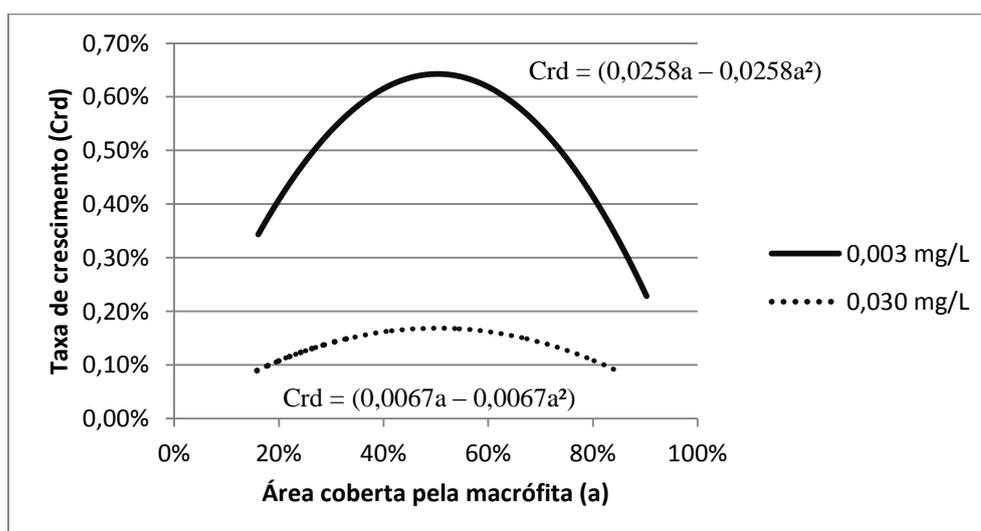


Figura 9 - Taxa de crescimento diário (Crd) de *S. minima* em função da área do tanque coberta pela macrófita (%) de acordo com a concentração de Cd na solução.

Na Figura 10, observa-se que houve aumentos no teores de Cd nos tecidos das plantas com o aumento da concentração deste metal na solução de cultivo. Apesar de não observado crescimento dos indivíduos cultivados em $0,300 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd, estes, foram os que apresentaram maiores teores desse metal ($0,803 \text{ mg g}^{-1}$). Resultados parecidos em relação ao aumento do teor de Cd nos tecidos de outras plantas como *Hordeum vulgare* foram observados por outros autores (SRIDHAR et al., 2007).

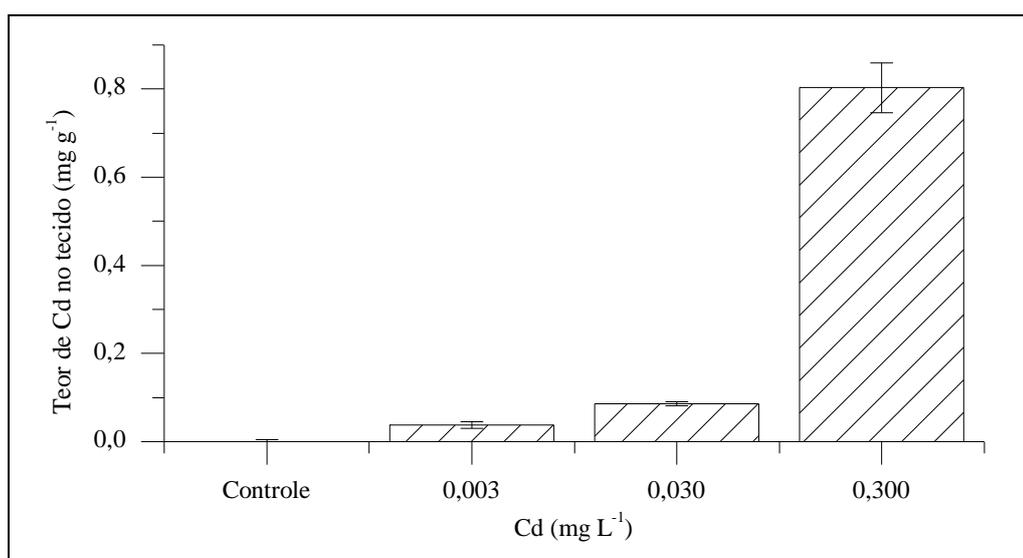


Figura 10 - Teores de Cd em *S. minima* (\pm DP) em função da concentração desse metal no cultivo.

As macrófitas cultivadas nas concentrações de $0,003$ e $0,030 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd foram capazes de assimilar respectivamente $0,0071 \pm 0,0014 \text{ mg}$ (7,88% do total de Cd que passou pelo recipiente em fluxo contínuo) e $0,0049 \pm 0,0002 \text{ mg}$ (0,54% do total de Cd). OLGUÍN; HERNÁNDEZ; RAMOS (2002) avaliando bioconcentrações em macrófitas observaram que *S. minima* cultivada por 5 dias em solução com $4,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd acumulou nos tecidos $10,930 \text{ mg g}^{-1}$ e obtiveram um $\text{BCF} = 2718$. O valor encontrado pelos autores é próximo ao calculado neste trabalho ($\text{BCF}_{0,300 \text{ mg L Cd}} = 2676$ e $\text{BCF}_{0,030 \text{ mg L Cd}} = 2876$). A maior taxa de remoção de Cd ($5,52 \mu\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) ocorreu quando a *S. minima* foi cultivada na menor concentração ($0,003 \text{ mg L}^{-1}$).

Com o aumento da concentração de Cd no meio de cultivo também ocorreu o aumento da concentração deste metal no tecido da planta. A curva da Eq. 6 (Figura 11) ajustada aos dados indica que o teor teórico máximo de Cd em *S. minima* (R_K) foi $7,052 \text{ mg g}^{-1}$ ($C_1 = 2,3353$; $R^2 = 0,9973$; $N = 12$; $p = 0,01$). Entretanto, são necessários outros estudos para avaliar se a concentração máxima teórica corresponde à esperada, de acordo com o ajuste dos

dados. De acordo com o ajuste, para que o teor máximo de metal seja encontrado nos tecidos, *S. minima* deveria estar em uma solução com concentração maior que $0,300 \text{ mg L}^{-1}$, o que não ocorreu neste estudo. Entretanto, para concentrações até $0,300 \text{ mg L}^{-1}$ o ajuste apresentou um valor alto de R^2 , indicando que esta curva apresenta alta correlação com os dados.

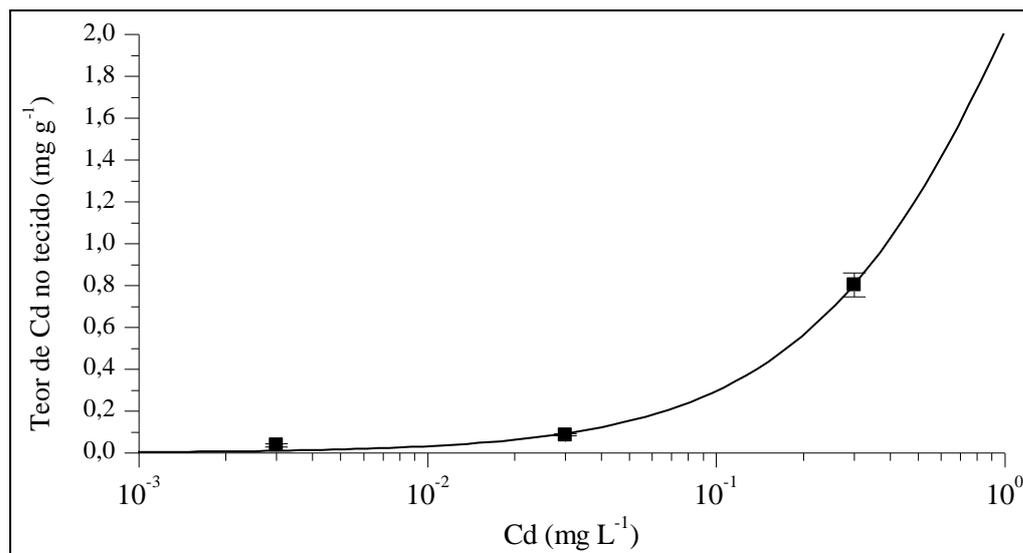


Figura 11 - Teores de Cd nos tecidos de *S. minima* (\pm DP) em função das concentrações do metal na solução (eixo das abscissas em escala logarítmica).

Conforme a planta cresce ela é capaz de adsorver e acumular metais, portanto a taxa de crescimento das plantas está relacionada à quantidade de metais que pode ser removido do meio. De acordo com os resultados, em uma concentração de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd o teor de metal na planta foi $0,0371 \text{ mg g}^{-1}$ e o $rm = 0,0257 \text{ dia}^{-1}$. Supondo que esse cultivo fosse realizado em uma área de $0,667 \text{ m}^2$ e que a *S. minima* esteja ocupando 50% da área do tanque, utilizando a formula da Eq. 4 tem-se:

$$Txa = \frac{0,0371}{529,7} \times (0,0257 \times 0,5 - 0,0257 \times 0,5^2) \times 6670$$

$$Txa = 0,003 \text{ mg. dia}^{-1}$$

Analisando a resolução da Eq. 4 foi possível observar que para *S. minima* remover 0,003 mg de Cd por dia de uma solução, cultivada em concentração de 0,003 mg L⁻¹, ela precisaria crescer 42,88 cm² dia⁻¹. Para que esse crescimento ocorresse ela precisaria ser cultivada em tanque com, no mínimo, 0,667 m² e estar ocupando 50% da sua área.

O exemplo mencionado pode ser utilizado para definir o tamanho necessário do tanque para o tratamento de efluentes que contenham concentrações de metais até 0,030 mg L⁻¹ (concentração máxima onde foi observado crescimento de *S. minima*). É importante salientar que fatores abióticos interferem nas diversas variáveis biológicas como a taxa de crescimento e possivelmente a taxa de assimilação de metais, portanto o modelo deve ser utilizado como norteador de futuros estudos para avaliar o real potencial da utilização destas macrófitas no tratamento de efluentes contaminados.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das análises de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC) e carbono inorgânico (IC) avaliados no efluente dos tanques de cultivo em diferentes períodos. O objetivo inicial foi avaliar o carbono exsudado pela macrófita cultivada em Cd; entretanto, vários tanques foram contaminados por algas. A contaminação interferiu na determinação do carbono exsudado pela planta e do carbono assimilado pelas algas. Esse fator não foi considerado no delineamento experimental e, portanto, as análises não corresponderam com o esperado. Apesar da contaminação, foi realizado o Teste-t (ZAR, 2010) para amostras de mesmo tamanho e variâncias iguais (teste-F com $p < 0,05$) com o objetivo de avaliar se a média de TOC no efluente do tratamento controle (2,11±0,52) foi diferente da média dos tratamentos com metais. O resultado do teste, permite afirmar que as médias não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

Os resultados das concentrações de Cd nos efluentes dos tanques de cultivos também são apresentados na Tabela 4. A análise estatística indicou que as concentrações de Cd nos efluentes dos cultivos com 0,030 e 0,300 mg L⁻¹ não apresentaram diferenças significativas em relação a concentração inicial do metal. O limite de quantificação da técnica utilizada para avaliar as concentrações de Cd no efluente foi 0,005 mg L⁻¹. Este limite, maior que o utilizado no tratamento com 0,003 mg L⁻¹, impediu a avaliação das variações de Cd neste tratamento. Apesar disso, pode-se afirmar que não foram observadas concentrações maiores que 0,005 mg L⁻¹ no tratamento controle e no tratamento com 0,003 mg L⁻¹ de Cd.

Tabela 4 – Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Cd no efluente do tanque de cultivo (mg L⁻¹).

Dia inicial	Dia final	TOC	TC	IC	Cd
Controle					
9	12	1,68	2,01	0,34	<0,005
20	27	2,19	2,61	0,42	<0,005
28	33	2,69	3,11	0,42	<0,005
35	39	2,51	2,83	0,32	<0,005
42	47	1,49	2,53	1,03	<0,005
Cádmio - 0,003 mg L⁻¹					
9	12	1,53	2,31	0,78	<0,005
20	27	2,36	2,56	0,20	<0,005
28	33	1,77	2,43	0,67	<0,005
35	39	2,01	2,20	0,19	<0,005
42	47	2,63	2,65	0,02	<0,005
Cádmio - 0,030 mg L⁻¹					
9	12	1,16	1,40	0,25	0,027
20	27	1,26	1,76	0,50	0,033
28	33	4,26	5,02	0,77	0,035
35	39	2,23	2,53	0,30	0,022
42	47	1,52	2,42	0,90	0,031
Cádmio - 0,300 mg L⁻¹					
9	12	1,32	1,58	0,26	0,250
20	27	0,89	1,26	0,36	0,367
28	33	2,34	3,06	0,72	0,256
35	39	1,63	1,97	0,34	0,367
42	47	1,49	1,76	0,27	0,257

2.2.2.2 *Lemna valdiviana*

Na Figura 12 são apresentadas as medidas das áreas foliares de *L. valdiviana* quando cultivadas em 0,003, 0,030, 0,300 e 0,600 mg L⁻¹ de Cd. Quando cultivada em 0,600 mg L⁻¹ de Cd observou-se reduções das áreas foliares (i.e. morte das plantas). Não foi observado crescimento significativo no cultivo com 0,300 mg L⁻¹. Nos cultivos com concentrações de 0,030 mg L⁻¹, observaram-se crescimentos significativos (p=0,02) apenas no ultimo dia amostral (46º dia) . Quando cultivadas em 0,003 mg L⁻¹ os indivíduos cresceram 114,14 cm² (0,195g MS).

As áreas foliares de *L. valdiviana* cultivadas em qualquer concentração de Cd foram menores que as do grupo controle, sugerindo que mesmo em baixas concentrações (0,003 mg L⁻¹) este metal já seja tóxico para *L. valdiviana*.

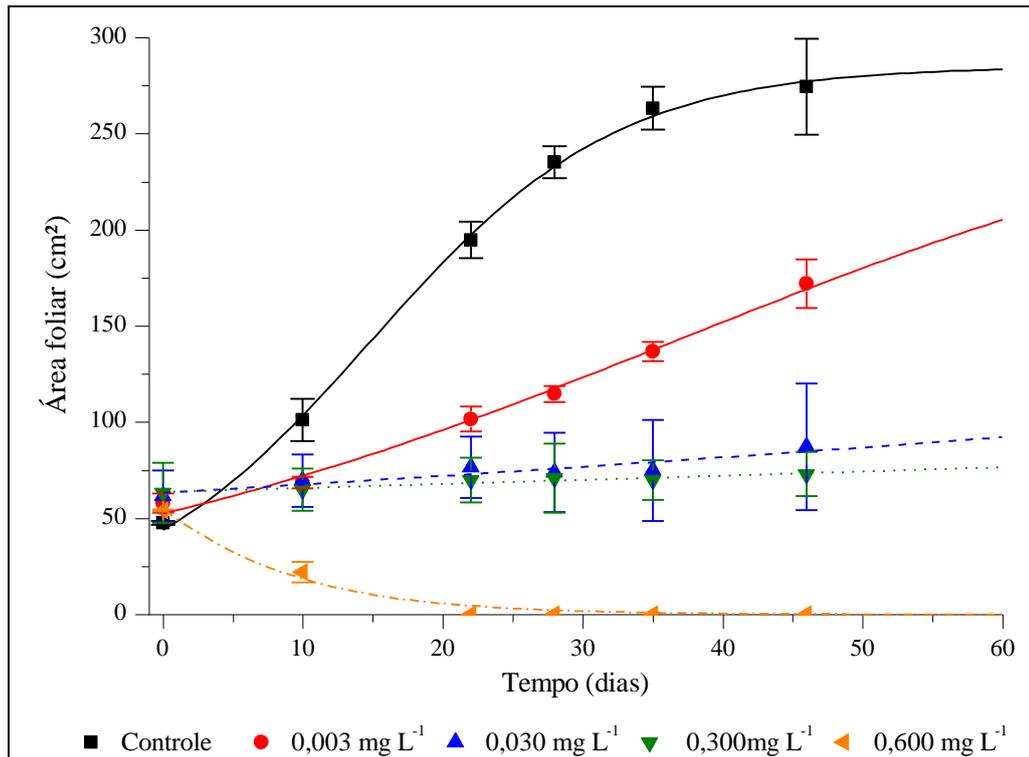


Figura 12- Áreas foliares de *L. valdiviana* (\pm DP) cultivadas em diferentes concentrações de Cd.

Na Figura 13 apresentam-se os coeficientes de crescimento para *L. valdiviana* de acordo com a concentração de cádmio em que foram cultivadas. Os coeficientes de crescimento diminuiriam quando aumentadas as concentrações do metal, sugerindo que os aumentos das concentrações tornaram os meios mais tóxicos para estes indivíduos. Quando cultivadas em concentrações de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd o rm foi $0,0397 \pm 0,0051 \text{ dia}^{-1}$.

Na Figura 14 é apresentado o ajuste da curva de decaimento (Eq. 3) do rm de *L. valdiviana* em função da concentração de Cd na solução. Obtiveram-se os seguintes valores: $D = 104,60 \text{ C}^{-1}$; $R^2 = 0,971$; $p_{\text{teste.F}} < 0,001$ ($rm_{\text{controle}} = 0,1145 \text{ dia}^{-1}$; $N = 15$) indicando que o modelo selecionado explica razoavelmente bem os dados experimentais e que houve uma relação exponencial negativa entre os coeficientes de crescimento de *L. valdiviana* e as concentrações de Cd no meio. Outros estudos indicam que cultivos de *Lemna gibba* em concentrações de $0,001 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd, após 2 dias afetaram negativamente o crescimento (MEGATELI; SEMSARI; COUDERCHET, 2009). Estes autores não observaram crescimento de *L. gibba* após 2 dias quando cultivadas em $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ e após 10 dias quando cultivadas em $0,001 \text{ mg L}^{-1}$.

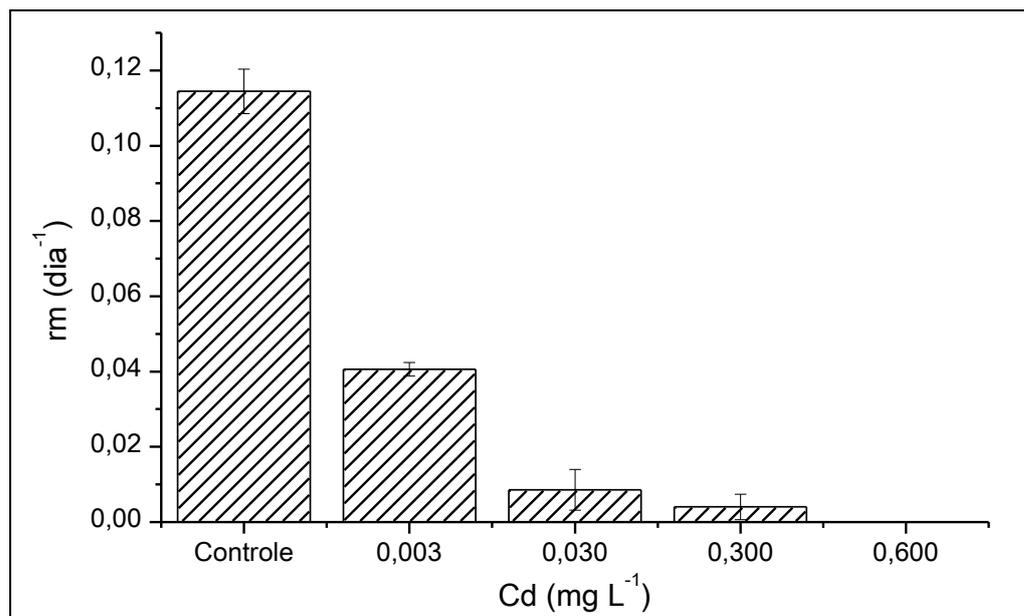


Figura 13- Coeficientes médios de crescimento ($\pm DP$) de *L. valdiviana*, quando cultivadas em diferentes concentrações de Cd.

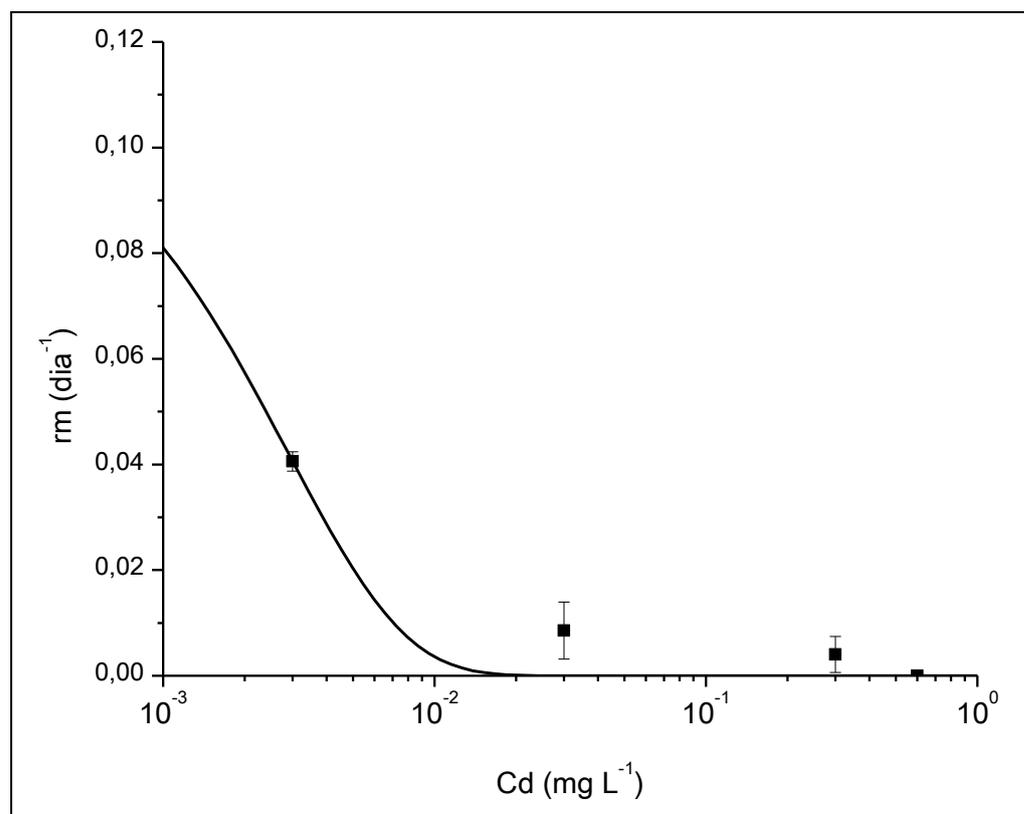


Figura 14 - Ajuste da curva exponencial às variações dos coeficientes de crescimento ($\pm DP$) de *L. valdiviana* em função da concentração de Cd no meio de cultivo (eixo das abscissas em escala logarítmica).

Na Figura 15 são apresentados os teores de Cd nos tecidos de *L. valdiviana*. O maior teor ($1,30 \text{ mg g}^{-1}$) foi obtido no cultivo com $0,300 \text{ mg L}^{-1}$. Observou-se também que o teor de metal aumentou até a concentração de $0,300 \text{ mg L}^{-1}$ e que diminuiu quando cultivada em $0,600 \text{ mg L}^{-1}$. Os maiores teores foram obtidos em concentrações mais altas apesar dos baixos crescimentos. Outros autores também observaram aumentos nos teores de Cd nos tecidos de *Lemna trisulca* (máx. 50 mg g^{-1}) quando cultivadas em concentrações de $0,0112$ a $1,124 \text{ mg L}^{-1}$, durante dois dias (PRASAD et al., 2001).

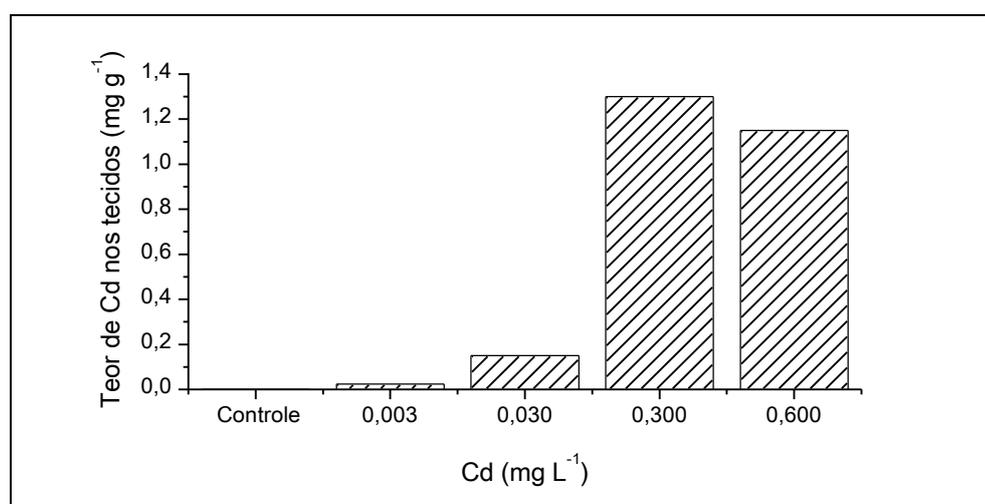


Figura 15 – Teores de Cd nos tecidos de *L. valdiviana* de acordo com a concentração de metal em que foi cultivada.

Na Figura 16 apresenta-se a curva da Eq. 6 ajustada aos dados ($R_K = 1,56$; $C_1 = 0,128$; $N = 15$; $R^2 = 0,93$). Esta curva ajustada aos teores de Cd nos tecidos em função da concentração deste metal no meio de cultivo apresentou uma probabilidade de correlação ao acaso maior que 5,0% (Probabilidade de $F = 0,052$). Por estar muito próximo do limiar de aceitação optou-se por apresentá-la. Provavelmente o ajuste não foi adequado devido ao menor teor de metal encontrado nos tecidos quando cultivado em $0,600 \text{ mg L}^{-1}$. Este valor menor pode estar relacionado à liberação do metal que foi assimilado pelo tecido em função da morte das macrófitas (como observado na Figura 12). Em função da toxicidade deste metal na concentração máxima selecionada ($0,600 \text{ mg L}^{-1}$), pode ser que os indivíduos de *L. valdiviana* nem mesmo tenham assimilado o Cd em seus tecidos em teores maiores que os observados.

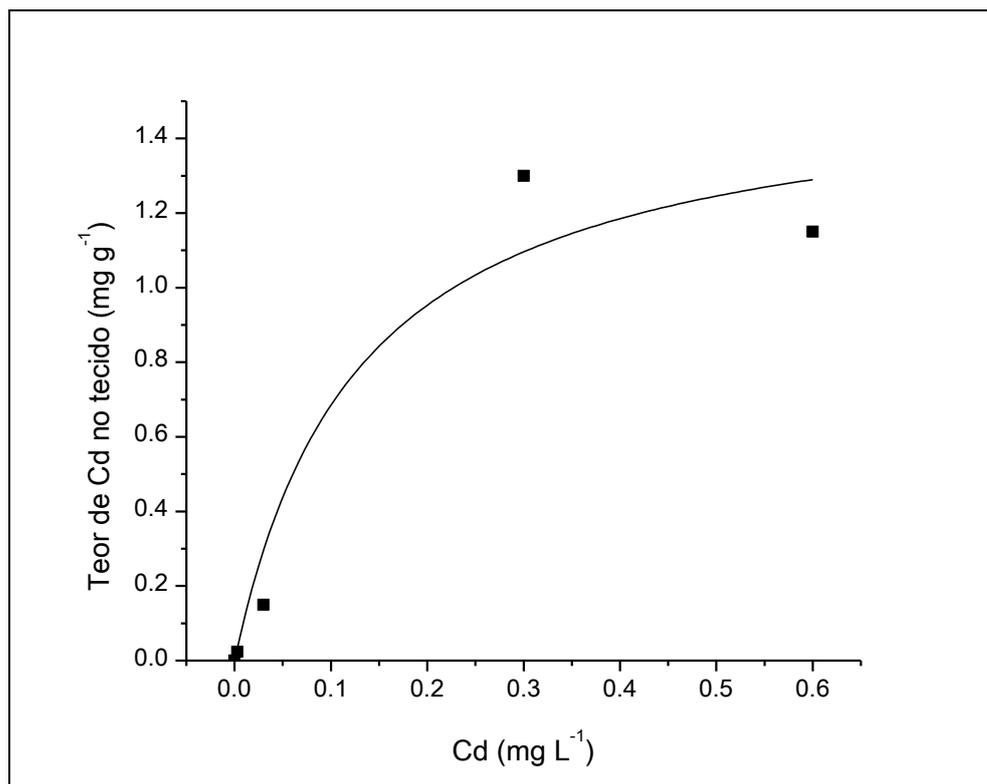


Figura 16 - Teores de metal no tecido de *L. valdiviana* em função das concentrações de metal na solução.

Como verificado no cultivo de *S. minima* também houve contaminação por algas nos meios com *L. valdiviana* que impediu a análise acurada do carbono orgânico exsudado. Na Tabela 5 são apresentados os resultados das análises de carbono e metais no efluente dos recipientes de cultivo. Apesar da contaminação, foi realizado o Teste-t (ZAR, 2010) para amostras de tamanhos diferentes tendo em vista avaliar se as médias de TOC no efluente do tratamento controle ($3,78 \pm 1,67$) foram diferentes das médias dos tratamentos com metais. A variação amostral do tratamento controle foi diferente das variações dos tratamentos com 0,003 e 0,030 mg L⁻¹ de Cd (Teste-F com $p < 0,05$). O resultado do Teste-t permite afirmar que os valores médios de carbono orgânico entre o tratamento controle e os tratamentos com 0,003 e 0,030 mg L⁻¹ de Cd não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). As variações amostrais do tratamento controle e do tratamento com 0,300 mg L⁻¹ de Cd foram iguais (Teste-F com $p < 0,05$). O resultado do Teste-t para variações iguais, permite afirmar que as médias entre o tratamento controle e o tratamento com 0,300 mg L⁻¹ de Cd não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

As concentrações de Cd dos efluentes dos cultivos do grupo controle mantiveram-se abaixo do limite de quantificação ($0,005 \text{ mg L}^{-1}$). As concentrações de Cd nos efluentes dos cultivos com $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ apresentaram alguns valores maiores que os esperados. Entretanto, por se tratar de valores baixos e próximos ao limite de quantificação a contaminação pode ter ocorrido no momento da leitura entre uma amostra mais concentrada e outra com menor concentração. Outra possibilidade é a bioacumulação de metais por algas que contaminaram o cultivo e que podem ter influenciado o resultado.

Não houve diferenças significativas ($\alpha < 0,05$) entre as médias dos valores observados e os esperados. Os resultados da análise de Cd nos cultivos com $0,300 \text{ mg L}^{-1}$ também não apresentaram diferenças significativas entre a média dos valores observados e esperados.

A permanência das concentrações iniciais era esperada, uma vez a estratégia experimental foi justamente avaliar os crescimentos da macrófita em concentrações de metais que não variassem; esse também foi o propósito do tempo de residência ser mantido em dois dias.

Tabela 5 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Cd no efluente dos tanques de cultivo com *L. valdiviana* (mg L^{-1}).

Dia inicial	Dia final	TOC	TC	IC	Metal
Controle					
11	20	3,30	4,93	1,63	<0,005
20	29	1,99	2,81	0,82	<0,005
36	41	6,01	7,88	1,87	<0,005
43	49	3,82	6,02	2,20	
Cádmio - $0,003 \text{ mg L}^{-1}$					
0	11	1,89	2,83	0,93	<0,005
11	20	1,44	2,07	0,63	<0,005
20	29	2,10	2,96	0,86	0,005
36	41	2,63	3,52	0,89	0,005
43	49	354,70*	379,00	24,25	
Cádmio - $0,030 \text{ mg L}^{-1}$					
0	11	1,77	2,64	0,88	0,024
11	20	1,52	2,20	0,67	0,031
20	29	1,95	2,81	0,86	0,020
36	41	1,35	1,73	0,38	0,027
43	49	1193,00*	1194,00	0,93	
Cádmio - $0,300 \text{ mg L}^{-1}$					
0	11	2,09	2,90	0,80	0,250
11	20	2,08	3,00	0,92	0,272
20	29	1,96	3,07	1,11	0,367
36	41	2,19	2,73	0,54	0,287
43	49	3,50	4,10	0,60	

*Valor não incluído na análise estatística devido à contaminação por algas

Como mencionado, na remoção de metais de efluentes líquidos é comum o emprego de procedimentos químicos que utilizam sais de sulfeto. Utilizando essa técnica, a remoção de Cd é a terceira em menor eficiência, sendo possível reduzir a concentração deste metal a $10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$ (ECKENFELDER, 2000). A partir dos resultados encontrados nesse estudo, propõe-se uma alternativa para o método químico ou o uso concomitante dos dois métodos. Propõe-se que sejam utilizados procedimentos químicos para a remoção de Cd a concentrações próximas a $0,030 \text{ mg L}^{-1}$ e posteriormente o uso destas macrófitas no tratamento de efluentes.

2.2.3 Tratamento com Chumbo

O excesso de Pb pode causar morte das plantas, pois inibe rapidamente o crescimento radicular, causa atrofia e clorose; no interior das células, leva à inibição da atividade enzimática, perturbação da nutrição, mudanças nos teores de água, alterações hormonais e na permeabilidade da membrana; outros efeitos tóxicos do Pb são: a inibição da germinação de sementes e o retardamento do crescimento das mudas (SHARMA; DUBEY, 2005).

2.2.3.1 *Salvinia minima*

Apresentam-se na Figura 17 as variações temporais das áreas foliares de *S. minima* cultivadas em diferentes concentrações de Pb e as respectivas curvas de crescimento ajustadas aos dados (Eq. 1) em função do tempo. A maior ocupação foi observada no último dia de cultivo (53), quando as macrófitas cultivadas em 0,01 mg L⁻¹ ocuparam 128,82 cm² (41%) da área total do tanque. A menor ocupação no último dia de cultivo foi observada quando as macrófitas foram cultivadas em 1,00 mg L⁻¹ de Pb e ocuparam apenas 53,27 cm² (17% do recipiente).

Em todos os tratamentos com Pb ocorreram crescimentos das plantas. O crescimento do cultivo em solução com 0,01 mg L⁻¹ assemelhou-se ao do controle até o 25^o dia e, após, houve maior crescimento do grupo controle. Os demais tratamentos apresentaram baixos crescimentos quando comparadas ao tratamento controle. Após o 30^o dia não houve diferença estatística nos crescimentos dos cultivos em 0,100 e 1,00 mg L⁻¹.

Na Figura 18 são apresentados os valores de *rm* para *S. minima* em função das concentrações selecionadas. Quando cultivadas em 0,010 mg L⁻¹ de chumbo o *rm* foi 0,0356 ± 0,0023 dia⁻¹. Quando cultivadas com 0,100 e 1,00 mg L⁻¹ os valores de *rm* foram respectivamente: 0,0198 ± 0,0019 e 0,00169 ± 0,0035 dia⁻¹. Observou-se que as plantas cultivadas em concentrações acima de 0,100 mg L⁻¹ apresentaram valores de *rm* baixos quando comparados ao tratamento controle, além disso, o fato de não crescerem após o 30^o dia de cultivo indica que estas concentrações foram tóxicas para essa macrófita. Outros estudos apontam que 0,020 mg L⁻¹ de Pb são tóxicos para *S. minima* e prejudicaram o crescimento desta macrófita quando cultivadas por 11 dias (HOFFMANN; KUTTER; SANTAMARÍA, 2004).

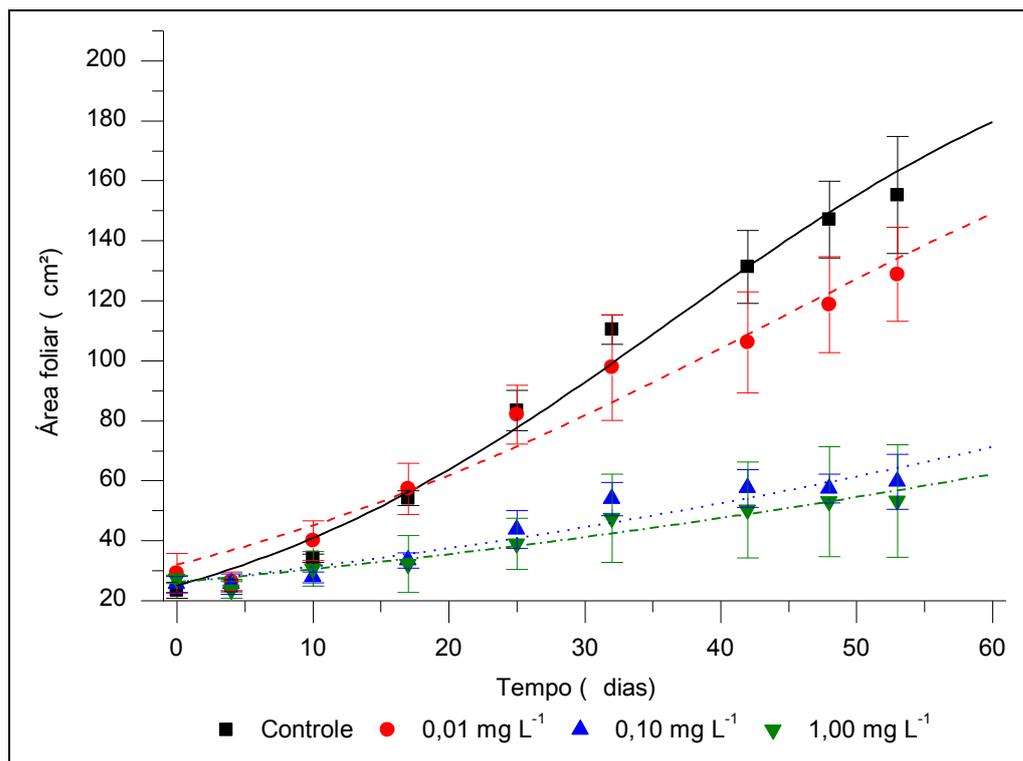


Figura 17 – Crescimentos de *S. minima* (\pm DP) cultivada em diferentes concentrações de Pb.

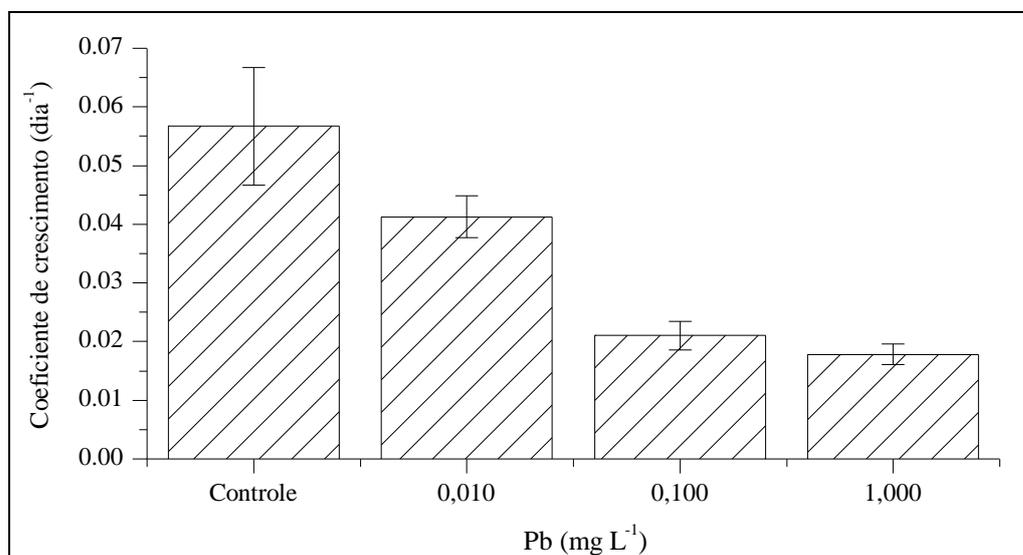


Figura 18 – Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de *S. minima* cultivadas em diferentes concentrações de Pb.

O coeficiente de determinação do ajuste da Eq. 3 (eq. de decaimento) para os tratamentos com Pb apresentou valores baixos ($R^2 = 0,57$; $N=12$), indicando que este modelo não se mostrou adequado para explicar os decréscimos de rm em função do incremento das concentrações de Pb observados nos cultivos com *S. minima* nas concentrações escolhidas e, portanto, o ajuste da curva não foi apresentado.

Os teores de Pb nos tecidos das macrófitas cultivadas em diferentes concentrações são apresentados na Figura 19. Observou-se que houve aumento nos teores de Pb nos tecidos das plantas com o aumento da sua concentração na solução. Os indivíduos cultivados em solução de 0,1 e 1,0 mg L⁻¹ de Pb, foram os que apresentaram maiores teores.

Na Figura 20 é apresentada a curva da Eq. 6 ajustada com os teores de Pb nos tecidos de *S. minima* em função do incremento das concentrações deste metal nos meios de cultivo. A análise deste ajuste indica que o teor teórico máximo de Pb em *S. minima* (R_K) foi 1,888 mg g⁻¹ ($C_1=0,052$; $R^2=0,968$; $N=12$; $p<0,01$). Outro estudo demonstrou que *S. minima* é capaz de adsorver aproximadamente 40 mg g⁻¹ de Pb quando expostas a concentrações de 28,40 mg L⁻¹ e a capacidade de adsorção é máxima nas primeiras 10h de cultivo (SÁNCHEZ-GALVÁN et al., 2008). Esses autores também concluíram que o teor de chumbo no tecido de *S. minima* aumenta de acordo com a concentração desse elemento no meio. A divergência nos teores máximos que *S. minima* pode bioacumular pode estar relacionada às concentrações usada nos dois trabalhos, uma vez que a concentração máxima de Pb utilizada neste estudo foi 1,0 mg L⁻¹.

Durante o período experimental as macrófitas cultivadas nas concentrações de 0,010 e 0,100 mg L⁻¹ de Pb foram capazes de crescer respectivamente 99,63 e 34,21 cm² e assimilar respectivamente $0,0046 \pm 0,0019$ e $0,0812 \pm 0,0080$ mg de Pb. Outros autores relataram grande potencial para o uso de *S. minima* no tratamento de efluentes contaminados por chumbo. Isto porque, indivíduos de *S. minima* são capazes de produzir nanopartículas que se ligam ao Pb e bioacumulam essas partículas nas paredes e membranas de suas células impedindo, parcialmente, a ação tóxica deste elemento (CASTRO-LONGORIA et al., 2014). O estudo destes autores indica também que a celulose, lignina e pectina são os componentes principais que podem atuar como agentes redutores de íons de Pb. Outro trabalho demonstrou que a presença do Pb no meio de cultivo aumenta a produção de fitoquelatinas e que elas estão relacionadas aos mecanismos de bioacumulação deste metal nos tecidos das raízes de *S. minima* (ESTRELLA-GÓMEZ et al., 2009).

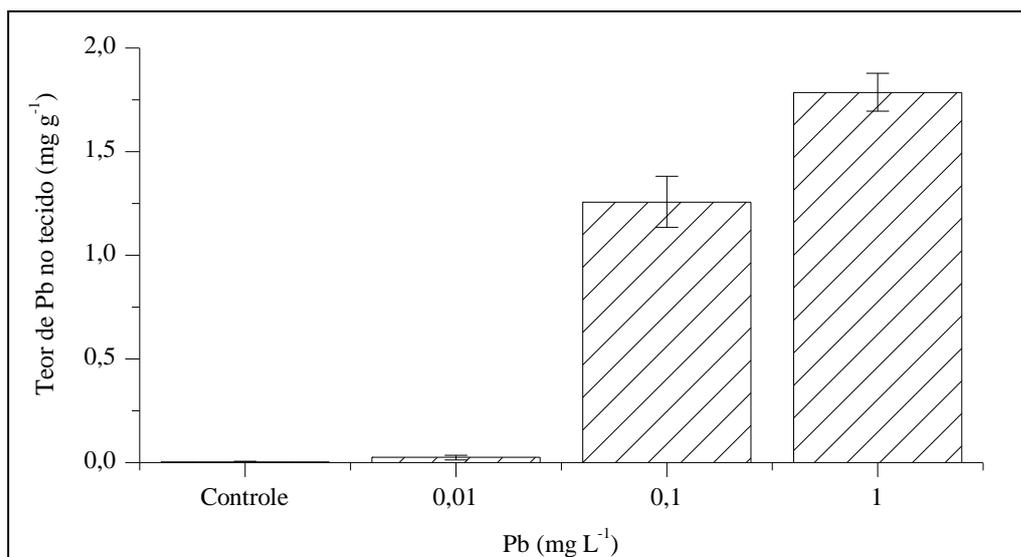


Figura 19 – Teores de Pb em *S. minima* (\pm DP) em função da concentração do metal na solução de cultivo.

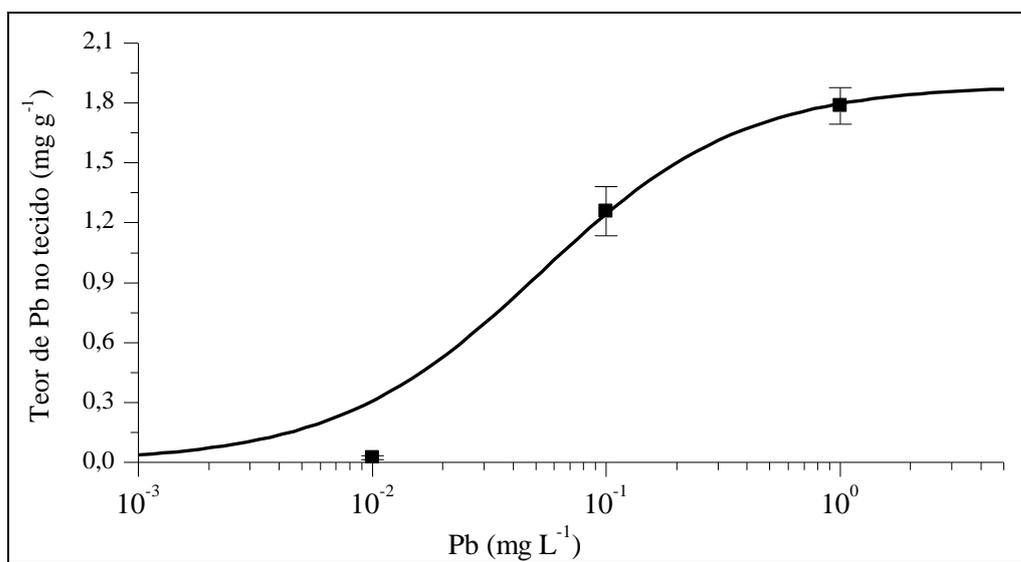


Figura 20 - Teores de Pb em *S. minima* (\pm DP) em função da concentração desse metal no cultivo.

Na Figura 21 apresenta-se a curva da Eq. 2 relativa às variações da taxa de crescimento (Crd) em função da área de ocupação máxima de *S. minima* (%). O cálculo da Txa (Eq. 4) para cultivos em $0,010 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb, supondo que a ocupação do tanque seja de 50% de uma área total de $2,443 \text{ m}^2$, é o seguinte:

$$Txa = \frac{0,0244}{529,7} \times (0,0356 \times 0,5 - 0,0356 \times 0,5^2) \times 24430$$

$$Txa = 0,010 \text{ mg Pb dia}^{-1}$$

Para que o cultivo de *S. minima* consiga remover $0,010 \text{ mg dia}^{-1}$ de Pb da solução seria necessário um tanque com uma área mínima de $2,443 \text{ m}^2$. Estes cálculos pressupõem que as mesmas condições experimentais selecionadas nesse estudo sejam adotadas (e.g. temperatura e intensidade luminosa). Outro estudo aponta que as eficiências nos tratamentos de efluentes contaminados com Ni e Cd aumentaram para 65% quando cultivos foram realizados em associações com palha de trigo e palha de arroz (DHIR; KUMAR, 2010). Outro, mostrou que *S. minima* assimilou aproximadamente 40 mg g^{-1} de Pb quando cultivadas em $33,15 \text{ mg L}^{-1}$ e que a assimilação ocorreu nas primeiras 48 horas de cultivo (HOFFMANN; KUTTER; SANTAMARÍA, 2004).

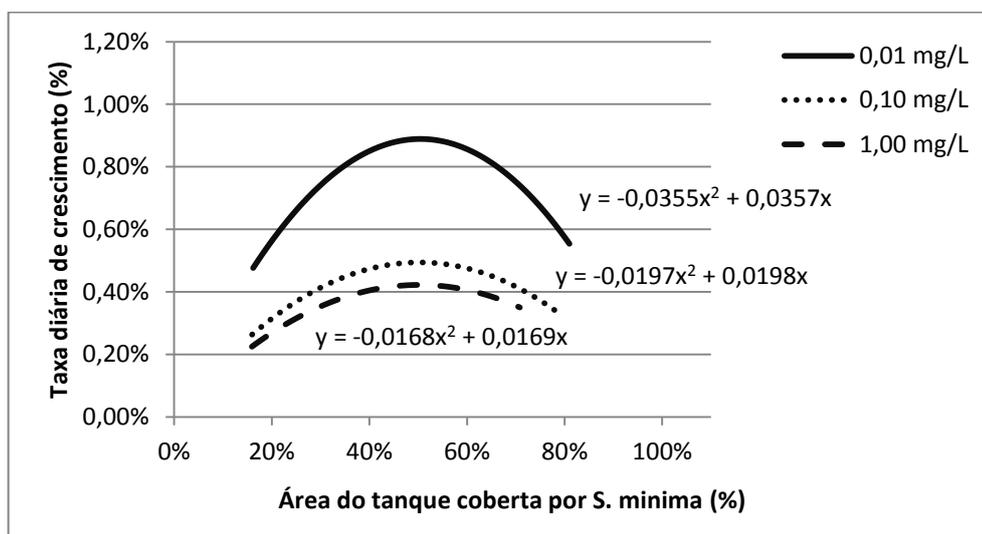


Figura 21 - Taxa diária de crescimento de *S. minima* em função da área do tanque coberta pela macrófita de acordo com a concentração de Pb na solução.

Como ocorrido no cultivo de *S. minima* com Cd, também houve contaminação por algas nos meios com Pb, o que impediu a análise acurada do carbono exsudado. Na Tabela 6 são apresentados os resultados das análises de carbono e metais no efluente dos tanques de cultivo. Foi aplicado o Teste-t (ZAR, 2010) para amostras de tamanhos diferentes e variações iguais (teste-F com $p < 0,05$) com objetivo de avaliar se a média de TOC no efluente do tratamento controle ($2,11 \pm 0,52$) foi diferente das médias dos tratamentos com Pb. O resultado do Teste-t, permite afirmar que as médias entre o tratamento controle e os tratamentos com 0,010 e 0,100 mg L⁻¹ de Pb não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$). Entretanto, houve diferença significativa entre a média de TOC no tratamento com 1,00 mg L⁻¹ de Pb ($1,08 \pm 0,27$) e do tratamento controle. Os valores médios do tratamento com maior concentração de Pb provavelmente impediram a produção de exsudados e de outros compostos orgânicos (em adição, visualmente houve menor quantidade de algas neste tratamento) em função da sua toxicidade.

Tabela 6 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Pb no efluente dos tanques de cultivo com *S. minima* (mg L⁻¹).

Dia inicial	Dia final	TOC	TC	IC	Metal
Controle					
9	12	1,68	2,01	0,34	<0,025
20	27	2,19	2,61	0,42	<0,025
28	33	2,69	3,11	0,42	<0,025
35	39	2,51	2,83	0,32	
42	47	1,49	2,53	1,03	
Chumbo - 0,010 mg L⁻¹					
0	6	1,39	1,66	0,28	<0,025
7	13	1,51	1,80	0,29	<0,025
32	36	2,73	3,97	1,24	<0,025
Chumbo - 0,100 mg L⁻¹					
0	6	1,63	2,37	0,74	0,099
7	13	1,55	1,73	0,18	0,105
32	36	2,03	2,84	0,81	0,101
Chumbo - 1,000 mg L⁻¹					
0	6	1,27	1,57	0,30	0,958
7	13	1,20	1,36	0,16	0,896
32	36	0,78	0,94	0,16	1,021

Tendo em vista remover metais de efluentes líquidos, usualmente os procedimentos metodológicos utilizam sais de hidróxido ou sulfeto. Utilizando-se hidróxido, a remoção de Pb é a de menor eficiência, sendo possível reduzir a concentração deste metal a 10 mg L^{-1} . Utilizando-se sais de sulfeto é possível reduzir a concentração à $10^{-8} \text{ mg L}^{-1}$ de Pb (ECKENFELDER, 2000). A partir dos resultados encontrados nesse estudo, propõe-se uma alternativa para o método químico ou o uso concomitante dos dois métodos. Propõe-se que sejam utilizados procedimentos químicos para a remoção de Pb a concentrações próximas a $0,010 \text{ mg L}^{-1}$ e posteriormente o uso destas macrófitas no tratamento de efluentes.

Após o cultivo de *S. minima* em efluentes contaminados, o Pb pode ser extraído de seus tecidos por diversos métodos em que a eficiência de extração chega a 99% utilizando EDTA e posteriormente o metal extraído pode ser reutilizado ou acondicionado em volumes menores até sua destinação final (NÚÑEZ-LÓPEZ et al., 2008).

2.2.3.2 *Lemna valdiviana*

O crescimento de fungos contaminou o experimento com $0,010 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb, esse evento prejudicou a análise do crescimento de *L. valdiviana* e também impediu as avaliações precisas de Pb nos tecidos e nos efluentes dos recipientes de cultivo. Os resultados das análises de TOC também foram alterados. Apesar das 3 repetições, a contaminação por fungos persistiu. Por não ter sido prevista contaminações por fungos, alterações no delineamento experimental não puderam ser feitas, já que essa contaminação ocorreu apenas na fase final do experimento com *L. valdiviana* e prejudicariam a comparação dos resultados iniciais com os finais. Talvez a presença do Pb no meio de cultivo tenha prejudicado mecanismos de defesa das macrófitas contra o crescimento excessivo de fungos (GARCION; LAMOTTE; MÉTRAUX, 2007; STANGARLIN et al., 2011).

Nas concentrações de $0,10$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb não houve crescimento de *L. valdiviana* e portanto os coeficientes de crescimento para essas duas concentrações (rm) foram nulos. Para esses tratamentos não houve a mensuração do teor de chumbo nos tecidos em virtude de insuficiência de massa para esta análise. Não ocorrendo o crescimento, optou-se por não avaliar as concentrações de carbono e de Pb nos efluentes dos tanques de cultivo.

2.2.4 Tratamento com Níquel

Entre as consequências da presença do Ni na solução de cultivo estão as reduções das clorofilas “a”, “b”, da feofitina e as reduções de proteínas e aminoácidos (APPENROTH et al., 2010; SEN; BHATTACHARYYA, 1994). O declínio na fotossíntese pode ser o resultado da inativação de enzimas de grupos sulfídricos que são necessárias para a biossíntese de ácidos graxos que fazem parte do processo fotossintético (JANA; CHOUDHURI, 1982; MALHOTRA, 1977). Outros estudo sugere que o Ni forma complexo proteico com o grupo -SH e se liga fortemente às raízes, prevenindo a passagem do metal para dentro da planta (SIGEL, 1983).

2.2.4.1 *Salvinia minima*

Apresentam-se na Figura 22 os valores das áreas foliares de *S. minima* acumuladas no tempo, esses resultados foram utilizados para ajustar a Eq. 1 do crescimento sigmóide. Foram observados crescimentos em todos os tratamentos com Ni; entretanto, menores em relação ao controle. Nos cultivos com 0,400 mg L⁻¹ de Ni não foi observado crescimento ($p < 0,05$) a partir do dia 37 (52,37 cm²) e em 0,200 mg L⁻¹ não foi observado crescimento ($p < 0,05$) a partir do dia 42 (76,47 cm²). Em relação ao tratamento em 0,020 mg L⁻¹ observou-se crescimento até o ultimo dia de cultivo (60^o dia) quando ocupou uma área de 102,32 cm² (35% do recipiente).

Na Figura 23 são apresentados os valores de r_m para *S. minima* em função das concentrações de Ni selecionadas. Quando cultivadas em concentrações de 0,020, 0,200 e 0,400 mg L⁻¹ de Ni os valores de r_m foram, respectivamente, $0,0263 \pm 0,0015$, $0,0205 \pm 0,0033$ e $0,0120 \pm 0,0026$ dia⁻¹. Observaram-se decréscimos dos valores de r_m conforme as concentrações de Ni aumentaram.

O coeficiente de determinação do ajuste da Eq. 3 (eq. de decaimento) para os tratamentos com Pb apresentou valores baixos ($R^2 = 0,70$; $N = 12$), indicando que este modelo matemático não foi sensível para explicar os decréscimos dos coeficientes de crescimento observados nos cultivos com *S. minima* com Ni.

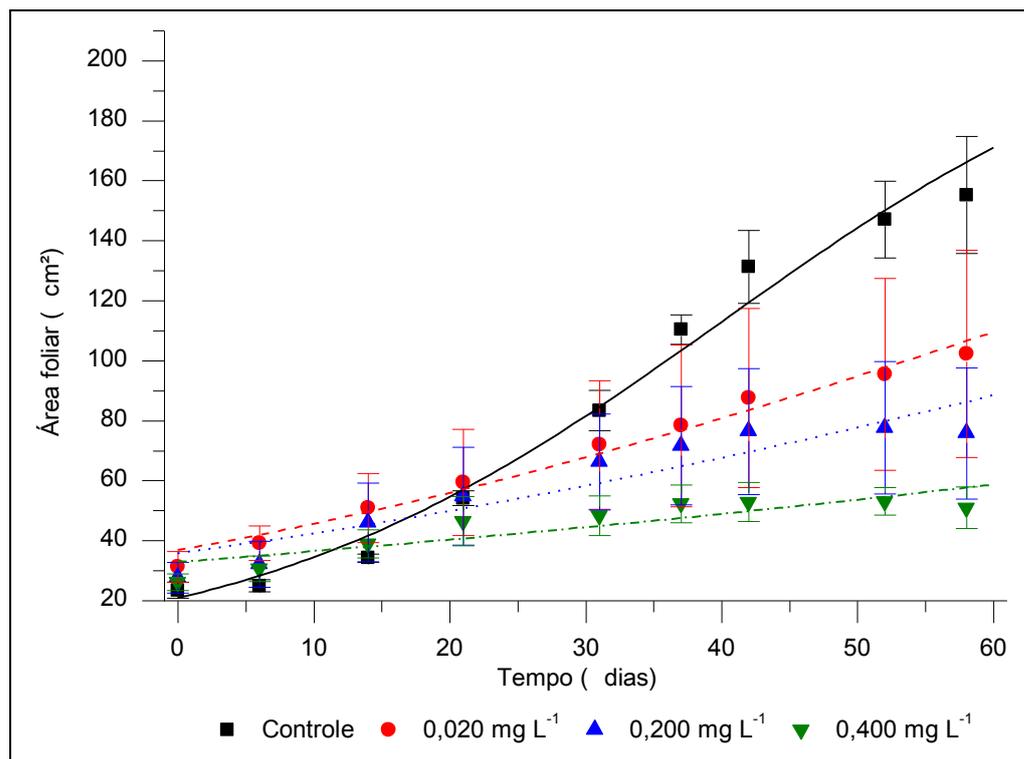


Figura 22 – Crescimentos de *S. minima* (\pm DP) em diferentes concentrações de Ni.

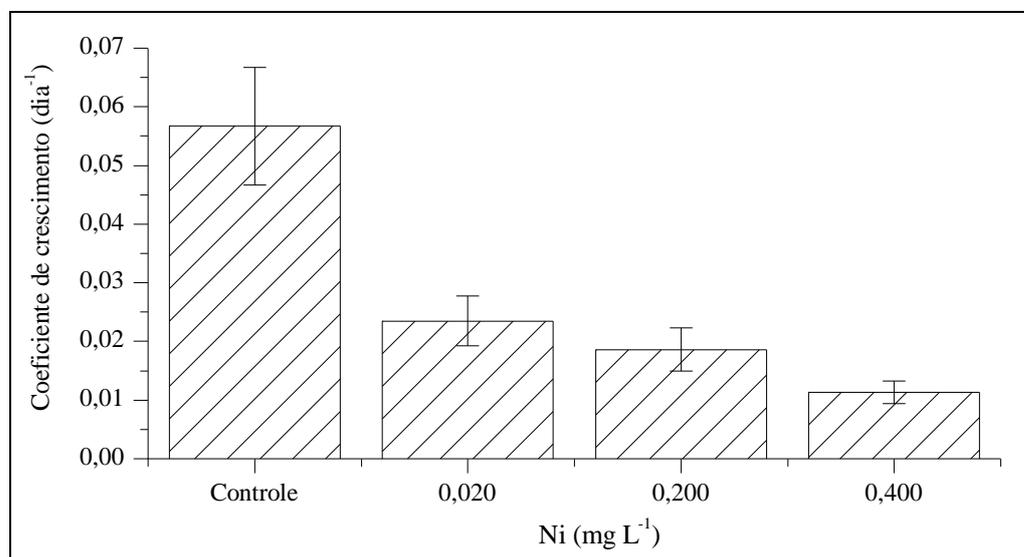


Figura 23 – Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de *S. minima* cultivadas em diferentes concentrações de Ni.

Os teores de Ni nos tecidos de *S. minima* cultivadas em diferentes concentrações desse elemento são apresentados na Figura 24. O maior teor de Ni nos tecidos foi verificado quando as plantas foram cultivadas em solução com $0,200 \text{ mg L}^{-1}$ e os menores quando cultivadas em soluções com $0,020$ e $0,400 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni. Durante o período experimental, as macrófitas cultivadas nas concentrações de $0,020$ e $0,200 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni foram capazes de crescer respectivamente $71,08$ e $48,19 \text{ cm}^2$ e assimilar respectivamente $0,0174 \pm 0,0004$ e $0,0616 \pm 0,0075 \text{ mg}$ de Ni.

Os resultados deste estudo assemelham-se aos de SEN; BHATTACHARYYA (1994). Esses autores concluíram que os teores de Ni nos tecidos de *Salvinia natans* aumentaram de acordo com o incremento da concentração de metal no meio. Apesar de o experimento desenvolvido ser conduzido em concentrações 50 vezes menores que os deste estudo, o teor máximo de Ni ($3,33 \text{ mg g}^{-1}$) ocorreu quando as macrófitas foram cultivadas em $0,040 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ni.

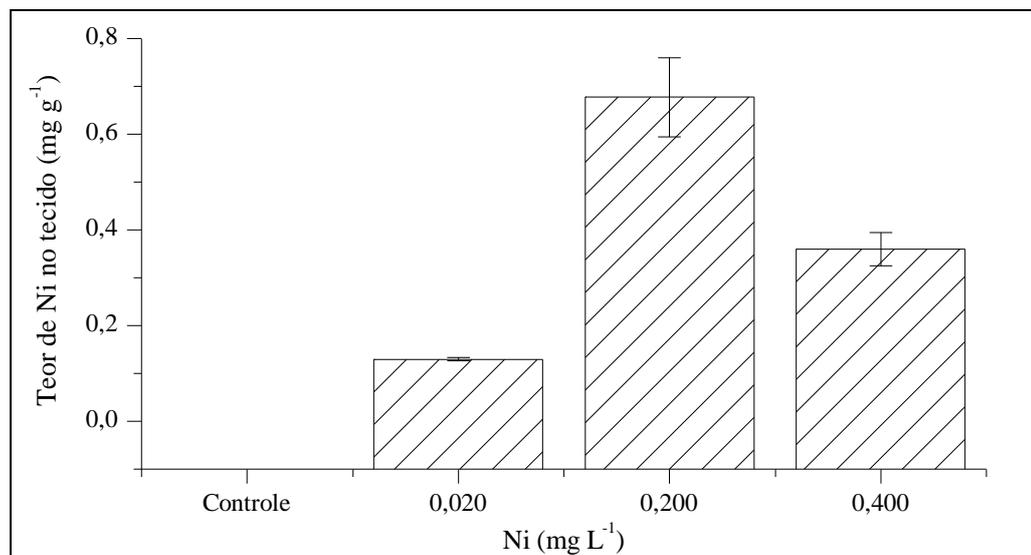


Figura 24- Teores de Ni em *S. minima* (\pm DP) em função das concentrações desse metal no cultivo.

Na Figura 25 apresentam-se as variações das taxas diárias de crescimento em função da área do tanque coberta pela macrófita. Utilizaram-se os dados dos experimentos para ajustar uma curva polinomial. Através desta curva é possível estabelecer o melhor tamanho do tanque de cultivo e qual deve ser a porcentagem da área coberta por *S. minima* para que seja possível remover determinada quantidade de metal do efluente líquido, admitindo-se que sejam mantidas as mesmas condições que as dotadas no experimento. Observou-se o Crd máximo quando *S. minima* foi cultivada em concentrações de $0,020 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni.

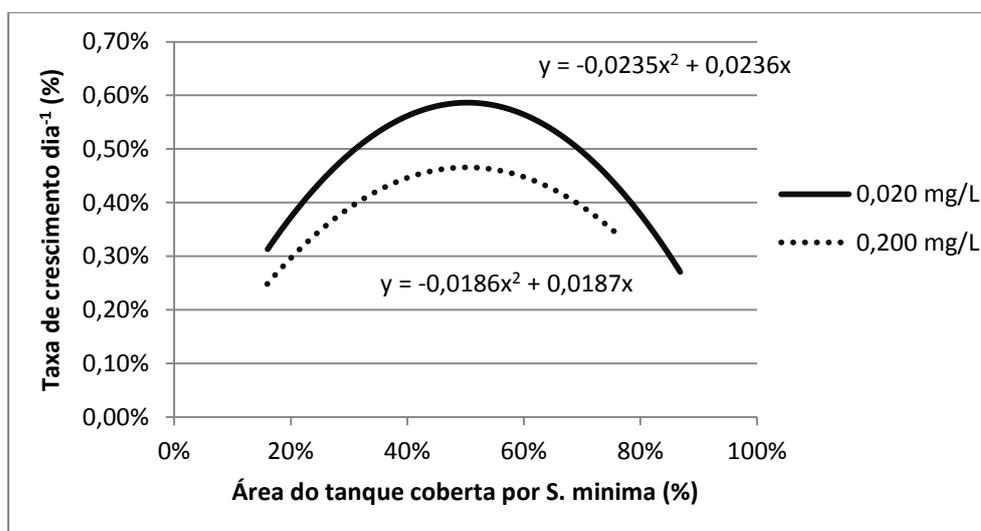


Figura 25 - Taxa diária de crescimento de *S. minima* em função da área do tanque coberta pela macrófita de acordo com as concentrações de Ni na solução.

Na Tabela 7 são apresentadas as concentrações das formas de carbono nos efluentes dos cultivos com Ni. Mais uma vez, o crescimento de algas prejudicou a análise do carbono exsudado pelas macrófitas. Contudo, foi realizado o Teste-t (ZAR, 2010) para amostras de tamanhos diferentes e variações iguais (teste-F com $p < 0,05$) com objetivo de avaliar diferenças na concentração de TOC entre o tratamento controle e os tratamentos com Ni. O Teste-t, permitiu afirmar que as médias entre o tratamento controle e os tratamentos com diferentes concentrações de Ni não foram significativamente diferentes ($p < 0,05$).

As análises da concentração de Ni no efluente do tratamento controle apresentaram valores de Ni abaixo do limite de quantificação do método ($0,005 \text{ mg L}^{-1}$). Foi realizado o Teste-t (ZAR, 2010) para avaliar diferenças entre os valores observados e esperados para as concentrações médias de metais no efluente dos cultivos. Após a análise estatística, pode-se afirmar que as concentrações de Ni determinadas nos efluentes dos tratamentos não apresentaram diferenças significativas com os valores esperados ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Ni no efluente dos tanques de cultivo com *S. minima* (mg L⁻¹).

Dia inicial	Dia final	TOC	TC	IC	Metal
Controle					
9	12	1,68	2,01	0,34	<0,005
20	27	2,19	2,61	0,42	<0,005
28	33	2,69	3,11	0,42	
35	39	2,51	2,83	0,32	
42	47	1,49	2,53	1,03	<0,005
Níquel - 0,020 mg L⁻¹					
0	6	1,32	2,05	0,73	0,014
7	13	1,73	1,97	0,23	0,014
32	36	0,87	1,04	0,17	0,015
Níquel - 0,200 mg L⁻¹					
0	6	1,70	2,59	0,89	0,213
7	13	1,82	2,07	0,25	0,198
32	36	0,94	1,11	0,18	0,204
Níquel - 0,400 mg L⁻¹					
0	6	2,21	3,20	0,99	0,367
7	13	1,93	2,05	0,13	0,368
32	36	0,97	1,19	0,22	0,255

Tradicionalmente para remover Ni de efluentes, as técnicas químicas utilizam sais de sulfeto. Por esses procedimentos a remoção de Ni é a penúltima em eficiência sendo possível reduzir a concentração deste metal a 10⁻⁶ mg L⁻¹ (ECKENFELDER, 2000). ÇERIBASI; YETIS (2004) estudaram a absorção de Ni por um fungo (*Phanerochaete chrysosporium*) que pode estar associado às raízes de macrófitas e encontraram valores altos de remoção de Ni por esta espécie (77.96 mg g⁻¹, em cultivos com 50 mg L⁻¹).

O emprego de *S. minima* visando à remoção de Ni de efluentes industriais deve ser estudado melhor e preferivelmente utilizado em consórcio com outras espécies de macrófitas ou microrganismos que consigam remover este metal. Uma alternativa seria o consórcio com *Brassica juncea* ou *Brassica carinata* (PANWAR; AHMED; MITTAL, 2002); quando se verificou a absorção de 28.410 mg g⁻¹ de Ni.

A partir dos resultados encontrados nesse estudo, propõe-se uma alternativa para o método químico ou o uso concomitante dos dois métodos. Propõe-se que sejam utilizados procedimentos químicos para a remoção de Ni até concentrações próximas a 0,020 mg L⁻¹ e posteriormente o uso destas macrófitas no tratamento de efluentes que podem estar associados com outros microrganismos que podem aumentar a eficiência no tratamento de efluentes contaminados por Ni.

2.2.4.2 *Lemna valdiviana*

Os lotes cultivados nas concentrações de 0,020 e 0,200 mg L⁻¹ de Ni apresentaram crescimento lento (Figura 26). Quando cultivada em concentração de 0,020 mg L⁻¹ os indivíduos cresceram apenas 32,6 cm² (0,056 g) e em 0,200 mg L⁻¹ observou-se o crescimento de 20,4 cm² (0,035g). Devido aos crescimentos baixos observados na concentração de 0,200 mg L⁻¹ o tratamento com 0,400 mg L⁻¹ não foi realizado.

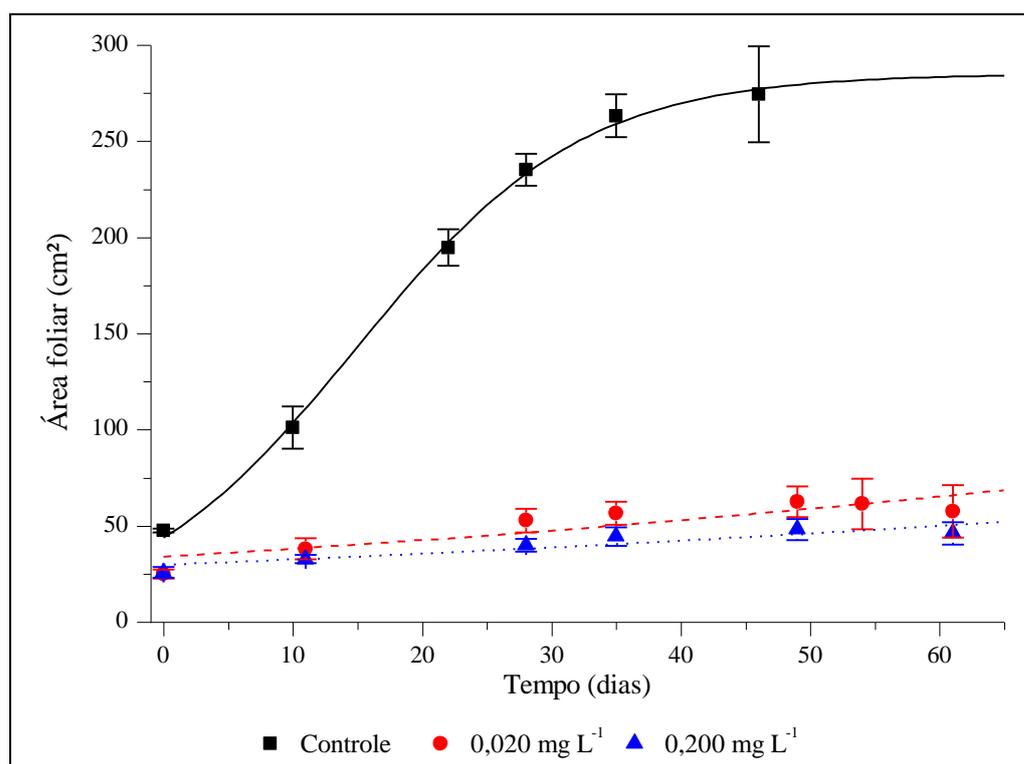


Figura 26- Áreas foliares de *L. valdiviana* (\pm DP) cultivadas em diferentes concentrações de Ni.

Na Figura 27 são apresentadas as variações de rm de *L. valdiviana* de acordo com a concentração de níquel na solução. Quando cultivadas em concentrações de 0,020 e 0,200 mg L⁻¹ de Ni os valores de rm foram, respectivamente, 0,0130 e 0,0100 dia⁻¹. Apesar do ajuste do modelo apresentar valores positivos de rm observa-se na Figura 26 que os crescimentos foram muito baixos quando comparados ao tratamento controle indicando que essas concentrações são tóxicas para essas macrófitas. De acordo com os resultados deste trabalho e de outros autores (APPENROTH et al., 2010; SEN; BHATTACHARYYA, 1994) evidencia-se que Ni é tóxico para *L. valdiviana* mesmo na concentração mais baixa selecionada (0,020 mg L⁻¹).

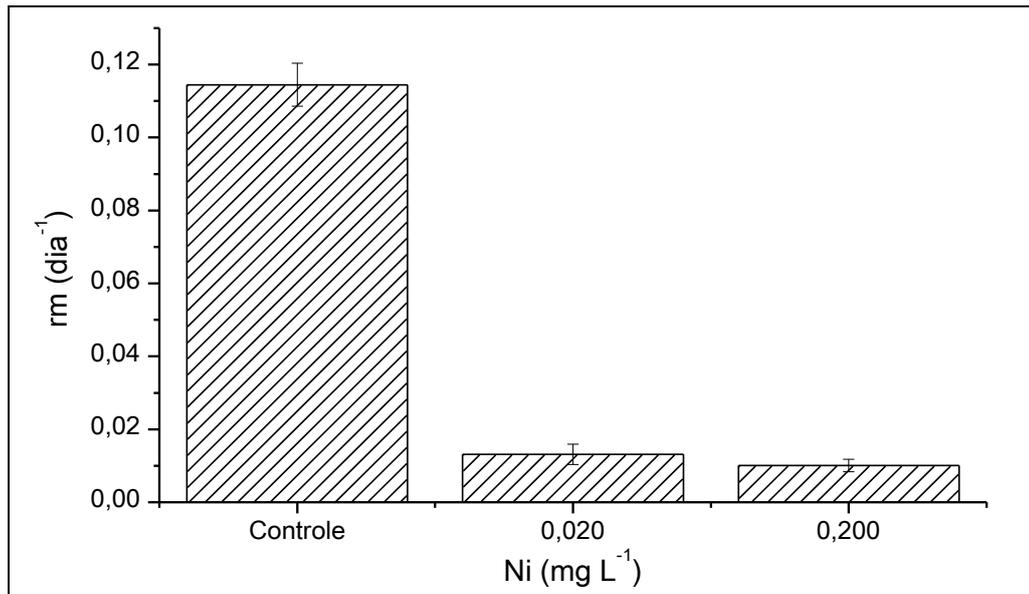


Figura 27 - Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de *L. valdiviana*, quando cultivadas em diferentes concentrações de Ni.

Na Figura 28 são apresentados os teores de Ni nos tecidos de *L. valdiviana* em função da concentração deste metal na solução de cultivo. Comparando com o tratamento controle, os teores aumentaram quando cultivados em concentrações de 0,020 e 0,200 mg L⁻¹, apesar do baixo crescimento. Outros autores têm utilizado indivíduos mortos e secos de *Lemna minor* que adsorvem Cd e Ni em seus tecidos e têm encontrado bons resultados, onde, após tratamentos químicos a adsorção de metais nos tecidos destas macrófitas chegou a 83 mg g⁻¹ de Cd e 59 mg g⁻¹ de Ni (SAYGIDEGER et al., 2005). O ajuste da curva para estimar o teor de metal (Eq. 6) resultou em valor baixo do coeficiente de determinação ($R^2= 0,80$; $N=18$) e, portanto, não foi apresentada.

Avaliando a influencia do pH no acúmulo de Ni por *Lemna minor* observou-se que quando cultivadas em pH 6,0 e 10 mg L⁻¹ de Ni por 28 dias essas macrófitas conseguiram assimilar cerca de 0,395 mg Ni g⁻¹ em seus tecidos (KAUR; GADGIL; SHARMA, 2012). Os resultados encontrados neste trabalho e pelos autores citados evidenciam a possibilidade de se utilizar indivíduos de *L. valdiviana* e outras macrófitas aquáticas para remover de Ni de meios contaminados.

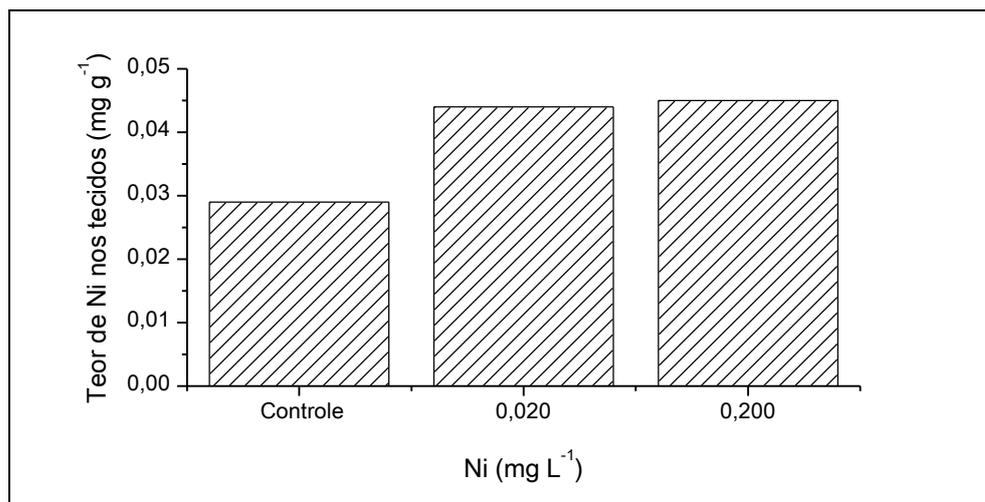


Figura 28 – Teores de Ni nos tecidos de *L. valdiviana* em função das concentrações de metal no meio de cultivo.

Na Tabela 8 são apresentados os resultados das análises de carbono e Ni no efluente dos tanques de cultivo. Mais uma vez ocorreu contaminação por algas nos recipientes prejudicando a análise do carbono exsudado por *L. valdiviana*. Apesar da disso, foi realizado o Teste-t (ZAR, 2010) para amostras de tamanhos e variações iguais (Teste-F com $p < 0,05$) visando avaliar diferenças entre nas concentrações médias de TOC presentes no efluente do tratamento controle e no efluente do tratamento com metais. Após essa análise foi possível afirmar que não houve diferença significativa entre as concentrações de TOC no efluente do tratamento controle e as concentrações dos tratamentos com Ni. ($p < 0,05$).

A análise estatística (Teste-t) utilizada para avaliar divergências entre as concentrações observadas e esperadas de metais no efluente dos recipientes de cultivo também não apresentou diferenças significativas ($p < 0,05$). Entretanto, diferente do sistema utilizado neste trabalho (fluxo contínuo), outros autores utilizando o sistema de batelada encontraram remoções de 87% de Ni quando *L. minor* foi cultivada em concentrações de $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni por 72 horas (AXTELL; STERNBERG; CLAUSSEN, 2003).

Tabela 8 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Ni no efluente dos tanques de cultivo com *L. valdiviana* (mg L^{-1}).

Dia inicial	Dia final	TOC	TC	IC	Metal
Controle					
0	5	2,20	2,49	0,29	<0,005
6	13	1,73	2,26	0,53	
29	34	2,85	4,09	1,24	<0,005
36	42	3,69	5,89	2,20	
Níquel - 0,020 mg L^{-1}					
0	5	1,77	2,61	0,84	0,014
6	13	2,50	2,96	0,45	0,023
29	34	2,15	3,18	1,03	0,015
36	42	2,59	3,96	1,37	0,014
Níquel - 0,200 mg L^{-1}					
0	5	1,17	1,84	0,67	0,204
6	13	1,70	2,07	0,38	0,203
29	34	2,39	3,59	1,20	0,206
36	42	2,31	3,63	1,32	0,201

2.2.5 Tratamento com Zinco

Os sintomas de toxicidade do Zn em plantas são caracterizados por redução no crescimento e clorose de folhas; a clorose tem relação com a deficiência de vários elementos responsáveis pela formação de cloroplastos e síntese de clorofila (BRECKLE; KAHLE, 1992). A deficiência desses elementos pode ser resultado da presença do zinco, que pode inibir, por competição, a absorção de outros íons como o ferro, devido à semelhança nos raios iônicos desses elementos (MALAVOLTA, 1994).

2.2.5.1 *Salvinia minima*

Em relação aos experimentos conduzidos com Zn, a maior área ocupada durante o período de 54 dias foi 211 cm² no cultivo com 1,00 mg L⁻¹ de Zn e a área média das plantas cultivadas nesta concentração foi 202 ± 13 cm². Apresentam-se na Figura 29 as áreas foliares acumuladas no tempo, estes resultados foram utilizados para estimar os coeficientes de crescimento. Observa-se que o cultivo em 1,00 mg L⁻¹ foi o que apresentou maiores áreas foliares em relação aos demais tratamentos. O cultivo com 0,10 mg L⁻¹ também apresentou rápido crescimento e o cultivo sem zinco apresentou crescimento até o 30^o dia e após não houve diferença significativa nos valores das áreas foliares.

O cultivo com 10 mg L⁻¹ de Zn não apresentou diferença significativa entre as áreas foliares (Teste-t) não ocorrendo crescimento, sugerindo que esta concentração seja tóxica para *S. minima*. Em outros estudos, cultivando *Salvinia auriculata* em concentrações de 7,5 e 10 mg L⁻¹ também foi observado a morte das macrófitas após 10 dias de cultivo (WOLFF et al., 2009). Por esta razão, não foram realizados os tratamentos com 100 e 1.000 mg L⁻¹.

É importante lembrar que para os experimentos com Zn não foi adicionada qualquer concentração deste metal à solução controle (o meio de cultivo com 15% de solução Hoagland-Arnon possuía para os outros experimentos 0,008 mg L⁻¹ de Zn).

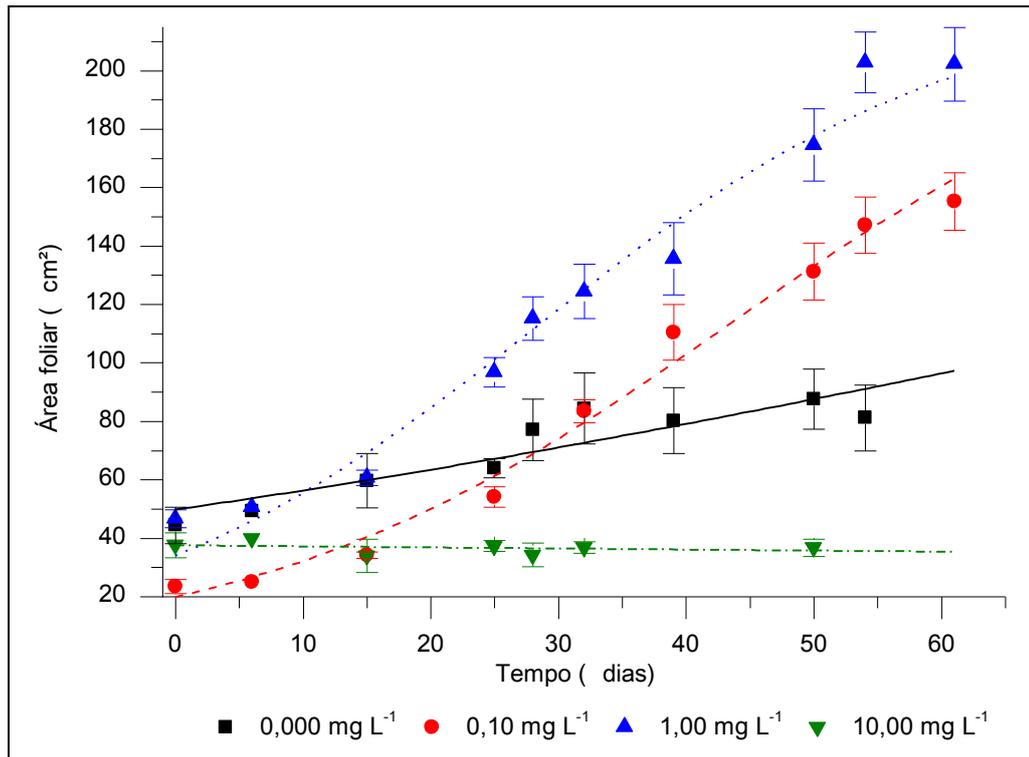


Figura 29 - Crescimentos de *S. minima* (\pm DP) em diferentes concentrações de zinco.

Na Figura 30 são apresentados os valores de rm dos cultivos com *S. minima* em função das concentrações selecionadas de zinco. O rm de *S. minima* cultivada sem Zn (controle) foi $0,0162 \text{ dia}^{-1}$. Quando cultivadas em concentrações de $0,1$ e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, os rm foram, respectivamente, $0,0541$ e $0,0609 \text{ dia}^{-1}$. As macrófitas cultivadas em concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ apresentaram rm 2,5 vezes maior que o verificado no tratamento controle. Esse resultado pode estar relacionado ao fato do Zn ser um elemento essencial (micronutriente) para o crescimento de diversas espécies vegetais e tem um importante papel na ativação de enzimas específicas como peptidases, desidrogenases, proteinases e fosfohidrolases (MEHRA; FARAGO, 2008).

Não foram observados incrementos das áreas foliares no cultivo com concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn. Dhir et al., (2008) avaliaram mudanças nas atividades fotoquímicas de *Salvinia natans* quando expostas à concentrações de 50 mg L^{-1} de Zn e observaram mudanças no potencial de assimilação de carbono pela atividade da ribulose-1,5 carboxylase/oxygenase, evidenciando que o Zn em concentrações próximas à essas podem ser tóxicas para indivíduos do mesmo gênero. Há relato de danos morfológicos, com o desenvolvimento de lesões e necroses marginais nas folhas de *S. auriculata* quando cultivada por 10 dias em concentrações de $7,5$ e 10 mg L^{-1} de Zn (WOLFF et al., 2009).

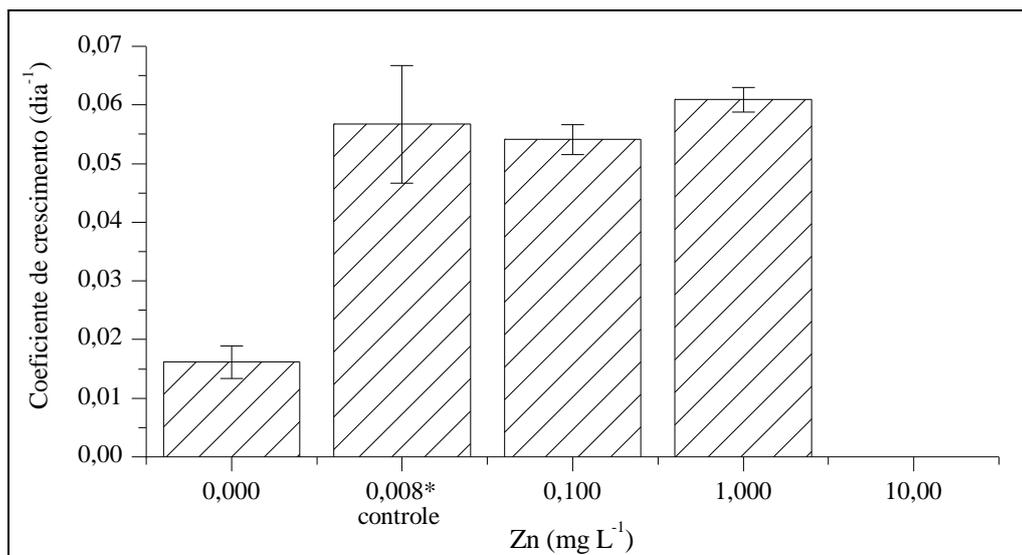


Figura 30 – Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de *S. minima*, quando cultivadas em diferentes concentrações de Zn

Os teores de Zn no tecido de *S. minima* cultivadas em diferentes concentrações de Zn são apresentados na Figura 31. Observa-se que houve um aumento nos teores dos tecidos vegetais provenientes das concentrações mais elevadas. Os indivíduos cultivados em solução de 10,0 mg L⁻¹ de Zn, apesar de não crescerem, foram os que apresentaram maior concentração deste metal em seus tecidos.

Na Figura 32 é apresentada a curva da Eq. 6 ajustada com os teores de Zn nos tecidos de *S. minima* em função do incremento das concentrações deste metal nos meios de cultivo. A análise deste ajuste indica que o teor teórico máximo de Zn em *S. minima* (R_K) foi 19,837 mg g⁻¹ ($C_1= 8,958$; $R^2=0,998$; $N=12$; $p<0,01$). Resultados semelhantes foram encontrados quando *Salvinia auriculata* foi cultivada em concentrações de 2,5 5,0 7,5 e 10 mg L⁻¹ durante 10 dias, quando também foi observado aumento no teor de metais no tecido das macrófitas (WOLFF et al., 2009). Outros autores também observaram o aumento no teor de metais (As, Cd e Zn) no tecido quando aumentadas as concentrações de metais nos meios de cultivo (GUIMARÃES et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2001; SRIDHAR et al., 2007).

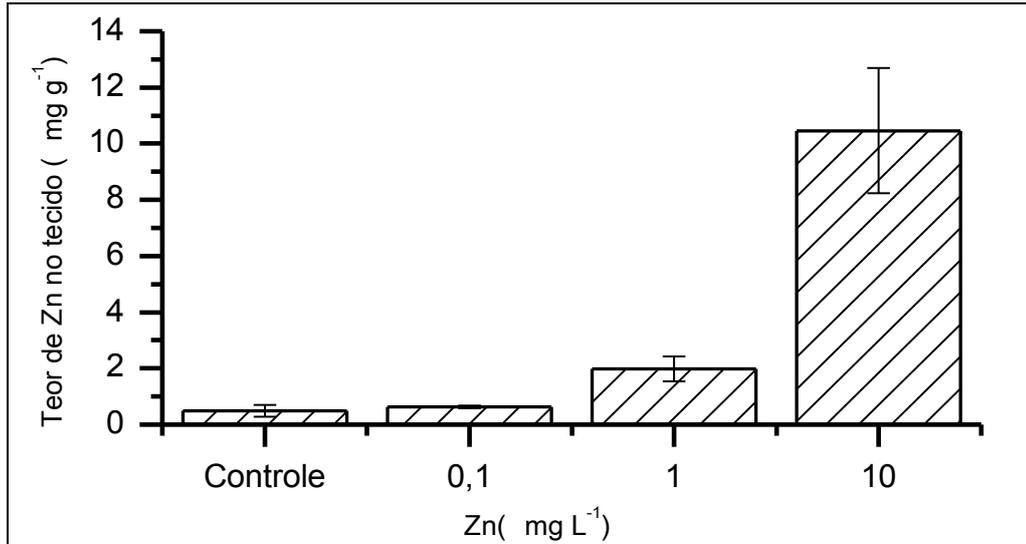


Figura 31 - Teores de Zn em *S. minima* (\pm DP) em função das concentrações de Zn na solução de cultivo.

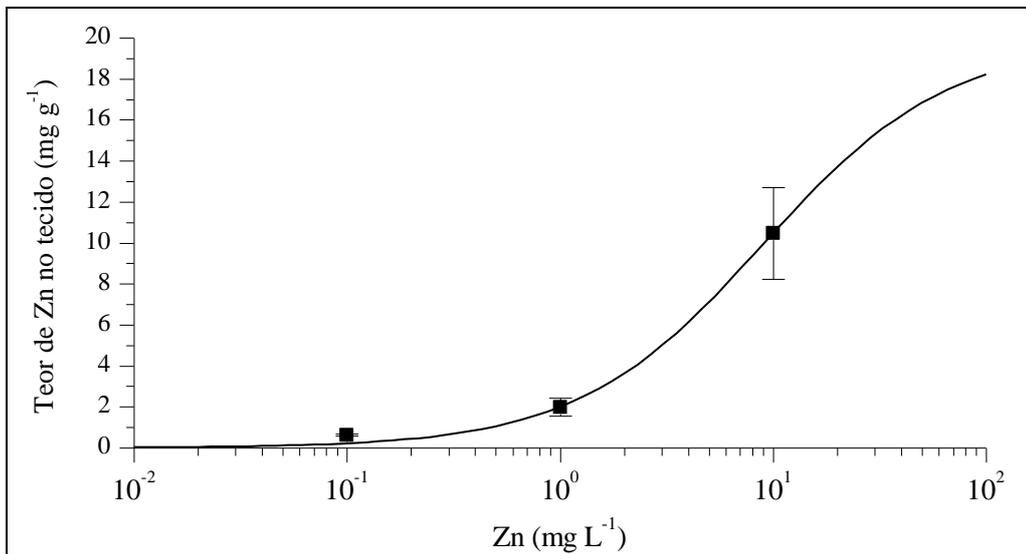


Figura 32 – Teores de Zn em *S. minima* (\pm DP) em função das concentrações deste metal no meio de cultivo (eixo das abscissas em escala logarítmica).

Durante o experimento as plantas cultivadas na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn cresceram $155,51 \text{ cm}^2$ o que corresponde ao incremento de $0,294 \text{ g}$ de massa seca. Considerando o incremento de massa seca e a quantidade de metal assimilado pelas plantas cultivadas nessa concentração, pode-se concluir que essas macrófitas assimilaram $0,583 \pm 0,128 \text{ mg}$ de Zn durante o período experimental e que estas plantas foram capazes de assimilar $0,0037 \pm 0,0008 \text{ mg}$ de Zn por cm^2 de área foliar. Durante o período experimental 30 L de solução com $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn passaram em cada recipiente, ou seja, passaram em cada unidade experimental 30 mg de Zn, nessas condições a eficiência de remoção de Zn por *S. minima* durante o período experimental foi de 2%. Para assimilar 1 mg de Zn *S. minima*

precisa crescer $266,77 \text{ cm}^2$ nas mesmas condições experimentais e estar ocupando 50% da área total do tanque e nesse caso, seria necessário um tanque com no mínimo 247 m^2 .

Na Figura 33 apresentam-se as variações das taxas diárias de crescimento em função da área do tanque coberta pela macrófita. Utilizaram-se os dados dos experimentos para ajustar uma curva polinomial. Através dessa curva foi possível estabelecer o melhor tamanho do tanque de cultivo e qual deve ser a porcentagem da área coberta por *S. minima* para que seja possível remover determinada quantidade de metal do efluente líquido, admitindo-se que sejam mantidas as mesmas condições que as dotadas no experimento. Por exemplo, se a concentração de Zn no tanque for 1 mg L^{-1} e pretende-se remover 1 mg de Zn por dia é necessário que a taxa de crescimento seja maior que $266,77 \text{ cm}^2 \text{ dia}^{-1}$, portanto, o valor de “y” da equação polinomial (Figura 33) para concentrações de 1 mg L^{-1} , deve ser maior que $266,77 \text{ cm}^2$ dividido pela área total do tanque em cm^2 , se o tanque possuir uma área de 30.000 cm^2 essa taxa vai ser atingida quando o tanque tiver entre 30 e 70% da sua área coberta.

Tendo em vista remover metais de efluentes líquidos, usualmente as remoções utilizam sais de sulfeto. No uso desse procedimento, a remoção do Zn é a que apresenta menor eficiência, sendo possível reduzir a concentração de Zn a $0,001 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (ECKENFELDER, 2000). A partir dos resultados encontrados nesse estudo, propõe-se uma alternativa para o método químico ou o uso concomitante dos dois métodos. Dessa forma pode-se economizar com a compra de sais de sulfeto e aumentar a eficiência no tratamento de efluentes contaminados com Zn. Propõe-se que sejam utilizados procedimentos químicos para a remoção de Zn a concentrações próximas a $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ e posteriormente o uso destas macrófitas no tratamento de efluentes. Contudo, estudos complementares são necessários para se encontrar a melhor concentração de Zn entre $1,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ para o crescimento de *S. minima*.

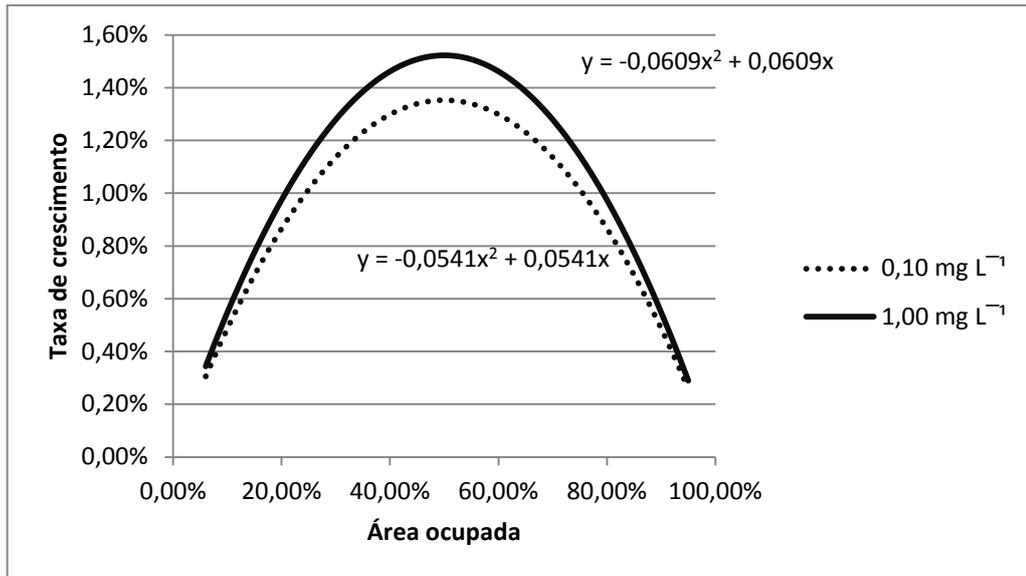


Figura 33 – Taxa diária de crescimento de *S. minima* em função da área do tanque coberta pela macrófita de acordo com as concentrações de Zn na solução.

Na Tabela 9 são apresentadas as concentrações de TOC, TC, IC e Zn no efluente do recipiente de cultivo. Não foi observada diferença entre as concentrações de TOC do tratamento controle e dos demais tratamentos com Zn ($p < 0,05$).

Diferente do observado para os demais elementos, as concentrações de Zn nos efluentes dos cultivos foram menores ($p < 0,05$). As concentrações médias de Zn nos efluentes dos tratamentos com 0,10 1,00 e 10,0 mg L⁻¹ de Zn foram respectivamente $0,017 \pm 0,004$; $0,661 \pm 0,277$ e $9,668 \pm 0,091$ mg L⁻¹. Estes valores indicam que a macrófita reduziu a concentração de Zn no meio de cultivo apesar do baixo tempo de residência (2 dias) e que esta remoção deve estar ligada aos processos de crescimento da macrófita e consequentemente a assimilação deste metal. *Salvinia natans* tem demonstrado eficiência alta (84,6%) na remoção de Zn de efluentes contaminados por misturas diversos metais como Cd, Ni, Pb e Zn (DHIR; SRIVASTAVA, 2011).

Tabela 9 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Zn no efluente dos tanques de cultivo com *S. minima* (mg L⁻¹).

Dia inicial	Dia final	TOC	TC	IC	Metal
Controle					
9	12	1,68	2,01	0,34	
20	27	2,19	2,61	0,42	
28	33	2,69	3,11	0,42	
35	39	2,51	2,83	0,32	
42	47	1,49	2,53	1,03	
Zinco - 0,10 mg L⁻¹					
0	4	1,51	1,73	0,22	0,016
4	7	3,23	3,52	0,28	0,015
7	12	1,60	1,94	0,34	0,023
12	18	1,90	2,36	0,46	0,015
Zinco - 1,00 mg L⁻¹					
0	4	1,73	2,11	0,39	0,999
4	7	1,84	2,22	0,39	0,665
7	12	1,51	1,86	0,35	0,661
12	18	0,77	1,09	0,33	0,320
Zinco - 10,00 mg L⁻¹					
0	4	1,22	1,45	0,22	9,690
4	7	2,61	2,93	0,32	9,770
7	12	1,65	2,06	0,40	9,660
12	18	2,08	2,46	0,38	9,550

2.2.5.2 *Lemna valdiviana*

Observa-se na Figura 34 que *L. valdiviana* cultivada em concentrações de 100,00 e 1.000,0 mg L⁻¹ de Zn apresentaram reduções de suas áreas foliares. As plantas cultivadas em concentração de 0,10 e 1,00 mg L⁻¹ de Zn cresceram, respectivamente, 201,0 cm² (0,343g) e 138,12 cm² (0,235g).

Na Figura 35 apresentam-se os valores de rm para *L. valdiviana* de acordo com a concentração de zinco na solução. Observou-se aumento do rm quando cultivadas em 0,1 mg L⁻¹ de Zn, esse fato deve estar associado ao fato do Zn ser um micronutriente essencial para o crescimento dessas macrófitas. Os coeficientes de crescimento foram menores nas outras concentrações de Zn sugerindo que essas concentrações elevadas sejam tóxicas para esta espécie. Não foram observados crescimentos nas concentrações de 100,0 e 1.000,0 mg L⁻¹ de Zn.

Outros autores não observaram efeitos negativos na taxa de crescimento de *Lemna gibba* quando cultivadas em concentrações de 0,01 mg L⁻¹ e 0,10 mg L⁻¹ e observaram reduções quando cultivadas em concentrações de 4; 30 e 50 mg L⁻¹ por 10 dias em sistema de batelada (MEGATELI; SEMSARI; COUDERCHET, 2009).

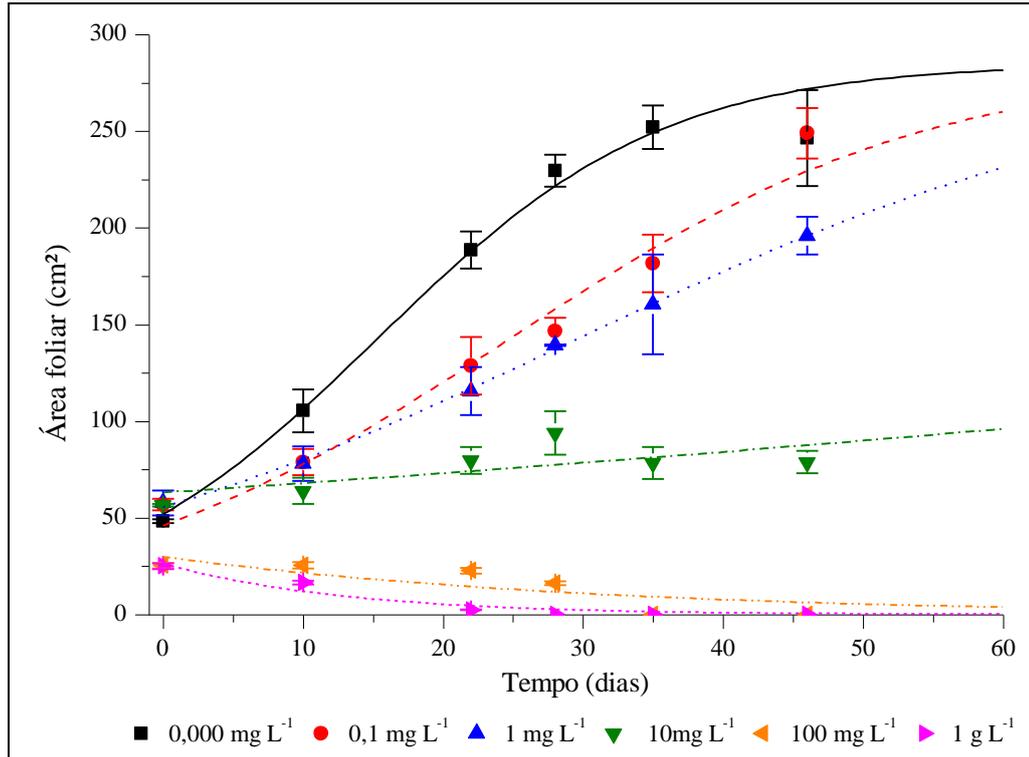


Figura 34 - Crescimentos de *L. valdiviana* (\pm DP) cultivadas em diferentes concentrações de zinco.

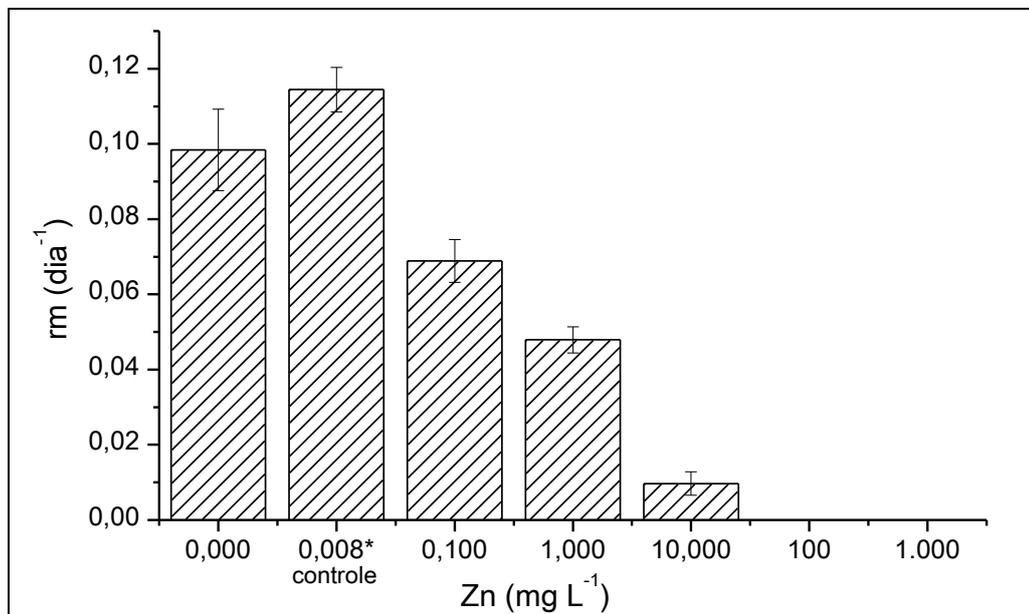


Figura 35 - Coeficientes médios de crescimento (\pm DP) de *L. valdiviana* em função de diferentes concentrações de Zn.

O coeficiente de determinação do ajuste da Eq. 3 (eq. de decaimento) para os tratamentos com Zn apresentou valores relativamente baixos ($R^2= 0,83$; $N=15$), indicando que este modelo matemático não foi adequado para explicar os dados observados nos cultivos com *S. minima* nas concentrações escolhidas para Zn e, portanto, o ajuste da curva não foi apresentado. O fato do rm ter aumentado na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn desfavoreceu o ajuste da curva de decaimento, uma vez que o modelo não prevê aumento nos valores de rm quando a concentração de metal na solução aumenta.

Na Figura 36 observa-se a Crd de *L. valdiviana* cultivada em diferentes concentrações de Zn em função da área ocupada. Observa-se a maior Crd (1,7%) quando cultivada em $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn e ocupando 50% da área total.

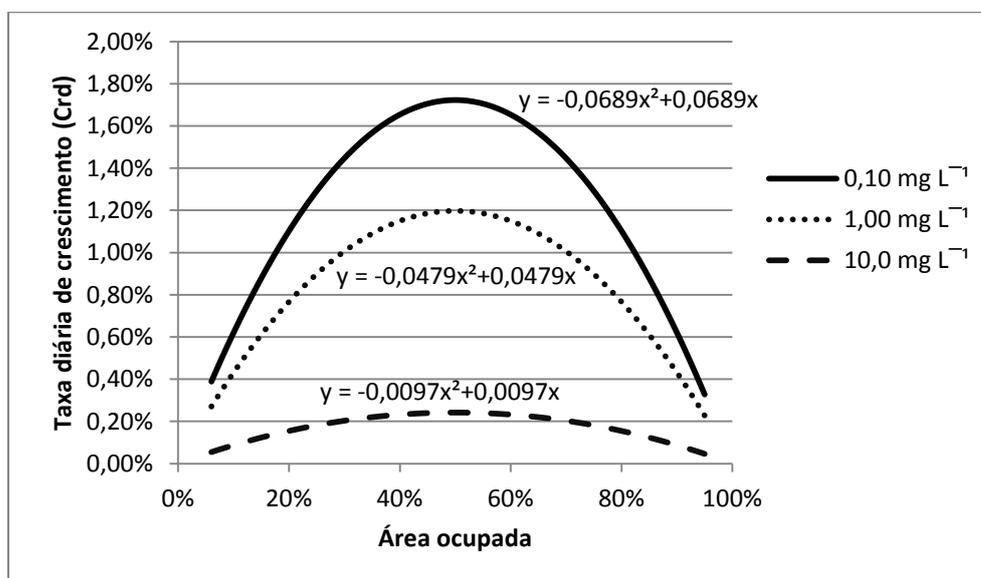


Figura 36 – Taxa diária de crescimento de *L. valdiviana* cultivada em diferentes concentrações de Zn em função da área ocupada (%).

Na Figura 37 apresentam-se os teores de Zn (mg g^{-1}) em *L. valdiviana* de acordo com a concentração de Zn em que foi cultivada (mg L^{-1}). Como observado para os demais elementos selecionados, os teores de Zn nos tecidos das plantas também aumentaram conforme o incremento de Zn no meio. Entretanto, observou-se que na concentração mais alta ($1,00 \text{ g L}^{-1}$) o teor de Zn diminuiu. O ajuste da curva para estimar o teor de metal (Eq. 6) resultou em valor baixo do coeficiente de determinação ($R^2= 0,80$; $N=18$) e, portanto, a curva não foi apresentada. O resultado menor no teor de Zn encontrado quando o cultivo foi realizado em $1,00 \text{ g L}^{-1}$ prejudicou o ajuste da Eq. 6 (decréscimo de rm), pois esta não prevê reduções no valor conforme aumenta-se a concentração de metal no meio.

Em outro trabalho de fitoacumulação de Zn por *Lemna gibba*, há relato que essas macrófitas foram capazes de assimilar 4,23 15,62 23,88 e 25,81 mg g⁻¹ quando expostas por 10 dias, respectivamente, às seguintes concentrações: 6,30 9,92 14,23 e 17,57 mg L⁻¹ de Zn, em que os percentuais de remoção variaram de 61 a 71% (KHELLAF; ZERDAOUI, 2009).

Lemna. minor foi capaz de remover Zn de meios contaminados com 1, 2, 4 e 8 mg L⁻¹ de Zn após 14 dias e sua capacidade em acumular este metal em seus tecidos foram respectivamente 0,717; 1,284; 2,227 e 3,698 mg g⁻¹ (JAIN; VASUDEVAN; JHA, 1989)

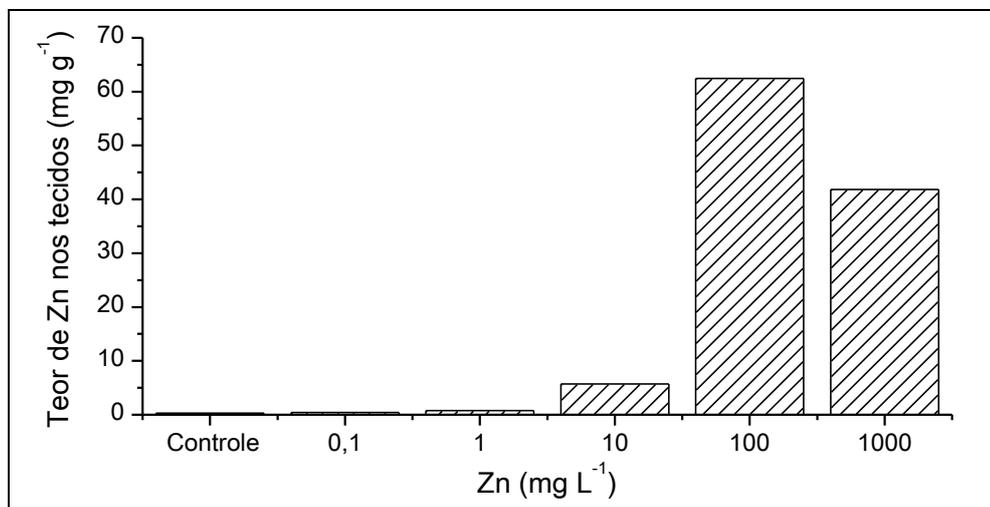


Figura 37 – Teores de Zn nos tecidos de *L. valdiviana* em função das concentrações de metal na solução de cultivo.

Na Tabela 10 são apresentadas as concentrações de TOC, TC, IC e Zn no efluente do recipiente de cultivo. Não foi observada diferença entre as concentrações de TOC do tratamento controle e dos demais tratamentos com Zn ($p < 0,05$).

Em relação às concentrações de metais nos efluentes dos recipientes de cultivo observaram-se reduções nos valores ($p < 0,05$) quando o cultivo foi realizado na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn. Não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de metal esperada e observada no tratamento com $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn. Em outros trabalhos *L. gibba* mostrou um excelente desempenho em remover respectivamente 100%, 90% e 77% de Zn, Cd e Cu do meio após 10 dias de cultivo em concentrações de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn; $1,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd e $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu (MEGATELI; SEMSARI; COUDERCHET, 2009).

Tabela 10 - Concentrações de carbono orgânico total (TOC), carbono total (TC), carbono inorgânico (IC) e concentração de Zn no efluente dos tanques de cultivo com *L. valdiviana* (mg L^{-1}).

Dia inicial	Dia final	TOC	TC	IC	Metal
Controle					
0	5	2,20	2,49	0,29	
6	13	1,73	2,26	0,53	
29	34	2,85	4,09	1,24	
36	42	3,69	5,89	2,20	
Zinco - $0,10 \text{ mg L}^{-1}$					
0	11	2,00	3,28	1,28	0,02
11	20	1,94	2,51	0,57	0,01
20	29	1,74	2,71	0,97	<0,005
36	41	3,32	4,35	1,04	<0,005
43	49	1,40	2,36	0,96	
Zinco - $1,00 \text{ mg L}^{-1}$					
0	11	2,11	4,32	2,20	0,99
11	20	2,59	2,98	0,39	0,67
20	29	1,85	2,13	0,28	
36	41	3,24	4,30	1,06	
43	49	2,03	3,16	1,13	
Zinco - $10,00 \text{ mg L}^{-1}$					
0	11	354,70*	379,00	24,25	
11	20	1,84	2,62	0,78	
20	29	1,67	2,13	0,46	
36	41	3,63	4,54	0,90	
43	49	2,63	3,55	0,92	

*Valor não incluído na análise estatística devido à contaminação por algas.

2.2.6 Comparações entre as toxicidades dos metais

2.2.6.1 *Salvinia minima*

Na Figura 38 são apresentados os valores relativos dos coeficientes de crescimento de *S. minima* em função da concentração dos quatro metais selecionados; nesse caso, 1 refere-se ao valor de r_m do controle ($0,0567 \text{ dia}^{-1}$). Observa-se que houve redução de 44%, 86% e 100% quando cultivadas respectivamente com 0,003; 0,030 e 0,300 e mg L^{-1} de Cd. Quando cultivadas com 0,020; 0,200 e 0,400 mg L^{-1} de Ni houve redução de 54%, 64% e 79%, respectivamente. Observaram-se diminuições nos valores r_m de 27%, 63% e 69% quando cultivadas respectivamente com 0,010; 0,100 e 1,00 mg L^{-1} de Pb. Quando cultivadas sem zinco a diminuição do r_m foi de 71% e quando cultivadas com 0,100 e 1,00 mg L^{-1} de Zn o crescimento não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) do crescimento observado no tratamento controle ($0,008 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn).

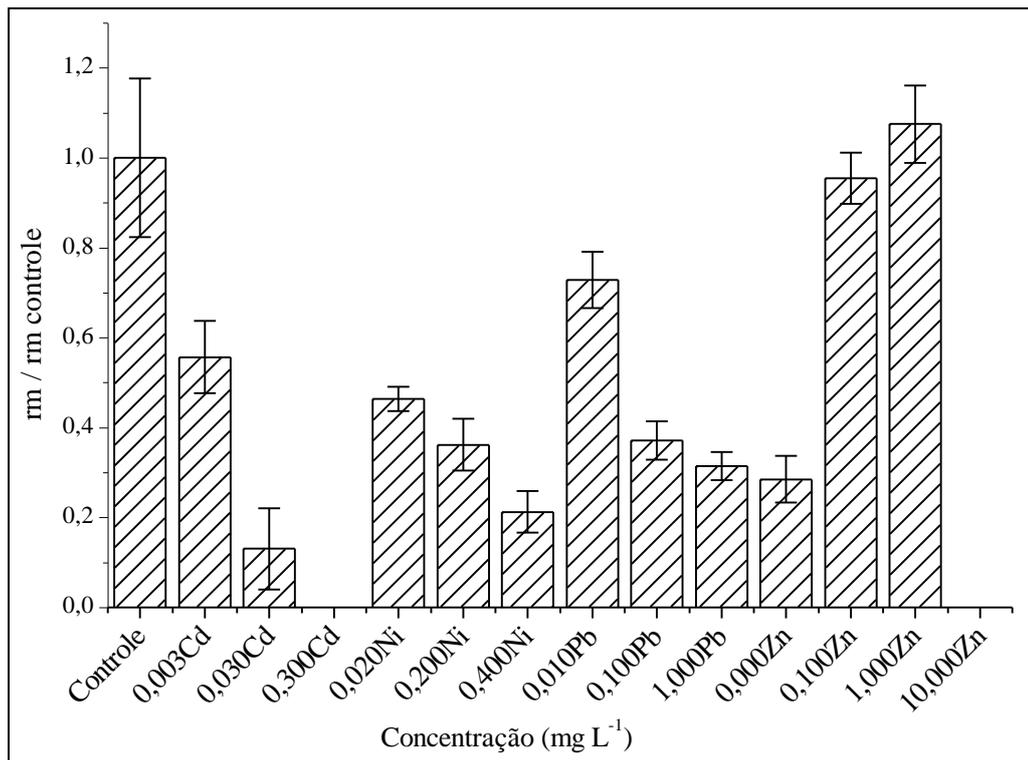


Figura 38 – Coeficientes de crescimento relativo (\pm DP) de *S. minima* em função das concentrações de metais no meio.

Na Tabela 11 são apresentados os valores do coeficiente de crescimento (rm), teor de metal no tecido (R), taxa máxima de remoção de metais (Txa) considerando a área total disponível de 1m², a área mínima necessária (A) para remover a concentração de metal em que o cultivo esta sendo realizado (i.e. se *S. minima* for cultivada em 0,003 mg L⁻¹ de Cd é necessária uma área mínima de 0,54 m² para remover 0,003 mg de Cd por dia da solução) e o fator de bioacumulação (BCF) da *S. minima* de acordo com as concentrações de metais na solução.

Entre todos os metais, o maior valor do rm (0,061 dia⁻¹) e a maior taxa de remoção (Txa= 571 µg m⁻² dia⁻¹) foram observados quando *S. minima* foi cultivada em 1,00 mg L⁻¹ de Zn. A menor área teórica necessária (0,54 m²) para remover Cd do meio de cultivo foi observada quando *S. minima* foi cultivada em 0,003 mg L⁻¹.

O maior fator de bioacumulação (12.571) foi observado quando o cultivo foi realizado em 0,100 mg L⁻¹ de Pb. De acordo com ZAYED; GOWTHAMAN; TERRY (1998) as plantas são consideradas boas acumuladoras de metais quando o BCF é maior que 1.000. Nos resultados observados neste trabalho para *S. minima*, o único valor do BCF inferior a 1.000 foi observado no cultivo com 0,400 mg L⁻¹ de Ni, indicando que, de maneira geral, *S. minima* é boa bioacumuladora de Cd, Pb e Zn e, dependendo da concentração, de Ni.

Tabela 11 – Valores do coeficiente de crescimento (rm), teor (R), taxa máxima de remoção de metais (Txa), área mín. necessária (A) e fator de bioacumulação (BCF) da *S. minima* de acordo com as concentrações de metais na solução.

Tratamento (mg L ⁻¹)	rm (dia ⁻¹)	R (mg g ⁻¹)	Txa máx. (µg m ⁻² dia ⁻¹)	A mín (m ²)	BCF
Controle	0,057				
0,003 Cd	0,032	0,037	5,52	0,54	12.353
0,030 Cd	0,007	0,086	3,01	9,98	2.876
0,300 Cd	0,000	0,803	n.d.	n.d.	2.676
0,020 Ni	0,026	0,130	16,08	1,24	6.480
0,200 Ni	0,021	0,677	65,52	3,05	3.386
0,400 Ni	0,012	0,360	20,46	19,55	900
0,010 Pb	0,041	0,024	4,75	2,11	2.439
0,100 Pb	0,021	1,257	124,72	0,80	12.571
1,000 Pb	0,018	1,786	150,26	6,66	1.786
0,000 Zn	0,016	0,481	n.d.	n.d.	n.d.
0,100 Zn	0,054	0,625	159,50	0,63	6.249
1,000 Zn	0,061	1,986	571,00	1,75	1.986
10,00 Zn	0,000	10,464	n.d.	n.d.	1.046

n.d. - Não determinado

OLGUÍN; HERNÁNDEZ; RAMOS (2002) avaliando bioconcentrações em macrófitas observaram que *S. minima* cultivada por 5 dias em solução com 4,00 mg L⁻¹ de Cd acumulou nos tecidos 10,930 mg g⁻¹ e obtiveram um BCF = 2718. O valor encontrado pelos autores é próximo ao calculado neste trabalho (BCF_{0,300mg L.Cd}= 2.676 e BCF_{0,030mg L.Cd}=2.876).

Quando cultivada em 10 mg L⁻¹ de Zn e 0,300 mg L⁻¹ de Cd não foram observados crescimentos de *S. minima*. Comparando o efeito tóxico entre os metais na mesma ordem de grandeza das concentrações, observou-se maior toxidez de Cd (0,300 mg L⁻¹) em relação aos outros metais (0,400 mg L⁻¹ Ni; 0,100 mg L⁻¹ Pb e 0,100 mg L⁻¹ Zn). Analisando os dados apresentados na Figura 38, pode-se afirmar que mesmo baixas concentrações de Cd são tóxicas para *S. minima* e que, apesar das concentrações do metal em seus tecidos ter aumentado quando aumentou-se a concentração deste metal no meio, a planta é tão sensível que a Txa não aumentou (Tabela 11). Reduções nos pigmentos fotossintéticos quando expostos à metais já foram reportados por diversos autores para outras espécies de *Salvinia* (AL-HAMDANI; BLAIR, 2004; HADAD et al., 2007; NICHOLS; COUCH; AL-HAMDANI, 2000).

OLGUÍN; HERNÁNDEZ; RAMOS (2002) avaliando bioconcentração de *S. minima* cultivada por 5 dias em solução com 3,00 mg L⁻¹ de Pb, observaram acúmulo de 9,780 mg g⁻¹ nos tecidos e obtiveram um BCF = 3.304. Esses valores são bem maiores que os observados neste estudo, quando a mesma espécie foi cultivada em 1,00 mg L⁻¹ Pb (R = 1,786 mg g⁻¹; BCF = 1786), outros testes são necessários para encontrar o fator máximo de bioacumulação de Pb por essa macrófita. Talvez a divergência entre os valores encontrados pelos dois trabalhos resida na concentração do metal na solução de cultivo e no tempo de contato da macrófita com o meio, já que neste experimento as plantas foram cultivadas por 55 dias e não foi observado o crescimento da planta e no trabalho de Olgúin et al. (2002) a planta permaneceu em contato com a solução por 5 dias e o sistema não era de fluxo contínuo.

Em um trabalho mais recente, OLGUÍN et al. (2005) cultivaram *S. minima* em soluções com 12,9 mg L⁻¹ de Pb e encontraram 27,473 mg g⁻¹ deste metal acumulados e adsorvidos nos tecidos (BCF = 2.129). Estes autores encontraram Pb aderido aos tecidos externos da planta (adsorvidos) e na região intracelular e intersticial (acumulados) e concluíram que *S. minima* pode remover Pb do meio de cultivo através desses dois processos. A adsorção de metais por macrófitas também foi descrito por SCHNEIDER; RUBIO (1999); os autores sugeriram que a adsorção de metais no tecido externo da planta esteja relacionada a mecanismos de troca iônica e poderiam estar relacionados aos grupos carboxílicos presentes na parede celular. Esse

mecanismo torna *S. minima* ainda mais propícia ao uso tendo em vista a remoção de metais, pois as ligações são feitas no tecido externo da planta, evitando que o metal torne-se tóxico através da interferência nos processos fisiológicos.

Apesar de não ocorrer crescimento da planta quando cultivada em 10 mg L^{-1} de Zn, nesta concentração foi observada a maior assimilação deste elemento ($10,464 \text{ mg g}^{-1}$). Quando cultivada em $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ por 54 dias a assimilação total foi $0,7581 \text{ mg}$ de Zn quando ocupou uma área de $202,22 \text{ cm}^2$ ($0,3818\text{g}$).

2.2.6.2 *Lemna valdiviana*

Na Figura 39 são apresentados os valores relativos dos coeficientes de crescimento de *L. valdiviana* em função da concentração dos quatro metais selecionados ($r_{\text{controle}}=0,1145 \text{ dia}^{-1}$). Observa-se que houve uma redução de 65%, 93%, 96% e 100% quando cultivadas respectivamente com $0,003$; $0,030$; $0,300$ e $0,600 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd. Quando cultivadas com $0,020$ e $0,200 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni houve uma redução de 89% e 91%, respectivamente. Quando cultivadas sem zinco o crescimento não foi significativamente diferente ($p<0,05$) do crescimento observado no tratamento controle ($0,008 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn). Houve diminuição de 40%, 58% e 92% quando cultivada em $0,10$; $1,00$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn, respectivamente, e reduções de 100% quando cultivadas em $100,0$ e $1.000,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn.

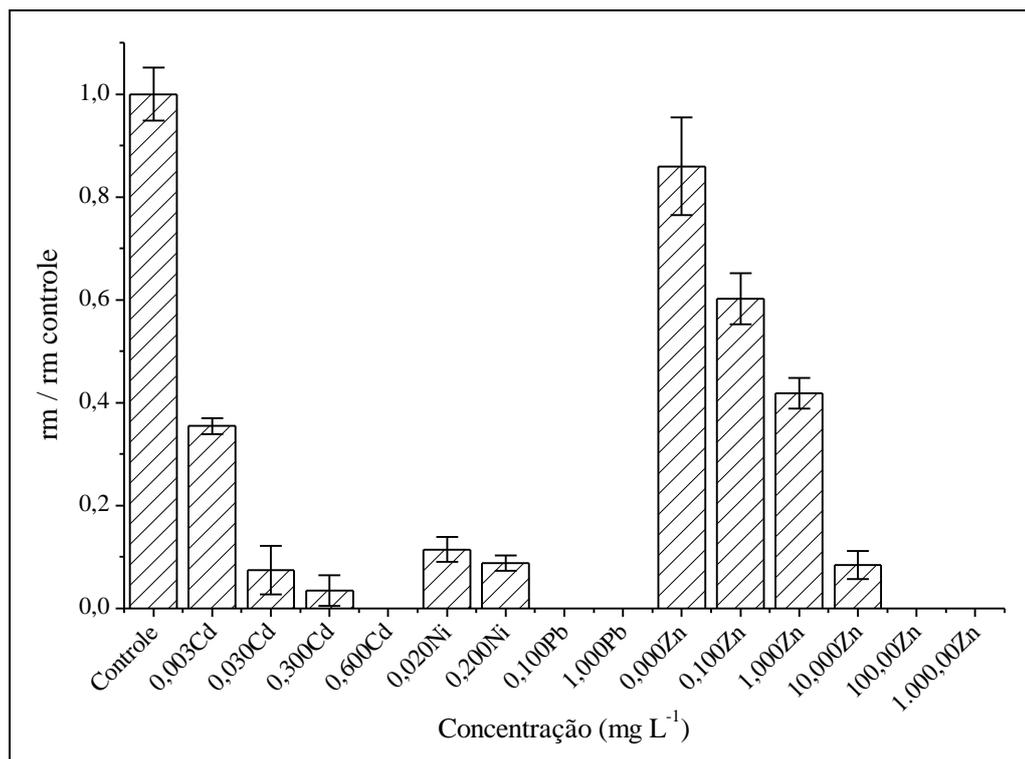


Figura 39 – Coeficientes de crescimento relativo (\pm DP) de *L. valdiviana* em função das concentrações de metais no meio.

Observou-se que nas concentrações de 0,100 mg L⁻¹, o Pb diminuiu 100% o coeficiente de crescimento e o Zn não causou efeitos tóxicos, o Cd afetou negativamente o crescimento de *L. valdiviana* a partir de 0,003 mg L⁻¹, evidenciando a toxicidade de Cd e Pb para essa macrófita.

Na Tabela 12 observam-se os valores do coeficiente de crescimento, dos teores de metais, das taxas máximas de remoção de metais, das áreas mínimas necessárias para remover a concentração de metal em que a planta está sendo cultivada (i.e. se a concentração da solução for 0,003 mg L⁻¹ de Cd para remover 0,003 mg L⁻¹ de Cd por dia seria necessária uma área mínima de 0,72 m²) e fator de bioacumulação da *L. valdiviana* de acordo com as concentrações de metais na solução.

Apesar de não observado o crescimento na concentração de 100,0 mg L⁻¹ de Zn, foi nesta concentração em que houve a maior assimilação ($R = 62,465 \text{ mg g}^{-1}$) entre todos os metais. A maior taxa de remoção de metais por m² foi observado quando *L. valdiviana* foi cultivada em 10 mg L⁻¹ de Zn apesar do baixo crescimento ($rm = 0,010$; 8% em relação ao controle). A menor área teórica necessária para remover 0,100 mg Zn por dia é 0,47 m². O maior fator de bioacumulação ($BCF = 8.000$) foi observado quando *L. valdiviana* foi cultivada

em 0,003 mg L⁻¹ de Cd. Valores de BCF maiores que 1.000 foram observados quando *L. valdiviana* foi cultivada em 0,003; 0,300 e 0,600 mg L⁻¹ de Cd; em 0,020 mg L⁻¹ de Ni e em 0,100 mg L⁻¹ de Zn.

Tabela 12 - Valores do coeficiente de crescimento (rm), teor (R), taxa máxima de remoção de metais (Txa), área mín. necessária (A) e fator de bioacumulação (BCF) da *L. valdiviana* de acordo com as concentrações de metais na solução.

Tratamento mg L ⁻¹	rm dia ⁻¹	R mg g ⁻¹	Txa máx. µg m ⁻² dia ⁻¹	A mín. m ²	BCF
Controle	0,114				
0,003 Cd	0,041	0,024	4,15	0,72	8.000
0,030 Cd	0,009	0,150	5,48	5,48	500
0,300 Cd	0,004	1,300	22,26	13,48	4.333
0,600 Cd	0,000	1,150	n.d.	n.d.	1.917
0,020 Ni	0,013	0,044	2,46	8,14	2.200
0,200 Ni	0,010	0,045	1,93	103,82	225
0,000 Zn	0,098	0,320	n.d.	n.d.	n.d.
0,100 Zn	0,069	0,440	214,50	0,47	4.400
1,000 Zn	0,048	0,750	153,02	6,53	750
10,00 Zn	0,010	5,739	236,37	42,31	574
100,0 Zn	0	62,465	n.d.	n.d.	625
1.000 Zn	0	41,826	n.d.	n.d.	42

n.d. - não determinado

Em outro estudo os BCFs apresentados por *L. gibba* para Ni foram 100; 33,3 e 40 quando cultivadas respectivamente em 0,1; 0,3 e 0,5 mg L⁻¹ por 4 dias (KHELLAF; ZERDAOUI, 2010). Comparando com os resultados observa-se que os BCFs encontrados neste trabalho são 2 vezes maiores que os encontrados pelos outros autores. Esta diferença pode estar relacionada ao maior tempo de retenção, às diferenças nos fatores abióticos e nas concentrações do metal dos dois trabalhos. Em outro estudo o BCF apresentado por *L. minor* foi 600 quando cultivada por 14 dias na concentração de 1,0 mg L⁻¹ de Ni e reduziu para aproximadamente 200 quando cultivada em concentrações maiores que 5 mg L⁻¹ (KAUR; GADGIL; SHARMA, 2008).

O BCF para *L. minor* foi de 1275±32 quando cultivada por 72h em 0,0015 mg L⁻¹ de Cd (BIANCONI et al., 2013). Valor menor que o encontrado neste trabalho (BCF=8.000) quando cultivada em 0,003 mg L⁻¹ de Cd.

2.2.6.3 Comparações entre as macrófitas

A legislação brasileira vigente (BRASIL, 2011) permite o lançamento de efluentes com concentrações de $0,200 \text{ mg L}^{-1}$ de cádmio. *S. minima* cultivadas em concentrações próximas a esta ($0,300 \text{ mg L}^{-1}$) apresentou inibição de 100% do seu crescimento ($r_m = 0 \text{ dia}^{-1}$) e *L. valdiviana* apresentou 96% de inibição ($r_m = 0,004 \text{ dia}^{-1}$). Portanto, a hipótese de que estas macrófitas permitem a fitorremediação de efluentes com essa concentração de Cd é falsa.

Em relação ao Pb, a concentração máxima permitida para o lançamento de efluentes é $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (BRASIL, 2011). Os coeficientes de crescimento de *S. minima* cultivadas em $0,10$ e $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ deste metal foram respectivamente $0,0210$ e $0,0179 \text{ dia}^{-1}$ (63 e 69% de inibição do crescimento). Em relação à *L. valdiviana*, quando cultivadas em concentrações maiores que $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb não foi observado o crescimento desta macrófita ($r_m = 0 \text{ dia}^{-1}$). Logo, a hipótese do uso de *L. valdiviana* para a fitorremediação de efluentes contaminados com $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb é falsa, e verdadeira para *S. minima*.

A concentração de Ni máxima permitida pela legislação para o lançamento de efluentes é 2 mg L^{-1} (BRASIL, 2011). Quando *S. minima* foi cultivada em concentrações de $0,400 \text{ mg L}^{-1}$ deste elemento o r_m foi $0,0120 \text{ dia}^{-1}$, a inibição do crescimento foi de 79%, e evidenciou-se uma tendência ao aumento da inibição com o aumento das concentrações. Quando *L. valdiviana* foi cultivada em $0,200 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni foi observada inibição de 91% do crescimento. A hipótese do uso de *S. minima* para fitorremediação do Ni não pôde ser avaliada com certeza, pois seriam necessários experimentos em concentrações mais próximas às permitidas pela legislação. Entretanto, o uso de *S. minima* e de *L. valdiviana* para o tratamento de efluentes contaminados com Ni deve ser evitado, pois foram observados valores altos de inibição do crescimento e baixas taxas de remoção (Tabelas 11 e 12).

Em relação ao Zn a concentração máxima permitida pela legislação (BRASIL, 2011) é 5 mg L^{-1} . A variação do coeficiente de crescimento de *S. minima* quando cultivadas em $1,0$ e $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ foi alta. Quando *S. minima* foi cultivada em concentrações de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ observaram-se crescimentos próximos aos crescimentos do tratamento controle e quando cultivadas em 10 mg L^{-1} de Zn não foi observado crescimento (Figura 38). Os coeficientes de crescimento de *L. valdiviana* quando cultivadas em concentrações de $1,0$ e 10 mg L^{-1} de Zn foram respectivamente $0,0479$ e $0,0097$ (58 e 92% de inibição do crescimento). Sugere-se que estudos em concentrações intermediárias devam ser feitos para avaliar o uso potencial desta macrófita em concentrações de 5 mg L^{-1} .

Concentrações de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd diminuem o crescimento de *S. minima* (56%) e *L. valdiviana* (35%) e quando cultivadas nesta concentração *S. minima* é capaz de bioacumular mais Cd ($\text{BCF}=12.353$) que *L. valdiviana* ($\text{BCF}=8.000$). Entretanto, quando cultivadas em $0,300 \text{ mg L}^{-1}$ *L. valdiviana* conseguiu assimilar mais Cd ($R=1,300 \text{ mg g}^{-1}$) que *S. minima* ($R=0,803 \text{ mg g}^{-1}$). O uso de *L. valdiviana* ($\text{Txa}_{\text{máx}}= 22,26 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) é mais eficiente no tratamento de efluentes contaminados com Cd que *S. minima* ($\text{Txa}_{\text{máx}}= 5,52 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$).

Concentrações de $0,020 \text{ mg L}^{-1}$ de Ni são mais tóxicas para *L. valdiviana* ($\text{rm}_{\text{relativo}}= 0,11$) que para *S. minima* ($\text{rm}_{\text{relativo}}= 0,46$) e nesta concentração o fator de bioacumulação e o teor de metal nos tecidos de *S. minima* ($\text{BCF}=6.480$; $R=0,130$) foram maiores que os observados para *L. valdiviana* ($\text{BCF}=2.200$; $R=0,044 \text{ mg g}^{-1}$). O uso de *S. minima* ($\text{Txa}_{\text{máx}}= 65,52 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) é mais eficiente no tratamento de efluentes contaminados com Ni que *L. valdiviana* ($\text{Txa}_{\text{máx}}= 2,46 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$).

Concentrações de $0,100 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb afetaram negativamente o crescimento de *S. minima* (37%) e foram extremamente tóxicas para *L. valdiviana* ($\text{rm}=0$).

Concentrações de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn não prejudicaram o crescimento de *S. minima* ($\text{rm}_{\text{relativo}}= 1,07$) e *L. valdiviana* ($\text{rm}_{\text{relativo}}= 0,91$) e em concentrações de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ são tóxicos para as duas macrófitas ($\text{rm}= 0$ para *S. minima* e $\text{rm}_{\text{relativo}}= 0,08$ para *L. valdiviana*). Quando cultivadas em $0,100 \text{ mg L}^{-1}$ *S. minima* bioacumulou mais Zn ($\text{BCF}=6.249$) que o de *L. valdiviana* ($\text{BCF}=4.400$) e quando cultivadas em $10,0 \text{ mg L}^{-1}$ *S. minima* conseguiu assimilar $10,464 \text{ mg g}^{-1}$ em seus tecidos enquanto *L. valdiviana* assimilou $5,739 \text{ mg g}^{-1}$. A eficiência da *L. valdiviana* ($\text{Txa}_{\text{máx}}= 236,37 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$) em tratar efluentes contaminados com Zn é menor que a de *S. minima* ($\text{Txa}_{\text{máx}}= 571,00 \text{ } \mu\text{g m}^{-2} \text{ dia}^{-1}$).

2.2.7 Cultivo de *S. minima* visando à remoção de metais de efluente de galvanoplastia

O tratamento do efluente bruto com o CaOH buscava uma alternativa química que permitisse o crescimento de *S. minima* no efluente tratado, uma vez que não houve crescimento das plantas no efluente tratado com NaOH. Entretanto, mesmo utilizando esta alternativa não houve crescimento da macrófita e, portanto, a determinação da concentração de metais no efluente tratado utilizando CaOH não foi realizado e por isso não apresentado na Tabela 2.

Apresenta-se na Figura 40 o crescimento de *S. minima*, representado pela sua área foliar, durante o período experimental. As plantas cultivadas na solução controle cresceram normalmente ($rm = 0,0451 \pm 0,0035 \text{ dia}^{-1}$, $N = 3$), o valor do rm encontrado assemelhou-se com os valores encontrados para o crescimento de *S. minima*, conduzido outras vezes neste trabalho ($rm = 0,0567 \pm 0,0100 \text{ dia}^{-1}$, $N = 12$).

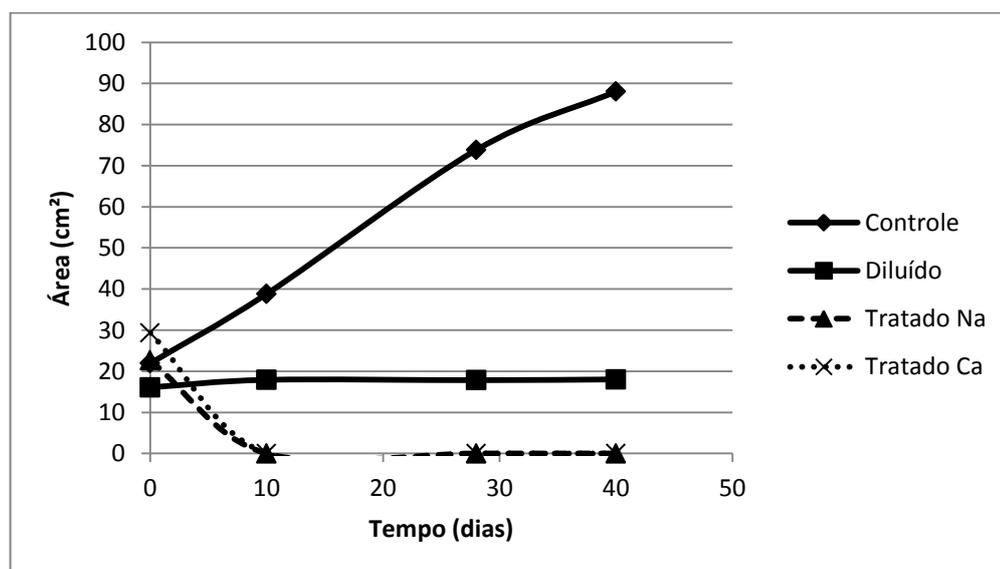


Figura 40 – Crescimento de *Salvinia minima* cultivadas em efluente de galvanoplastia.

As plantas cultivadas na solução diluída cresceram muito pouco no período de 40 dias ($rm = 0,00231 \pm 0,00121 \text{ dia}^{-1}$). Este resultado indica que mesmo o efluente diluído 1000 vezes impediu o crescimento normal de *S. minima*. Além dos elementos considerados nos testes anteriores, a solução diluída continha concentrações de alumínio, estanho, ferro, cromo, cobre e boro cuja toxicidade não foi avaliada neste trabalho. As concentrações dos outros metais foram muito baixas para serem avaliadas ou estavam abaixo das concentrações tóxicas para *S. minima* (cádmio, chumbo, níquel, zinco, magnésio, manganês e molibdênio).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 13 evidencia-se que, mesmo não ocorrendo crescimento significativo das plantas cultivadas em solução diluída, houve aumentos nos teores de metais nos tecidos de *S. minima* após o cultivo com efluente diluído (23,35 vezes de níquel; 14,64 vezes de prata; 7,74 vezes de cromo e; 6,38 vezes de alumínio). Observou-se também que houve aumento na concentração de diversos outros metais com exceção do boro e estanho. Estes resultados indicam que o uso destas macrófitas para remoção de metais pode ser uma alternativa para o tratamento de efluentes, mesmo não ocorrendo o crescimento dos indivíduos.

Não foram observados aumentos nos teores de manganês, magnésio e sódio. Entretanto, observa-se que estes elementos são importantes para o desenvolvimento destes organismos, uma vez que grandes quantidades destes elementos foram verificadas nos tecidos de *S. minima* quando cultivadas na solução controle e na solução diluída. Esse fato sugere que estes elementos podem ser removidos da água através do crescimento destes indivíduos.

Tabela 13 – Teor de metais nos tecidos de *S. minima* após 40 dias de cultivo em solução controle (tecido-controle) e com efluente diluído (tecido-diluído).

Parâmetro	Unidade	Tecido- Controle	Tecido-Diluído	% de metal em relação ao controle
Alumínio	mg.kg ⁻¹	29,19	63,63	218%
Antiônio	mg.kg ⁻¹	<0,50	<0,50	
Arsênio	mg.kg ⁻¹	<0,60	<0,60	
Bário	mg.kg ⁻¹	2,56	16,33	638%
Bismuto	mg.kg ⁻¹	<1,50	<1,50	
Boro	mg.kg ⁻¹	15,95	12,67	79%
Cádmio	mg.kg ⁻¹	<0,50	<0,50	
Cálcio	mg.kg ⁻¹	9.306,57	10.994,65	118%
Chumbo	mg.kg ⁻¹	2,78	8,44	304%
Cobalto	mg.kg ⁻¹	1,66	3,66	220%
Cobre	mg.kg ⁻¹	106,53	306,02	287%
Cromo	mg.kg ⁻¹	<0,80	6,19	774%
Estanho	mg.kg ⁻¹	1,73	<1,50	87%
Estrôncio	mg.kg ⁻¹	16,85	23,65	140%
Ferro	mg.kg ⁻¹	130,98	310,81	237%
Magnésio	mg.kg ⁻¹	3.237,96	3.107,83	96%
Manganês	mg.kg ⁻¹	1.069,51	1.064,72	100%
Molibdênio	mg.kg ⁻¹	1,96	<1,50	131%
Níquel	mg.kg ⁻¹	2,11	49,27	2335%
Prata	mg.kg ⁻¹	<0,50	7,32	1464%
Sódio	mg.kg ⁻¹	5.889,49	3.920,61	67%
Zinco	mg.kg ⁻¹	157,39	359,23	228%

Analisando os resultados apresentados na Tabela 14, observa-se que houve redução de 55% na concentração de cromo, 96% na de ferro, 60% de níquel e 81% de zinco. Esperava-se que a planta removesse metais da solução através da assimilação desses durante o seu crescimento, entretanto observou-se que mesmo não ocorrendo o crescimento das macrófitas houve redução na concentração de metais.

Tabela 14 – Concentrações de metais nos efluentes dos experimentos e porcentagens de remoção dos metais em relação às concentrações iniciais de metais.

Parâmetro	Unidade	Controle - pós	% de remoção	Diluído - pós	% de remoção
Alumínio	mg.L ⁻¹	<0,010		<0,010	
Antiônio	mg.L ⁻¹	<0,005		<0,005	
Arsênio	mg.L ⁻¹	<0,008		<0,008	
Bário	mg.L ⁻¹	<0,025		<0,025	
Bismuto	mg.L ⁻¹	<0,025		<0,025	
Boro	mg.L ⁻¹	<0,050		<0,050	
Cádmio	mg.L ⁻¹	<0,005		<0,005	
Cálcio	mg.L ⁻¹	20,32	32%	15,82	47%
Chumbo	mg.L ⁻¹	<0,008		<0,008	
Cobalto	mg.L ⁻¹	<0,008		<0,008	
Cobre	mg.L ⁻¹	<0,018		<0,018	
Cromo	mg.L ⁻¹	<0,010		<0,010	55%
Estanho	mg.L ⁻¹	<0,025		<0,025	
Estrôncio	mg.L ⁻¹	<0,025		<0,025	
Ferro	mg.L ⁻¹	<0,008	61%	<0,008	97%
Magnésio	mg.L ⁻¹	3,998	45%	3,525	52%
Manganês	mg.L ⁻¹	<0,011	85%	<0,011	86%
Molibdênio	mg.L ⁻¹	<0,025		<0,025	
Níquel	mg.L ⁻¹	<0,008		<0,008	60%
Prata	mg.L ⁻¹	<0,005		<0,005	
Sódio	mg.L ⁻¹	0,898		0,317	
Zinco	mg.L ⁻¹	0,082		0,026	82%

As plantas cultivadas no efluente tratado com sódio ou cálcio morreram após 10 dias de cultivo, diante desse resultado foi possível inferir 3 causas para as mortes:

1. Os aumentos das concentrações de sódio ou de cálcio (devido à utilização destes elementos no processo de alcalinização no processo de tratamento químico do efluente bruto) e dos valores de condutividade elétrica nas soluções (i.e., aumento das concentrações de sais) tornaram o meio tóxico ou hipersalino.
2. Apesar das concentrações de cádmio, chumbo e zinco estarem abaixo da concentração tóxica para *S. minima* a concentração de níquel (1,527 mg L⁻¹) pode ser tóxica para esses indivíduos, uma vez que os experimentos conduzidos neste projeto com concentrações máximas de 0,04 mg.L⁻¹ apresentou redução nos valores do rm para *S. minima* (item 2.2.4.1), além disso, as concentrações de alumínio, bário, boro,

cobre, estrôncio, ferro e prata, remanescentes na solução tratada podem ter tornado o meio tóxico.

3. As concentrações de magnésio, manganês, molibdênio e outros elementos indispensáveis para a sobrevivência da *S. minima* não encontravam-se em concentrações suficientes.

Apesar de testadas duas formas de tratamento do efluente, utilizando hidróxido de sódio e hidróxido de cálcio, nenhuma destas técnicas permitiu que a solução tratada propiciasse o crescimento da *S. minima* e conseqüentemente a remoção de metais do efluente. Este fato indica que os métodos utilizados para o tratamento (precipitações por hidróxido de sódio ou de cálcio) não foram eficientes para a remoção dos metais a ponto de torna-los não tóxicos para as macrófitas. É possível, ainda, que os tratamentos tenham gerado subprodutos que sejam tóxicos. Os valores elevados de condutividade elétrica (Tabela 2) podem sugerir que houve estresse osmótico sem que houvesse necessariamente elemento tóxico na solução de cultivo.

Analisando os resultados, observa-se ainda que o emprego de macrófitas como ferramenta fitorremediadora para diminuir as concentrações de metais em efluentes é complexo e que tratamentos químicos prévios podem interferir direta e indiretamente no crescimento das plantas. Pelo exposto, são necessários testes adicionais com outras técnicas de tratamento de efluentes contaminados com metais ou com outras plantas que toleram a presença dos metais restantes e consiga removê-los da solução de cultivo através do seu crescimento.

2.3 Considerações finais

Como mencionado, observou-se que todos os coeficientes de crescimento aumentaram quando as concentrações de Cd, Ni e Pb no meio foram menores. Esses resultados corroboram a indicação do uso dessas macrófitas para o tratamento de efluentes contaminados por estes metais uma vez que se a macrófita for capaz de reduzir as concentrações de metais do meio em que estiver sendo cultivada ela também terá aumentado sua capacidade de crescer.

De acordo com a previsão do modelo matemático, ajustado com os dados do experimento, quando a concentração de metal no meio de cultivo diminui muito a capacidade das macrófitas crescerem, sugere-se que para tratar efluentes contaminados por Cd, Ni e Pb as plantas sejam cultivadas primeiramente em um tanque não contaminado, dessa forma, as plantas poderiam crescer no primeiro tanque, em um segundo momento, serem introduzidas no segundo tanque (contaminado) e retiradas quando atingirem a concentração máxima de acumulação ou adsorção em seus tecidos (R_K). OLGUÍN et al. (2005) sugerem que a capacidade máxima de acumulação de metais pela *S. minima* ocorre em um período de 24 horas. Outros estudos têm apontado que a circulação da solução aumenta a eficiência (62%) na remoção de metais como o Pb, Ni e Cu do meio de cultivo (YILMAZ; AKBULUT, 2011).

Em uma situação hipotética, em um meio onde a concentração de Zn for próxima a 10 mg L⁻¹ onde não ocorrerá o crescimento de *S. minima*, o sistema possuirá maior eficiência na remoção de Zn se os indivíduos forem introduzidos cobrindo toda a extensão do tanque e retirados quando os teores de Zn nos tecidos estiverem próximos a 10 mg g⁻¹. Nesse caso, a cobertura de 100% do tanque é melhor do que colocar uma quantidade menor de plantas para que o Zn seja removido durante o crescimento da planta. Portanto, cada estação de tratamento de esgoto deve considerar as condições ambientais, área disponível, vazão e concentração de nutrientes e metais que dispõe para avaliar se a eficiência de remoção de metais por *S. minima* é viável economicamente e ecologicamente.

Mais testes são necessários para avaliar o crescimento dessas macrófitas quando mais de um metal estiver presente na solução de cultivo, pois as interações entre os metais podem alterar a capacidade dessas plantas atuarem como fitorremediadoras e crescerem. Não devem ser descartadas opções químicas de tratamento de esgoto e o uso concomitante de processos químicos com biológicos (fitorremediação) podem melhorar a capacidade de remoção de metais.

Em estudos de toxicologia aguda o objetivo é demonstrar o efeito negativo (geralmente morte) em um período curto (24h) e devem ser observados diversos procedimentos protocolares; os efeitos tóxicos crônicos são realizados em períodos que correspondem a toda a vida do organismo e a exposição ao agente tóxico geralmente dura mais de 3 meses; os estudos que analisam efeitos adversos em períodos que não excedam 10% da vida do organismo são considerados subagudos e os que excedem esse período mas não são avaliados durante todo o ciclo de vida são considerados subcrônicos (CHASIN; AZEVEDO, 2004).

Neste estudo a primeira análise do crescimento ou senescência foi realizada entre o 4º e o 5º dia amostral e não foram observadas diferenças significativas quando comparada ao início do experimento (dia 0). Através das imagens fotográficas foram avaliadas as áreas verdes das macrófitas e não é possível afirmar através da técnica utilizada se a planta estava viva ou morta no 5º dia e, portanto, não foram realizadas as análises para determinar o efeito tóxico agudo e a CL50 para os metais selecionados. Além disso, a análise do efeito tóxico agudo deve avaliar a primeira concentração que não causa efeitos tóxicos e a menor concentração que causa 100% de mortalidade com no mínimo mais duas concentrações intermediárias para a determinação da CL50 (USEPA, 2002), o que não ocorreu neste experimento.

Os efeitos tóxicos observados neste estudo podem ser considerados subagudos ou subcrônicos uma vez que as inibições dos crescimentos foram determinadas em períodos inferiores a 3 meses e superiores a 24h e o período de vida de *S. minima* e *L. valdiviana* variam em função das mudanças ambientais (e.g. temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes).

3. Conclusões

Com base nos procedimentos experimentais adotados nesse estudo conclui-se que:

Salvinia minima é mais eficiente no tratamento de efluentes contaminados com Ni, Pb e Zn e que *Lemna valdiviana* é mais eficiente no tratamento de efluentes contaminados com Cd.

A hipótese do uso de *L. valdiviana* para o tratamento de efluentes contaminados com Cd, Pb e Ni nas concentrações permitidas pela legislação brasileira (BRASIL, 2011) é falsa, pois os valores do coeficiente de crescimento foram baixos ou nulos.

Apenas as concentrações de Pb permitidas pela legislação brasileira para o lançamento de efluentes (BRASIL, 2011) possibilitaram o crescimento *S. minima*. Portanto, apenas para esse elemento a hipótese do uso desta macrófita como fitorremediadora de efluentes contaminados com chumbo na concentração permitida pela lei é válida. Quando cultivada com Cd e Ni nas concentrações permitidas pela legislação, observaram-se inibições do crescimento de *S. minima*.

Não foi possível determinar se houve ou não crescimentos de *S. minima* e *L. valdiviana* em concentrações de 5,0 mg L⁻¹ de Zn (concentração permitida pela legislação brasileira) e portanto, não foi possível determinar se a hipótese do uso destas macrófitas para tratar Zn foi verdadeira ou não.

Para todos os metais testados (Cd, Pb, Ni e Zn) em concentrações mais altas e ainda permitidas pela legislação brasileira para o lançamento de efluentes foram observados efeitos tóxicos ou diminuição no crescimento das macrófitas. Entretanto, observa-se que houve bioacumulação de metais e crescimento das macrófitas em concentrações mais baixas que a permitida pela legislação brasileira e, portanto, o uso de *S. minima* e *L. valdiviana* para tratar efluentes contaminados por metais pode ser indicado dependendo da concentração de metal no efluente. Não devem ser descartadas opções químicas de tratamento de esgoto. O uso concomitante de processos químicos e biológicos (fitorremediação) pode ajudar na remoção de metais com diminuição dos custos com reagentes.

O uso de macrófitas aquáticas para o tratamento de efluentes é complexo e procedimentos químicos anteriores para tratar efluentes e a interação com outros elementos podem interferir na bioacumulação de metais e no crescimento das macrófitas.

4. Referências bibliográficas

ABNT. **Água - Determinação de metais - Método de espectrometria de absorção atômica por chama**. 13810:1997. ed. Brasília: Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1997. p. 4

AL-HAMDANI, S. H.; BLAIR, S. L. Influence of copper on selected physiological responses in *Salvinia minima* and its potential use in copper remediation. **American Fern Journal**, v. 94, n. 1, p. 47–56, 2004.

APPENROTH, K.-J. et al. Effects of nickel on the chloroplasts of the duckweeds *Spirodela polyrhiza* and *Lemna minor* and their possible use in biomonitoring and phytoremediation. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 216–23, 2010.

ART, H. . W. **Dicionário de Ecologia e Ciências Ambientais**. UNESP ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2001. p. 583

ATSDR. **Toxicological Profile for Nickel**. Atlanta,GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005a. p. 397

ATSDR. **Toxicological Profile for Zinc**. Atlanta,GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005b. p. 352

ATSDR. **The Priority List of Hazardous Substances That Will Be the Subject of Toxicological Profiles**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>. Acesso em: 2 maio. 2010.

AXTELL, N. R.; STERNBERG, S. P. K.; CLAUSSEN, K. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. **Bioresource technology**, v. 89, n. 1, p. 8-41, 2003.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, v. 13, p. 1–37, 1990.

BEST, E. P. H. Models on metabolism of aquatic weeds and their application potential. In: PIETERSE, A. H.; MURPHY, K. J. (Eds.). **Aquatic Weeds: the ecology and management of nuisance aquatic vegetation**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1990. p. 254–273.

BIANCHINI JR., I. et al. Growth of *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle under controlled conditions. **Hydrobiologia**, v. 644, n. 1, p. 301–312, 2010.

BIANCONI, D. et al. Uptake of cadmium by *Lemna minor*, a (hyper?) accumulator plant involved in phytoremediation applications. **E3S Web of Conferences**, v. 1, p. 13002, 2013.

BRADSHAW, J. D.; RICE, M. E.; HILL, J. H. Digital analysis of leaf surface area: Effects of shape, resolution, and size. **Journal of the Kansas Entomological Society**, v. 80, n. 4, p. 339–347, 2007.

BRASIL. **Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e**

dá outras providências. BRASIL, 2004. Disponível em:
<<http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-518.htm>>

BRASIL. **Resolução CONAMA n. 430, de 13 de maio de 2011.** BRASIL, 2011. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>

BRECKLE, S.-W.; KAHLE, H. Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus sylvatica* L.). **Vegetatio**, v. 101, n. 1, p. 43–53, 1992.

BROUN, E. R. et al. Excessive zinc ingestion. A reversible cause of sideroblastic anemia and bone marrow depression. **JAMA : the Journal of the American Medical Association**, v. 264, n. 11, p. 1441–3, 1990.

CARDWELL, A. J.; HAWKER, D. W.; GREENWAY, M. Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia. **Chemosphere**, v. 48, n. 7, p. 653–63, 2002.

CASABIANCA, M. L. Large-scale production of *Eichhornia crassipes* on paper industry effluent. **Bioresource technology**, v. 54, p. 35–38, 1995.

CASTRO-LONGORIA, E. et al. Biosynthesis of lead nanoparticles by the aquatic water fern, *Salvinia minima* Baker, when exposed to high lead concentration. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 277–83, 2014.

ÇERIBASI, I. H.; YETIS, U. Biosorption of Ni(II) and Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium* from a binary metal system – kinetics. **Water SA**, v. 27, n. 1, p. 15–20. 2004.

CHANEY, R. L. et al. Phytoremediation of soil metals. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 279–84, 1997.

CHASIN, A. A. DA M.; AZEVEDO, F. A. Intoxicação e avaliação da toxicidade. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. DA M. (Eds.). **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. RiMa ed. São Carlos: [s.n.]. p. 127–165, 2004.

COOK, C. . D. K. et al. **Water Plants of the World: A Manual for the Identification of the Genera of Freshwater Macrophytes**. England: Springer, 1974. p. 329–330

DAJOZ, R. **Ecologia Geral**. João Pessoa-PB: Ed. Vozes, 1983.

DHIR, B.; KUMAR, R. Adsorption of heavy metals by *Salvinia* biomass and agricultural residues. **International Journal of Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 427–432. 2010.

DHIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI, P. P. Photosynthetic performance of *Salvinia natans* exposed to chromium and zinc rich wastewater. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 20, n. 1, p. 61–70, 2008.

DHIR, B.; SRIVASTAVA, S. Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by *Salvinia natans*. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 6, p. 893–896, 2011.

DIRILGEN, N.; DOĞAN, F. Speciation of chromium in the presence of copper and zinc and their combined toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, n. 3, p. 397–403, 2002.

ECKENFELDER, W. W. **Industrial water pollution control**. 3. ed. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 584

ENNABILI, A.; ATER, M.; RADOUX, M. Biomass production and NPK retention in macrophytes from wetlands of the Tingitan Peninsula. **Aquatic Botany**, v. 62, n. 1, p. 45–56, 1998.

EPA. **2012 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories**EUAAU.S. Environmental Protection Agency, 2012.

ESPINOZA-QUIÑONES, F. R. et al. Removal of heavy metal from polluted river water using aquatic macrophytes *Salvinia sp.* **Brazilian Journal of Physics**, v. 35, n. 3b, p. 744–746, 2005.

ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. Rio de Janeiro: INTERCIENCIA, 1998.

ESTRELLA-GÓMEZ, N. et al. The Pb-hyperaccumulator aquatic fern *Salvinia minima* Baker, responds to Pb(2+) by increasing phytochelatin synthesis via changes in SmPCS expression and in phytochelatin synthase activity. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 91, n. 4, p. 320–8, 2009.

EU. **on the quality of water intended for human consumption (Drinking Water Directive)**European Communities, 1998.

FARAHBAKSHAZAD, N.; MORRISON, G. M.; SALATI FILHO, E. Nutrient removal in a vertical upflow wetland in Piracicaba, Brazil. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v. 29, n. 2, p. 74–77, 2000.

GALIULIN, R. V et al. A critical review : protection from pollution by heavy metals – phytoremediation of industrial wastewater. **Land Contamination & Reclamation**. v. 9, n. 4, 2001.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J.-P. Mechanisms of defence to pathogens: Biochemistry and physiology. In: **Induced Resistance for Plant Defence**. [s.l.] Blackwell Publishing, 2007. p. 109–132.

GENSEMER, R. W.; PLAYLE, R. C. The bioavailability and toxicity of aluminum in aquatic environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 29, n. 4, p. 315–450, 1999.

GOPAL, B. Biology and ecology. In: PATTEN, B. C. (Ed.). **Wetlands and shallow continental water bodies**. The Hague ed. Jaipur: National Institute of Ecology, 1990. p. 9–15.

GRANT, C. A. et al. Cadmium accumulation in crops. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 78, n. 1, p. 1–17, 1998.

GUIMARÃES, F. P. et al. Estudos laboratoriais de acúmulo e toxicidade de arsênio em *Eichhornia crassipes* e *Salvinia auriculata*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 2, p. 109–113, 2006.

GUSTAVSSON, P.; GERHARDSSON, L. Intoxication from an accidentally ingested lead shot retained in the gastrointestinal tract. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 4, p. 491–3, 2005.

GUTIÉRREZ, E. L. et al. Biomass and productivity of water hyacinth and their application in control programs. In: JULIEN, M. H.; HILL, M. P. (Eds.). **Biological and integrated control of water hyacinth *Eichhornia crassipes***. v. 102 p. 109–119, 2001.

GYORFFY, E. J.; CHAN, H. Copper deficiency and microcytic anemia resulting from prolonged ingestion of over-the-counter zinc. **The American journal of gastroenterology**, v. 87, n. 8, p. 1054–5, 1992.

HADAD, H. R. et al. The effect of nutrient addition on metal tolerance in *Salvinia herzogii*. **Ecological Engineering**, v. 31, n. 2, p. 122–131, 2007.

HENRY-SILVA, G. G. **Utilização de macrófitas aquáticas flutuantes (*Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Salvinia molesta*) no tratamento de efluentes de piscicultura e possibilidades de aproveitamento da biomassa vegetal**. UNESP - Jaboticabal, 2001.

HENRY-SILVA, G. G.; FERNANDO, A.; CAMARGO, M. Efficiency of aquatic macrophytes to treat Nile tilapia pond effluents. **Scientia Agricola**, v. 63, n. 5, p. 433–438, 2006.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water culture method of growing plants without soil. In: **Circular 347 - The college of Agriculture University of California - Berkeley**. 3. ed. p. 32, 1950.

HOFFMANN, T.; KUTTER, C.; SANTAMARÍA, J. Capacity of *Salvinia minima* Baker to Tolerate and Accumulate As and Pb. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 1, p. 61–65, 2004.

HU, J. et al. Bioaccumulation and chemical forms of cadmium, copper and lead in aquatic plants. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. february, p. 235–240, 2010.

HUANG, L.-S. et al. Exploring nonlinear association between prenatal methylmercury exposure from fish consumption and child development: evaluation of the Seychelles Child Development Study nine-year data using semiparametric additive models. **Environmental Research**, v. 97, n. 1, p. 8–100, 2005.

INGH, M. G. H. S. P. S. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 1–18, 2005.

JAIN, S. K.; VASUDEVAN, P.; JHA, N. K. Removal of some heavy metals from polluted water by aquatic plants: Studies on duckweed and water velvet. **Biological Wastes**, v. 28, n. 2, p. 115–126, 1989.

JANA, S.; CHOUDHURI, M. A. Senescence in submerged aquatic angiosperms: Effects of heavy metals. **New Phytologist**, v. 90, n. 3, p. 477–484, 1982.

JONCKHEERE, I. et al. Review of methods for in situ leaf area index determination. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 121, n. 1-2, p. 19–35, 2004.

JONES, D. L. Organic acids in the rhizosphere – a critical review. **Plant and Soil**, v. 295, n. 1, p. 25–44, 1998.

JONES, J. I.; EATON, J. W.; HARDWICK, K. The effect of changing environmental variables in the surrounding water on the physiology of *Elodea nuttallii*. **Aquatic Botany**, v. 66, n. 2, p. 115–129, 2000.

KÄKELÄ, R.; KÄKELÄ, A.; HYVÄRINEN, H. Effects of nickel chloride on reproduction of the rat and possible antagonistic role of selenium. **Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology**, v. 123, n. 1, p. 27–37, 1999.

KARPISCAK, M. M. et al. Multi-species plant systems for wastewater quality improvements and habitat enhancement. **Water Sci. Technol**, v. 33, n. 10-11, p. 231–236, 1996.

KAUR, L.; GADGIL, K.; SHARMA, S. Phytoaccumulation of nickel from contaminated water by duckweed (*Lemna minor*). **Journal of Environmental Research And Development**, v. 3, n. 2, p. 388–394, 2008.

KAUR, L.; GADGIL, K.; SHARMA, S. Role of pH in the accumulation of lead and nickel by common duckweed (*Lemna minor*). **Int. Journal of Bioassays**, v. 1, n. 12, p. 191–195, 2012.

KAY, S. H.; HALLER, W. T.; GARRARD, L. A. Effects of heavy metals on water hyacinths (*Eichhornia crassipes*). **Aquatic Toxicology**, v. 5, n. 4415, p. 117–128, 1984.

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. **Bioresource technology**, v. 100, n. 23, p. 6137–40, 2009.

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Growth response of *Lemna gibba* L. (duckweed) to copper and nickel phytoaccumulation. **Novatech**, p. 1–8, 2010.

KLUMP, A. et al. Variation of nutrient and metal concentrations in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). **Environment International**, v. 28, n. 3, p. 165–71, 2002.

MAHUJCHARIYAWONG, J.; IKEDA, S. Modelling of environmental phytoremediation in eutrophic river — the case of water hyacinth harvest in Tha-chin River, Thailand. **Ecological Modelling**, v. 142, n. 1-2, p. 121–134, 2001.

MAINE, M. A.; DUARTE, M. V; SUÑÉ, N. L. Cadmium uptake by floating macrophytes. **Water research**, v. 35, n. 11, p. 2629–34, 2001.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados: mitos, mistificação e fatos**. [s.l.] ProduQuímica, 1994. p. 153

- MALHOTRA, S. S. Effects of aqueous sulphur dioxide on chlorophyll destruction in *Pinus contorta*. **New Phytologist**, v. 78, n. 1, p. 101–109, 1977.
- MARTINS, D. et al. Caracterização química das plantas aquáticas coletadas no reservatório de Salto Grande (Americana-SP). **Planta daninha**, v. 21, p. 21–25, 2003.
- MEGATELI, S.; SEMSARI, S.; COUDERCHET, M. Ecotoxicology and environmental safety toxicity and removal of heavy metals (cadmium , copper , and zinc) by *Lemna gibba*. **Ecotoxicology & Environmental Safety**, v. 72, n. 6, p. 1774–1780, 2009.
- MEHRA, A.; FARAGO, M. E. Metal ions and plant nutrition. In: FARAGO, M. E. (Ed.). **Plants and the Chemical Elements: Biochemistry, Uptake, Tolerance and Toxicity**. Weinheim: VCH, Verlagsgesellschaft, 2008. p. 31–67.
- MINEAR, R. A. et al. **Data Base for Influent Heavy Metals in Publicly Owned Treatment Works**. [s.l.] U.S. Environmental Protection Agency, Municipal Environmental Research Laboratory, 1981.
- 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.
- MONOD, J. The growth of bacterial cultures. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 3, p. 371–394, 1949.
- MOSHIRI, G. A. (ED.). **Constructed Wetlands for Water Quality Improvement**. p. 632, 1993.
- MUCHA, A. P. et al. Exudation of organic acids by a marsh plant and implications on trace metal availability in the rhizosphere of estuarine sediments. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 65, n. 1-2, p. 191–198, 2005.
- MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering geology**, v. 60, n. 1-4, p. 193–207, 2001.
- NICHOLS, P. B.; COUCH, J. D.; AL-HAMDANI, S. H. Selected physiological responses of *Salvinia minima* to different chromium concentrations. **Aquatic Botany**, v. 68, n. 4, p. 313–319, 2000.
- NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. **Nature**, v. 333, n. 6169, p. 134–9, 1988.
- NÚÑEZ-LÓPEZ, R. A. et al. Leaching of lead by ammonium salts and EDTA from *Salvinia minima* biomass produced during aquatic phytoremediation. **Journal of hazardous materials**, v. 154, n. 1-3, p. 623–32, 2008.
- O'NEAL, M. E.; LANDIS, D. A.; ISAACS, R. An inexpensive, accurate method for measuring leaf area and defoliation through digital image analysis. **Journal of economic entomology**, v. 95, n. 6, p. 1190–4, 2002.

ODUM, E. P. **Fundamentos de Ecologia**. p. 434, 2012.

OLGUÍN, E. J. et al. Surface adsorption, intracellular accumulation and compartmentalization of Pb(II) in batch-operated lagoons with *Salvinia minima* as affected by environmental conditions, EDTA and nutrients. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 32, n. 11-12, p. 577–86, 2005.

OLGUÍN, E. J.; HERNÁNDEZ, E.; RAMOS, I. The effect of both different light conditions and the pH value on the capacity of *Salvinia minima* Baker for removing cadmium, lead and chromium. **Acta Biotechnol**, v. 22, n. 1-2, p. 121–131, 2002.

OLIVEIRA, J. A. DE et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 329–341, 2001.

PACYNA, J. M.; PACYNA, E. G. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. **Environmental Reviews**, v. 9, n. 4, p. 269–298, 2001.

PANDEY, R. et al. Male reproductive effect of nickel sulphate in mice. **Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine**, v. 12, n. 4, p. 339–46, 1999.

PANDEY, R.; SRIVASTAVA, S. P. Spermatotoxic effects of nickel in mice. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 64, n. 2, p. 161–7, 2000.

PANWAR, B. S.; AHMED, K. S.; MITTAL, S. B. Phytoremediation of nickel-contaminated soils by Brassica species. **Environment, Development and Sustainability**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2002.

PATTERSON, W. P.; WINKELMANN, M.; PERRY, M. C. Zinc-induced copper deficiency: megamineral sideroblastic anemia. **Annals of Internal Medicine**, v. 103, n. 3, p. 385, 1985.

PETRUCIO, M.; ESTEVES, F. Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichhornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 2, p. 229–236, 2000.

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

POTT, V. J.; CERVI, A. C. A família Lemnaceae Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 22, n. 2, p. 153–174, 1999.

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas Aquáticas do Pantanal**. Embrapa ed. [s.l.] Embrapa, 2000. p. 404

PRASAD, A. S. Discovery and importance of zinc in human nutrition. **Federation proceedings**, v. 43, n. 13, p. 2829–34, 1984.

PRASAD, M. N. . et al. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 881–889, 2001.

PRESS, W. H. et al. **Numerical Recipes in C: The Art of Scientific Computing**. Cambridge ed. New York: [s.n.]. p. 994, 1993.

PROCTOR, G. R. Monocotyledons and Gymnosperms of Puerto Rico and the Virgin Islands. In: ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; STRONG, M. T. (Eds.). **Contributions from the United States National Herbarium**. Smithsonian ed. Smithsonian Institution, 2005. v. 52, p. 415.

RAMADURAI, J. et al. Zinc abuse and sideroblastic anemia. **American journal of hematology**, v. 42, n. 2, p. 227–8, 1993.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. D. **Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment**. Wiley, 2000.

SALT, D. E. et al. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Bio/technology (Nature Publishing Company)**, v. 13, n. 5, p. 468–74, 1995.

SAMECKA-CYMERMAN, A.; KEMPERS, A. J. Concentrations of heavy metals and plant nutrients in water, sediments and aquatic macrophytes of anthropogenic lakes (former open cut brown coal mines) differing in stage of acidification. **The Science of the total environment**, v. 281, n. 1-3, p. 87–98, 2001.

SÁNCHEZ-GALVÁN, G. et al. Assessment of the hyperaccumulating lead capacity of *Salvinia minima* using bioadsorption and intracellular accumulation factors. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 194, n. 1-4, p. 77–90, 2008.

SANTOS, C. L. DOS. **Acúmulo e toxidez de manganês em macrófitas aquáticas flutuantes livres**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2009.

SANTOS, G. A. DOS. **Crescimento e respostas antioxidantes de macrófitas aquáticas submetidas ao arsênio**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 2006.

SAYGIDEGER, S. et al. Adsorption of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) ions by *Lemna minor* L.: effect of physicochemical environment. **Journal of hazardous materials**, v. 126, n. 1-3, p. 96–104, 2005.

SCHNEIDER, I. A. H.; RUBIO, J. Sorption of heavy metal ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. **Environmental Science & Technology**, v. 33, n. 13, p. 2213–2217, 1999.

SELA, M.; GARTY, J.; TEL-OR, E. The accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. **New Phytologist**, v. 112, n. 1, p. 7–12, 1989.

SEN, A. K.; BHATTACHARYYA, M. Studies of uptake and toxic effects of NI (II) on *Salvinia natans*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 78, n. 1-2, p. 141–152, 1994.

SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 48, n. 4, p. 523–544, 2001.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 35–52, 2005.

SIGEL, H. **Metal Ions in Biological Systems**, 2. [s.l.] Taylor & Francis, 1983. p. 520

SÖRME, L.; LAGERKVIST, R. Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. **The Science of the total environment**, v. 298, n. 1-3, p. 131–45, 2002.

SPERLING, M. VON; CHERNICHARO, C. A. DE L. **Biological Wastewater Treatment in Warm Climate Regions**. [s.l: s.n.]. p. 1460, 2005.

SRIDHAR, B. B. M. et al. Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 15–22, 2007.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

STOTTMEISTER, U. et al. Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands for wastewater treatment. **Biotechnology Advances**, v. 22, n. 1-2, p. 93–117, 2003.

SUMMERFIELD, A. L.; STEINBERG, F. U.; GONZALEZ, J. G. Morphologic findings in bone marrow precursor cells in zinc-induced copper deficiency anemia. **American journal of clinical pathology**, v. 97, n. 5, p. 665–8, 1992.

THIÉBAUT, G. et al. Accumulation of metals in *Elodea canadensis* and *Elodea nuttallii*: implications for plant-macroinvertebrate interactions. **The Science of the total environment**, v. 408, n. 22, p. 5499–505, 2010.

THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. **Ecologia e Manejo de Macrófitas Aquáticas**. [s.l: s.n.]. p. 342, 2003.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and allied plants: with special reference to tropical America**. Springer-V ed. p. 857, 1982.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Limnologia**. Oficina de ed. São Carlos. p. 632, 2008.

USEPA. **Short term methods for estimating the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 4. ed. Office of water, Washington, DC: EPA-821-R-02-013. U.S. Environmental Protection Agency, 2002.

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

WETZEL, R. G. **Limnology: Lake and River Ecosystems**. Academic Press, 2001.

WHO. **Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution**. p. 144, 2007.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. WHO. ed. World Health Organization, 2008. p. 668

WOLFF, G. et al. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. **Planta daninha**, v. 27, n. 1, p. 133–137, 2009.

WOLFF, G. et al. The use of *Salvinia auriculata* as a bioindicator in aquatic ecosystems: biomass and structure dependent on the cadmium concentration. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, n. 1, p. 71–7, 2012.

WOOLHOUSE, H. W. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In: LANGE, O. L. et al. (Eds.). **Encyclopedia of Plant Physiology- Physiological Plant Ecology III**. New Series ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1983. p. 245–300.

XAVIER, D. K. DE S. **Monitoramento ambiental através do Índice de Qualidade de Água – IQA associado com o Índice de Toxidez – IT das águas das bacias hidrográficas do Curimataú e Maxaranguape no Estado do Rio Grande do Norte**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2010.

YILMAZ, D. D.; AKBULUT, H. Effect of circulation on wastewater treatment by *Lemna gibba* and *Lemna minor* (floating aquatic macrophytes). **International Journal of Phytoremediation**, v. 13, n. 10, p. 970–984, 2011.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. 5. ed. p. 144, 2010.

ZAYED, A.; GOWTHAMAN, S.; TERRY, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. **Journal of Environment Quality**, v. 27, n. 3, p. 715–721, 1998.

ZHU, Y. L. et al. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. water hyacinth. **Journal of Environment Quality**, v. 28, n. 1, p. 339, 1999.

5. Anexos

5.1 Avaliação do crescimento por imagens fotográficas

As folhas de *Salvinia minima* e *Lemna valdiviana* são as estruturas morfológicas que melhor representam o tamanho destes organismos e, portanto, podem ser utilizadas para avaliar de forma direta o crescimento destas plantas. Métodos de quantificação de áreas foliares que utilizam paquímetro e outros dispositivos mecânicos podem ser invasivos, danificar as folhas e assim prejudicar o crescimento das plantas. O uso de imagens fotográficas para avaliar áreas foliares tem se tornado uma técnica comum, pois se trata de uma determinação não invasiva e não destrutiva dos organismos em análise. Vários estudos têm utilizado esta técnica para avaliar de forma precisa a área foliar de diversas plantas (BRADSHAW; RICE; HILL, 2007; JONCKHEERE et al., 2004; O'NEAL; LANDIS; ISAACS, 2002).

Muitos softwares de análises de imagens fotográficas possuem ferramentas que auxiliam encontrar áreas específicas em uma determinada imagem. O Spring é um software desenvolvido pelo INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) e sua principal aplicação é a avaliação do uso e ocupação do solo utilizando imagens fotográficas. Nesse estudo utilizou-se este software para determinar a área foliar das macrófitas aquáticas. Mediante a correlação entre área foliar e massa seca pôde-se verificar se esta técnica é eficiente para estimar a massa seca e o crescimento destas plantas.

Para confecção das fotos foi construída uma “plataforma fotográfica” (Figura 41), esta plataforma possui uma base (50x50x1,5cm) branca de madeira que pode ser nivelada. Em cada um dos quatro cantos desta base foram fixados, de forma perpendicular, 4 hastes de metal. Nestas hastes de metal foram presas 4 lâmpadas fluorescentes (altura= 25cm) de mesma intensidade e frequência luminosa (15W). Estas lâmpadas podem ser colocadas em diferentes posições e permitem que a base possa receber a mesma condição luminosa. Próximo às lâmpadas há um dispositivo que permite a fixação de câmeras fotográficas (altura = 40cm). Este dispositivo permite ainda que a câmera seja nivelada e fixada na mesma posição em relação à base.

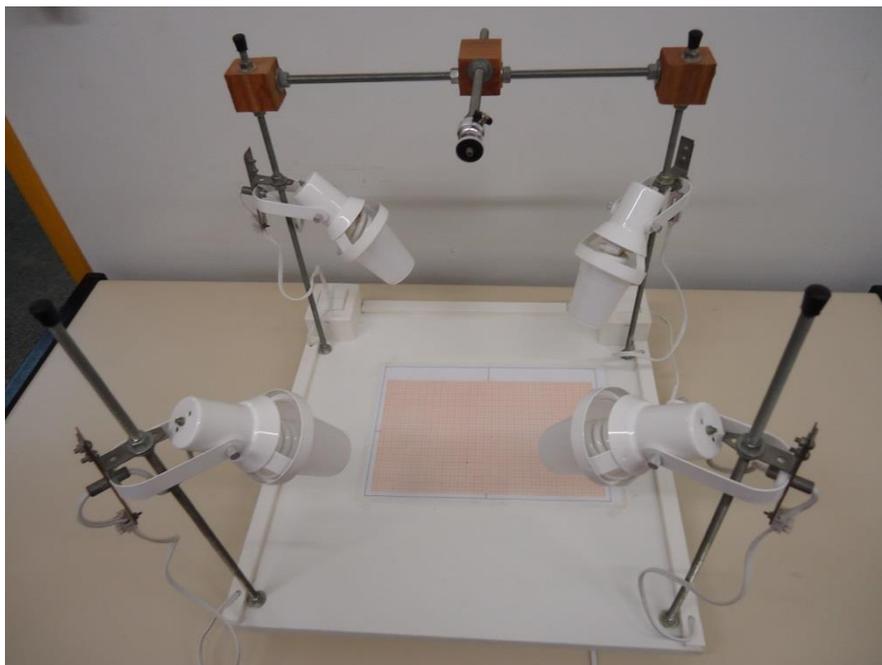


Figura 41 - Plataforma fotográfica

A câmera fotográfica utilizada foi a DSC-WX10 (Sony®), esta câmera possui regulagens para ajustes de branco, ISO, exposição, abertura e zoom. Estas características permitem que cada foto seja feita sob as mesmas condições e, portanto, permitem que as imagens possam ser comparadas em relação à cor e tamanho.

Seis lotes de *S. minima* e oito de *L. valdiviana* foram separados e colocados em recipientes de PVC (233x163x77 mm) que continham 1,0 L de água destilada. Cada recipiente foi alocado na plataforma e fotografado três vezes. Próximo ao recipiente foi colocado uma folha de papel milimetrado, esta folha auxiliou a mensuração das áreas das macrófitas.

O software selecionado permite que sejam quantificadas as emissões da cor verde em cada pixel da imagem, dessa forma foi possível identificar quais pixels possuem a cor correspondente à área da folha da macrófita (Figura 42). Com o auxílio do papel milimetrado, presente na imagem, obteve-se a quantidade de pixels presentes em 1,0 cm². Dessa forma foi possível relacionar a quantidade pixels verdes com a área de 1,0 cm² e, portanto, determinar a área foliar. Todos os passos relativos à realização destas técnicas podem ser obtidos no manual do software (<http://www.dpi.inpe.br/spring/>).

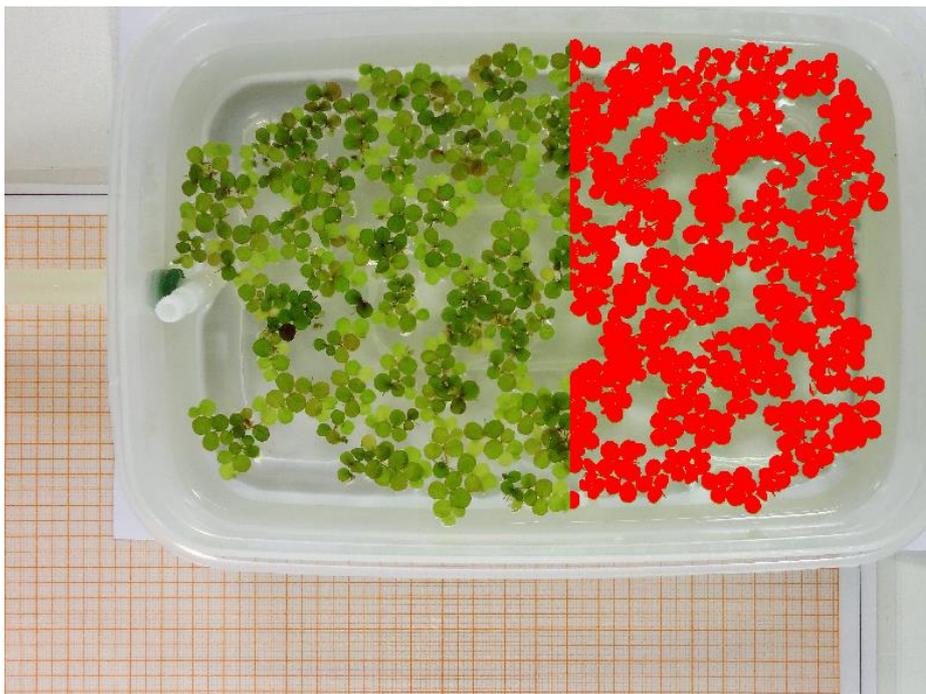
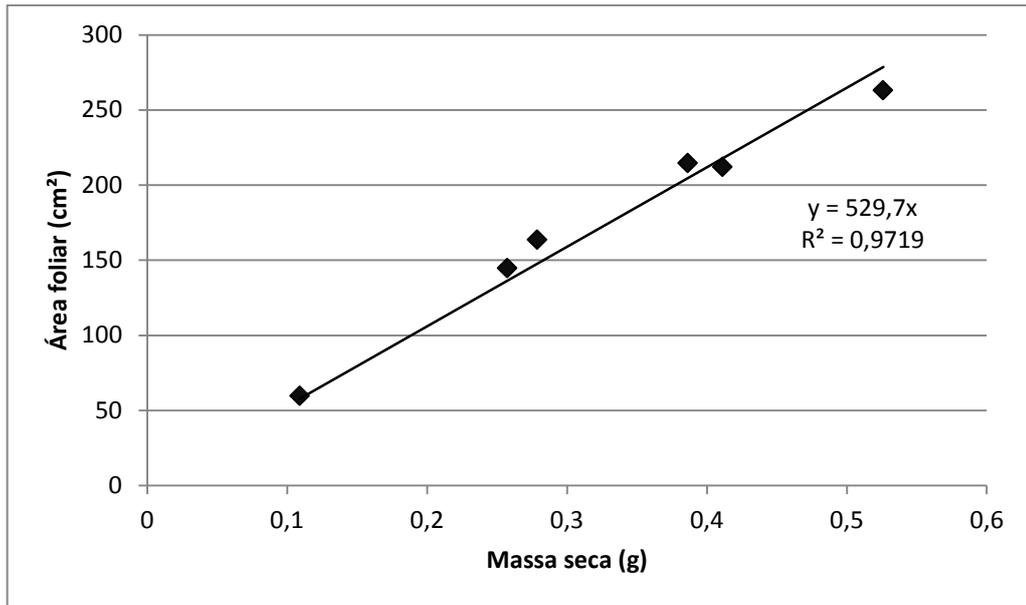
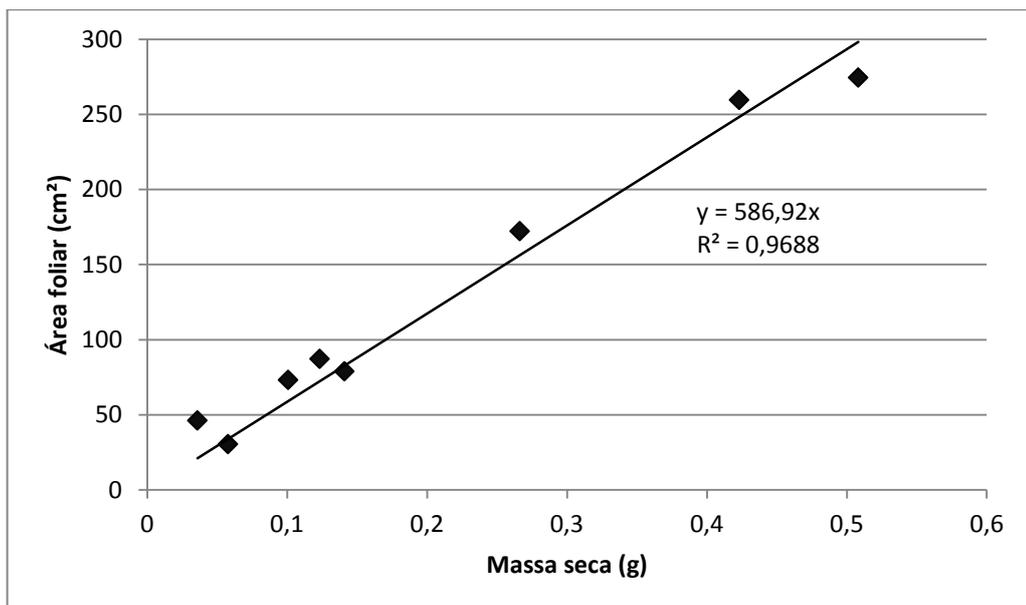


Figura 42 – Determinação da área foliar de *S. minima* com papel milimetrado em baixo do recipiente.

As plantas foram colocadas para escorrer em uma peneira por 5 minutos e posteriormente em um papel absorvente por mais 5 minutos para retirar o excesso de água. A massa seca foi obtida através da secagem das plantas em estufa à 40°C, até massa constante. Após estes procedimentos as macrófitas foram pesadas em uma balança eletrônica com precisão de 4 casas decimais. As determinações dos coeficientes de correlação entre os valores das áreas foliares *versus* a massa seca foi feita com o auxílio do software Excel-2010 da Microsoft®.

Na Figura 43 e 44 apresentam-se as correlações entre as áreas foliares e as massas secas determinadas através da técnica proposta. Observou-se que houve uma correlação elevada entre a área foliar e a massa seca de *S. minima* ($R^2= 0,972$) e *L. valdiviana* ($R^2= 0,969$). Estas correlações altas indicam que a mensuração da área foliar através dessa técnica pode ser utilizada para estimar a massa seca de *S. minima* e *L. valdiviana* e que, portanto, pode ser utilizada para avaliar os crescimentos destas macrófitas.

Figura 43 – Correlação entre área foliar e massa seca de *S. minima*.Figura 44 - Correlação entre área foliar e massa seca de *L. valdiviana*.

5.2 Melhor concentração do meio de cultivo

Antes de cultivar as macrófitas com metais foi avaliada qual concentração de nutrientes no meio de cultivo permitia o melhor crescimento de *S. minima*. Foram testados cultivos com 1%, 5%, 20% e 40% de solução Hoagland-Arnon (HOAGLAND; ARNON, 1950), o pH foi ajustado para 6,5 com solução de hidróxido de sódio (NaOH 50%) ou solução de ácido clorídrico (HCl 18%).

Os valores de rm para o crescimento de *S. minima* foram 0,0276; 0,0390; 0,0403 e 0,0392 dia^{-1} , respectivamente para as concentrações de 1%, 5%, 20% e 40%. A área teórica de ocupação máxima (K) do grupo controle foi $225,50 \pm 61,20 \text{ cm}^2$ (72% da área total do recipiente), este valor foi utilizado na parametrização dos ajustes das curvas sigmóides (Eq. 1). Ajustando a curva de Michaelis-Mentem aos dados encontrados, obtêm-se a seguinte expressão matemática:

$$Rm = \frac{0,0410 \times d}{0,4582 + d}$$

em que: rm = coeficiente de crescimento; d = diluição do meio Hoagland (%); 0,0410 = coeficiente de crescimento máximo; 0,4582 = constante de meia saturação (diluição na qual $rm = 0,5$ rm máximo).

Analisando a curva desta equação (Figura 45), observa-se que a partir da concentração de 9,3% da solução o crescimento de *S. minima* não apresenta mudanças significativas em seu coeficiente de crescimento. Portanto, nas condições experimentais adotadas, utilizando 15% de concentração do meio Hoagland-Arnon obteve-se o coeficiente máximo de crescimento de *S. minima*. Para os experimentos com adição de metais a concentração de 15% do meio de cultivo (tanto para *S. minima* quanto para *L. valdiviana*) foi escolhida com o objetivo de evitar que a falta de nutrientes, ao invés da toxicidade dos metais, prejudicasse o crescimento das plantas.

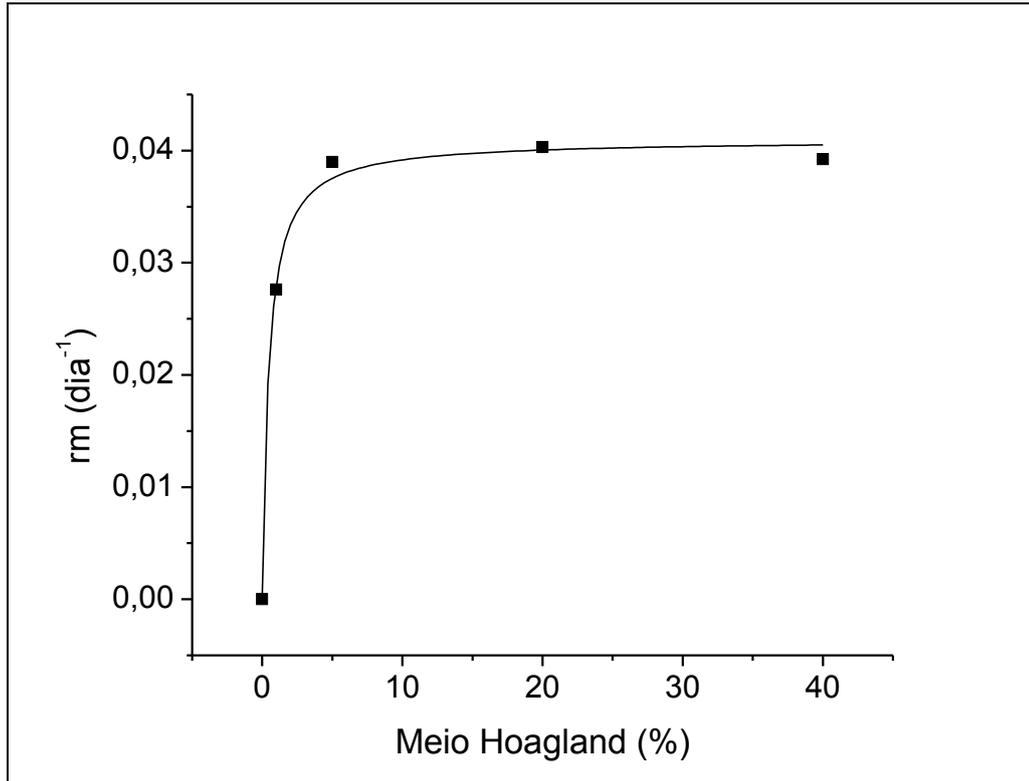


Figura 45 - Coeficientes de crescimento de *S. minima* (r_m) em função das diluições do meio Hoagland-Arnon.