

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA DE ÁREAS IMPACTADAS POR CINZAS DE
CARVÃO MINERAL: CONTRIBUIÇÃO DA MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.) E
RESPOSTAS DA ESPÉCIE A METAIS PESADOS

MARISA AZZOLINI

Tese de Doutorado

Porto Alegre, março de 2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BOTÂNICA

RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA DE ÁREAS IMPACTADAS POR CINZAS DE
CARVÃO MINERAL: CONTRIBUIÇÃO DA MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.) E
RESPOSTAS DA ESPÉCIE A METAIS PESADOS

MARISA AZZOLINI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Porto
Co-orientador: Prof. Dr. Luís Mauro Gonçalves Rosa

Porto Alegre- RS

2008

O conhecimento não deve servir como uma ferramenta para enaltecer a vaidade humana,
mas deve servir para algo superior, como o
entendimento da natureza e a preservação da vida
nela existente.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho dependeu da contribuição de muitas pessoas e instituições para as quais eu gostaria de registrar meus agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Botânica, especialmente à coordenação e aos professores por fornecer um excepcional ambiente de pesquisa e aprendizado.

À Prof^a. Dr^a. Maria Luiza Porto, pela orientação, incentivo, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Luís Mauro Gonçalves Rosa, pela co-orientação, incentivo, amizade e apoio.

Ao Prof. Dr. Thomas Stützel, pela co-orientação durante a bolsa Sanduíche e pelo apoio e atenção, durante todo o período de estadia na Rhur-Universität de Bochum.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa, apoio financeiro ao projeto CT-Mineral I e atenção despendida durante todo o processo de concessão da bolsa Sanduíche.

Ao *Deutscher Akademischer Austauschdienst* (DAAD), pela brilhante oportunidade de realização da bolsa Sanduíche na Alemanha.

Ao Departamento de Ecologia, pela infra-estrutura gentilmente disponibilizada para a realização deste trabalho.

Aos funcionários e a direção do Centro de Ecologia, pelo apoio, amizade e por disponibilização de equipamentos e laboratórios.

À Companhia de Geração Termelétrica de Energia e Eletricidade (CGTEE) e aos funcionários da Usina Termelétrica de São Jerônimo, pelo apoio e acessibilidade à usina.

Ao *Institute for Analytical Sciences* (ISAS), especialmente a Aleksandra Polatajko, Ingo Feldmman, Evygeny Gurevich, Robert Hergenröder e Norbert Jakubowski, pela disponibilização de equipamentos, auxílio na realização das análises no ICP-MS e na realização das análises com laser.

Ao grupo do laboratório de Ecotoxicologia, pelos inúmeros empréstimos de água destilada.

Ao Prof. Ribas Vidal (Dept. Planta e Lavoura, por disponibilizar a casa de vegetação usada para a realização de um dos experimentos.

Ao prof. Fabio Scarano (UNB) pelo empréstimo do fluorômetro.

À Prof^a Débora Dick (Dep. Química), pelas análises de carbono e discussões.

Ao Prof. Antonio P. Vieiro (Dep.Geologia), pelos mapas da Usina de São Jerônimo.

À minha amiga Ana Paula Moreira da Silva, pela ajuda incondicional, pelas idéias filosóficas, pelas discussões científicas intermináveis e pela “tolerância aos estresses ambientais”.

Ao colega Gilberto pela cooperação no projeto CT-Mineral e montagem do laboratório.

Aos (as) estagiários (as) e amigos (as), Morgana Tanise, Ricardo, Samantha, Jéssica, Bárbara Daniel, pelos inúmeros auxílios nos experimentos.

Aos amigos do laboratório de Ecologia de Paisagem, Eduardo, Ana, Rogério, Magda e Greice pelo divertido convívio durante estes 4 anos.

Ao Eduardo Forneck e Sandra Muller, pela ajuda com as análises estatísticas e valiosas sugestões.

Aos (as) amigos (as) do Departamento Spezielle Botanik- Ruhr Universität Bochum, pela grande amizade, apoio e atenção durante minha permanência em Bochum.

À minha amiga Alessandra Coan, pelas valiosas sugestões nos trabalhos anatômicos e a divertida convivência.

Ao Jean, que amavelmente me ajudou em todos os passos deste trabalho e com sua paciência, cuidado e carinho me deixou sempre confiante para continuar.

À minha família, a base de tudo, pela força e compreensão da minha ausência. Sem o apoio de cada um de vocês eu jamais teria chegado até aqui. Agradecimentos especiais aos meus pais, que tiveram a sensibilidade de perceber que a educação é a chave da transformação e não pouparam esforços para me deixar percorrer os caminhos da Universidade. E à minha querida irmã Lorena, uma das pessoas mais fantásticas que já conheci dedico.

A Deus por estar sempre protegendo meu caminho.

RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA DE ÁREAS IMPACTADAS POR CINZAS DE CARVÃO MINERAL: CONTRIBUIÇÃO DA MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.) E RESPOSTAS DA ESPÉCIE A METAIS PESADOS

AUTOR: Marisa Azzolini

ORIENTADORA: Profª. Dra. Maria Luiza Porto

CO- ORIENTADOR: Luís Mauro Gonçalves Rosa

RESUMO

A atividade carbonífera brasileira está concentrada no sul do Brasil, região que apresenta as maiores reservas do país. A implementação de medidas de redução do impacto ambiental gerado pela atividade carbonífera inclui o manejo adequado dos resíduos da extração e das cinzas geradas durante a queima do carvão mineral. Dentre estas medidas, a restauração por meio da revegetação ecológica tem se tornado uma necessidade. O presente estudo teve por objetivo avaliar alguns dos processos que envolvem a relação entre a mamona (*Ricinus communis* L.) e as cinzas de carvão mineral. O estudo abrangeu as características do estabelecimento de uma comunidade espontânea numa área de depósito de cinza de carvão mineral e sua potencialidade de ser um sistema vegetal eficiente para a restauração ecológica de áreas impactadas. Sob condições controladas, em laboratório, foi determinado o potencial fitorremediador da mamona avaliando o efeito de metais pesados, cromo hexavalente (cromo VI) e níquel (Ni) em processos fisiológicos e na anatomia da planta. Os experimentos a campo foram realizados em depósito de cinza de carvão localizado na Termelétrica de São Jerônimo-RS e, os trabalhos em casa de vegetação utilizaram cinzas desta usina para o cultivo da mamona. Os resultados dos experimentos no campo demonstraram que a comunidade vegetal, espontaneamente estabelecida no depósito de cinza, é um modelo eficiente para a restauração e que a mamona desempenha uma função importante na sucessão desta comunidade vegetal. Os resultados das análises em condições controladas mostram que a deficiência de macronutrientes da cinza foi o principal fator limitante para o crescimento da espécie. A mamona apresenta o comportamento de uma planta indicadora de níquel, sendo que concentrações acima de 60 μM foram tóxicas a estas. As análises fisiológicas e anatômicas possibilitaram demonstrar que estas concentrações causaram danos no processo

fotossintético e inibiram o crescimento das raízes laterais. Estes danos possivelmente estão associados à localização do níquel nos tecidos foliares e radicais. No caso do cromo (VI) para concentrações menores de 90 μM , não foram observados sintomas de toxidez, possivelmente, porque a maior parte do cromo absorvido é mantida nas raízes. O estudo conclui que a mamona mostra ser uma espécie eficiente para o sistema de restauração e pode contribuir para a fitoestabilização de cromo e níquel em áreas de depósito de cinza de carvão mineral

ECOLOGICAL RESTORATION OF IMPACTED AREAS BY MINERAL COAL ASH:
CASTOR BEANS CONTRIBUTION (*RICINUS CUMMUNIS L.*) AND RESPONSES OF
THE SPECIES TO HEAVY METALS.

AUTHOR: Marisa Azzolini

ADVISER: Profa. Dra. Maria Luiza Porto

CO- ADVISER: Prof. Dr. Luís Mauro Gonçalves Rosa

ABSTRACT

The Brazilian carboniferous activity is concentrated in the Southern region, the area where the country's biggest reserves are located. Measures to reduce the environmental impact from carboniferous activity include the adequate management of coal extraction's residues and the ashes generated during the coal combustion. Amongst those measures, restoration through ecological revegetation has become a necessity. This study aimed to assess some of the processes involving the relation between the castor beans (*Ricinus communis L.*) and the coal ashes. The study included the characteristics of a spontaneous community establishment in an area of mineral coal ash deposition and its potential of being an efficient vegetal system for the restoration of impacted areas. Under laboratory controlled conditions, it was determined the castor beans' potential for phytoremediation, assessing the effects of the heavy metals chromium (hexavalent, Cr VI) e nickel (Ni) on some of the physiological processes and in the plant anatomy. The field experiments were performed in a coal ash deposit area, located in a thermoelectric power plant in São Jerônimo-RS and, the greenhouse investigation used ashes from this power station to grown castor beans. The results of the field experiments have demonstrated that the vegetal community, spontaneously established in the ash deposit, is an efficient model for the revegetation and have shown that castor bean represent a very important function in the vegetal community succession. The results of the analyses under controlled conditions have shown that the deficiency of the ash's macronutrients was the main limiting factor for the growth of castor bean. Castor bean responds to nickel as indicator species and concentrations above 60 μM were considered toxic for the plants. The physiologic and anatomic analyses show damage

to photosynthetic processes and inhibited the growth of lateral roots. These damages are possibly associated to the localization of nickel in the leaves and roots tissues. In the case of the chromium (VI), concentrations below 90 μM , showed no symptoms of toxicity, possibly because most of the chromium absorbed was kept in the roots. The study has concluded that the castor bean may be an efficient species for the revegetation system and it can contribute for the phytoestabilization of nickel and chromium in areas of mineral coal ash deposit.

ORGANIZAÇÃO DA TESE

Esta tese é composta por:

Introdução Geral seguida pelas hipóteses e objetivos;

Referencial Teórico;

Quatro capítulos, que são uma seqüência das etapas realizadas para atingir os objetivos propostos e não foram elaborados como artigos científicos independentes. Isto porque entendemos que a escrita em forma de artigo levaria a perda de muitas das informações as quais são necessárias para a compreensão do trabalho, já que esta tese envolve diferentes escalas de trabalho. Porém, posteriormente serão publicados como artigos independentes;

Considerações Finais; e

Referências Bibliográficas (páginas finais), que correspondente somente aos itens Introdução Geral e Referencial Teórico. As referências de cada capítulo encontram-se citadas no final de cada capítulo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	1
HIPÓTESES	3
OBJETIVOS	3
REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
1- CARVÃO MINERAL, USO E IMPACTO AMBIENTAL	5
1.1- USO DE CARVÃO MINERAL.....	5
1.2- PRODUÇÃO DE RESÍDUOS PELA ATIVIDADE CARBONÍFERA	6
1.2.1- Características químicas e físicas das cinzas. 8	
1.2.2- Impactos ambientais causados pela deposição de cinzas de carvão 10	
1.2.2.1- Efeito das cinzas no estabelecimento e no crescimento de plantas	10
1.2.2.2- Efeito das cinzas de carvão no aumento da concentração de metais pesados na vegetação	13
1.3. RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS POR DEPÓSITO DE CINZAS.....	15
2. OS METAIS PESADOS NO AMBIENTE	19
2.1. COMPORTAMENTO DOS METAIS PESADOS NO SOLO.....	19
2.2. METAIS PESADOS NAS PLANTAS	22
2.2.1. Os primeiros conceitos e observações	22
2.2.2. Absorção de metais pelas plantas.....	23
2.2.3. Efeitos tóxicos dos metais pesados nas plantas	25
2.2.4. Estratégias de resposta das plantas às elevadas concentrações de metais pesados no solo.....	28
2.2.5. Mecanismos de tolerância a metais pesados	29
2.2.5.1. Mecanismos de exclusão	30
2.2.5.2. Mecanismos de acumulação dos metais na parte aérea	31
3. FITORREMEDIAÇÃO COMO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR METAIS PESADOS	33
4. ASPECTOS GERAIS DA REGULAMENTAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS NO SOLO.....	35
5. CARACTERÍSTICAS INTERESSANTES DA MAMONA (RICINUS COMMUNIS L.) PARA O USO EM FITORREMEDIAÇÃO.....	37
CAPÍTULO I.....	39
COMUNIDADE VEGETAL PIONEIRA EM CINZA DE CARVÃO MINERAL: UM MODELO PARA INÍCIO DE UMA RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA?	39
MATERIAIS E MÉTODOS	40
ÁREA DE ESTUDO	40
LEVANTAMENTO DE DADOS.....	42
ANÁLISE DOS DADOS	45
RESULTADOS	48
CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DA CINZA NO PERFIL.....	48
DIFERENÇAS QUÍMICAS ENTRE AS ÁREAS DO DEPÓSITO.....	50
CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS EM MAMONA	52

ANÁLISE DA VEGETAÇÃO	54
DISCUSSÃO	65
CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
CAPÍTULO II	74
ANÁLISE DO EFEITO DA CINZA LEVE DE CARVÃO MINERAL NO CRESCIMENTO E NA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS EM MAMONA (<i>RICINUS COMMUNIS</i> L.).....	74
MATERIAS E MÉTODOS.....	75
TRATAMENTOS	75
COLETA DAS CINZAS LEVES E DO SOLO.....	75
COLETA DAS SEMENTES	76
MONTAGEM DO EXPERIMENTO	76
ANÁLISES	77
RESULTADOS	80
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS SUBSTRATOS	80
TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO EM ALTURA E BIOMASSA SECA	82
CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DOS METAIS PESADOS EM MAMONA.....	85
FOTOSSÍNTESE	87
DISCUSSÃO	90
CONSIDERAÇÕES ECOLÓGICAS	93
CONCLUSÕES	94
CAPÍTULO III.....	99
CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE NÍQUEL E CROMO EM MAMONA (<i>RICINUS COMMUNIS</i> L.) CULTIVADA EM SOLUÇÃO NUTRITIVA	99
MATERIAIS E MÉTODOS	101
COLETA E GERMINAÇÃO DAS SEMENTES.....	101
CULTIVO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA	102
ANÁLISES	103
ANÁLISE DOS DADOS	106
RESULTADOS	107
SINTOMAS DE TOXIDEX E O EFEITO DE NÍQUEL E DE CROMO (VI) NA TAXA DE CRESCIMENTO	107
EFEITOS DE NÍQUEL E DE CROMO (VI) NA PRODUÇÃO DE MASSA SECA.....	110
CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE NÍQUEL E CROMO NAS PLANTAS	111
INFLUÊNCIA DOS METAIS NO TEOR DE CLOROFILA	115
FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA	117
DISCUSSÃO	120
RESPOSTAS DE <i>R. COMMUNIS</i> AO NÍQUEL.....	120
RESPOSTAS DA PLANTA AO CROMO	124
ESTRATÉGIAS DE RESPOSTAS <i>R. COMMUNIS</i> A NÍQUEL E A CROMO E A E AS IMPLICAÇÕES DO USO DA ESPÉCIE NA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS	127
CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129

CAPÍTULO IV	135
LOCALIZAÇÃO DE NÍQUEL E MUDANÇAS ANATÔMICAS EM RAÍZES DE MAMONA (<i>RICINUS COMMUNIS L.</i>).....	135
MATERIAIS E MÉTODOS	136
<i>CULTIVO E PROCEDIMENTO DE COLETA</i>	136
ANÁLISES	137
ANÁLISE DOS DADOS	141
RESULTADOS	142
FITOTOXIDEZ DE NÍQUEL	142
<i>MASSA SECA</i>	144
<i>CONCENTRAÇÃO DE NÍQUEL</i>	146
ALTERAÇÕES ANATÔMICAS E LOCALIZAÇÃO DE NÍQUEL EM RAÍZES DE <i>R. COMMUNIS</i>	148
DISCUSSÃO	155
CONCLUSÕES	161
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	162
CONSIDERAÇÕES FINAIS	164
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167

INTRODUÇÃO GERAL

A grande demanda por energia em países em desenvolvimento, como o Brasil, tem gerado uma discussão profunda a respeito das conseqüências ambientais decorrentes da instalação de novas unidades geradoras de energia. Nesse contexto, o carvão mineral assume uma condição de destaque já que, por exemplo, 40% da energia elétrica mundial provém da queima deste minério (*International Energy Agency- IEA*, 2004). O carvão mineral apresenta a grande vantagem de diversificar a matriz energética aumentando as possibilidades de crescimento econômico. Entretanto, muitos estudos apontam para os impactos ambientais gerados pela extração, queima e disposição dos resíduos, inclusive a sua contribuição para o aquecimento global. Além dos problemas decorrentes da emissão de poluentes na atmosfera, salienta-se o grande impacto sobre o solo e recursos hídricos.

Os principais estudos realizados nesta área abordam, principalmente, o impacto da disposição dos rejeitos que causam a drenagem ácida pela oxidação da piritita. Entretanto, cresce o interesse e a necessidade de avaliar o impacto das cinzas de carvão, que é o resíduo proveniente da queima do minério. Grande proporção das cinzas é depositada sobre o solo nos arredores das usinas, formando grandes depósitos que comprometem a vegetação e a fauna locais (Puhshon et al., 2003), além de serem fontes importantes de contaminação para o solo e a água.

Sendo assim, o desenvolvimento de projetos para a recuperação dos ambientes degradados pela mineração e pelos depósitos de resíduos de carvão tem sido um desafio para técnicos e pesquisadores. As ações recuperadoras destes locais são baseadas no uso de medidas de proteção do solo, sendo de importância fundamental a formação de cobertura pela vegetação. Entretanto, existe uma grande dificuldade que é o conjunto das características físicas, químicas e biológicas dos rejeitos e cinzas que são desfavoráveis, e freqüentemente limitantes, ao crescimento de plantas. Nas áreas de depósitos de rejeitos e cinzas de carvão mineral a presença de condições extremas de pH, baixa disponibilidade de nutrientes, presença de metais pesados em níveis tóxicos e a falta de propágulos são fatores que dificultam o crescimento das plantas e, conseqüentemente, a revegetação.

Em muitos casos, a indicação das espécies para a revegetação é feita somente em função da disponibilidade de mudas ou sementes. Porém, nem sempre as espécies são tolerantes às condições adversas destas áreas, o que determina o fracasso do projeto de restauração, especialmente em médio e longo prazo. Como alternativa, trabalhos têm sido

desenvolvidos para testar espécies vegetais adequadas para serem introduzidas nestas áreas degradadas. Segundo Resende & Kondo (2001), é importante buscar plantas de crescimento rápido com baixa demanda de insumos externos e capazes de criar condições favoráveis aos mecanismos de regeneração natural da área degradada. Na maioria das situações há necessidade de intervenção para a melhoria do substrato antes de se iniciar a revegetação.

A utilização de espécies que apresentam tolerância a metais pesados pode ser uma estratégia importante para o início de um processo de restauração ecológica de áreas impactadas por resíduos de carvão. Além de sobreviverem nestes ambientes, algumas espécies vegetais podem acumular quantidades elevadas de metais pesados promovendo a descontaminação do solo ou a estabilização dos elementos na área, processo denominado de fitorremediação.

A função fitorremediadora de uma espécie só poderá ser estabelecida se as respostas da planta ao aumento da concentração de determinado elemento for conhecida. Assim, testes de toxidez são importantes e visam estabelecer os limites de toxidez e as alterações que a planta pode sofrer com o aumento da concentração do metal. Além disso, o conhecimento das espécies em comunidades naturais e a capacidade de concentração de metais pesados em seus tecidos contribuem com a compreensão das complexas relações substrato-planta presentes em um processo de restauração ecológica. A partir destas avaliações, é possível indicar a capacidade da espécie para a fitorremediação e avaliar a contribuição desta dentro do contexto da restauração do ambiente.

O desenvolvimento desta tese de doutorado teve como motivação o estudo de uma comunidade vegetal que se desenvolve espontaneamente sobre cinzas de carvão e enfocou as respostas fisiológicas e anatômicas da mamona (*Ricinus communis* L.) a metais pesados. Neste contexto, as hipóteses a seguir foram levantadas.

HIPÓTESES

As observações feitas a campo, onde a espécie *R. communis* parece ser uma planta pioneira na colonização espontânea de áreas de depósito de cinzas de carvão mineral, aliadas aos dados obtidos em experimentos anteriores, que mostraram que plantas na área do depósito apresentam concentrações de alguns metais pesados acima dos limites considerados normais, permitiram a formulação das seguintes hipóteses:

- A vegetação espontânea estabelecida na área de depósito de cinza permite a sucessão vegetal e, portanto pode ser um bom modelo para a restauração ecológica de áreas impactadas por este resíduo.
- A espécie *R. communis* L. apresenta capacidade de acumular metais pesados e por isso a presença da mesma em depósito de cinzas de carvão mineral tem um papel importante na melhoria das condições químicas e físicas do substrato, permitindo assim o estabelecimento de outras espécies vegetais.
- A capacidade de *R. communis* de acumular metais pesados está associada a mudanças fisiológicas e anatômicas que atuam na redução dos efeitos tóxicos causados pelas concentrações excessivas de metais pesados.

Para tanto, os objetivos a seguir foram formulados.

OBJETIVOS

Os objetivos principais deste trabalho foram: (i) avaliar se a vegetação espontaneamente estabelecida em depósito de cinza de carvão mineral representa um sistema vegetal eficiente para a restauração de áreas impactadas por este resíduo, identificando a relação de *R. communis* com os metais pesados presentes na cinza. (ii) determinar o potencial fitorremediador da mamona a partir de estudos de campo e em condições controladas avaliando o efeito de metais pesados específicos em processos fisiológicos e na anatomia das plantas.

Cada capítulo contempla um dos seguintes objetivos específicos:

I - Avaliar se a comunidade vegetal espontaneamente estabelecida em um depósito de cinza de carvão mineral poderá ser utilizada como modelo para o início de uma restauração ecológica de áreas com degradação semelhante, enfatizando a função da mamona *Ricinus communis* L. neste sistema, por ser esta a espécie visualmente predominante na área de estudo;

II - Avaliar em condição de maior controle experimental, em casa de vegetação, a influência da cinza de carvão mineral no crescimento e na concentração de metais pesados em plantas de *R. communis*, bem como, na fotossíntese.

III - Determinar a distribuição de níquel e cromo (VI) em *R. communis* e avaliar as concentrações fitotóxicas destes metais para a espécie, utilizando medidas de fluorescência da clorofila a e de crescimento das plantas.

IV - Determinar a localização de níquel nos tecidos de raízes e de folhas de *R. communis* e avaliar o efeito deste metal na anatomia e na absorção e no transporte de outros micronutrientes (Cu, Fe, Zn).

REFERENCIAL TEÓRICO

1- CARVÃO MINERAL, USO E IMPACTO AMBIENTAL

1.1- Uso de carvão mineral

De acordo com o último relatório da IEA (*International Energy Agency*, 2007) entre 2002 e 2030 a demanda de carvão deve crescer anualmente 1,4% e em 2030 o consumo de carvão deve ultrapassar sete bilhões de toneladas. No Brasil, o carvão representa apenas 6,6 % da matriz energética. As reservas nacionais de carvão são de aproximadamente 31,7 bilhões de toneladas representando apenas 1,2 % das reservas mundiais. As principais reservas brasileiras de carvão mineral estão localizadas na região Sul, sendo que o Rio Grande do Sul detém aproximadamente 90% das reservas nacionais (Agencia Nacional de Energia e Eletricidade -ANEEL, 2003).

O carvão é uma complexa e variada mistura de componentes orgânicos sólidos, fossilizados ao longo de milhões de anos. Pode ser definido como uma rocha sedimentar combustível, formada a partir de determinados vegetais encontrados em diferentes estados de conservação e tendo sofrido soterramento e compactação em bacias originalmente pouco profundas, possuindo teores variáveis de carbono, oxigênio e hidrogênio de acordo com os diversos estágios de transformação dos vegetais em carvão (Abreu, 1973 *apud* Guerra, 2000). Sua qualidade é determinada pelo conteúdo de carbono, que varia de acordo com o tipo e o estágio dos componentes orgânicos e segue a seguinte ordem de purificação: turfa (45% de carbono), linhito (60 a 75%), hulha (75 a 85%) e antracito (90%). Os carvões brasileiros são de difícil classificação e apresentam altos teores de cinza e enxofre da ordem, de 50% e 25%, respectivamente. Esse elevado grau de impureza contribui para o baixo índice de aproveitamento de carvão no Brasil (ANEEL, 2003).

A utilização do carvão como recurso energético gera quantidades significativas de resíduos, os quais constituem grande problema ambiental, afetando diretamente o solo, a água e o ar. No Rio Grande do Sul e, especialmente, em Santa Catarina, a disposição inadequada dos resíduos de carvão causou e causa grave impacto ambiental, com comprometimento da qualidade dos recursos hídricos e do solo, sendo que somente a partir do final da década de 80 começaram a ser reparados (Zocche, 1989, Zanardi & Porto, 1991, Marcomin & Porto 1998, Binotto et al., 1999).

1.2- Produção de resíduos pela atividade carbonífera

A atividade carbonífera gera diferentes impactos no ambiente ao longo de toda a cadeia que engloba as etapas de mineração, beneficiamento e industrialização. Durante a mineração, que pode ser a céu aberto ou subterrânea, o maior impacto é diretamente no solo. Na lavra a céu aberto, a camada superficial do solo é completamente removida promovendo a destruição da flora e da fauna locais, perda da microfauna do solo e da matéria orgânica. A exposição das camadas inferiores torna-as mais suscetíveis à erosão causando assoreamento das drenagens (Bugin, 2002). Outro problema é a exposição da pirita às condições oxidantes formando a drenagem ácida. A pirita é uma rocha rica em sulfato que ocorre associada ao carvão, que, em condições oxidantes, forma ácido sulfúrico, que solubiliza minerais, dentre eles metais pesados. Estes, se tornando disponíveis aos organismos vegetais, podem posteriormente entrar na cadeia trófica (Carson et al., 1982).

Na etapa de beneficiamento, as impurezas como argila e pirita são retiradas do carvão por diferentes processos, os quais são classificados pela granulometria do carvão (Sampaio, 2002). A maior parte destes processos utiliza água para facilitar a separação do carvão. A água e as impurezas, conhecidas genericamente como rejeitos, podem conter grandes quantidades de metais pesados dependendo do grau de impureza do carvão. Segundo Akers e Dospoy (1994), os principais metais que podem ser removidos do carvão na etapa de beneficiamento são: Ni, As, Se, Cd, Cr, Hg e Pb. Alguns procedimentos, como reaproveitamento e filtragem da água e a deposição dos rejeitos nas cavas de extração, são adotados pelas empresas como forma de diminuir o impacto ao ambiente.

Na etapa de industrialização, o carvão pode ser utilizado em diferentes segmentos: carboquímica (síntese de metanol, metano, amônia e outros), siderurgia (produção de aço) e geração de energia elétrica (Ferret et al., 2002; Osório & Vilela 2002). Nesse último processo o carvão é queimado em grandes caldeiras de geração de vapor que alimentam turbinas geradoras de eletricidade. A combustão de carvão gera grande quantidade de resíduos, chamados genericamente de cinzas.

As cinzas geradas durante a combustão podem ser de diferentes tipos (Rissato, 1982 apud Rohde 1995): (i) escória (em inglês: *slag* ou *boiler slag*): apresentam granulometria grosseira e elevados teores de carbono não queimado (10-20 %) e são retiradas pelo fundo das fornalhas após serem resfriadas com água; (ii) cinzas pesadas ou

de fundo (*botton ash*): apresentam granulometria grossa e caem para o fundo das fornalhas e gaseificadores, sendo freqüentemente retiradas por fluxo de água. Contêm geralmente teores de carbono não queimado entre 5 e 10 %; (iii) cinzas leves, também denominadas de cinzas volantes (*fly ash*): são constituídas de partículas extremamente finas < 0,15mm e que são arrastadas pelos gases de combustão das fornalhas. Uma grande parcela dessas partículas é retirada por sistema de captação, tais como filtros de tecido, ciclones e precipitadores eletrostáticos.

Grandes quantidades de cinzas são geradas durante a combustão dos carvões brasileiros. Em média a queima de 1kg de carvão gera 0,5 kg de cinza e 1 kWh de energia (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica -CGTEE, 2007). As cinzas podem ser utilizadas, por exemplo, na indústria cimenteira. Entretanto, dado ao grande volume de cinzas produzido diariamente somente uma pequena parte é reutilizada. Desta forma, no Brasil, quando economicamente viável, as cinzas são depositadas nas cavas de extração do carvão quando esta ocorre a céu aberto. Entretanto, quando as distâncias tornam o transporte das cinzas economicamente inviável ou o carvão provém de minas subterrâneas, as cinzas são depositadas em áreas geralmente adjacentes as termelétricas (Zocche, comunicação pessoal). Sendo assim, inúmeras áreas de antigos depósitos de cinzas podem ser encontradas (Rohde, 1995) e novas continuam a surgir. As áreas de antigos depósitos foram na maioria das vezes abandonadas sem qualquer programa de recuperação.

Na combustão do carvão, inúmeros metais pesados são liberados para o meio ambiente como material particulado, aerossóis e/ou estão concentrados nas partículas de cinzas. A deposição inadequada das cinzas pode levar, facilmente, à contaminação do solo e da água. As cinzas podem ser lixiviadas no próprio local, ser transportadas pelos ventos ou pela erosão hídrica, contaminando o solo e a água (Alloway & Ayres, 1996; Benito et al., 2001). Segundo Martins (2002), alguns carvões possuem quantidades significativas de urânio, transformando as termelétricas em fontes significantes de radioatividade.

Os graves problemas ambientais gerados pela extração e processamento do carvão sempre chamaram a atenção, e inúmeros trabalhos científicos a respeito do impacto gerado pelo carvão e estratégias para a redução do problema são encontrados na literatura brasileira (Zocche & Porto, 1993; Citadini-Zanette, 1999; Zocche, 2005). Por outro lado, apesar dos riscos ambientais que as cinzas de carvão mineral representam, no Brasil, poucos trabalhos têm avaliado o impacto das mesmas (Rohde, 1995; Minozzo, 2006), e nenhum trabalho de revegetação destas áreas foi encontrado. Isto deixa claro que as áreas

de depósito de cinzas não estão sendo objeto de estudos, portanto, pouco pode ser proposto para a recuperação das mesmas. Por este motivo, a relação entre espécies vegetais e cinza de carvão mineral é tema deste trabalho, utilizando como base as cinzas leves e as áreas de depósito da termelétrica de São Jerônimo, RS. Esta termelétrica é a mais antiga do Rio Grande do Sul e apresenta grandes problemas ambientais relacionados ao depósito de cinza e a emissão de partículas na atmosfera.

1.2.1- Características químicas e físicas das cinzas.

As características físicas, químicas e mineralógicas das cinzas são variáveis, dependendo do tipo de processamento e do tipo de carvão. Entretanto, para algumas características, existem similaridades entre o mesmo tipo de cinza. As cinzas leves são compostas predominantemente por partículas de pequeno tamanho (0,01-100 μ m), porosas e vítreas e com densidade entre 2,1 e 2,6. Por outro lado, as cinzas pesadas contêm grande quantidade de agregados e podem incluir uma quantidade considerável de material com mais de 2 mm de tamanho (Carlson & Adriano, 1993).

Os estudos têm mostrado que as cinzas possuem concentrações superiores de certos metais pesados em relação ao carvão de origem. Isso ocorre em função dos processos de enriquecimento que as cinzas sofrem durante a combustão do carvão (Adriano et al., 1980; Pires et al., 2002). Durante a combustão alguns elementos são volatilizados e posteriormente condensam-se sobre a superfície das cinzas quando os gases são resfriados (Natusch et al., 1974 *apud* Pires, 2002). Para Adriano et al. (1980), os elementos As, B, Ca, Mo, S, Sr e Se são geralmente enriquecidos durante o processo de combustão do carvão. O enriquecimento do metal durante a combustão está diretamente relacionado com a volatilidade do elemento. Segundo Iyer (2002), os elementos Mn, Ba, V, Co, Cr, Ni, Ln, Ga, Nb, As, Sb, Sn, Br, Zn, Se, Pb, Hg e S são mais facilmente volatilizados durante a combustão do carvão. Os elementos Mg, Na, K, Mo, Ce, Rb e Nb são poucos volatilizados, enquanto, Si, Fe, Ca, Sr, La, Sm, Tb, Yb, Y, se, Zr, Ta, Ag e Zn são pouco ou não volatilizados durante a combustão do carvão.

As concentrações de metais pesados nas cinzas são muito variáveis; entretanto é amplamente reportado que certos metais pesados podem estar em concentrações elevadas nas cinzas e, portanto, as cinzas possuem potencial poluidor (Tabela 1). Dessa forma, a sua utilização e deposição no ambiente devem ser acompanhadas de planejamento e alguns cuidados. Segundo estudo realizado com cinzas das Termelétricas do Rio Grande

do Sul (São Jerônimo e Charqueadas), que levou em conta as normas NBR 10006 (ABNT, 1987a), NBR 10005 (ABNT, 1987b) e NBR 10004 (ABNT, 1987c), as cinzas constituem resíduos “não-inertes”, portanto deveriam seguir normas para a sua deposição no solo. Nos ensaios de solubilização, as cinzas leves de São Jerônimo apresentaram valores acima do estabelecido para As= 51,4 $\mu\text{g l}^{-1}$; Al=0,47 mg l^{-1} ; surfactantes= 0,33 mg l^{-1} fenol 0,33 mg l^{-1} e fluoreto= 2,0 mg l^{-1} (Rohde, 1995).

Outra característica comum às cinzas é o baixo teor de nitrogênio, o qual volatiliza durante a combustão. As concentrações de outros macronutrientes, como fósforo, podem ser elevadas, porém, as concentrações disponíveis podem ser reduzidas em função da complexação com Al e Fe (Carlson & Adriano, 1993). A maioria das cinzas possui pH alcalino (pH 8,5 - 12,5). Entretanto, cinzas provenientes de carvões com elevados teores de enxofre podem apresentar pH ácidos (pH 6 – 6,7) (Gupta et al., 2002). As cinzas das termelétricas de São Jerônimo e Charqueadas apresentaram pH alcalino, tanto em testes de solubilização quanto de lixiviação das mesmas (Rohde, 1995).

Tabela 1. Características químicas de cinzas leves provenientes de diferentes termelétricas.

Composição química	Termelétrica		
	Florida (EUA) (Li & Chen, 2006)	São Jerônimo (Brasil) (Rohde, 1995)	Bhusawal (Índia) (Twardowska et al., 2003)
pH (água)	9,4	10,58	8,2- 8,6
Zn (mg kg^{-1})	198	78	90
Cu (mg kg^{-1})	285	44	54,0
Mn (mg kg^{-1})	96	78	194
Fe (mg kg^{-1})	45348	5346	2,98 (%)
Cd (mg kg^{-1})	3	0,53	9,7
Pb (mg kg^{-1})	113	1,70	36,0
Ni (mg kg^{-1})	79	22,8	136,0
Argila (%)	11,3	3	-
Silte (%)	82,5	15	-

Observa-se na Tabela 1 que a concentração de metais pesados nas cinzas pode ser muito variável entre as termelétricas, bem como os teores de argila e silte. Comparada as demais termelétricas, as cinzas de São Jerônimo apresentam menores teores de metais pesados e pH mais alcalino.

1.2.2- Impactos ambientais causados pela deposição de cinzas de carvão

As áreas de depósito de cinzas são locais completamente alterados. O solo é recoberto por uma camada de cinza que geralmente excede alguns metros de altura, impedindo o contato das raízes com o solo. Outro problema associado a estes locais é o potencial poluidor das cinzas. Segundo Carlson & Adriano (1993), os principais impactos das cinzas de carvão nos ecossistemas incluem: a) lixiviação de substâncias potencialmente tóxicas das cinzas para o solo e para a água; b) redução no estabelecimento e no crescimento de plantas; c) mudança na composição de elementos químicos nas plantas e aumento na ciclagem de elementos potencialmente tóxicos por meio da cadeia alimentar. Nesta revisão serão focados os dois últimos impactos, por estarem diretamente ligados ao tema abordado neste trabalho. Os estudos do comportamento de metais em áreas de depósito são escassos no Brasil. Poucos trabalhos têm avaliado a disponibilidade de metais diretamente nos depósitos e as implicações a longo prazo, à vegetação, à fauna bem como às águas subterrâneas e superficiais.

1.2.2.1-Efeito das cinzas no estabelecimento e no crescimento de plantas

É de conhecimento geral que o estabelecimento da vegetação nas áreas de depósito de cinzas desempenha funções importantes para: (i) estabilização física das cinzas contra a erosão eólica e hídrica, (ii) melhoria das condições químicas e conseqüentemente melhoria para o estabelecimento da microfauna do solo e (iii) recomposição estética da paisagem (Cheung et al., 2000; Vajpayee et al., 2000; Gupta & Sinha, 2007). Entretanto, a revegetação natural desses locais ocorre lentamente, devido à presença de limitações física e/ou química das cinzas, as quais são prejudiciais ao crescimento das plantas.

Segundo Carlson & Adriano, (1993), os principais fatores que limitam o estabelecimento da vegetação nos locais de depósito de cinza são: deficiência de nutrientes essenciais como N e P; toxicidade causada pelo pH extremamente alcalino e/ou pela elevada concentração de sais solúveis como boro, presença de metais pesados; e formação de camadas compactadas e/ou cimentantes. As cinzas também podem levar à deficiência indireta de nitrogênio às plantas por causar danos aos microorganismos fixadores de nitrogênio (Martensson & Witter 1990). A concentração de fósforo nas cinzas pode ser elevada, atingindo valores entre 400-800 mg de P kg⁻¹, mas em geral muito pouco desta concentração é disponível às plantas (Page et al., 1979). A adição de

outros resíduos como lodo de esgoto, dejetos de suínos e bovinos, com concentrações elevadas de nitrogênio e fósforo tem sido testada para auxiliar no estabelecimento da vegetação nas áreas de depósito de cinzas (Tripathi et al., 2004).

A presença de metais pesados nas cinzas é um dos principais problemas deste resíduo. Embora seja de conhecimento geral que as cinzas apresentam concentrações elevadas de alguns metais, poucos trabalhos têm avaliado a dinâmica dos metais neste resíduo em condições de campo. A fitodisponibilidade de metais pesados foi estudada por Maharaj et al. (2006), numa área de depósito de cinzas na Carolina do Sul (EUA), pelo método de extração seqüencial. A extração seqüencial possibilita determinar a quantidade de metal associada a diferentes compartimentos geoquímicos do solo (por exemplo. trocável, associados aos óxidos, matéria orgânica, argilas e presente na estrutura cristalina). Os autores supra citados mostram que, dentre os metais estudados, Mn, Zn, Ni e Cr foram ligados à fração orgânica e trocável. Pb e Se foram fortemente ligados à fração cristalina, ou seja, não disponíveis, enquanto Al, As Cd e Fe foram fracamente ligados à fração cristalina. Como forma de confirmar se a análise seqüencial foi capaz de prever corretamente a fitodisponibilidade dos metais, a concentração de metais na vegetação espontânea na área foi investigada. Exceto para Cr e Ni, a extração seqüencial indicou de forma correta a fitodisponibilidade de metais as plantas. A concentração dos metais nas plantas foi dependente da espécie, e os níveis ficaram dentro dos limites permitidos. Algumas espécies estudadas tiveram acúmulo de Se. As concentrações médias de Se 14,19 mg kg⁻¹ e 10,76 mg kg⁻¹ encontradas nas espécies *Panicum capillare* e *Eupatorium compositifolium* foram maiores que a concentração de 8,8 mg kg⁻¹ encontrada nas cinzas. Assim, os autores sugerem o monitoramento contínuo da vegetação local, a fim de avaliar se as concentrações de metais nas plantas não atingem níveis tóxicos.

A elevada concentração de sais solúveis aumenta a condutividade elétrica das cinzas dificultando o estabelecimento das plantas. Para a maioria das espécies vegetais, incluindo as plantas de interesse agrônomo, condutividade acima de 4 dS m⁻¹ afeta o crescimento normal das plantas. Inúmeros trabalhos têm mostrado que as cinzas apresentam valores de condutividade elétricas bem maiores: 7,42 dS m⁻¹ (Dwivedi et al., 2007) e 7,61 dS m⁻¹ (Gupta et al., 2006). Embora Carlson & Adriano (1993) considerem o boro como um dos elementos responsáveis pelo aumento da condutividade das cinzas, a variabilidade na concentração deste elemento nas cinzas não permite uma afirmação conclusiva. Desta forma, o aumento na condutividade elétrica nas cinzas é atribuído ao

aumento de diferentes sais na solução, dependendo das cinzas avaliadas (Gupta et al., 2002).

O pH é uma das variáveis mais importantes que controla a disponibilidade dos elementos químicos do solo, nutrientes ou não nutrientes. Em uma análise simplificada, podemos dizer que as condições extremas de pH, alcalinas ou ácidas, alteram a disponibilidade dos elementos e a vida microbiana, afetando, portanto a nutrição das plantas. Tal como outras características, o pH das cinzas é variável em função do tipo de carvão. Pinto (1997) verificou pH alcalino (pH 8,3) para as cinzas da termelétrica de Candiota, RS.

As características físicas das cinzas também são citadas como um fator negativo para o estabelecimento das plantas. Algumas cinzas possuem características cimentantes e podem formar camadas compactadas, diminuindo a infiltração de água e a penetração de raízes (Carlson & Adriano, 1993; Gupta et al., 2002). Mulhern et al. (1989) mostraram que, embora algumas espécies possuam a capacidade de colonizar os depósitos de cinzas, o sucesso no estabelecimento da vegetação nas cinzas nem sempre é alcançado. Em um estudo no Kansas (EUA), sete espécies herbáceas e seis espécies arbóreas foram plantadas em cinzas pesadas (pH=7,1), com e sem adição de fertilizantes, resíduos de madeira, grama e dejetos de bovinos. O resultado do estudo foi que nenhuma das espécies sobreviveu, independente do tratamento aplicado. O principal fator que contribuiu para isso foi a característica das cinzas: baixa capacidade de retenção de água, elevada temperatura (devido à cor escura das cinzas) e presença de uma camada compactante entre 6 e 10 cm abaixo da superfície.

Como descrito acima, as cinzas apresentam características químicas e físicas que dificultam o estabelecimento das espécies vegetais. Porém, diferentes espécies vegetais são capazes de colonizar áreas de depósito de cinzas e são de grande interesse para a recuperação destas áreas. A implantação de vegetação em depósitos de cinza é uma etapa fundamental para a recuperação ecológica destas áreas.

1.2.2.2. Efeito das cinzas de carvão no aumento da concentração de metais pesados na vegetação

Os trabalhos envolvendo a questão do efeito das cinzas na concentração de metais pesados nas plantas objetivaram, inicialmente, determinar as concentrações desses elementos nas espécies vegetais que cresciam naturalmente sob as áreas de depósito de cinzas. Elevados níveis de Se, (acima de 60 mg kg⁻¹ em algumas plantas) foram encontrados em *Melilotus alba* Medik e *Melilotus officinalis* Lamb que colonizavam um depósito de cinza em Nova Iorque (Furr et al., 1975 apud Carlson & Adriano, 1993). Scanlon & Duggan (1979) observaram elevada concentração de B, Ni e Se em sete espécies arbóreas plantadas sob depósitos de cinza.

No Rio Grande do Sul, em áreas de depósito de cinzas adjacentes à termelétrica São Jerônimo, Porto (2002) observou concentrações anormais de cromo (19,8 µg g⁻¹) em folhas de *Paspalum* sp. A autora também verificou concentrações elevadas de chumbo (4,7µg g⁻¹) e concentrações excessivas de cromo (1,34 a 4,6 µg g⁻¹) em plantas de alface coletadas em hortas domésticas existentes na área de influência do depósito de cinzas.

A maior ou menor acumulação de metais nas plantas sob influência das cinzas depende da espécie analisada. Em um estudo em área de depósito de cinzas, as concentrações médias de ferro nas espécies *Cynodon dactylon* Pers., *Borrhevia repens* L., *Achyranthus aspera* L. e *Blumera lacera* DC. foram 1203, 460, 3823 e 1138 mg kg⁻¹, respectivamente (Maiti & Nandhini, 2006). Essas concentrações foram acima das concentrações de 150 mg kg⁻¹ consideradas normais para plantas (Markert, 1994 apud Greger, 2004).

Uma das práticas comuns no manejo das cinzas é o recobrimento dos depósitos com uma camada de solo e, posteriormente, a implantação da vegetação. Poucos trabalhos têm avaliado a eficiência desta prática na restauração das áreas bem como a acumulação de metais nas plantas. Weisten et al. (1989) estudaram a acumulação de metais em gramíneas e leguminosas crescendo em quatro depósitos de cinzas, em Nova Iorque. A cobertura das cinzas, com aproximadamente 60 cm de solo não evitou que as plantas acumulassem elevados níveis de boro e selênio. Stoewsand et al. (1990) também encontraram elevadas concentrações de selênio em *Brassica napus* L. crescendo sob cinzas recobertas por solo. Estes estudos mostram que as cinzas podem levar ao aumento na concentração de metais pesados nas plantas mesmo quando recobertas com solo. Desta forma, é importante um maior número de estudos nestes ambientes e o contínuo

monitoramento das concentrações de metais nas plantas para a correta avaliação da influência das cinzas na composição química das mesmas.

Embora seja de consenso geral que as cinzas podem levar ao aumento da concentração de metais pesados nas plantas com efeitos deletérios às mesmas, a viabilidade do uso das cinzas na agricultura vem sendo amplamente investigada, especialmente nos últimos anos (Carlson & Adriano 1993; Mitra et al, 2005; Jaja & Goyal 2006; Dwivedi et al., 2007). Ram et al. (2007), por exemplo, avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações de cinza no solo, com e sem, a adição de resíduos de cana de açúcar (ricos em matéria orgânica) na produção e crescimento de *Arachis hypogaea* L., *Crotalaria juncea* L. e *Zea mays* L durante seis cultivos intercalados dessas espécies. Os autores observaram que a aplicação de 200t/ha de cinzas com e sem adição de 10 t/ha de material orgânico vegetal aumentou significativamente a produção das espécies estudadas. Independente das concentrações aplicadas, a adição de cinzas promoveu aumento nas concentrações de metais (Cu, Zn, Mn, Fe, Cr, Pb e Ni) nas sementes e casca de *A. hypogaea*, mas em nenhum tratamento atingiram níveis tóxicos. Os autores sugerem que o uso das cinzas na agricultura seria uma forma viável de diminuir os problemas com os grandes depósitos de cinzas. Entretanto, um estudo aprofundado das características físicas e químicas de cada tipo de cinza é necessário antes de indicar seu uso na agricultura.

Atualmente, embora a cinza seja utilizada para diversos fins, como construção civil, o consumo brasileiro e mundial é ainda menor que a produção. Assim, depósitos de cinzas continuam surgindo em todos os países, ocupando áreas e alterando ambientalmente grandes extensões de terra. Por este motivo, existe a necessidade de ao menos reduzir ou minimizar os impactos químico, físico e paisagístico gerado pela deposição das cinzas no ambiente. Como veremos no item a seguir a revegetação desses ambientes é uma das etapas iniciais e principais para a promoção de qualquer forma de restauração dessas áreas.

1.3. Recuperação de áreas degradadas por depósito de cinzas

No contexto de um ecossistema terrestre, área degradada pode ser definida como uma área que sofreu destruição da cobertura vegetal e da fauna, perda da camada fértil do solo e alteração na qualidade e vazão do sistema hídrico (Minter/IBAMA, 1990). A preocupação com o reparo dos danos provocados pelo homem tem levado a proposição de diferentes metodologias de intervenção, sendo que uma terminologia particular é utilizada para designar os processos naturais e artificiais de reparação de danos ambientais aos ecossistemas terrestres (Engel & Parrota, 2003).

O termo “recuperação” (*reclamation*) é amplamente utilizado no Brasil. Segundo Engel & Parrota (2003), a recuperação refere-se tipicamente aos trabalhos realizados em sítios mais severamente degradados pelas atividades mineradoras ou grandes obras da construção civil. No manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração (Minter/IBAMA, 1990), recuperação é definida como “o retorno do sítio degradado a uma forma e utilização de acordo com um plano pré-estabelecido de uso do solo”. Entretanto, outros termos, como reabilitação e restauração ecológica, são freqüentemente utilizados para designar práticas semelhantes, porém não podem ser utilizados como sinônimos de recuperação. A reabilitação refere-se tipicamente a ações sobre ecossistemas degradados. Na reabilitação o objetivo é restaurar a produtividade do solo sem a preocupação com a similaridade com o ecossistema original, mas de modo que o ecossistema recriado seja auto-sustentável a longo prazo, cujas espécies dominantes sejam capazes de se regenerar e permanecer dominantes no sítio. A restauração ecológica tem como meta a viabilidade ecológica a longo prazo do ecossistema, e a recriação, no futuro de comunidades mais próximas possíveis das naturais, quanto a estrutura e ao funcionamento (Engel & Parrota, 2003). Na Figura 1 podemos observar que a diferença entre as abordagens está na definição das metas e dos objetivos e que a recuperação e a reabilitação podem ser etapas da restauração ecológica. Embora ainda existam divergências a respeito do uso dos diferentes termos, recuperação, reabilitação e restauração, a tendência mundial é adotar o termo restauração.

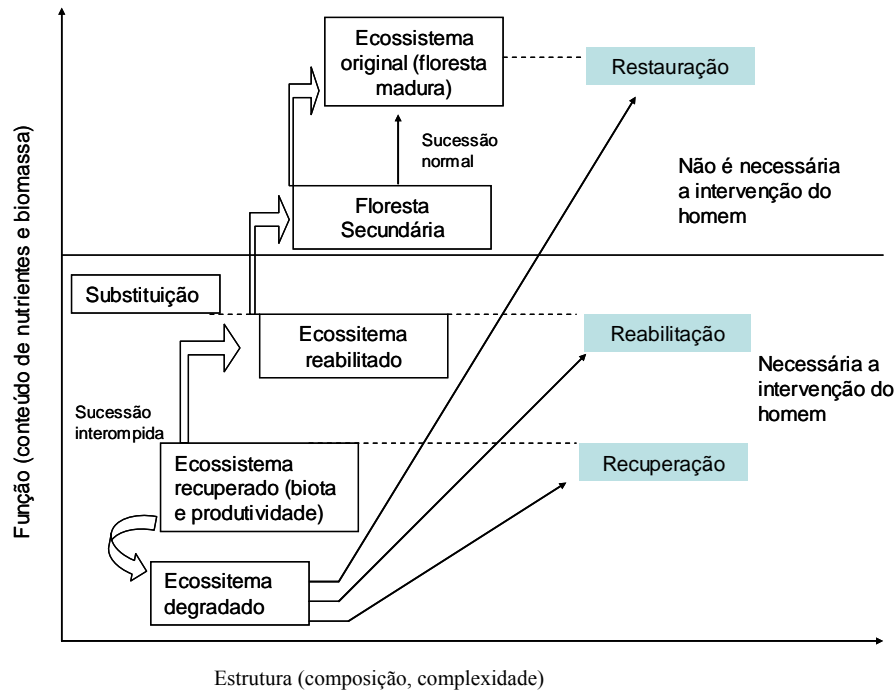


Figura 1. Abordagens na restauração ecológica, que inclui o conceito de recuperação. Adaptado de Bradshaw (1984) e Brown & Lugo (1994) citado em (Engel & Parrota, 2003).

A vegetação nas áreas de depósito de cinzas tem um papel importante na redução da difusão da poluição, não só pelo controle da erosão, mas também, pela fixação de contaminantes nos tecidos das plantas. Espécies capazes de acumular metais pesados em seus tecidos promovem a fixação desses elementos na área, diminuindo o risco de lixiviação dos contaminantes para os recursos hídricos ou para áreas adjacentes ao depósito. Conseqüentemente, a estratégia de estabelecimento da vegetação sobre as áreas de depósito de cinza é uma etapa indispensável para a restauração dessas áreas.

Entretanto, por suas características físicas e químicas, as cinzas impõem fortes limitações ao desenvolvimento vegetal. Por isso, o recobrimento das cinzas com camadas de solo e/ou adição de outros resíduos como lodo de esgoto e uso de fertilizantes vêm sendo testados para permitir o estabelecimento das plantas nesses locais (Tripathi et al., 2004; Sinha et al., 2005). Além disso, Gupta et al. (2002) salientam que o sucesso da revegetação nas áreas de depósito de cinzas depende da seleção de espécies vegetais capazes de crescer em ambientes enriquecidos com metais pesados e pH alcalino.

Neste sentido, Mulhern et al. (1989) demonstraram que plantas herbáceas do gênero *Agropyrum*, *Festuca* e *Melilotus* apresentam melhor capacidade de crescimento

em depósitos de cinza do que plantas arbóreas. Porém outros experimentos têm mostrado o potencial de espécies arbóreas para a revegetação de áreas de depósito de cinza. Por exemplo, Sinha & Gupta (2005) avaliaram a capacidade de *Sesbania cannabina* L. Ritz de acumular metais quando cultivada em cinzas. As plantas foram cultivadas em vasos com diferentes porcentagens de cinza (10, 25, 50 e 100%) e solo comercial. A concentração dos metais foi maior na parte aérea das plantas em comparação com as raízes em todos os tratamentos. Entre os metais estudados, as maiores concentrações observadas foram de ferro. Após 90 dias de cultivo, a concentração de ferro nas folhas foi em média $2400 \mu\text{g g}^{-1}$. Entretanto, o aumento na concentração dos compostos antioxidantes (cisteína, carotenóides, prolina livre, ácido ascórbico e tiol não-protéico) foi maior nas raízes do que nas partes aéreas das plantas expostas as cinzas. Por isso, segundo os autores, a espécie tem mecanismos de tolerância a metais pesados e, portanto é uma espécie recomendada para revegetação e fitorremediação de áreas contaminadas por cinzas de carvão.

Poucos estudos têm avaliado o potencial de revegetação das espécies que crescem espontaneamente em cinzas. Esses estudos são importantes, porque permitem avaliar não só a eficiência de determinada espécie na revegetação, mas também avaliar a eficiência da comunidade vegetal que geralmente se estabelece segundo critérios de sucessão vegetal. Maiti & Nandhini (2006) avaliaram a biodisponibilidade de metais nas cinzas e a acumulação desses na vegetação natural. Uma parcela de 3 m x 3 m x 1 m foi isolada em um depósito de cinza. Após um ano foi realizado o levantamento das espécies e amostras da cinza e das plantas foram coletadas. Após este período somente quatro espécies foram encontradas na área: *Cynodon dactylon* Pers (espécie dominante) e as outras espécies encontradas foram as herbáceas: *Borrhevia repens* L.; *Achyranthus aspera* L.; *Blumea lacera* DC. As espécies mostraram diferentes capacidades de acúmulo de metais. A máxima concentração de Fe foi encontrada em *A. aspera* (3813 mg kg^{-1}) e a menor concentração em *B. repens* (460 mg kg^{-1}), sendo que estas concentrações estão acima das concentrações normais (150 mg kg^{-1}) em tecidos vegetais, conforme Market et al. (1994). Para os demais elementos estudados (Co, Ni, Pb, Cu, Zn e Mn), todas as espécies também mostraram diferentes capacidades de acúmulo; entretanto as concentrações ficaram dentro da faixa de normalidade. Dentre as espécies, *C. dactylon* apresentou menor acúmulo de Mn, Zn, Cu, Pb, Ni e Co. Segundo os autores, essa característica associada à elevada taxa de crescimento torna *C. dactylon* uma importante espécie para a revegetação de áreas com cinzas. Isto porque promoveria um rápido recobrimento do solo sem acúmulo de metais e conseqüentemente não apresentaria problemas de toxidez.

Um importante estudo ecofisiológico desenvolvido por Pavlovic et al. (2004) mostrou que as plantas crescendo nas cinzas estão expostas a diferentes condições de estresse. Nesse estudo 10 espécies foram analisadas: *Tamarix gallica* L., *Spiraea van-hauttei* Briot., *Populus alba* L., *Ambrosia artmisifolia* L., *Amorpha fruticosa* L., *Eupatorium cannabinum* L., *Crepis setosa* Hall, *Epilobium collinum* Gmel., *Verbascum phlomoides* L. e *Cirsium arvense* (L) Scop, sendo que, as três primeiras foram introduzidas na área. Na média geral das plantas, os valores da eficiência fotossintética, obtida por medidas de fluorescência da clorofila foram menores que o ótimo. Isso foi resultado do desequilíbrio químico das cinzas e da deposição de cinza sobre a superfície das folhas. Essa deposição pode causar danos mecânicos às folhas e/ou atuar como barreira física reduzindo a eficiência de captação de luz pelas plantas. Outro resultado importante explorado pelos autores é que a invasão natural de herbáceas e arbustos têm importante função no controle da erosão e permite a estabilização das cinzas com baixo investimento.

Para avaliar a eficiência da revegetação na recuperação de duas áreas de depósito de cinza, Matla e Hendrina, na África do Sul, Van Rensburg et al. (2003) compararam a composição florística entre as áreas. Matla e Hendrina foram inicialmente recobertas com 20 cm de solo (estocado em pilhas) e 10 cm de solo recém escavado, respectivamente. A área que recebeu o solo sem prévia estocagem apresentou maior número de espécies. Além disso, as plantas apresentaram maior biomassa. As áreas também diferiram na composição das espécies dominante, sendo *Eragrostis curvula*, *Chloris gayana* e *Digitaria eriantha* dominantes na área Matla e *Eragrostis curvula*, *Hyparrhenia hirta* e *Cynodon dactylon* dominantes na área Hendrina. Ambas as áreas foram pobres em nutrientes essenciais, podendo com o tempo ser este um fator limitante ao desenvolvimento das plantas. Por isso é necessário, segundo os autores, uma manutenção mínima e freqüente para promover a sustentabilidade da vegetação.

Em outro estudo, realizado por Djurdjevic et al. (2006), foi mostrado que compostos fenólicos podem ser utilizados como bioindicadores do sucesso da revegetação em áreas de depósito de cinzas. A presença de determinados ácidos fenólicos identificam a ação de microorganismos que atuam na degradação da matéria orgânica para a formação do húmus. Os autores demonstraram uma correlação positiva entre a presença de compostos fenólicos nas cinzas e o aumento na abundância e cobertura vegetal. Desta forma, foi possível afirmar que a vegetação contribuiu de forma significativa para a melhoria das condições do substrato. A colonização da vegetação espontânea teve um

papel fundamental para o aumento da cobertura e contribuiu significativamente para o aumento da matéria orgânica no solo. A presença de compostos fenólicos no solo demonstra que a matéria orgânica oriunda das plantas foi incorporada no solo. A matéria orgânica no solo é um dos principais fatores de melhoria da qualidade química, física e biológica do solo.

No Brasil, os trabalhos de recuperação de áreas degradadas pela atividade carbonífera focam a recuperação de áreas de extração de carvão, por exemplo, Gaivizzo et al. (2000), Rigotti (2002), Costa et al. (2006), Zocche et al. (2007). Possivelmente, a falta de levantamentos oficiais das áreas de depósito de cinzas e o aparente menor impacto que as cinzas promovem em relação aos rejeitos de carvão sejam as causas do não desenvolvimento de pesquisas nessas áreas. Entretanto, como amplamente discutido por Rohde (1995), as cinzas não são um resíduo inerte e a deposição das mesmas causa grande impacto no ambiente. Por isso o estudo da vegetação espontânea, que ocorre nas áreas de depósito de cinzas, pode servir com um modelo para a revegetação dessas áreas visando em longo prazo à restauração ecológica desses ambientes.

2. OS METAIS PESADOS NO AMBIENTE

Os resíduos de carvão mineral, assim com inúmeros outros resíduos industriais contribuem para o incremento significativo de metais pesados no ambiente, levando em muitos casos à sua contaminação. O entendimento das características das fontes de metais para o ambiente e os mecanismos de interação entre os metais com o substrato e com as plantas é fundamental para o delineamento de estratégias de restauração de áreas degradadas pela atividade carbonífera.

2.1. Comportamento dos metais pesados no solo

O termo metais pesados é utilizado para designar elementos com densidade maior que 5 g cm^{-3} e engloba metais e metalóides que estão relacionados com poluição, toxidez e elementos essenciais utilizados como micronutrientes por diferentes organismos (Adriano, 2001). Outros termos como elementos traços, metais traços geralmente são utilizados na literatura como sinônimos.

O conhecimento das reações que regem o comportamento dos metais pesados no solo é essencial para avaliar o impacto que estes podem provocar no ambiente. As principais preocupações em relação à adição de metais pesados ao solo são entrada na cadeia alimentar, contaminação do solo, efeitos fitotóxicos e contaminação dos recursos hídricos. Os metais adicionados no solo podem estar presentes em diferentes compartimentos, conforme fluxograma apresentado por Alloway (1995) (Figura 2).

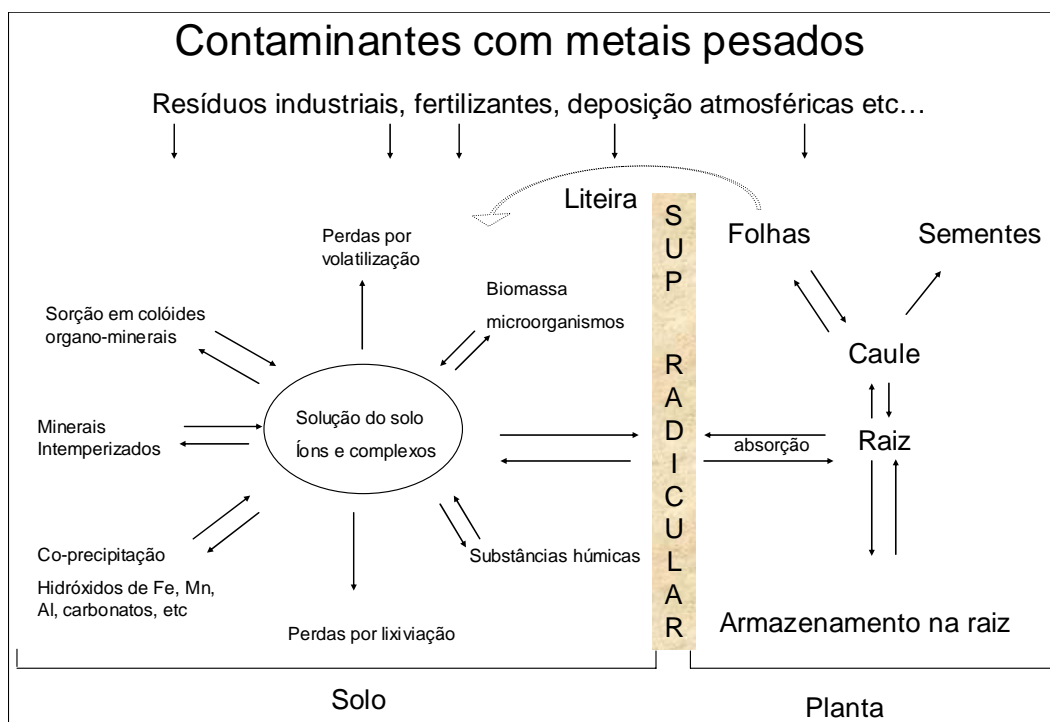


Figura 2. Principais componentes do sistema solo-planta participantes da dinâmica de metais pesados presentes nos solos (Adaptado de Alloway, 1995).

Os metais pesados podem estar presentes no solo em diferentes formas, as quais podem sofrer constantes alterações. As principais formas que os metais pesados podem estar no solo são resumidamente descritas abaixo (McBride, 1994).

- Solúveis: íons livres, complexos solúveis com ânions inorgânicos ou ligantes orgânicos. Nessa forma os metais são facilmente absorvidos pelas plantas e/ou lixiviados no solo.
- Trocáveis: nesta forma, os metais estão ligados por forças eletrostáticas em sítios carregados negativamente presentes nos minerais ou na matéria orgânica. A energia de ligação é baixa, possibilitando assim, uma troca rápida com a fração presente na solução do solo.

- Adsorvidos: ligados covalentemente a sítios específicos. Os metais nesta forma são liberados lentamente para a solução porque a ligação do metal com o sítio específico é uma ligação de alta energia.
- Ligados a materiais orgânicos insolúveis: ligados a frações orgânicas de lenta degradação ou presente em células recentemente mortas.
- Precipitados: os metais podem formar precipitados diretamente com os ânions, ou ainda podem ser co-precipitados junto a componentes pouco solúveis como Ca, Mg, Al e Fe.

Maharaj et al. (2006) mostraram que as formas de metais são variáveis nas cinzas. O cromo, níquel, manganês e zinco, por exemplo, foram predominantemente presentes na fração orgânica e forma trocável, enquanto o selênio e chumbo foram predominantes na fração cristalina e residual. No Brasil, o trabalho de Rohde (1995), avaliou a concentração total, extraível (HNO₃ 0,1 N), lixiviada (NBR 10005, ABNT 1987b) e solúvel (NBR 10006, ABNT 1987c) em cinzas de carvão. Na tabela 2 é possível observar a forma de alguns elementos para as cinzas leves de São Jerônimo.

Tabela 2. Formas de metais pesados em cinzas leves de carvão mineral obtidas da termelétrica de São Jerônimo (Rohde, 1995).

Elemento	Total (mg kg ⁻¹)	Extraível (mg kg ⁻¹)	Solubilizado (µg l ⁻¹)	Lixiviado (µg l ⁻¹)
Cu	44,0	4,63	10	20
Ni	22,8	5,53	16,6	79
Pb	1,70	0,16	1,60	1,60
Cr	120,0	2,36	6	6,0

Tal como no solo, os mecanismos de sorção dos metais com as partículas de cinzas dependem de inúmeras características, como pH, potencial redox e dos teores de argila, de matéria orgânica e de óxidos de ferro e manganês. A disponibilidade de metais é maior em substratos com pHs ácidos. Isto porque os íons de hidrogênio têm alta afinidade para cargas negativas, competindo assim, pelos sítios de ligação e liberando os metais para a solução. Por outro lado, o maior conteúdo de matéria orgânica, argila e óxidos

levam à redução da quantidade de metais na solução, pois aumentam o número de sítios com cargas negativas (Greger, 2004).

Considerando os diferentes compartimentos geoquímicos do solo, apenas parte da concentração total de metal presente num solo está disponível para as plantas. Existem inúmeros métodos de análise química, os quais utilizam extratores específicos para determinar a concentração disponível às plantas, tais como DTPA, CaCl_2 , EDTA e NH_4NO_3 (Greger, 2004). Em cinzas, estes extratores também têm sido utilizados para a determinação dos teores disponíveis (Twardowska et al., 2003). Entretanto, em alguns casos, a determinação da forma disponível não corresponde à concentração absorvida pelas plantas, já que as plantas podem apresentar mecanismos complexos de absorção: por exemplo, promover alterações no pH da rizosfera que influenciam a quantidade de metal absorvida pela planta (Mitsios & Danalatos, 2006).

2.2. Metais pesados nas plantas

2.2.1. Os primeiros conceitos e observações

Desde a idade média existe a percepção de que as plantas refletem a qualidade do substrato. Inicialmente as plantas foram usadas como indicadoras na busca por água, pedras preciosas e minerais (Brooks, 1998). A associação de plantas com tipo de solo específico tem sido a longo tempo reconhecida. Linstow (1929) *apud* Porto (1986) denominou as plantas que se associam a tipo específicos de substrato como *Bodenanzeigende Pflanzen* (plantas indicadoras de solo). Com o desenvolvimento dos primeiros métodos quantitativos para a determinação da concentração de elementos químicos em plantas, em 1940 foi relatada, pela primeira vez, a capacidade de uma espécie (*Alyssum bertolonii*) em acumular extraordinárias concentrações de metais (Malyuga, 1964).

Na década de 50 e 60 muitos trabalhos foram realizados com o objetivo de utilizar a vegetação para a identificação das propriedades do substrato (geobotânica). As mudanças morfológicas, como redução no tamanho de pétalas e mudanças na coloração foram utilizadas como características indicadoras de solos com concentrações elevadas de determinado metal. O fenômeno de mutabilidade de plantas e animais sob influência de

fatores químicos é comum na superfície da terra. Ele pode ser expresso nas mais variadas formas: mudanças morfológicas e fisiológicas, doenças em organismos, interferência no ciclo de vida. Muitas dessas alterações têm sido associadas com a estocagem de metais pesados nos tecidos. Malyuga et al. (1959) apud Malyuga, (1964) observaram pela primeira vez modificações anatômicas em células dos vasos condutores e nas células secretoras de látex de papola que cresciam em área rica de cobre, zinco e chumbo. Howard-Williams (1970) destaca que a presença de elementos metálicos nos solos, em concentrações excessivas provocam mudanças bruscas nos componentes edáficos e microclimáticos, submetendo a vegetação a uma variação notadamente distinta daquela que a cerca. Ernest (1972) define como *Scwermetallvegetation* (vegetação metalófila) àquela que cresce sobre áreas ricas em metais pesados.

No Brasil, os trabalhos pioneiros envolvendo a questão vegetação e metais pesados foram desenvolvidos por Porto (1981, 1986, 1989a e 1989b) em diferentes áreas do Brasil. Estes trabalhos mostraram que certas modificações morfológicas e anatômicas nas plantas estavam associadas com concentrações excessivas de metais pesados no solo. No Rio Grande do Sul, nas regiões de Seival (Caçapava do Sul), Sanga Negra (Encruzilhada do Sul) e Volta Grande (Lavras do Sul), a autora demonstrou que estruturas anatômicas escleromórficas em *Schinus lentiscifolius* estavam relacionadas com a presença excessiva de metais pesados no solo e nas plantas. Porto (1981) mostrou que em folhas de *S. lentiscifolius* de áreas mineradas o número de estômatos é significativamente menor do que em folhas de áreas não mineradas enquanto o número de cristais nos tecidos é significativamente maior. Também verificou reduções de tamanho (nanismo) e modificações de forma de vida para a espécie.

2.2.2. Absorção de metais pelas plantas

A absorção dos metais pelas plantas ocorre a partir do contato do metal com as raízes, que se dá por difusão, fluxo de massa e interceptação das raízes com o metal (Marschner, 1995). A interceptação é menos relevante em relação à difusão e ao fluxo de massa. Quando a quantidade de metais pesados fornecida pelo fluxo de massa, que é gerado pela transpiração, é inferior à quantidade absorvida pela planta, a concentração na solução próxima as raízes diminui. Com isso, um gradiente de concentração é formado e ocorre a difusão de metais em direção as raízes. É importante determinar qual o papel de cada processo na absorção de metais. Se a difusão for predominante, por exemplo, fatores

que reduzem a mobilidade difusiva do metal, como a complexação, devem reduzir também a absorção pelas plantas (Mitsios & Danalatos, 2006). Por outro lado, se o fluxo de massa é mais importante, o aumento da transpiração da planta pode resultar em maior absorção do metal (Blaylock et al., 1997).

Estando os metais em contato com as raízes, eles poderão ser absorvidos pelas mesmas. Segundo Salt et al. (1995), os metais pesados essenciais e não essenciais possivelmente entram na planta pelos mesmos mecanismos. Duas etapas são importantes nesse processo: a entrada passiva, via apoplasto (extracelular), e a entrada ativa, via simplasto (intracelular). Primeiramente os metais atingem o apoplasto, onde a celulose, hemicelulose e glicoproteínas presentes na parede celular atuam como trocadoras de cátions em função de suas cargas negativas. Por isso muitos metais podem ficar adsorvidos a parede celular. Para atingir o xilema os metais primeiramente devem atravessar a barreira da endoderme e as estrias suberizadas de Caspary. Assim, os metais presentes no apoplasto são obrigados a atravessar as membranas plasmáticas das células da endoderme para depois alcançar o xilema.

A entrada de metais no interior da célula requer o transporte ativo dos mesmos através das membranas. Este processo envolve o consumo de energia e possivelmente depende da presença de carregadores e canais da membrana plasmática. Alguns genes envolvidos no transporte de metais têm sido caracterizados. O gene IRT1 (Iron Regulated Transporter) é envolvido no transporte de ferro e zinco (Eide et al., 1996; Kim & Guerinot, 2007). Diferentes famílias gênicas são conhecidas por codificar proteínas envolvidas no transporte de metais através da membrana plasmática, por exemplo: família ZIP (Zinco Regulated Transporter /Iron Regulated Transporter Protein), especialmente ZIP-3, que codificam proteínas capazes de transportar zinco, cádmio, cobre e possivelmente manganês (Grotz et al., 1998); família Nramp (Natural Resistance Associated Macrophage Protein), cujos genes codificam proteínas transportadoras de manganês em *Arabidopsis thaliana* (Thomine et al., 2000).

É possível que diferentes metais (essenciais e não essenciais) compitam pelos mesmos carregadores na membrana plasmática. Assim, a presença de um metal poderá causar a deficiência de outro elemento, sendo este, considerado um efeito indireto de toxidez dos metais pesados (Rhaman et al., 2005).

2.2.3. Efeitos tóxicos dos metais pesados nas plantas

A elevada concentração de metais nutrientes, como Fe, Zn, Cu, Ni e Mn ou não nutrientes como Pb, Cr, Cd e Hg podem causar danos ao metabolismo normal das plantas. A toxicidade pode ser resultante: (i) da ligação do metal com os grupos sulfidril das proteínas, levando à inibição da atividade e perda da estrutura; (ii) da substituição de elementos essenciais, levando a deficiência dos mesmos; (iii) da formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio que levam ao estresse oxidativo (Foy, 1978; Hall, 2002; Prasad, 2004; Küpper & Kroneck, 2005). A concentração de metal pesado que causa toxidez às plantas é fortemente dependente da espécie vegetal e do tipo de metal. As espécies vegetais diferem muito na capacidade de tolerar a presença de metais e os mecanismos de tolerância são geralmente específicos para cada metal. A seqüência de toxicidade dos metais pesados em plantas varia em função do grupo taxonômico considerado: em angiosperma (*Hordeum vulgare*) a seqüência observada foi Hg > Pb > Cu > Cd > Cr > Ni > Zn e para algas (*Chlorella vulgaris*) Hg > Cu > Cd > Fe > Cr > Zn > Ni > Co > Mn (Nieboer & Richardson, 1980 apud Shaw et al., 2004).

O aparato fotossintético é um dos locais mais sensíveis ao excesso de metais. Os metais pesados podem causar danos tanto na fase fotoquímica quanto na fase bioquímica da fotossíntese (Mysliwa-Kurdizel et al., 2004). Na fase fotoquímica, os danos são mais severos no fotossistema II em comparação com o fotossistema I (Clijsters & Assche, 1985). Os metais pesados podem interferir em praticamente todas as reações no fotossistema II. O Cu, por exemplo, interfere no complexo de liberação de oxigênio que envolve a doação de elétrons da água para o centro de reação do fotossistema II (Mysliwa-Kurziel et al., 2004). Experimentos *in vitro* mostraram que Ni inibe o transporte de elétrons (Krupa et al., 1993). Estudo com a alga *Chlorella pyrenoidosa* revelaram que o cromo (VI) pode causar a destruição do centro de reações do fotossistema II (Hörscsik et al., 2007).

Os metais interferem na fotossíntese também por alterar a atividade de enzimas do ciclo de Calvin. A atividade de uma das principais enzimas responsáveis pela fixação do carbono, a Ribulose 1-5 bisfosfato carboxilase-oxigenase, pode ser inibida por diferentes metais como Ni, Cu, Zn, Cd, Zn, como foi de mostrado em diversas espécies: *Cajanus cajan* (Sheoran et al., 1990), *Oryza sativa* (Lidon & Henriques, 1993), *Hordeum vulgare* (Stiborova et al., 1988), *Lolium perenne* (Monnet et al., 2001), respectivamente.

Os metais pesados interferem na síntese e a degradação de pigmentos ligados à fotossíntese, como clorofilas e carotenóides (Mysliwa-Kurdizel et al., 2004). Alguns metais como Cu e Ni podem substituir o átomo de Mg da molécula da clorofila, resultando em perda da eficiência fotossintética, porque as clorofilas substituídas não mantêm a fotossíntese, pois, resumidamente, pode-se dizer que estas clorofilas perdem a capacidade de absorção e transferência da energia (Küpper et al., 1998, Küpper & Kroneck, 2005). Além disso, os metais pesados podem causar mudanças na estrutura dos cloroplastos e no arranjo dos tilacóides (Choudhury & Panda, 2004; Vitória et al., 2006).

A geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que leva ao estresse oxidativo é uma das respostas comuns das plantas para diferentes estresses bióticos e abióticos. As plantas, mesmo sob condições normais produzem ROS nas células como intermediários da redução do O₂ para H₂O. Para conter os efeitos deletérios das ROS, as plantas possuem um eficiente sistema de defesa antioxidante constituído por enzimas (por exemplo, peroxidase, catalase, superóxido dismutase) e componentes não enzimáticos (por exemplo, cisteína, ascorbato, gluatationa) (Shaw et al., 2004; Gratão et al., 2005a). Diversos trabalhos mostram a ação do sistema antioxidante para conter os efeitos tóxicos dos metais pesados. Por exemplo, em culturas de células em suspensão de *Coffea arabica*, Gomes-Junior et al. (2006) verificaram que a indução da atividade de enzimas antioxidantes como superóxido dismutase, catalase, guaiacol peroxidase e ascorbato peroxidase evitaram a peroxidação de lipídios nas células expostas a 0,05 mM NiCl₂.

A peroxidação de lipídios é considerada um indicador de estresse oxidativo em plantas, que leva a perda da integridade e funcionalidade das membranas celulares. A peroxidação pode ser induzida por espécies reativas de oxigênio que são geradas como resultado da toxidez de metais pesados em plantas (Panda, 2003). Cardoso et al. (2005) verificaram, por exemplo, o aumento da peroxidação de lipídeos na parte aérea de plântulas de *Crotalaria juncea* expostas a 0,5 mM de NiCl₂.

O crescimento das plantas é usualmente utilizado com um parâmetro para avaliar a toxidez dos metais pesados (Köhl & Lösch, 2004). A inibição do crescimento por metais pesados é resultado de desordens metabólicas e de efeitos diretos sobre o crescimento, isto é, pelas interações com polissacarídeos da parede celular que resultam na redução da plasticidade e conseqüente redução do tamanho das células (Seregin & Ivanov, 2001). O crescimento das raízes geralmente é mais afetado pelos metais pesados, possivelmente por ser este o local de maior acúmulo de metais na maioria das espécies vegetais (Pandolfini et al., 1992; Liao et al., 2000). A redução do crescimento também pode ser resultado de

distúrbios nutricionais causado pelos metais pesados. Em *Zea mays*, por exemplo, o cromo reduziu a absorção de Fe, Zn e Mn (Sharma & Pant, 1994). Em *Vigna unguiculata*, a concentração de ferro na parte aérea foi menor nas plantas expostas a níquel (Kopittke et al., 2007).

Os efeitos diretos e indiretos dos metais pesados levam ao aparecimento de sintomas visuais de toxidez. Em geral os sintomas mais visíveis da fitotoxicidade por metais pesados incluem, caracteristicamente, redução do crescimento, clorose e necrose das folhas, e posteriormente sintomas típicos de senescência e abscisão (Shaw et al., 2004). A concentração de metal nos tecidos foliares acima da qual a produção da parte aérea é reduzida é considerado o nível crítico de toxidez. Este nível na planta pode ser definido como sendo a concentração do elemento na parte aérea que reduz em 10% a produção da planta (Kabata-Pendias, 2000). De acordo com Davis et al. (1978) citado por (Kabata-Pendias, 2000) o nível crítico de alguns metais para *Hordeum vulgare* é em mg kg⁻¹: Cd= 1,5; Cu= 20; Hg= 3; Ni= 26; Pb= 35 e Zn= 290.

Muitos trabalhos como, por exemplo, Barceló & Poschenrieder (1990); Sanitá di Toppi et al. (2002); Vitória et al. (2006); Kozhevnikova et al. (2007) mostram que as plantas, quando expostas a concentrações excessivas de metais pesados, podem apresentar modificações nas estruturas anatômicas e morfológicas. Entretanto, em muitos casos é difícil separar quando estas alterações na estrutura representam algum tipo de adaptação das plantas para tolerar os efeitos tóxicos dos metais ou quando elas são simplesmente um efeito negativo do metal sobre a célula ou tecido levando a um distúrbio da função e estrutura da célula (Barceló & Poschenrieder, 2004).

Dada a grande variação que as espécies vegetais apresentam na capacidade de absorver e acumular metais pesados, o estabelecimento de faixas de concentrações ‘normais’ para as plantas não é um processo simples. Entretanto, alguns autores apresentam valores considerados normais para as plantas (Tabela 3). Como pode ser observado na tabela 3, para alguns metais como o chumbo, os valores considerados normais são bem variáveis entre os autores. Entretanto, para a maioria dos metais existe certo consenso entre os autores. Embora variáveis estes valores são importantes, pois permitem balizar os estudos de influência de metais nas plantas e permitem comparar resultados de diferentes experimentos.

Tabela 3. Concentrações foliares de metais pesados consideradas normais, segundo diferentes autores.

Elemento	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)		
	(Markert, 1994)	Kabata-Pendias (2000)*	(Adriano, 2001)*
Cádmio	0,05	0,05- 0,2	0,05
Cromo	1,5	0,1-0,5	1,0
Cobre	10	5-30	5-20
Chumbo	1,0	5-10	0,2-1
Níquel	1,5	0,1-5,0	0,05-5
Zinco	50	27-150	27 -150

*- Estas concentrações foram tabuladas por estes autores tendo como referência inúmeros trabalhos de diversos autores.

2.2.4. Estratégias de resposta das plantas às elevadas concentrações de metais pesados no solo.

O conhecimento de que certas espécies vegetais são capazes de colonizar solos metalíferos é conhecido desde a década de 40 (Brooks, 1998). Essas espécies podem adotar a combinação de duas diferentes estratégias para evitar o efeito tóxico dos metais: excluir o metal ou permitir a acumulação nos tecidos utilizando, para tanto, diferentes mecanismos de tolerância internos (Salt, 2001). Baker (1981) classificou as plantas segundo as respostas das mesmas às elevadas concentrações de metais no solo, como:

- Exclutoras- a concentração do metal na parte aérea é mantida constante e menor que a concentração do metal no solo, até determinado limite acima do qual os mecanismos de resistência não são mais eficientes e a concentração aumenta bruscamente;
- Indicadoras- a absorção e o transporte para a parte aérea são regulados de modo que a concentração interna reflete os níveis externos; e
- Acumuladoras- apresentam a capacidade de acumular metais na parte aérea tanto em solos com baixa ou elevada concentração de metal (Figura 3A).

Recentemente, McGrath et al. (2000) propuseram algumas alterações no modelo proposto por Baker (1981) (Figura 3B). Isto se deve aos novos conhecimentos obtidos.

Estes mostram que as plantas hiperacumuladoras são capazes de acumular metais em concentrações bem acima das plantas indicadoras e exclusoras, sem apresentarem sintomas de toxidez. Além disso, no modelo proposto por Baker (1981), as plantas hiperacumuladoras poderiam crescer em solos com baixa concentração de metais. Entretanto, agora é conhecido que isto não é verdadeiro, pois as plantas hiperacumuladoras de Zn possuem um maior requerimento fisiológico deste metal, em comparação com outras espécies (Shen, 1997; Küpper et al., 1999). É importante ressaltar que para ser classificada como uma espécie hiperacumuladora a planta deve acumular elevada concentração de metal na parte aérea e não apresentar sintomas de toxidez (Callahan et al., 2006).

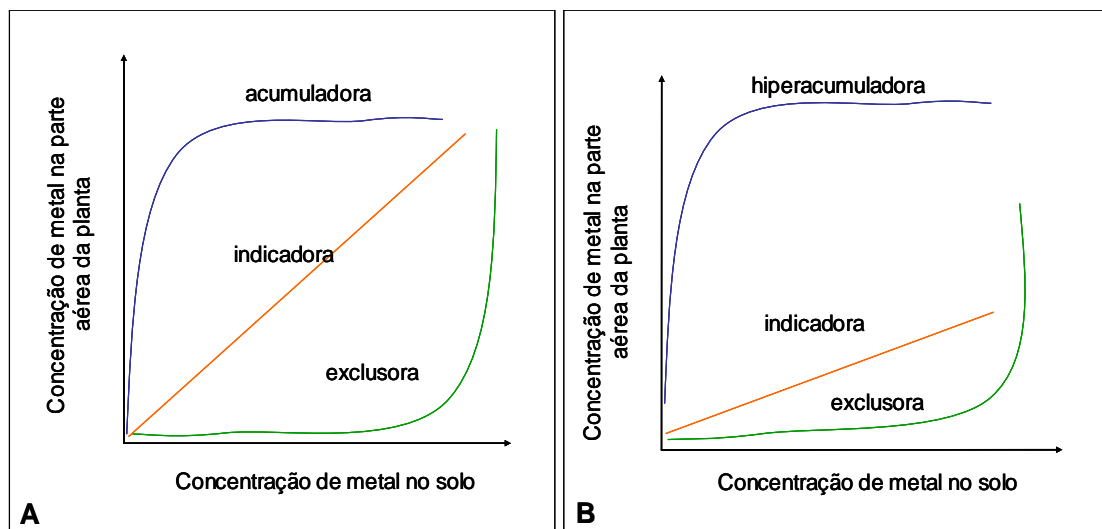


Figura 3. Possíveis respostas das plantas ao aumento de concentração de metais no solo. (A) modelo proposto por Baker (1981) e (B) modelo proposto por McGrath et al. (2000).

2.2.5. Mecanismos de tolerância a metais pesados

A tolerância a metais pesados pode ser definida como a capacidade de uma planta de sobreviver e reproduzir em locais que são tóxicos ou perigosos para a maioria das outras plantas, devido à elevada concentração no solo de um ou mais metais. Esta definição de tolerância requer a demonstração da fitotoxicidade do solo e a capacidade de uma planta crescer e reproduzir sem qualquer sinal de toxidez neste solo fitotóxico, onde

a maioria de outras plantas para o crescimento normal e mostram sinais de toxidez (Macnair, 1993; Macnair & Baker, 1994).

2.2.5.1. Mecanismos de exclusão

No caso das plantas exclusoras, a exclusão dos metais pode ocorrer em dois níveis, exclusão das raízes ou exclusão da parte aérea (Salt, 2001). A exclusão das raízes pode ocorrer pela redução da concentração de íons livres no solo que são disponíveis para a absorção e modificação de transportadores de membrana nas raízes. A redução da concentração de íons livres no solo pode ser feita por meio da secreção de substância quelantes pelas raízes, na rizosfera. Um exemplo típico é a liberação, pelas raízes, de ácidos orgânicos induzida pelo alumínio. Os ácidos orgânicos são capazes de quelar Al reduzindo assim a concentração de íons livres na solução do solo (Kochian, 1995). Em *Thlaspi arvense*, espécie não-acumuladora de Ni, a liberação de citrato e histidina pelas raízes aumentam com a exposição das plantas a níquel. De modo contrário, a espécie hiperacumuladora de níquel *T. goesingense*, quando exposta a concentrações crescentes de níquel, não apresenta aumento da concentração de citrato e histidina no exudato (Salt et al., 2000). Possivelmente nesta espécie o mecanismo de metal-exclusão tenha sido suprimido, permitindo a hiperacumulação de níquel. É importante ressaltar que, em muitos casos a liberação de agentes quelantes pelas raízes favorece a absorção do metal, aumentando a concentração deste na planta. Um exemplo clássico é a absorção de ferro (Römheld & Marschner, 1986).

A modificação da expressão de transportadores de membrana plasmática é outro mecanismo que pode levar a exclusão de metais, tanto pela redução do influxo e/ou aumento do efluxo. A expressão de genes ZIP1-3, os quais estão envolvidos no transporte de zinco, cádmio, cobre e possivelmente manganês, é fortemente induzida em raízes de plantas deficientes em zinco. Sob condições de concentrações suficientes ou de excesso de zinco, a expressão é suprimida (Grotz et al., 1998). Este mecanismo permite a planta excluir o excesso de zinco das raízes.

O aumento da expressão de genes envolvidos no transporte de metais para fora das raízes tem sido estudado como sendo outro mecanismo de exclusão de metais (Van der Zaal et al., 1999; Hall, 2000). Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre este mecanismo.

A exclusão dos metais da parte aérea é uma característica comum à grande maioria das espécies vegetais. Uma das formas de restringir o transporte para a parte aérea de

determinado metal é a acumulação deste em uma forma imóvel dentro das raízes. Plantas expostas a cádmio, por exemplo, mantêm-no nas raízes devido à complexação do mesmo aos grupos tióis das fitoquelatinas. Estes complexos não são transportados para a parte aérea (Rauser, 1999, Salt et al., 1995). A compartimentalização dos metais no vacúolo das células radiculares também é um eficiente mecanismo que reduz o transporte de metal para a parte aérea (Salt, 2001). A acumulação de zinco no vacúolo das células radiculares da espécie *Thlaspi arvense* (não-acumuladora) foi encontrada ser aproximadamente o dobro da concentração encontrada no vacúolo da espécie hiperacumuladora *T. caerulescens* (Lasat et al., 1998). A complexação dos metais com a parede celular das células radiculares podem auxiliar na retenção de metais nas raízes. A parede celular primária consiste de uma rede de celulose, hemicelulose (incluindo pectinas) e glicoproteínas. Uma porção variável da fração pectica consiste de ácido poligalacturônico que apresenta grupos carboxílicos negativamente carregados atuando como sítios de ligação de cátions. O número de sítios negativamente carregados na parede celular é variável, sendo maior nas dicotiledôneas do que nas monocotiledôneas (Greger, 2004). Inúmeros trabalhos mostram a acumulação de metais na parede celular, especialmente, no espessamento da endoderme das raízes (Wierzbicka, 1987; Heumann, 2002).

2.2.5.2. Mecanismos de acumulação dos metais na parte aérea

Como dito anteriormente, algumas espécies desenvolveram a capacidade de tolerar a presença de elevada concentração de metais no solo, acumulando estes na parte aérea. Isto foi descrito primeiramente por Minguzzi & Vergano (1948) apud Brooks (1998). Os autores observaram que a espécie *Alyssum bertolonii* Desv., que crescia em solo contaminado tinha a extraordinária capacidade de acumular nos tecidos da parte aérea cerca de 10.000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Ni. Somente 30 anos depois, o termo hiperacumuladora foi criado para descrever plantas que possuem a capacidade de acumular concentrações elevadas de metais na parte aérea da planta (Brooks et al., 1977 apud Brooks, 1998).

Atualmente são conhecidas mais de 400 espécies hiperacumuladoras de diferentes metais. Estas espécies estão distribuídas em cerca de 50 famílias. A família Brassicaceae possui o maior número de espécies hiperacumuladoras. Dentre todas as hiperacumuladoras identificadas, cerca de 75% são acumuladoras de níquel (Küpper & Kroneck, 2007). Estas espécies geralmente acumulam 3 a 4% de níquel na matéria seca

das folhas. Poucas espécies são conhecidas por hiperacumular cromo. Isto possivelmente ocorre porque o cromo no solo ocorre predominantemente na forma de Cr^{+3} , que é uma forma pouco disponível para as plantas. A espécie *Brassica juncea* é conhecida por hiperacumular Cr^{+6} , bem como Cu, Pb, Ni, Zn (Prasad, 2005). Para tolerar a elevada concentração de metal na parte aérea, as plantas desenvolveram inúmeras estratégias, descritas a seguir.

Uma vez absorvido pelas raízes, o transporte do metal para a parte aérea é controlado por dois principais processos: movimento para dentro do xilema e o volume do fluxo através do xilema, este último sendo mediado pela pressão de raiz e transpiração (Salt, 2001). O carregamento do xilema é um processo controlado pelos transportadores de membrana; entretanto, estes não são completamente conhecidos (Clemens, 2001, Clemens et al., 2002). A quelação de metais com certos ligantes, como histidina, e nicotianamina, parece ser um processo que facilita o carregamento do xilema. Trabalhos com a espécie hiperacumuladora *Alyssum lesbiacum* têm mostrado que o aumento na concentração do aminoácido histidina aumenta a concentração de Ni no xilema (Kerveb & Krämer, 2003). Uma vez dentro do xilema, os metais são transportados para a parte aérea. Diversos trabalhos têm sugerido que no xilema os metais são transportados principalmente ligados a aminoácidos e ácidos orgânicos. A complexação de metais com ligantes diminui a atividade química dos metais, diminuindo assim, a toxidez dos mesmos (Krämer et al., 1996; Salt et al., 1999; Pickering et al., 2000; Haydon & Cobbett, 2007).

Quando os metais chegam às folhas, eles necessitam ter seu potencial tóxico reduzido, para que não causem danos ao metabolismo. As plantas hiperacumuladoras utilizam diferentes mecanismos para prevenir a toxicidade dos metais. A complexação dos íons metálicos por ligantes ou precipitação com compostos insolúveis reduzem a concentração de íons metálicos livres com alta atividade química. Um exemplo deste mecanismo é a complexação do Cd com as fitoquelatinas. Este complexo é posteriormente acumulado nos vacúolos (Vögeli-Lang & Wagner, 1990; Salt & Rauser, 1995).

Estudos recentes têm indicado que a compartimentalização dos metais deve ser o mecanismo chave da tolerância das plantas hiperacumuladoras. Os metais são preferencialmente seqüestrados em compartimentos subcelulares, especialmente na parede celular (Krämer et al., 2000; Li et al., 2006), no vacúolo (Küpper et al., 1999; Küpper et al., 2001) e em células não fotossintéticas (Küpper et al., 1999; Frey, 2000; Psaras et al., 2000; Küpper et al., 2001). Na epiderme, os metais são excluídos das células guardas, que

são as únicas células fotossintetizantes da epiderme (Psaras et al., 2000; Küpper et al., 2001). A parede celular parece desempenhar uma importante função na detoxificação de metais em espécies hiperacumuladoras de Ni e Zn/Cd. Aproximadamente 60-70% de Ni e /ou Zn acumulado foi encontrado na parede celular (Krämer et al., 2000; Li et al., 2005).

A descoberta de que certas espécies vegetais possuem a capacidade de acumular grande quantidade de metais tem despertado o interesse de uso destas plantas para promover a “limpeza” de solos contaminados por metais pesados no processo conhecido como fitorremediação. Este termo foi primeiramente proposto por Chaney (1983) e muitos trabalhos têm sido realizados nesta direção.

3. FITORREMEDIAÇÃO COMO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR METAIS PESADOS.

A fitorremediação pode ser definida como uso de plantas e dos microorganismos associados para remover, degradar, ou seqüestrar contaminantes perigosos do solo, da água e do ar (Raskin et al., 1997; Salt et al., 1998; Prasad, 2001). A fitorremediação pode ser utilizada para contaminantes orgânicos como hidrocarbonetos e inorgânicos como metais pesados. Nessa revisão iremos explorar exemplos do uso de plantas para a remediação de solos contaminados por metais pesados, por ser esta a abordagem deste trabalho de pesquisa.

A fitorremediação apresenta diferentes métodos os quais são dependentes do tipo de contaminante e do objetivo da remediação (Figura 4). Prasad (2001) forneceu uma descrição dos métodos de fitorremediação, podendo ser resumidos em: fitoestabilização, fitovolatilização e fitoextração.

Na fitoestabilização as plantas são usadas para estabilizar baixos níveis de metais presentes no solo via absorção ou precipitação, evitando assim, a mobilização e lixiviação dos contaminantes no solo (Salt et al., 1995). Os possíveis mecanismos envolvidos neste método incluem seqüestro do metal dentro das células das raízes e/ou ligados à parede celular, ligação do metal à matéria orgânica, diminuindo a mobilidade do contaminante. A fitoestabilização é um método eficiente para locais onde os limites não estão muito acima dos permitidos, sendo utilizada principalmente após o uso de outro método de

remediação. A utilização de plantas com o objetivo de diminuir a erosão em áreas contaminadas, também é referido como fitoestabilização (Pilon-Smits, 2005).

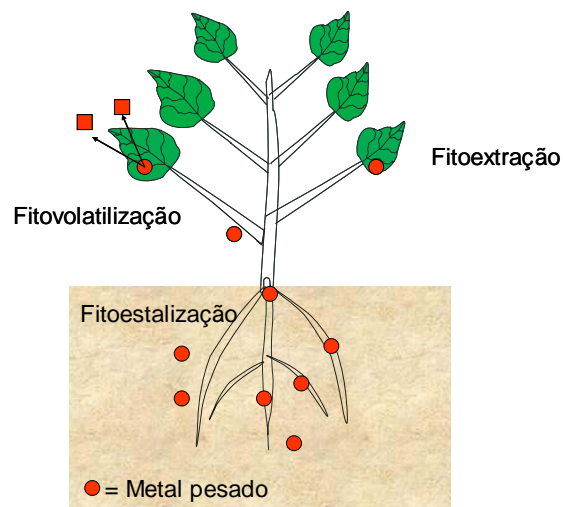


Figura 4. Métodos de fitorremediação para solos contaminados com metais pesados. (Adaptado de Pilon-Smits, 2005).

Fitovolatilização é um método empregado somente para contaminantes que são altamente voláteis. Este método pode ser utilizado para áreas contaminadas por mercúrio e selênio. Após absorção estes metais são por convertidos em formas não tóxicas e são volatilizados para atmosfera via raízes, caules e folhas (Zayed et al., 2000). Algumas espécies do gênero *Brassica* são capazes de volatilizar selênio.

Fitoextração consiste no uso de plantas capazes de absorver e de acumular nos tecidos grandes quantidades de metais. Posteriormente, as plantas são colhidas e podem ser processadas para a separação do metal (dependendo da viabilidade econômica), ou então, incineradas, sendo as cinzas depositadas em local apropriado. É importante lembrar que o volume das cinzas é significativamente menor que a biomassa fresca das plantas ou ainda do solo contaminado. Outra possibilidade promissora é a utilização destas plantas para a geração de biodiesel ou o uso industrial de fibras (Alkorta et al., 2004; Gratão et al., 2005). A fitoextração tem sido comercialmente utilizada, especialmente nos EUA, para a remediação de solos contaminados por diferentes metais (Lasat, 2002). Embora considerada uma tecnologia barata em comparação com as tecnologias convencionais de descontaminação de solos, a fitoextração exige planejamento minucioso com técnicas adequadas, baseado num profundo estudo das características ambientais da área

contaminada, por meio de uma equipe ampla de profissionais qualificados (Alkorta et al., 2004; Gratão et al., 2005).

Um ponto fundamental para o sucesso do desenvolvimento de projetos de fitorremediação é a escolha das espécies a serem utilizadas. Particularmente para a fitoextração, as espécies devem apresentar rápido crescimento, elevada produção de biomassa, sistema radicular abundante, fácil colheita e, fundamentalmente, capacidade de tolerar e acumular grande quantidade de metais na parte aérea (Prasad, 2001; Yang et al., 2005). Entretanto, muitas espécies hiperacumuladoras não possuem algumas destas características, dificultando a viabilidade de projetos de fitorremediação. Por isso muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de entender os mecanismos moleculares da hiperacumulação e, a partir disso, criar plantas transgênicas com grande parte das características ótimas para a fitorremediação (Hassinen et al., 2007; Parameswaran et al., 2007).

4. ASPECTOS GERAIS DA REGULAMENTAÇÃO DOS NÍVEIS DE METAIS NO SOLO.

No Brasil, infelizmente, até o momento, não existe uma lei que regulamente os níveis normais de metais no solo. Atualmente, o Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA tem discutido a formulação desta lei. Entretanto, dada a extensão do Brasil e a variação nos tipos de solo em cada região, possivelmente, os limites serão determinados em cada estado (CONAMA, 2006). São Paulo é o único estado que desde 2001, por meio da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental-CETESB, estabelece valores orientadores para avaliação da qualidade do solo (Tabela 4). Para o estabelecimento destes valores, a CETESB tomou por base inúmeras determinações da concentração em solos de São Paulo e as metodologias adotadas em diferentes países (CETESB, 2001).

Tabela 4. Comparação dos valores orientadores para solo do estado de São Paulo com os valores internacionais (concentração, mg kg⁻¹), (CETESB, 2001).

Referência	Alerta	Valores de intervenção			
CETESB- São Paulo					
		Agrícola/APMax	Residencial	Industrial	
Cu	35	60	100	500	700
Cr	40	75	300	700	1000
Ni	13	30	50	200	300
Pb	17	100	200	350	1200
EUA (SSL soil screening levels, ingestão de solo)					
		Agrícola/APM	Residencial	Indústrial	
Cu		-	-	-	
Cr		-	390	-	
Ni		-	1600	41000	
Pb		-	400	-	
Alemanha (valores gatilho, ingestão direta de solo)					
		Residencial	Parque	Industrial	
Cu		-	-	-	
Cr		400	1000	1000	
Ni		140	350	900	
Pb		400	1000	2000	

Valor referência de qualidade - valores indicador de boa qualidade do solo, obtida para os solos do estado de São Paulo. **Valor alerta** - indica uma possível alteração da qualidade natural dos solos, há um potencial poluidor. **Valor intervenção** - limite acima do qual há risco potencial a saúde humana. **APMax**- área de proteção máxima, compreende zona de recargas de aquíferos.

Verifica-se que as concentrações são variáveis e isto está relacionado especialmente com as condições edafoclimáticas de cada país e os diferentes critérios adotados em cada país. Portanto, é de grande urgência o estabelecimento das concentrações limites para o Brasil, de forma a contemplar todas as variações edafoclimáticas aqui existentes.

Não existem dados oficiais a respeito do número de áreas contaminadas por metais pesados no Brasil. Entretanto, somente no estado de São Paulo são reportadas 238 áreas contaminadas por metais pesados (CETESB, 2006). A legislação brasileira, embora não

regulamente os níveis normais de metais nos solos, exige a recuperação de áreas contaminadas a fim de diminuir os riscos à saúde humana e ao ambiente. Nesse contexto o estabelecimento de índices de contaminação, em conjunto com os estudos estudo de métodos para a recuperação de áreas contaminadas, é uma necessidade crescente. Conforme demonstrado anteriormente, a fitorremediação é uma tecnologia adequada, economicamente viável. Mas para isso é necessário evoluir com o estudo de espécies vegetais que apresentem características desejáveis para a fitorremediação e que sejam adaptadas às condições climáticas brasileiras.

5. CARACTERÍSTICAS INTERESSANTES DA MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.) PARA O USO EM FITORREMEDIAÇÃO.

A mamona (*Ricinus communis* L.) também popularmente conhecida como carrapateira e palma christim, não possui um local de origem bem definido. Segundo Fontquer (1979), ela é originária possivelmente da Índia. Entretanto, para De Candolle (1836) *apud* Rodrigues et al. (2002) a mamona seria originária da África intertropical. De acordo com Cronquist (1968), a posição sistemática da mamona é a seguinte: Divisão *Magnoliophyta*; Classe *Magnoliopsida*; *Euphoriales* Lendley; Família *Euphorbiaceae* Jussieu; Subfamília *Euphorbioideae* (= *Crotonideae*) Pax; Tribo *Crotonae* Pax; Gênero: *Ricinus* L. Atualmente, segundo a classificação do *Angiosperma Phylogeny Group*- APG II (2003), a mamona pertence à subfamília *Acalyphoideae*, tribo *Acalypheae* e subtribo *Ricinae*.

A mamona ocorre espontaneamente em todo o Brasil e acredita-se que as sementes tenham chegado ao Brasil no século XVI trazidas pelos escravos (Rodrigues et al., 2002). As sementes possuem um dos compostos mais tóxicos conhecidos na natureza, a ricina. Atualmente, a mamona tem despertado grande interesse, dada a possibilidade de produção de biodiesel a partir das sementes. O conteúdo de óleo na semente de mamona é cerca de 43-45%, sendo bem maior que a concentração de 17% encontrada em sementes de soja (*Glycine max*). Em termos de rendimento de óleo, seria possível produzir entre 0,5 a 1 tonelada de óleo por hectare. O óleo de mamona é empregado em inúmeros segmentos industriais, como na fabricação de óleos lubrificantes para aeronaves, óleos para a fabricação de tintas e vernizes, na fabricação têxtil, para a obtenção de fibras e na indústria farmacêutica.

Ricinus communis L. possui porte arbustivo ou, com menor frequência, porte de árvore, que geralmente mede cerca de 2 metros de altura, mas que, algumas vezes pode chegar até 10 a 15 metros altura. A mamona é conhecida por sua rusticidade e capacidade de colonizar ambientes com condições adversas. Apresenta crescimento rápido e boa produção de biomassa. Essas características são desejáveis para espécies fitorremediadoras. Porém, poucos trabalhos têm avaliado a resposta desta espécie a metais pesados, bem como o uso na revegetação de áreas mineradas (Mendes et al., 2007). Khan et al. (1998) analisaram a concentração de metais (Cd, Zn, Cu, Pb) em plantas que cresciam em áreas de depósito de resíduos de aço. Dentre as espécies estudadas, a mamona apresentou a melhor capacidade de acúmulo de Zn, sendo considerada uma espécie promissora para a remoção deste metal do solo. Em experimento com solução nutritiva Romeiro et al. (2006) caracterizaram a mamona como uma espécie hiperacumuladora de Pb, também indicando a planta como espécie promissora para a fitorremediação. Por outro lado, alguns trabalhos sugerem que a mamona poderia ser utilizada como uma planta indicadora de poluição aérea. Amazarray (1985) mostrou que a atividade da enzima δ -aminolevulinato desidratase (δ -ALA) em folhas de mamona foi inibida por diferentes metais pesados (Mn, Hg, Co, Cd, Cu, Zn, Ni e Pb) quando expostas a concentrações variáveis de 1 a 200 μ M. A campo, a autora obteve correlações significativas entre a atividade da enzima em folhas de mamona (coletadas em 53 locais em Porto Alegre) e a intensidade de tráfego urbano.

CAPÍTULO I

COMUNIDADE VEGETAL PIONEIRA EM CINZA DE CARVÃO MINERAL: UM MODELO PARA INÍCIO DE UMA RESTAURAÇÃO ECOLÓGICA?

Projetos de restauração de áreas intensamente impactadas, como as áreas de mineração e depósito de cinzas de carvão mineral, geralmente têm focado o uso da cobertura vegetal para estabilizar o substrato. Na prática, muito esforço é concentrado na primeira etapa da revegetação, quando o rápido estabelecimento da vegetação é requerido para o controle do escoamento superficial e da erosão. Nas etapas seguintes, que envolvem o desenvolvimento da comunidade vegetal a longo prazo, as ações são reduzidas ou inexistentes. Grande parte dos projetos de recuperação utiliza inicialmente uma espécie gramínea para recobrir o solo e, posteriormente, ou conjuntamente, são introduzidas espécies arbóreas, não considerando o processo de sucessão natural. O processo sucessional não inicia somente com plantas arbóreas, mesmo que o clima local seja propício a uma comunidade florestal.

Segundo Bradshaw (2003), o uso do processo de sucessão vegetal para a revegetação de áreas impactadas é uma técnica valiosa que desperta a atenção não só de ecologistas, mas também de engenheiros. Para utilizar os processos naturais na recuperação de uma área é preciso observar quais componentes necessitam de alguma assistência, para que o sucesso da revegetação seja alcançado em um tempo razoável. O uso de processos naturais, mesmo que alguma assistência possa ser requerida, é vantajoso porque diminui o trabalho na área a ser revegetada, o resultado é mais próximo da condição natural e tende a ser auto-sustentável.

Entender como o processo sucessional ocorre naturalmente é indispensável para que a restauração de um ambiente degradado ocorra o mais próximo possível de uma condição natural (Rogalski et al., 2005). A observação de comunidades vegetais que se estabelecem espontaneamente em áreas de intensa perturbação pode fornecer inúmeras informações que podem contribuir para a restauração de outras áreas sob impacto semelhante. Rogalski et al. (2005) chama atenção que a utilização de espécies vinculadas

ao tipo de degradação é importante, pois se saberá antecipadamente que estas espécies respondem bem àquelas condições ambientais. No caso específico das cinzas de carvão mineral e de rejeitos de carvão a tolerância a metais pesados pode ser uma característica importante para o estabelecimento e o desenvolvimento da espécie.

No Brasil, não foi encontrado nenhum trabalho que tenha realizado estudos de revegetação em áreas de depósito de cinzas de carvão mineral, e a maioria dos trabalhos internacionais enfatiza o estudo da capacidade de espécies vegetais específicas para a revegetação de áreas de depósito de cinzas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar se a comunidade vegetal espontaneamente estabelecida em um depósito de cinza de carvão mineral poderá ser utilizada como modelo para a revegetação de áreas com degradação semelhante, enfatizando a função da mamona *Ricinus communis* L. neste sistema, por ser esta a espécie visualmente predominante na área de estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi desenvolvido no depósito de cinzas de carvão mineral situado no pátio da Usina Termelétrica de São Jerônimo, à margem do rio Jacuí, localizada no município de São Jerônimo, RS (Figura 1). A usina termelétrica de São Jerônimo (UTSJ) está em funcionamento desde 1953, é uma usina de pequeno porte, com capacidade instalada de 20 MW que utiliza como combustível o carvão mineral proveniente do município de Minas do Leão, RS. A usina conta com um processo antigo de queima, em leito fixo. As cinzas leves são retiradas por equipamentos do tipo ciclones e não por precipitadores eletrostáticos, os quais são mais eficientes na retenção de partículas e mais comumente utilizados no Brasil.

Tanto as cinzas grossas quanto as cinzas leves produzidas na usina foram ao longo dos anos sendo depositadas nas áreas adjacentes da usina. Neste local, as cinzas grossas (pesadas) e leves (finas) foram depositadas separadamente. Na área do depósito onde as cinzas leves foram depositadas, a camada varia de 0,5 à 5m de profundidade (Mercado d'Água, 2003, apud Minozzo, 2006) e ocupa uma área total de aproximadamente 23 ha (Figura 2).

O depósito sofreu uma forte alteração em meados de 2003 com o início da instalação de programas de recuperação da área. Estes consistiram, inicialmente, somente na remodelagem mecânica da área com depósito de cinza grossa e parte do depósito de cinzas leve, cobertura das cinzas com uma camada de solo plantio de gramíneas e de mudas de arbóreas nativas. Nesse período também foi implantado um novo sistema para a deposição das cinzas. Bacias foram construídas para a contenção da cinza leve. Quando essas bacias estão cheias, a cinza é retirada e transportada com caminhão até a área de extração de carvão onde é depositada nas cavas de onde foi retirado o carvão.

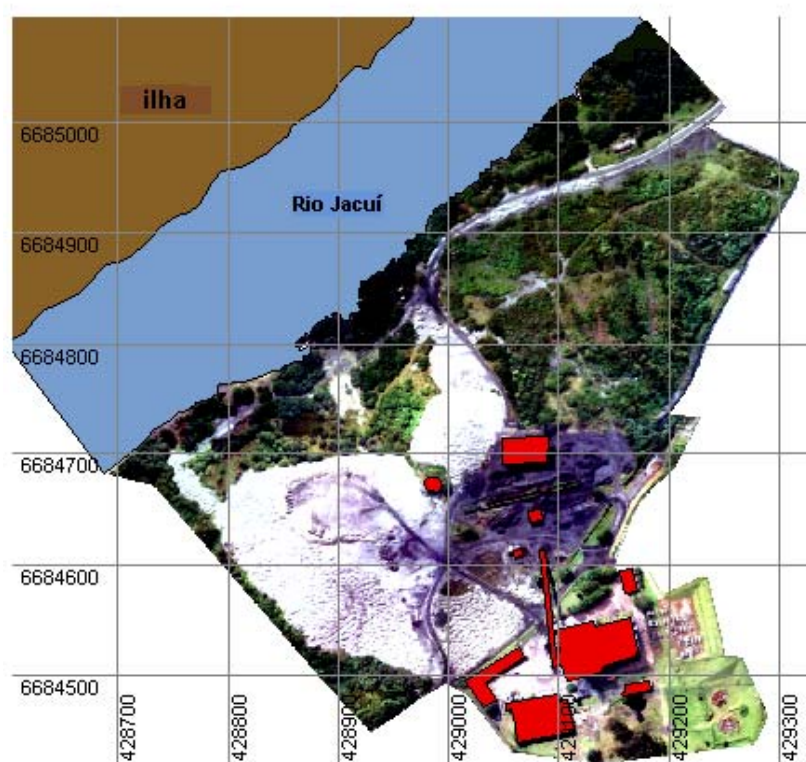


Figura 1. Localização da Usina Termelétrica de São Jerônimo, RS, mostrando as instalações da termelétrica (vermelho), depósito recente de cinzas (branco).

A área do depósito da cinza leve de aproximadamente 1 há, que é parte da área que não sofreu alterações com o estabelecimento do programa de recuperação, foi utilizada para o desenvolvimento deste trabalho. A área é recoberta por vegetação espontânea. Segundo técnicos responsáveis do local e observações do nosso grupo de pesquisa, a área pode ser sub-dividida em quatro áreas segundo o período da última deposição de cinza no local:

- Área 1- área com deposição recente de cinza, menos de 1 ano;
- Área 2- área sem deposição de novas cinzas entre 1 e 2 anos;
- Área 3- área sem deposição de novas cinzas entre 2 e 3 anos; e
- Área 4 - área sem deposição novas cinzas entre 4 e 5 anos.

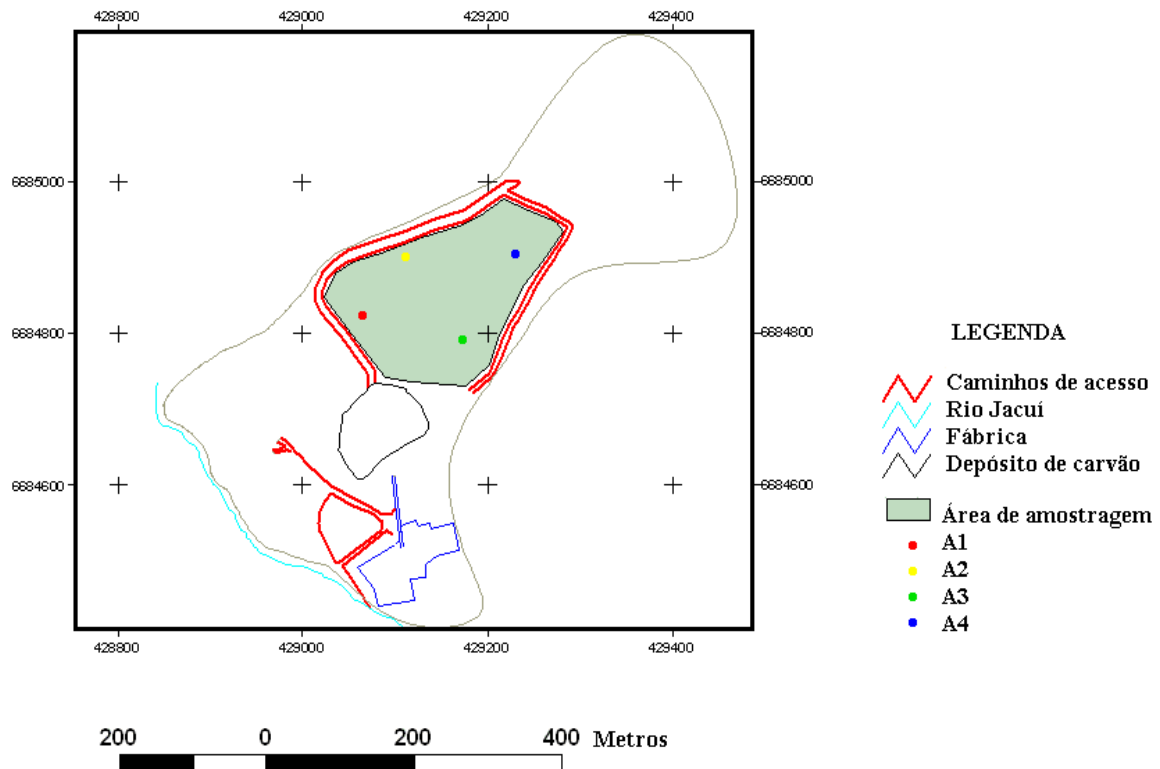


Figura 2. Localização dos pontos de coleta na área de depósito de cinza na usina termelétrica de São Jerônimo. (Modificado Minozzo, 2006).

Levantamento de dados

a) Vegetação

Em cada área (A1, A2, A3 e A4), foi traçado uma transecional de 30 m de comprimento. A partir desta transecional foram demarcadas seis parcelas (unidades amostrais) de 1m² cada, distanciadas entre si de aproximadamente 13,5m (Figura 3). Em cada parcela foi realizado o levantamento das espécies e estimada a porcentagem de cobertura do solo, que cada espécie ocupava, segundo as bases do método de abundância e cobertura de Braun-Blanquet (1979). Para a estimativa da cobertura vegetal foi utilizado o estrato da vegetação em 1 m de altura. Estabeleceu-se uma escala com oito classes,

correspondentes à porcentagem de cobertura de cada espécie, modificando a escala de Domin-Krajma citada em Braun-Blanquet (1979) conforme segue abaixo.

0 - 5% = 1	21 - 40% = 5
6 - 10% = 2	41 - 60% = 6
11 - 15% = 3	61 - 80% = 7
16 - 20% = 4	81 - 100% = 8

b) Coleta e análise de cinza e de mamona (*Ricinus communis* L.)

A cinza foi coletada em duas profundidades a partir da superfície do depósito: 0-20 cm e 100-120 cm. As amostras foram coletadas nessas profundidades para verificar se as cinzas estavam tendo algum tipo de alteração no perfil. Três amostras compostas foram coletadas em cada transecional estipulada para a vegetação. Cada amostra composta continha seis sub-amostras coletadas em duas parcelas (Figura 3). As amostras foram coletadas com auxílio de um cano de PVC, de 2,5 cm diâmetro, seccionado ao meio e acoplado a um trado de solo do tipo Calador.

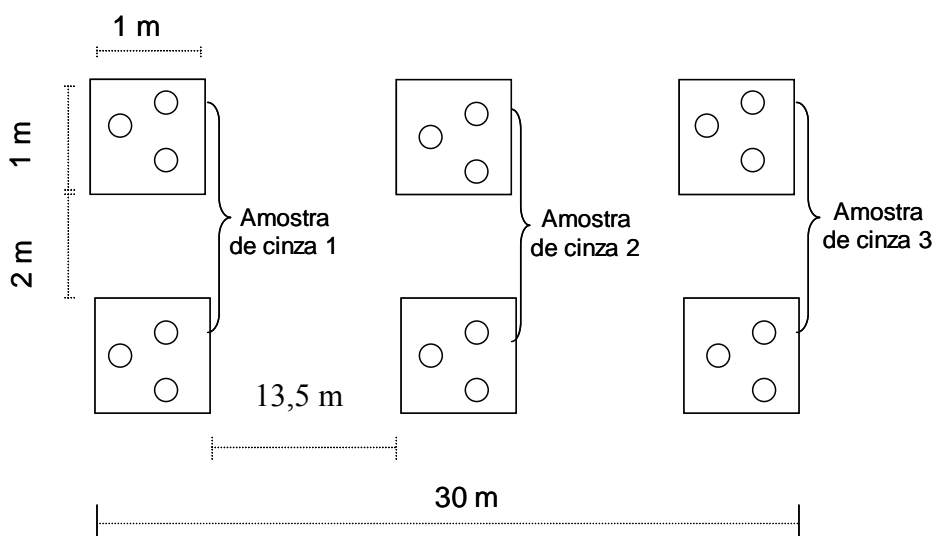


Figura 3. Esquema de uma transecional adotada para o levantamento florístico e coleta de amostras de cinza nas áreas de depósito de cinza leve.

No laboratório, as amostras foram secas em estufa a 60 °C durante 72 horas. As análises químicas foram feitas no laboratório de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Foram determinadas as seguintes variáveis:

pH em água 1:5 (potenciometria); porcentagem de carbono orgânico (combustão úmida Walkey Black); CTC, capacidade de troca de cátions (extração acetato de amônio 1 M); nitrogênio total (TNK: Kjeldahl); fósforo e potássio extraível (Mehlich-I); cálcio trocável (extraído com KCl 1 mol l⁻¹); enxofre-SO₄ (extraído com CaHPO₄ 500 mg l⁻¹), conforme Tedesco et al. (1995). Alumínio, ferro, cobre, níquel, chumbo foram extraídos segundo US-EPA 3050* (1986). As leituras destes últimos cinco metais foram feitas em espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) e os resultados expressos em mg kg⁻¹.

Plantas de *R. communis* foram coletadas para avaliar os teores de metais nas folhas e nas raízes. As plantas de mamona foram coletadas o mais próximo possível do local de amostragem das cinzas. Em cada área foram coletadas seis plantas. Para evitar a coleta de plantas em estágios diferentes de desenvolvimento, foram coletadas plantas que apresentavam de 15 a 20 entre-nós. Este valor foi estipulado a partir de observações de campo. As plantas da área de estudo com este número de entre-nós não apresentavam inflorescência e pareciam estar em plena fase de desenvolvimento. De cada planta foram coletadas quatro folhas, correspondente ao terceiro, quarto, quinto e sexto nó a partir do ápice. As plantas foram arrancadas para a coleta das raízes.

No laboratório, as folhas foram lavadas em água deionizada para a retirada de eventual resíduo de cinza depositado na superfície das mesmas. As raízes também foram lavadas em água deionizada e então foi retirada uma amostra (composta de pequenos pedaços de raízes laterais e da raiz pivotante). Esta amostra foi submetida a um banho de Ultrasson por 1 min e novamente foram lavadas com água deionizada. As folhas e as raízes foram secas em estufa a 60°C por 72 horas. Posteriormente, o material foi moído em gral de porcelana e 0,5 g foram pesadas em balança analítica para a determinação da concentração de metais (cobre, cromo, níquel e chumbo). As amostras foram digeridas com 5 ml de ácido nítrico e 3ml de água tri-destilada em bombas de Teflon, a 100 °C durante uma hora em estufa. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de absorção atômica acoplado a forno de grafite (THGA Perkim-Elmer modelo SIMMA 60000). Todo o procedimento foi realizado no laboratório de Absorção Atômica do Centro de Ecologia da UFRGS.

* Esta metodologia fornece as concentrações dos metais ambientalmente disponíveis, ou seja, concentração em solução e adsorvida, mas não determina a fração que faz parte da estrutura cristalina dos minerais.

Análise dos dados

a) Variáveis químicas da cinza e concentração de metais em mamona

Primeiramente os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade utilizando programa *Statistic* (Lewick, 2007), para comparar as variáveis químicas entre as áreas e entre as profundidades. Posteriormente, para identificar se as áreas poderiam ser consideradas quimicamente diferentes foi realizada a seguinte seqüência de análises:

a.1) Análise individual da capacidade discriminante de cada elemento

A primeira análise realizada foi um teste não-paramétrico denominado teste *H* ou teste *Kruskal-Wallis* (Levin, 1999). O teste foi aplicado para avaliar, individualmente, a capacidade discriminante de cada elemento químico (N, P, K, Ca, S, Fe, Al, Ni, Pb, Cr e Cu), do pH e da CTC, determinados nas amostras de cinza de cada área. O teste-*H* permite testar uma hipótese nula em que *k* amostras aleatórias independentes são provenientes de uma mesma população (diferentes áreas) considerando o nível de significância de 5%. Quando o valor de *H* calculado exceder o valor crítico de *H*, com *k*-1 graus de liberdade e grau de significância 5%, dizemos que a hipótese nula deve ser rejeitada, ou seja, a probabilidade é pequena (5% ou menos) de que as áreas sejam iguais. Nesse último caso a variável apresenta capacidade discriminante entre as áreas, e podemos selecioná-la para a próxima etapa de discriminação. Todo o procedimento pode ser realizado por um programa estatístico para determinar os valores de *H* e testar o valor exato de sua significância, nesse trabalho foi utilizado o programa *Statistica* (Lewick, 2007).

a.2) Determinação do melhor conjunto de elementos discriminantes

Nessa etapa foi aplicada uma análise discriminante multivariada com o propósito de avaliar a capacidade discriminante de um conjunto de variáveis para distinguir as quatro áreas. O método utiliza os elementos químicos selecionados pelo teste *Kruskal-Wallis* da etapa anterior e aplica uma função multivariada discriminante, que avalia a capacidade do conjunto de elementos. Essa análise permitiu maximizar a discriminação entre as áreas e minimizar o número de variáveis necessárias. A otimização do conjunto de variáveis

apresenta a vantagem de reduzir a dimensionalidade do problema. Isso evita o efeito deletério da multicolinearidade, que ocorre quando duas ou mais variáveis estão correlacionadas. Segundo Davis (1986), variáveis redundantes enfraquecem as análises devido à redução dos graus de liberdade dos erros e afeta a habilidade para a operação de inversão da matriz variância-covariância.

O programa *Statistica* (Lewick et al., 2007) foi utilizado para executar o procedimento de seleção das variáveis. O método é baseado na minimização do índice *Wilks' Lambda* (Λ^*), o qual é um componente da análise de variância multivariada (Johnson & Wichern, 1998). Não existe capacidade discriminante (os grupos são considerados iguais) do conjunto de variáveis selecionadas quando *Wilks' Lambda* é próximo de 1. Valores próximos de 0 ocorrem quando a variabilidade dentro do grupo é pequena quando comparada com a variabilidade total, isto é, quando a maior parte da variabilidade total pode ser atribuída à diferença entre os grupos. A significância do valor de *Wilks' Lambda* final pode ser estimada considerando a distribuição da lei de *Fisher-Snedecor* (Teste F).

No final desse procedimento tem-se como resultado: (i) o conjunto de variáveis que fornece a maior capacidade de discriminação para as quatro áreas, (ii) o valor parcial de Λ^* associado a cada variável, que significa o valor de Λ^* total caso a variável em questão seja excluída do conjunto, e (iii) o valor gradual de Λ^* acumulado que representa o decréscimo gradativo desse valor com a adição de cada variável.

a.3) Distância de *Mahanobilis*

Finalmente, uma medida de distância foi usada para auxiliar na avaliação da capacidade discriminante de cada conjunto de variáveis. A distância de *Mahalanobis* é uma medida de distância entre dois pontos no espaço e pode ser definida por duas ou mais variáveis correlacionadas. Quanto maior o valor da distância, maior é a diferença entre os grupos, neste caso, as áreas do depósito.

b) Vegetação

b.1) Índice de similaridade de Sørensen

Este índice foi utilizado para calcular a similaridade entre as unidades amostrais de cada área, possibilitando assim comparar similaridade entre as áreas, segundo Van Resensburg et al. (2003). Os dados de cobertura foram transformados para valores de presença (1) e ausência (0). A partir dos dados transformados foi gerada uma matrix de semelhança usando o índice de Sørensen como medida de semelhança. Os valores de similaridade das unidades amostrais correspondentes a cada área do depósito foram utilizados para calcular a similaridade média para cada área.

b.2- Análises multivariadas

A partir da tabela de cobertura das espécies em cada unidade amostral foram realizadas inúmeras análises utilizando dois programas estatísticos: *MULVA 5* (*Multivariate Analysis of Vegetation Data*, Wildi & Orlóci, 1996) e *MULTIV v.2.4* (*Multivariate Explorator Analysis, Randomization Testing and Bootstrap Resampling*, Pillar, 2006).

Na primeira etapa, uma matriz de semelhança para unidades amostrais e para espécies foi construída, utilizando-se como medida de similaridade a distância Euclidiana. Uma análise de ordenação foi realizada para verificar a associação entre as unidades amostrais utilizando o método de análise de Coordenadas Principais (PCoA). Os grupos gerados foram dispostos em um espaço bidimensional de um diagrama de dispersão de pontos. Os eixos dos diagramas são definidos pelas variáveis canônicas geradas na análise de concentração, as quais contêm o total do qui-quadrado da tabela de contingência. Os escores canônicos gerados para os grupos de unidades amostrais são utilizados como coordenadas para a localização dos grupos no diagrama (*MULTIV*).

Para mostrar de forma mais clara o gradiente da vegetação foi realizada uma rotina de análise no programa *MULVA 5*. Utilizou-se a rotina *CONCENT*, optando-se por uma análise de Componentes Principais expressando os resultados em Tabelas, pela Rotina *TABLES*.

Para identificar quais variáveis químicas das cinzas (*site factors*) estariam mais correlacionadas com a vegetação, foi realizada uma análise de correlação entre as variáveis químicas e a vegetação utilizando a rotina RESE opção F-(*MULVA 5*). Os fatores ambientais que geraram os maiores coeficientes de correlação positivos ou negativos foram escolhidos para análise.

Por meio da rotina COMPORD-FUZZY, que considera a distribuição difusa dos valores, no caso das variáveis ambientais, foi testada a correlação das unidades de amostra para com os fatores ambientais, optando-se pelo método de Roberts (Roberts, 1986), que se constitui numa ordenação bidimensional, na qual o eixo (x) é o próprio fator ambiental registrado no campo, transformado num intervalo de 0 a 1 e o outro eixo (y) é o valor ambiental virtual baseado na composição florística das unidades amostrais (*MULVA 5*).

Utilizou-se a rotina GRDPR, com o objetivo de se verificar a performance das espécies diagnóstico/ indicadoras (espécies de maior frequência e cobertura nos grupos ou nas fases sucessionais da vegetação analisada) de cada grupo formado em relação às variáveis ambientais, resultando em um histograma de frequência das espécies por classe, para cada uma das variáveis ambientais testadas (*MULVA 5*).

RESULTADOS

Características químicas da cinza no perfil

A concentração da maioria dos macronutrientes e o pH não apresentaram diferenças significativas no perfil vertical (profundidade) das cinzas em todas as áreas do depósito (Figura 4). Somente enxofre e cálcio mostraram-se mais concentrados em profundidade. A concentração de cálcio foi significativamente maior na profundidade de 100-120 cm na área mais antiga do depósito (A4), enquanto enxofre mostrou diferenças significativas tanto na área jovem (A1) como na área A4 (Figura 4).

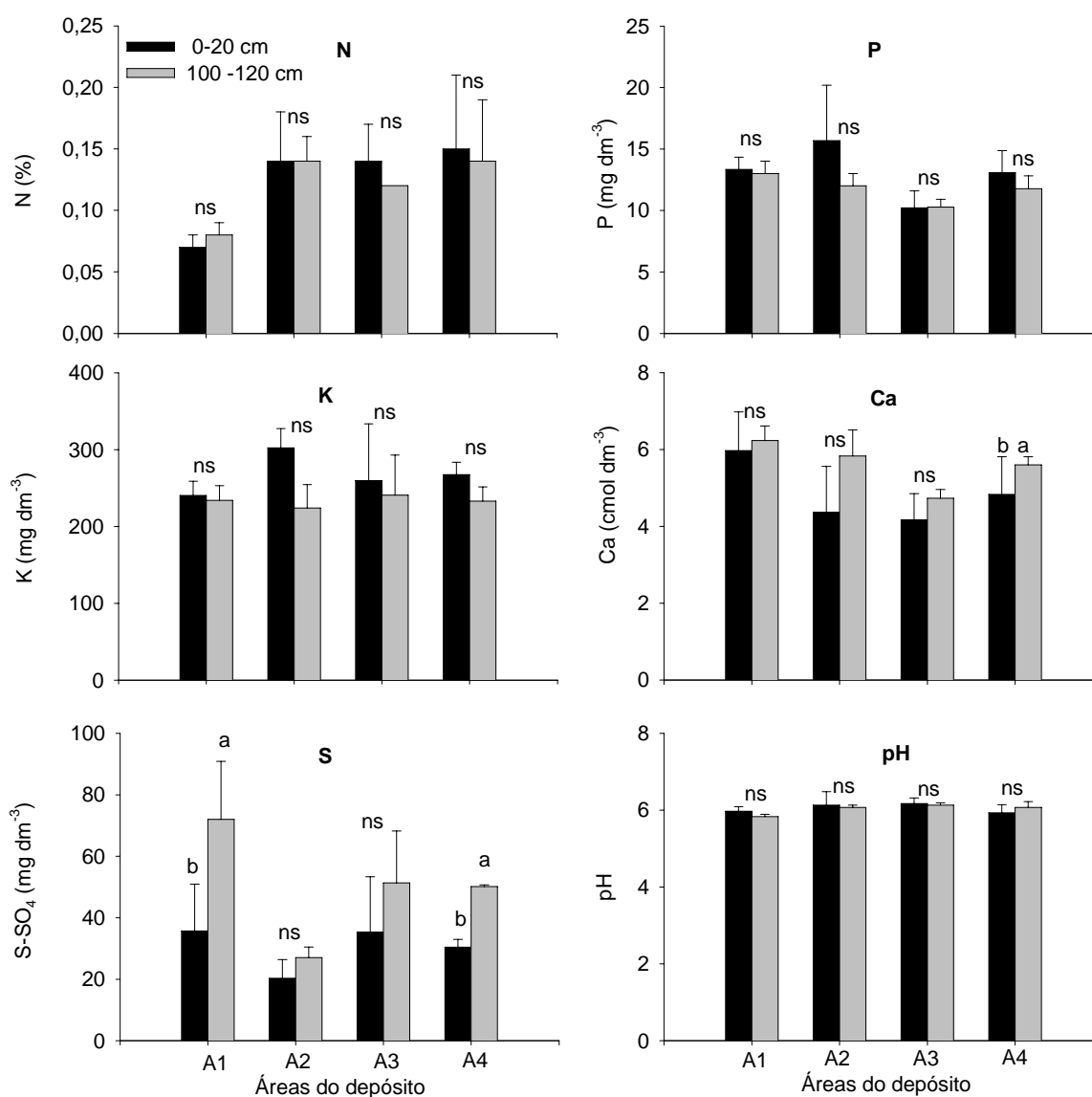


Figura 4. Concentração de macronutrientes e pH em diferentes profundidades no perfil de cinzas de carvão mineral presentes nas quatro áreas amostradas (A1, A2, A3 e A4). Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 10% de significância. ns= não significativo. Barras = desvio padrão da média, n= 3.

As concentrações dos metais pesados analisados não variaram significativamente no perfil (Figura 5). Até 120 cm, os metais mostram ter a mesma concentração que a observada na superfície, demonstrando que não há acúmulo destes metais no perfil.

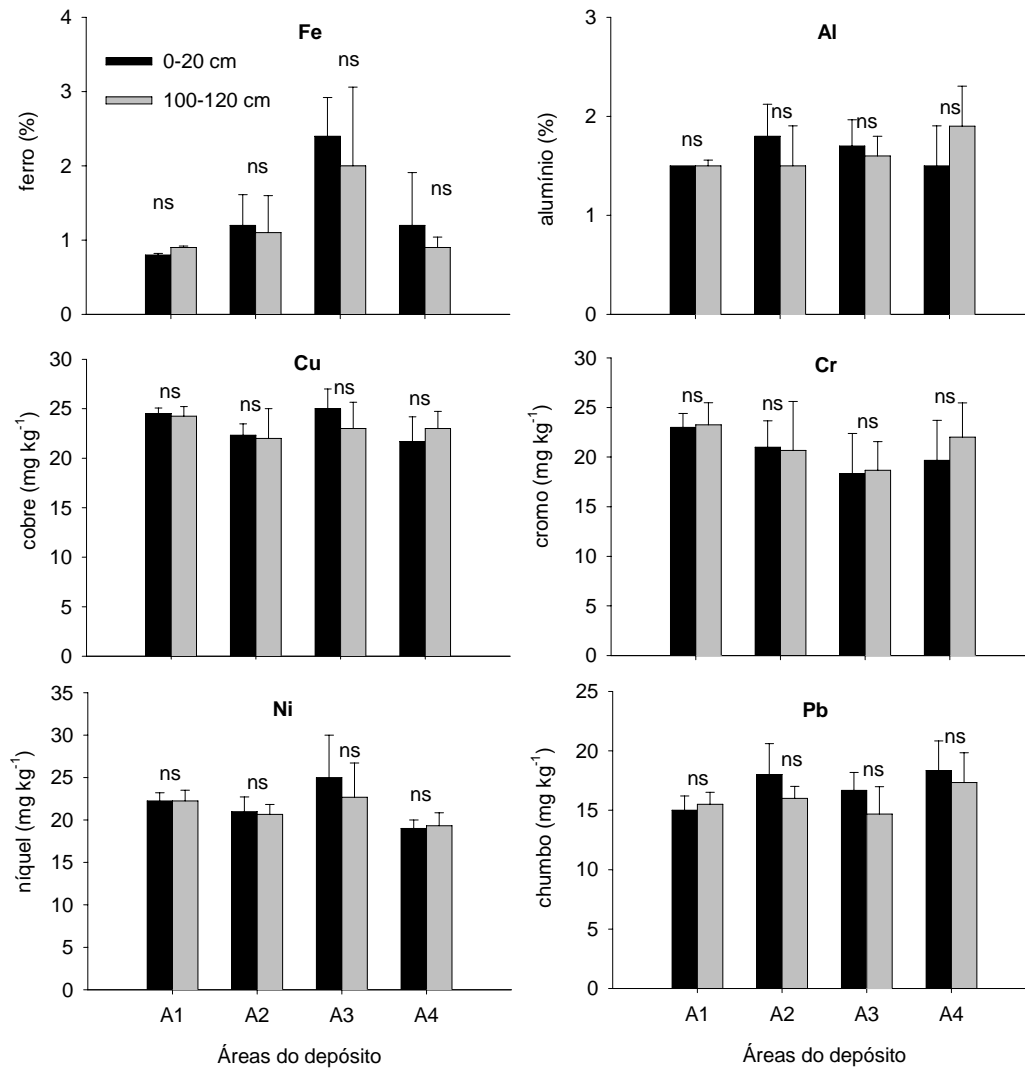


Figura 5. Concentração de metais pesados em diferentes profundidades no perfil de cinzas de carvão mineral presentes nas quatro áreas amostradas. Médias não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 10% de significância. Barras= desvio padrão da média, n= 3. ns= não significativo.

Diferenças químicas entre as áreas do depósito

As concentrações das variáveis químicas analisadas não apresentam uma tendência geral de aumento ou diminuição evidente entre as quatro áreas. Porém, a análise multivariada mostrou que as áreas do depósito são quimicamente diferentes. O teste de *Kruskal-Wallis* mostrou que apenas as variáveis, pH e CTC não foram capazes de separar as áreas, ou seja, não podem ser utilizadas como variáveis discriminantes. Entretanto, todas

as outras variáveis apresentam, individualmente, capacidade discriminante para os quatro grupos. Assim, o conjunto de variáveis utilizadas para as etapas seguintes foram as concentrações de N, K, P, S, Cr, Cu, Al, Pb, Ca, Fe, e Ni. O teste *Wilk's Lambda* revelou que este conjunto de variáveis químicas foi capaz de discriminar as quatro áreas. O valor de *Wilk's Lambda* obtido do conjunto de variáveis foi de 0,010. Isto significa que 99% da variabilidade, entre as áreas pode ser explicada pelo conjunto de variáveis. Na Tabela 1 é mostrado o valor de *Wilk's Lambda* parcial de cada elemento. Nesta tabela, quanto maior o valor *Wilk's Lambda* maior a contribuição do elemento para a separação das áreas. Observa-se que os maiores valores foram obtidos para P e K. Por outro lado, observa-se que nenhum elemento apresentou valor discrepante de *Wilk's Lambda* elevados. Isto indica que a contribuição de cada variável para a discriminação das áreas é semelhante na capacidade de diferenciar as áreas.

Tabela 1. Valor parcial de *Wilk's Lambda* (Λ^*) associado a cada variável, que significa o valor Λ^* total caso a variável em questão seja excluída do conjunto.

	S	Ni	Cr	Cu	Al	Pb	Ca	Fe	N	K	P
<i>Wilk's Lambda</i>	0,012	0,012	0,013	0,015	0,015	0,015	0,016	0,017	0,017	0,023	0,025

Valor total minimizado de *Wilk's Lambda* para o conjunto de variáveis = 0,010

Segundo a distância de *Mahalanobis*, a qual avalia a dissimilaridade entre grupos anulando o efeito de redundância das variáveis, existe uma dissimilaridade significativa entre todas as áreas (Tabela 2). Isto mostra que em termos químicos (segundo as variáveis analisadas), estas áreas podem ser consideradas diferentes. As duas áreas com maior diferença em termos de idade de deposição das cinzas (A1 e A4), também apresentaram maior distância entre si (Tabela 2). A área A2, em termos químicos, está mais próxima, a área A1 do que A3. Enquanto que área A3 apresenta maior similaridade com A2 e A1 do que com A4.

Tabela 2. Matriz da distância de *Mahalanobis* ao quadrado entre as áreas do depósito. As variáveis utilizadas no modelo foram (N, P, K, Ca, S, Cu, Cr, Ni, Pb, Al, Fe) e não foram consideradas as diferentes profundidades da cinza.

Áreas do depósito	A1	A2	A3	A4
A1	0,00			
A2	10,11 *	0,00		
A3	34,58 *	27,98 *	0,00	
A4	62,02 *	42,29 *	43,84 *	0,00

* Valores significativos pelo teste-F , α 0,05.

Concentração de metais pesados em mamona

Segundo análise de variância, somente as concentrações de cromo e níquel na mamona apresentaram diferenças significativas entre as áreas A1 e A4 (Figura 6). Nas raízes, as concentrações destes elementos aumentaram com a idade do depósito. Nas folhas, somente a concentração de níquel apresentou o mesmo comportamento, enquanto que para cromo as menores concentrações foram observadas nas áreas mais antigas (Figura 6). Isto pode indicar que na área A1 a forma de cromo predominante seja mais móvel que a forma de cromo predominante nas outras áreas. As maiores concentrações de níquel nas raízes ($2,74 \text{ mg kg}^{-1}$) e nas folhas ($5,33 \text{ mg kg}^{-1}$) foram observadas na área mais antiga do depósito. O cobre não apresentou diferenças significativas entre as áreas, e a concentração nas raízes foi semelhante à observada nas folhas. Quanto ao chumbo, observou-se maior concentração nas raízes em relação às folhas e não foram observadas diferenças significativas, pelo teste de Tukey, entre as áreas (Figura 6).

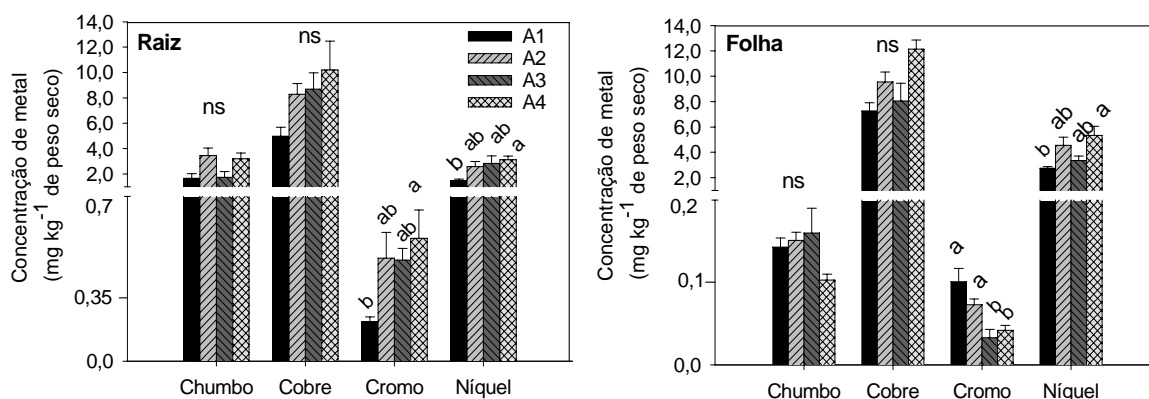


Figura 6. Concentração de metais em plantas de *R. communis* coletadas em diferentes áreas (A1, A2, A3 e A4) do depósito de cinzas de carvão mineral. Médias seguidas de mesma letra, considerando cada metal, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 10% de significância. Barras = erro padrão da média. A1, n= 4; A2, n= 6; A3, n= 6 e A4, n= 5. ns= não significativo

Embora somente as concentrações de níquel e cromo tenham apresentado diferenças significativas entre as áreas, pelo teste de Tukey, as análises multivariadas mostraram que as concentrações de metais na mamona não são similares. O conjunto de variáveis (concentração de Cr, Cu, Ni e Pb nas folhas e nas raízes) foi capaz de separar as quatro áreas (A1, A2, A3 e A4). O valor de Wilk's Lambda obtido para este conjunto de variáveis foi de 0,049, significativo pelo teste-F, α 0,05. Na Tabela 3 observa-se que cromo e níquel possuem os maiores valores parciais de *Wilk's Lambda* para as folhas, enquanto que para as raízes os maiores valores são para cobre e cromo.

Tabela 3. Valor parcial de *Wilk's Lambda* (Λ^*) associado a cada variável (concentração de Cr, Cu, Ni ou Pb), que significa o valor Λ^* total caso a variável em questão seja excluída do conjunto.

Parte da planta	Valores de <i>Wilk's Lambda</i> (Λ^*)			
	Pb	Cu	Cr	Ni
Raiz	0,051	0,057	0,054	0,053
Folha	0,051	0,054	0,078	0,062

Da mesma forma que o observado para todas as variáveis químicas nas cinzas, as concentrações de metais nas folhas e nas raízes de mamona mostram uma dissimilaridade entre as áreas. Assim, a matriz da distância quadrada de *Mahalanobis* mostra diferenças significativas entre as áreas do depósito, ou seja, considerando a concentração conjunta do quatro metais (Cr, Cu, Ni e Pb) tanto das folhas quanto das raízes foi possível separar as quatro áreas do depósito (Tabela 4). Somente A2 e A3 não mostraram distâncias significativas entre si, mostrando que as concentrações dos metais nas plantas de mamona entre estas duas áreas são similares. A maior distância foi observada entre A1 e A4, indicando que a concentração de metais na mamona está variando em função da idade do depósito. Pela análise de variância esta variação foi evidente para níquel e cromo conforme observado na Figura 6.

Tabela 4. Matriz da distância ao quadrado de *Mahalanobis* entre as áreas do depósito utilizando no modelo a concentração foliar ou radical dos metais: Cr, Cu, Ni e Pb.

Áreas do depósito	A1	A2	A3	A4
A1	0			
A2	17,82 *	0		
A3	24,16 *	7,05 ns	0	
A4	59,94 *	17,22 *	18,59 *	0

*Valores significativos, pelo teste-F $p < 0,05$. ns= não significativo.

Análise da vegetação

A amostragem fitossociológica revelou que cerca de 30 espécies compõem a vegetação do depósito, distribuídas em 14 famílias e 20 gêneros (Tabela 5). Na área mais antiga (A4) foram observadas plântulas, não sendo possível identificar as espécies. A maioria das espécies é herbácea, porém três espécies arbóreas foram encontradas: *Schinus terebentifolius* e *Casearia sylvestris* e *Mimosa bimucronata*. As famílias Asteraceae, Convolvulaceae e Poaceae possuem o maior número de espécies. O número de espécies aumentou com a idade da área. Na área A1 e A2 foram encontradas 6 espécies, na área A3 13 espécies e na área A4 16 espécies.

Tabela 5. Espécies e respectivas famílias encontradas no levantamento fitossociológico nas áreas do depósito de cinza de carvão mineral em São Jerônimo, RS.

Amaranthaceae	Flacourtiaceae
<i>Amaranthus viridis</i> L.	<i>Casearia sylvestris</i> SW.
<i>Alternanthera philoxeroides</i> (Mart) Griseb	Lamiaceae
Anacardiaceae	<i>Hyptis mutabilis</i> Briq.
<i>Schinus terebentifolius</i> Marchand	Leguminosae
Asteraceae	<i>Mimosa bimucronata</i> Kuntze
<i>Coyza bonariensis</i> L.	Poaceae
<i>Mikania micrantha</i> Kunth	<i>Cynodon dactylon</i> L.
<i>Eupatorium picturatum</i> Malme	<i>Paspalum pumilum</i> Nees
<i>Erechthites valerianaefolia</i> (Wolf) DC	<i>Paspalum</i> sp.
Commelinaceae	Solanaceae
<i>Commelina communis</i> L.	<i>Solanum americanum</i> Mill
Convolvulaceae	Urticaceae
<i>Ipomoea alba</i> L.	<i>Parietaria debilis</i> G. Forst
<i>Ipomoea cairica</i> (L.) Sweet	Indeterminadas
<i>Solidago chilensis</i> Meyen	<i>Plântula 1</i>
Cyperaceae	<i>Plântula 2</i>
<i>Cyperus</i> sp.	<i>Plântula 3</i>
<i>Cyperus esculentus</i> L.	<i>Plântula 4</i>
Discoraceae	<i>Planutla 5</i>
<i>Dioscoria</i> sp	<i>Plântula 6</i>
Euphorbiaceae	<i>Plântula 7</i>
<i>Ricinus communis</i> L.	

O índice de Sørensen foi usado para determinar a similaridade da composição da vegetação entre as unidades de cada área do depósito (A1, A2, A3 e A4), permitindo a comparação entre as áreas. Observa-se na Figura 7 que as áreas não são similares em termos de composição florística. O maior índice observado na área A1 e A2 indica que estas áreas possuem uma homogeneidade maior que a observada nas áreas A3 e A4. Estas

últimas áreas apresentam baixos índices de similaridade e, portanto a vegetação é mais heterogênea.

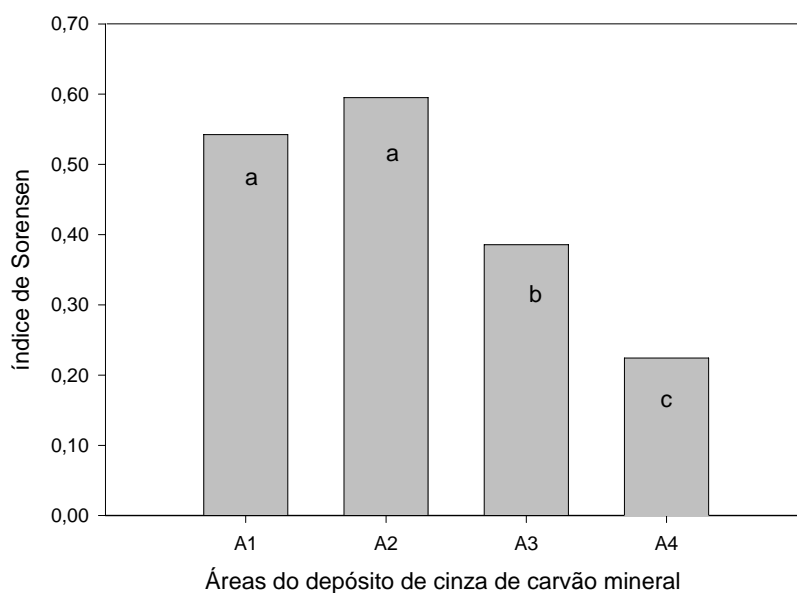


Figura 7. Índice de similaridade de Sørensen entre as áreas do depósito de cinza de carvão mineral em São Jerônimo RS. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de aleatorização.

A análise de ordenação das unidades amostrais, obtida por PCoA mostra a formação de dois grupos (Figura 8). Em um dos extremos do eixo das coordenadas estão concentradas as unidades amostrais correspondente a área mais jovem do depósito (A1) e no outro extremo do eixo, no sentido positivo, encontram-se as unidades da área mais antiga do depósito (A4) (Figura 8 A).

Na Figura 8B observa-se a distribuição das espécies nestes grupos. No grupo I a espécie mais correlacionada é o *Cynodon dactylon*. Já no grupo II inúmeras espécies estão mais correlacionadas: *Hyptis mutabilis*, *Paspalum pumilum*, *Commelina communis*.

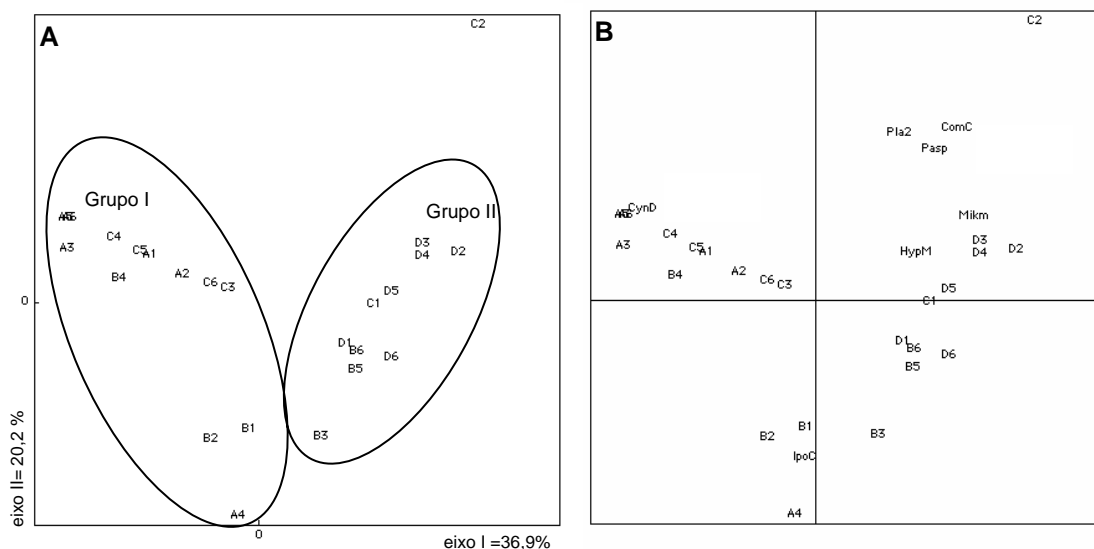


Figura 8. Diagrama de ordenação (PCoA) das unidades amostrais baseada no valor de cobertura das espécies, com distância Euclidiana entre as unidades-(A). Os Taxas são mostrados no diagrama na posição proporcional para o nível de correlação com os eixos da ordenação -(B). As letras representam as unidades amostrais em cada área: A1 a A6, área A1; B1a B6, área A2; C1a C3, área A3 e D1 a D6, área A4. CynD (*Cynodon dactylon*), IpC (*Ipomoea cairica*), HyM (*Hyptis mutabilis*), Mikm (*Mikania micrantha*), Pasp (*Paspalum pumilum*), ComC (*Commelina communis*), Pla2 (Plântula sp2).

A ordenação em gradiente, dada pela análise de Componentes Principais (PCA) para unidades amostrais e para as espécies, expressos em tabelas, mostra a diferença na distribuição das espécies e na gradação estabelecida na sucessão de espécies na comunidade (Tabela 6). Determinadas espécies, por exemplo, *Hyptis mutabilis* e *Casearia sylvestris*, *Mimonsa bimocrumata* e *Schinus terebentifolius* possuem ocorrência restrita somente nas áreas mais antigas do depósito, porém, outras espécies, *Ricinus communis* e *Cynodon dactylon*, têm distribuição mais ampla na área, estando presentes em quase todas as unidades amostrais (Tabela 6).

Tabela 6. Ordenação em tabela mostrando um gradiente de distribuição das espécies, segundo análise de componentes principais (PCA), para unidades amostrais e espécies, segundo *MULVA-5*.

RELEVE NO. (unidades amostrais 1-24)	1	111	1	111	1	212222
RELEVE GROUP NO.	1	11111111111111111111111111111111				
21 Hyptis mutabilis Briq.	1					1 1
27 Casearia sylvestris SW.	1					2
22 Mimosa bimucronata Kuntze	1					2
29 Plantula 7	1					1
30 Discoria sp.	1					1
28 Plantula 6	1					1
23 Schinus terebentifolius Marchand	1					1
11 Commelina communis L.	1			8		142 4
14 Plantula 1	1					1
13 Eupatorium picturatum Malme	1					1 21
26 Plantula 5	1					1
25 Plantula 4	1					1
24 Plantula 3	1					1
6 Alternanthera philoxeroides (Mart) Griseb	1			1		1
15 Plantula2	1			1		
17 Erechthites valerianaefolia (Wolf) DC	1	1				
3 Cyperus sp.	1		1			
18 Solanum americanum Mill	1	2				
19 Parietaria debilis G. Forst	1	1				1
20 Cyperus esculentus L.	1	2	4			
10 Mikania micrantha Kunth	1				21	2 222
16 Conitza bonariensis L.	1	1	2			
4 Ipomoea alba L.	1		2	2		1
8 Amaranthus viridis L.	1	1		1		
12 Paspalum sp.	1				5	31 2
7 Paspalum pumilum Nees	1	2	4		1	1 44
9 Solidago chilensis Meyen	1	1			1	1
5 Ipomoea cairica (L.) Sweet	1	51	4	371	1	
2 Cynodon dactylon L.	1	536632534127			2	7 7
1 Ricinus communis L.	1	12133120	1	132414		22 2

Unidades amostrais: 1 a 6 (A1); 7 a 12 (A2); 13 a 18 (A3) e 19 a 24 (A4).

Valores de 1 a 8 correspondem às classes de cobertura vegetal para cada espécie.

Inúmeros fatores ambientais podem atuar no estabelecimento de uma espécie vegetal, por exemplo, disponibilidade hídrica, luz, disponibilidade de nutrientes e elementos tóxicos. Por ser esta uma área de depósito de cinzas, onde o substrato original, solo, é substituído pela cinza, os teores de elementos nutrientes e não nutrientes foram explorados como sendo os prováveis fatores de interferência na distribuição das espécies. As variáveis químicas que apresentaram os maiores coeficientes de correlação com as unidades amostrais foram: N= 0,55; S= -0,63; Cr = 0,60 e Ni= -0,67. Na etapa seguinte, a análise de ordenação bidimensional utilizando a rotina COMPORD, opção FUZZY (MULVA 5) mostrou o gradiente de distribuição das unidades amostrais em função da

concentração de N, S, Cr, Ni (Figura 9). Foi possível observar que somente que nitrogênio, enxofre, e níquel parecem exercer alguma influência na distribuição das espécies, porque as unidades amostrais estão distribuídas mais próximas a uma diagonal e não dispersas como nos demais diagramas. Segundo Wildi (1994) e Wildi & Orlóci (1996) o estabelecimento de uma diagonal indica que a variável ambiental testada é o fator determinante na distribuição das espécies na área amostral.

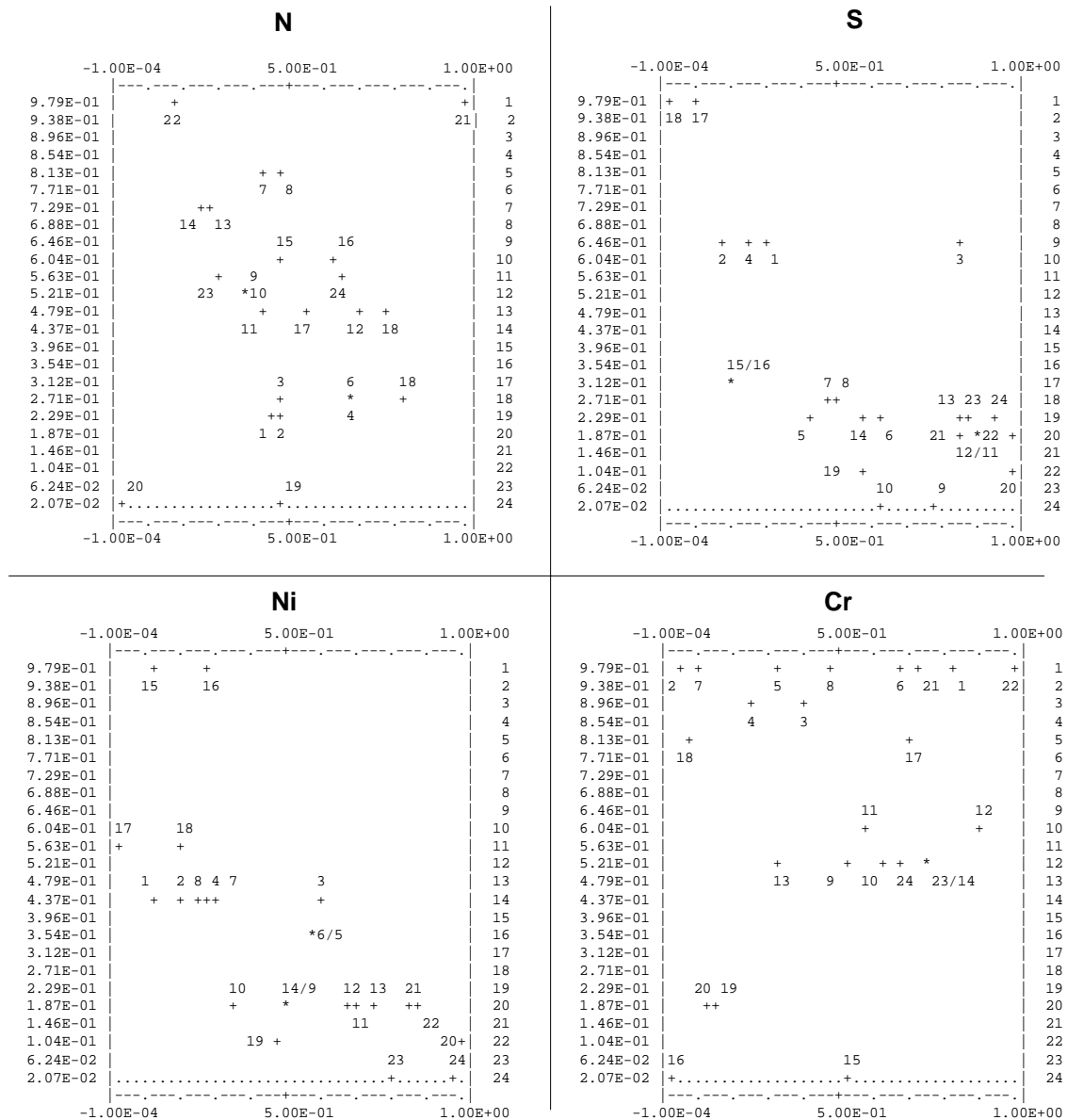


Figura 9. Diagrama de dispersão das unidades amostrais em função das concentrações nas cinzas de (N, S, Cr e Ni).

A análise da performance das espécies diagnóstico/indicadoras de grupo, mostrou que algumas das espécies analisadas ocorrem preferencialmente em determinadas classes de concentração dos elementos (N, S Cr, Ni), (Figura 10, 11, 12 e 13).

Para as concentrações totais de nitrogênio em cinza, observou-se que a ocorrência da maioria das espécies testadas não é restrita a uma classe de concentração de nitrogênio (Figura 10). *Cynodon dactylon* e *Ricinus communis* apresentam ampla distribuição nas três classes para nitrogênio, enquanto *Commelina communis* ocorre com certa preferência em classes de maior concentração de nitrogênio.

```

HISTOGRAM OF WEIGHTED SCORES
-----
ATTRIBUTES LABELS:
11      10      1      2      16      20      7      21

CLASS NO. 1 (N= 8, CENTROID= 4.50)
0.306E+00 0.250E+00 0.963E+00 0.887E+00 0.000E+00 0.000E+00 0.306E+00 0.217E+00

CLASS NO. 2 (N= 10, CENTROID= 11.50)
0.000E+00 0.573E+00 0.166E+01 0.145E+01 0.373E+00 0.445E+00 0.863E+00 0.000E+00

CLASS NO. 3 (N= 6, CENTROID= 18.50)
0.103E+01 0.667E+00 0.162E+01 0.104E+01 0.000E+00 0.000E+00 0.289E+00 0.289E+00

0.00E+00      8.28E-01      1.66E+00
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CLASS
  ATTRIBUTE NO. 11 Commelina communis
1 .*****
2 .*
3 .*****

  ATTRIBUTE NO. 10 Mikania micrantha
1 .*****
2 .*****
3 .*****

  ATTRIBUTE NO. 1 Ricinus communis
1 .*****
2 .*****
3 .*****

  ATTRIBUTE NO. 2 Cynodon dactylon
1 .*****
2 .*****
3 .*****

  ATTRIBUTE NO. 20 Cyperus esculentus
1 .*
2 .*****
3 .*

  ATTRIBUTE NO. 7 Paspalum pumilum
1 .*****
2 .*****
3 .*****

  ATTRIBUTE NO. 21 Hyptis mutabilis
1 .*****
2 .*
3 .*****

```

Figura 10. Histograma de freqüência da ocorrência das espécies diagnóstico/indicadoras segundo as classes (1, 2 e 3) dos teores totais de nitrogênio em cinzas de carvão mineral, rotina GRPDR (*MULVA 5*).

Em relação às concentrações de enxofre, *Commelina communis*, *Mikania micrantha*, e *Paspalum pumilum* mostram certa preferência a concentrações mais baixas deste elemento (Figura 11). Por outro lado, *Cyperus esculentum* parece ocorrer preferencialmente em áreas com maior concentração de enxofre.

HISTOGRAM OF WEIGHTED SCORES

```

-----
ATTRIBUTES LABELS:
11      10      1      2      16      20      7      21

CLASS NO. 1 (N= 18, CENTROID= 21.00)
0.480E+00 0.652E+00 0.159E+01 0.881E+00 0.111E+00 0.000E+00 0.712E+00 0.192E+00

CLASS NO. 2 (N= 4, CENTROID= 35.00)
0.000E+00 0.000E+00 0.933E+00 0.177E+01 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00

CLASS NO. 3 (N= 2, CENTROID= 49.00)
0.000E+00 0.000E+00 0.866E+00 0.244E+01 0.866E+00 0.222E+01 0.000E+00 0.000E+00

      0.00E+00      1.22E+00      2.44E+00
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CLASS
      ATTRIBUTE NO. 11 Commelina communis
1 .*****
2 .*
3 .*

      ATTRIBUTE NO. 10 Mikania micrantha
1 .*****
2 .*
3 .*

      ATTRIBUTE NO. 1 Ricinus communis
1 .*****
2 .*****
3 .*****

      ATTRIBUTE NO. 2 Cynodon dactylon
1 .*****
2 .*****
3 .*****

      ATTRIBUTE NO. 20 Cyperus esculentus
1 .*
2 .*
3 .*****

      ATTRIBUTE NO. 7 Paspalum pumilum
1 .*****
2 .*
3 .*

      ATTRIBUTE NO. 21 Hyptis mutabilis
1 .****
2 .*
3 .*

```

Figura 11. Histograma de frequência da ocorrência das espécies diagnóstico/indicadoras segundo as classes de teores de enxofre em cinzas de carvão mineral, rotina GRPDR (MULVA 5).

Com relação à concentração de níquel na cinza (Figura 12), observa-se que as espécies *Ricinus communis* e *Cynodon dactylon* distribuem-se igualmente, tanto em locais com teores mais baixos, medianos e de forma proeminente em locais com teores mais elevados. Por outro lado, as espécies *Commelina communis*, *Mikania micrantha* e *Paspalum pumilum* ocorreram preferencialmente nos locais com concentrações mais baixas de níquel (classe 1).

```

HISTOGRAM OF WEIGHTED SCORES
-----
ATTRIBUTES LABELS:
11      10      1      2      16      20      7      21

CLASS NO. 1 (N= 14, CENTROID= 20.00)
0.617E+00 0.838E+00 0.145E+01 0.469E+00 0.000E+00 0.000E+00 0.915E+00 0.247E+00

CLASS NO. 2 (N= 8, CENTROID= 24.00)
0.000E+00 0.000E+00 0.115E+01 0.203E+01 0.217E+00 0.556E+00 0.000E+00 0.000E+00

CLASS NO. 3 (N= 2, CENTROID= 28.00)
0.000E+00 0.000E+00 0.224E+01 0.253E+01 0.100E+01 0.000E+00 0.000E+00 0.000E+00

0.00E+00      1.27E+00      2.53E+00
-----+-----+-----+
CLASS
    ATTRIBUTE NO. 11 Commelina communis
1 .*****
2 .*
3 .*

    ATTRIBUTE NO. 10 Mikania micrantha
1 .*****
2 .*
3 .*

    ATTRIBUTE NO. 1 Ricinus communis
1 .*****
2 .*****
3 .*****

    ATTRIBUTE NO. 2 Cynodon dactylon
1 .*****
2 .*****
3 .*****

    ATTRIBUTE NO. 20 Cyperus esculentus
1 .*
2 .*****
3 .*

    ATTRIBUTE NO. 7 Paspalum pumilum
1 .*****
2 .*
3 .*

    ATTRIBUTE NO. 21 Hyptis mutabilis
1 .****
2 .*
3 .*

```

Figura 12. Histograma de frequência da ocorrência das espécies diagnóstico/indicadoras, segundo as classes de teores ambientalmente disponíveis de níquel em cinzas de carvão mineral, rotina GRPDR (*MULVA 5*).

Ricinus communis e *Cynodon dactylon* também ocorreram nas três classes de concentração de cromo (Figura 13). Entretanto, *Ricinus communis* ocorre, preferencialmente, nas classes de valores baixo e mediano enquanto *Cynodon dactylon* ocorre, preferencialmente, em locais de concentrações mais elevadas. Dentre as espécies

estudadas somente *Cyperus esculentum* mostrou maior preferência para concentrações mais elevadas de cromo, entretanto com baixa ocorrência (Figura 13).

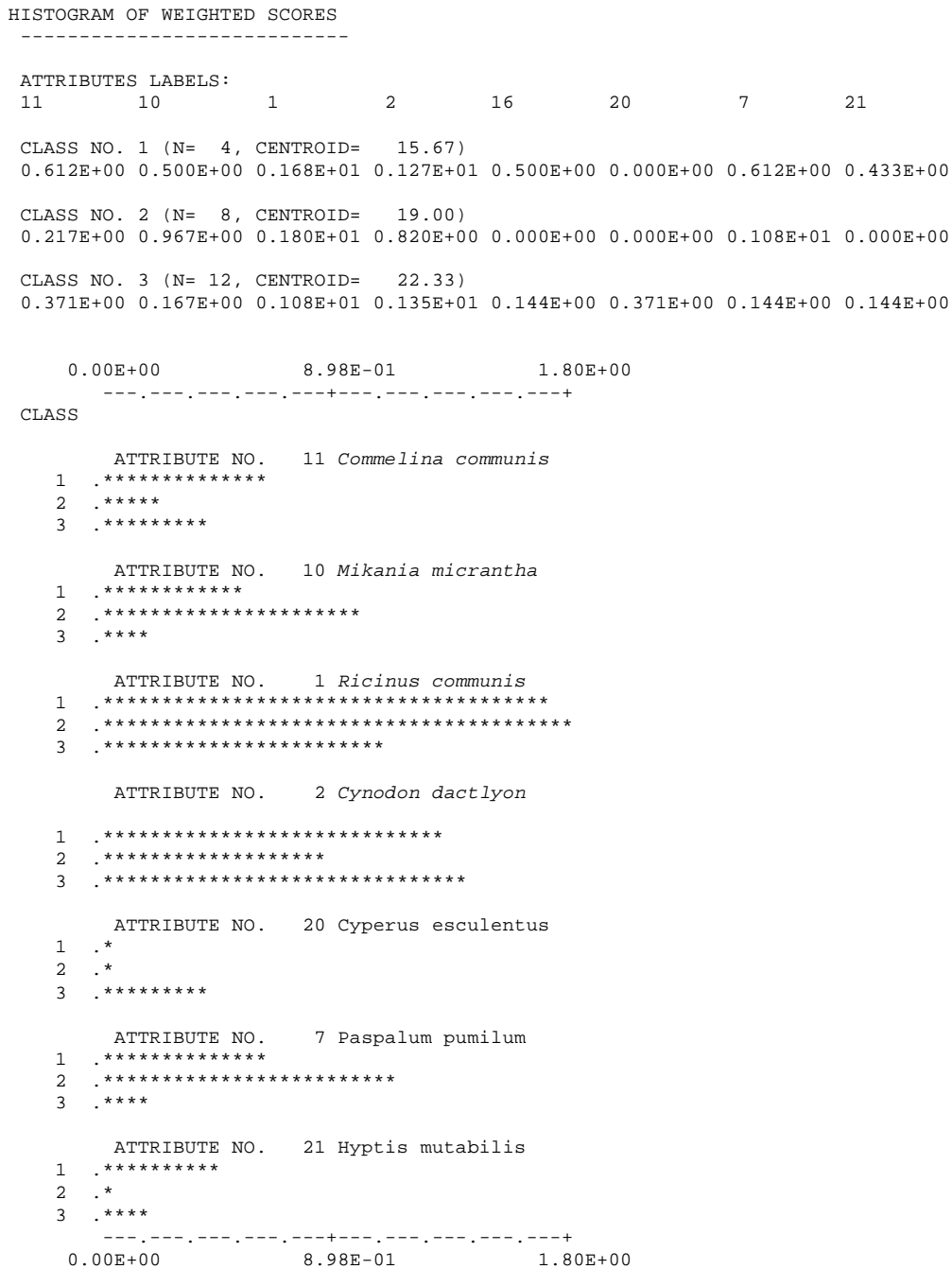


Figura 13. Histograma de frequência da ocorrência das espécies diagnóstico/indicadoras segundo as classes de teores ambientalmente disponíveis de cromo em cinzas de carvão mineral, rotina GRPDR (*MULVA 5*).

DISCUSSÃO

Nas áreas do depósito, as cinzas não apresentaram valores extremos de pH, o que é uma característica importante para o crescimento das plantas já que o pH é um dos fatores que regula a disponibilidade de nutrientes no solo. Em termos de fertilidade, o teor total de nitrogênio na cinza foi baixo enquanto as concentrações dos demais macronutrientes (P, K, Ca e S) podem ser consideradas como suficientes para o bom desenvolvimento das plantas. A concentração destes elementos pode ter sido influenciada pelas áreas adjacentes devido ao fato que a área do depósito está em uma parte baixa do terreno.

No caso do enxofre (forma SO_4^{2-}), as elevadas concentrações encontradas nas cinzas são possivelmente devido à elevada concentração deste elemento no carvão. A maior concentração deste elemento entre 100-120cm em relação à concentração na superfície mostra que este elemento está sendo lixiviado. De modo geral, no solo, o ânion sulfato é facilmente lixiviado devido a menor presença de sítios com cargas positivas para a adsorção do sulfato. A lixiviação do sulfato pode ser favorecida pelo aumento de pH, porque isto leva a liberação dos sulfatos adsorvidos. A maior concentração de matéria orgânica, promove o aumento das cargas negativas do solo, repelindo assim o sulfato (Raij, 1991). A maior concentração de cálcio, entre 100-120 cm em relação à superfície, na área mais antiga do depósito A4 pode estar relacionada com a maior concentração de sulfato nesta região do perfil das cinzas. Isto porque, o cálcio pode insolubilizar-se com os sulfatos.

Quanto à concentração dos metais pesados (Cu, Cr, Ni e Pb) nas cinzas, as mesmas encontraram-se abaixo da concentração alerta (que indica uma possível alteração na qualidade natural dos solos) consideradas pela CETESB para solos (CETESB, 2001). Os teores totais de ferro e alumínio estão dentro das faixas de concentração para solos brasileiros não contaminados. Da mesma forma que para a maioria dos macronutrientes, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações dos metais pesados entre a superfície e a profundidade de 100-120cm. Portanto, diferente da hipótese inicial, não está ocorrendo um acúmulo de metais na área de exploração das raízes, ou seja, até a profundidade de 100-120 cm. Por outro lado, a concentração de níquel e cromo na mamona foram significativamente diferente entre a área mais jovem e mais antiga do depósito. Isto mostra que em termos de disponibilidade a concentração destes elementos está se modificando em função da idade do depósito. Isto pode ser resultado de um conjunto de fatores que envolvem deste o intemperismo das partículas da cinza, interações entre

elementos favorecendo a maior disponibilidade de alguns elementos, alterações no pH da rizosfera por exudatos das próprias plantas e aumento da atividade microbiana.

Nas condições do depósito, a cinza parece não restringir o crescimento da mamona. Não foram observados sintomas de toxidez nas plantas nas áreas do depósito, mesmo que na área mais antiga A4 onde foram observadas concentrações mais elevadas de níquel nas folhas da mamona. Isto pode indicar que mamona tenha capacidade de acumular estes metais na parte aérea.

Embora a análise de variância não tenha mostrado diferenças significativas das concentrações dos elementos e do pH entre as áreas, a análise multivariada mostrou que o conjunto de variáveis químicas utilizadas foi capaz de diferenciar as quatro áreas do depósito. Portanto, em termos químicos, as quatro áreas são diferentes. Todos os elementos analisados apresentam discretas variações entre as áreas, sendo que os valores parciais de *Wilk's Lambda* associados a cada variável foram semelhantes. Isto sugere que estas áreas estão sofrendo lentas modificações ao longo dos anos e que nenhuma das variáveis estudadas é capaz de explicar individualmente as mudanças que estão ocorrendo neste sistema. Entretanto, não foi possível verificar uma tendência evidente da concentração dos elementos entre as áreas. Porém, acredita-se que a área mais antiga do depósito tenha sofrido mudanças positivas nas características químicas do substrato, as quais favoreceram o estabelecimento de um maior número de espécies vegetais nesta área. A concentração significativamente maior de nitrogênio na área A4 em relação a A1 aponta que a área A4 apresentou melhorias em termos químicos em relação à área A1.

O número reduzido de espécies e a predominância de gramíneas e herbáceas mostram que esta área encontra-se em processo inicial de sucessão. Segundo Budowski (1965), no estágio inicial e inicial secundário de sucessão, há um nítido favorecimento para gramíneas, arbustos e cipós, sendo que árvores são escassas. Porém, esta vegetação apresenta diferenças entre as áreas, como mostraram as diferenças significativas observadas no índice de similaridade de Sørensen, entre as unidades amostrais de cada área. Nas áreas mais jovens A1 e A2, onde ocorre menor número de espécies com maior cobertura de *C. dactylon*, o índice de similaridade foi maior, mostrando a homogeneidade destas áreas. Nas áreas mais antigas, A3 e A4, observa-se que as unidades amostrais apresentaram menor índice de similaridade, ou seja, maior dissimilaridade. Nestas áreas foi observado, especialmente na área A4, maior número de espécies em relação à área A1 e A2. Isto mostra que a vegetação estabelecida inicialmente permite o desenvolvimento de outras espécies no local, evidenciando o avanço do processo sucessional.

Segundo Rogalski et al. (2005), o processo sucessional é iniciado com algumas espécies e formas de vida, geralmente ervas e arbustos, que exercem o papel de facilitadoras. Estas melhoram as condições ambientais, retornando gradativamente ao ambiente, conforme sua capacidade de suporte, do clima e solo local. As espécies pioneiras transferem grande parte dos nutrientes disponíveis no solo para a biomassa sendo um mecanismo eficiente para a conservação de nutrientes na área, favorecendo o aumento da matéria orgânica do solo. Elas também modificam as condições microclimáticas nos estratos de crescimento, reduzindo as flutuações térmicas e aumento da umidade relativa (Gómez-Pompa & Vázquez-Yanes, 1981). Esta última função é especialmente importante em um substrato como as cinzas, que apresenta forte capacidade de retenção de calor devido à cor escura do material.

Foi possível identificar que em quatro anos a vegetação já mostra uma configuração distinta, como mostrado pela análise de ordenação. Os grupos formados separam a vegetação entre a área mais jovem e a mais antiga da área (A4). As demais áreas estão dispersas entre os grupos mostrando que não formam nenhum agrupamento específico. Isto, possivelmente, é explicado pelo curto período que separa uma área da outra e a proximidade das áreas. As áreas A2 e A3 parecem estar em processo de modificação, não apresentando uma composição específica capaz de formar um grupo distinto. O processo de revegetação natural pode ser muito lento em áreas severamente impactadas sendo necessário intervenções. Segundo Bradshaw (2003), é necessário analisar os componentes do processo natural e identificar onde as ações podem ser mais eficientes e, portanto garantir o sucesso do processo em um tempo razoável. Hodacova & Prach (2003) mostraram que a revegetação natural promove a longo prazo um aumento na diversidade em comparação à revegetação técnica. Segundo os autores, o rápido incremento na diversidade promovido pela revegetação técnica não é sustentado a longo prazo. Além disso, a revegetação natural é economicamente menos dispendiosa. Acreditamos que nas áreas de cinza de carvão o fator nutricional do substrato é um fator limitante. A área em estudo não demonstrou esta limitação, embora nenhuma intervenção neste sentido tenha sido feita. Isto pode ser explicado pelo fato que a área do depósito está localizada em uma região baixa do terreno e recebe escoamentos das regiões do entorno não pertencentes à área do depósito, que contribuem para o aumento da fertilidade deste substrato.

A tabela de ordenação mostra o gradiente formado pela vegetação. Nesta tabela observa-se que *R. communis* apresenta ampla distribuição na área, estando presente desde a área A1 até a A4. Outra espécie com ampla distribuição foi *C. dactylon*, porém, na área

mais antiga, A4, foi presente somente em duas unidades amostrais não ocorrendo nas demais. Isto mostra que seu crescimento pode ser controlado com o avanço da vegetação. Observou-se que as espécies arbóreas como *Casearia sylvestris*, *Mimosa bimucromata* e *Schinus terebentifolius* ocorreram somente nas áreas mais antigas do depósito A4, possivelmente, porque somente nesta área as condições de substrato e microclima foram viáveis ao surgimento destas espécies.

As observações de campo e as análises permitem descrever que uma seqüência de espécies ocorre na área, caracterizando uma sucessão, embora a área esteja em fase pioneira. A seguinte seqüência foi observada: *Cynodon dactylon* é a espécie pioneira, proporcionando rápida cobertura das cinzas. A mamona pode ocorrer conjuntamente com o *C. dactylon*, porém inicialmente com menor número de indivíduos (Figura 14). Com o crescimento de alguns indivíduos de mamona, ocorre um favorecimento de um maior número de indivíduos desta espécie. Embora não tenham sido feitas análises específicas, acredita-se que o sombreamento da área pela mamona desfavorece o crescimento de *C. dactylon*. Assim, esta espécie tem seu crescimento controlado. Quando o crescimento do *C. dactylon* reduz, é observado o surgimento de outras espécies (Figura 14). Em uma fase seguinte, o número de indivíduos de mamona reduz e outras espécies têm o estabelecimento e o crescimento favorecidos. Acredita-se que a redução do número de indivíduos de mamona possa ser uma resposta de competição por espaço, luz e nutrientes entre os indivíduos desta espécie.



Figura 14. Vegetação espontânea nas áreas do depósito de cinza de carvão mineral.

As características químicas e físicas do substrato são determinantes no estabelecimento da vegetação. Estudos em um remanescente florestal no Morro do Pinhal, RS (Porto et al., *in press a*) verificaram que a composição química do solo foi determinante na distribuição da vegetação. Espécies com maior tolerância a variações a determinada característica podem ter ampla distribuição (Odum, 1983; Porto *in press b*). Isto pode explicar a ampla distribuição de *R. communis* e *C. dactylon* no depósito de cinzas. Observou-se nos histogramas de frequência e ocorrência para os quatro elementos testados (N, S, Ni, Cr) que as espécies *R. communis* e *C. dactylon* foram as espécies que apresentaram ocorrência em todas as classes de concentração. As demais espécies têm menor tolerância, ocorrendo preferencialmente em classes de maior ou menor concentração, dependendo do elemento. Esta maior tolerância demonstra a rusticidade destas espécies e, portanto, a capacidade das mesmas em colonizar ambientes em condições limitantes a outras espécies.

R. communis e *C. dactylon* são duas espécies exóticas asselvajadas e, portanto, a utilização das mesmas para a revegetação pode ser vista por muitos pesquisadores como um aspecto negativo. A utilização de espécies exóticas é vista com um sério problema que leva ao declínio de habitats naturais (Vitousek et al, 1997; Wilcove et al., 1998). Porém, as espécies exóticas podem ter uma função importante dentro do processo restauração de uma área (Antonio & Meyerson, 2002). Segundo os autores, uma das funções positivas das espécies exóticas é que em muitos casos somente elas são capazes de colonizar a área inicialmente, pelo alto grau de rusticidade que apresentam. A presença inicial das mesmas na área causa modificações que permitem o estabelecimento das espécies nativas. A utilização de espécies exóticas com características importantes, como tolerância a metais pesados, também pode auxiliar no processo de revegetação e contribuir assim para a restauração ecológica.

Neste contexto, acredita-se que a utilização de *C. dactylon* e *R. communis* no processo inicial de revegetação de áreas impactadas por cinza de carvão mineral é uma prática vantajosa. Estas espécies promovem mudanças no sistema que permitem o estabelecimento de espécies nativas, como foi observado. Além disso, essas duas espécies têm o crescimento controlado com o avanço da sucessão. A duração e o avanço desse processo depende de vários fatores, como o clima, mas, principalmente, da proximidade de remanescentes de vegetação que determinam então a chegada de propágulos no local. Segundo Martinez Rui et al. (2001) e Reis et al. (2003), a regeneração de um ambiente degradado depende principalmente da chegada de propágulos a este local. Dependendo da

área, é necessária a introdução desses propágulos, especialmente de espécies arbóreas. Porém, em áreas de deposição de cinzas, parece claro que o sucesso de estabelecimento de espécies arbóreas depende de uma vegetação inicial herbáceo-arbustiva.

CONCLUSÃO

O conjunto de espécies estabelecidas naturalmente no depósito de cinza promoveu inicialmente a cobertura rápida da cinza e permitiu o desenvolvimento de espécies arbustivas e o estabelecimento de espécies arbóreas após quatro anos. Isto sugere um sistema em sucessão primária, que oferece condições ao estabelecimento de novas espécies conduzindo a área, a longo prazo, para uma restauração ecológica. A espécie *R. communis* parece desempenhar um papel fundamental no sistema, que consiste no controle do crescimento do *C. dactylon* e o favorecimento do estabelecimento de outras espécies que necessitam de condições mais específicas de substrato. O substrato mostrou características químicas diferentes entre as áreas, sugerindo que ao longo do processo de avanço da vegetação, as condições do substrato estão se modificando, apresentando as espécies *C. dactylon* e *R. communis* relações de afinidade com as variações dos elementos químicos especialmente, nitrogênio, níquel e enxofre. O sistema observado no campo parece constituir um bom modelo para o início de um processo de restauração ecológica em áreas de depósito de cinzas de carvão mineral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIO, C.D.; MEYERSON, L.A. (2002). Exotic Plant Species as Problems and Solutions in Ecological Restoration: A Synthesis. **Restoration Ecology**, 10:703-713.
- BRADSHAW, A.D. (2003). Use de natural processes In: WONG, M.H.; BRADSHAW, A.D. **The Restoration and Management of Rerelict Land: Modern Approaches**. World Scientific Publishing Company. 341 p.
- BRAUN-BLANQUET, J. (1979). **Fitossociologia: Bases para el estudio de las comunidades vegetales**. Madrid: H. Blume Ediciones. 820p.
- BUDOWSKI, G. (1965). Distribuiton of tropical American rain Forest species in the light of sucessional process. **Turrialba**, 15: 40-42.
- DAVIS, J. (1986). **Statistics and data analysis in geology**. Toronto: John Wiley. 646 p.
- GÓMEZ-POMPA, A.G.; VÁZQUEZ-YANES, C.V. (1981). Sucessional studies of a rain Forest in México. In: WEST, D.C.; SHUGART, H.H.; BOTOKIN, D.B. (ed.) **Forest succession - concepts and aplication**. New York: Springer-Verlag Press. p.247- 266.
- HODACOVÁ, D.; PRACH, K. (2003). Spoil heaps from brown coal mining: technical reclamation versus spontaneous revegetation. **Restoration Ecology**, 11: 285-391.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. (1998). **Applied multivariate statistical analysis**. 4 ed. Upper Saddle River: Prentice-Hall. 816 p.
- LEVIN, I.P. (1999). **Relating statistics and experimental design**. Thousand Oaks: Sage. 90 p.
- LEWICKI, P.; HILL T. (2007) **STATISTICS: Methods and Applications**. Tulsa: StatSoft Inc. (<http://www.statsoft.com>).
- MARTINEZ, R.C.; FERMÁNDEZ, S.B.; GÓMEZ, J.M. (2001). Effects of substrate coarseness and exposure on plant succession in uranium-mining wastes. **Plant Ecology**, 155: 79-89.
- MERCADO DA ÁGUA (2003). Relatório de perfuração de poços de monitoramento na usina termelétrica de São Jerônimo - UTSJ. **Relatório interno da CGTEE** (não publicado). 7p.
- MINOZZO, M. (2006). **Avaliação da Contaminação das águas subterrâneas por cinzas de carvão na área da usina termoeétrica de São Jerônimo, RS**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Porto Alegre. Instituto de Geociências. Departamento de Geologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 114p.
- ODUM, E. P (1983). Fatores Limitantes. In: RIOS, R.I.; TRIBE, C. (Trad.) **Ecologia**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA. p.141-180

- PILLAR, V.D. (2006). MULTIV- Multivariate Exploratory Analysis, randomization testing and bootstrap Resampling. **User's Guide** v.2.4. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 51p.
- PORTO, M.L.P.; WILD, O.; ASSUNÇÃO, A.F.; (*In press a*). Análise de gradiente de comunidades vegetais e sua relação com os fatores edáficos em um remanescente florestal no sul do Brasil. In: PORTO, M.L.P. (ed.) **Comunidades vegetais e Fitossociologia**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- PORTO, M.L.P. (*In press b*). **Comunidades vegetais e Fitossociologia**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- RAIJ, B.V. (1991). **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Editora Ceres. 343p.
- REIS, A.; ESPINDOLA, M.B.; VIEIRA, N.K. (2003). A nucleação como ferramenta para a restauração ambiental. **Anais do Seminário Temático sobre Recuperação de áreas Degradadas**. São Paulo: Instituto de Botânica. 32-39p.
- ROGALSKI, J.M.; BERKENBROCK, I.S.; REIS, A.; REIS, M.S. (2005). Sucessão e diversidade como fundamentos básicos na restauração ambiental. **Anais do VI Simpósio Nacional e Congresso Latino-americano de Recuperação de Áreas Degradadas**, Curitiba, PR, p. 433-439.
- ROBERTS, D.W. (1986). Ordination on the basis of fuzzy set theory. *Vegetatio*, v. 66: 123-131. *apud* WILDI, O.; ORLÓCI, L. (1996). **Numerical exploration of community patterns - A guide to the use of Mulva** 5. 2.ed. Amsterdam: SPB Academic Publishing 171p.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. (1995). **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 2. ed. Revisada e ampliada. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 174 p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA (1986a). Method 3050B-Acid digestion of sediments sludges, soils and oils. **Test Methods for evaluating solid waste- SW 846**. 3 ed. Washington: Office of Solid Waste and Emergency Response. Disponível em: (http://www.ehso.com/ehso.php?URL=http%3A%2F%2Fwww.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3_series.htm).
- VAN RENSBURG, L.; MORGENTHAL, T.L.; VAN HAMBURG, H.; MICHAEL, M.D. (2003). A comparative analysis of the vegetation and topsoil cover nutrient status between two similarly rehabilitated ash disposal sites. **The Environmentalist**, 23:285-295.
- VITOUSEK, P.M.; ANTONIO C.M.D.; LOOPE, L.L.; REJMANEK, M.; WETSBROOKS, R. (1997). Introduced species: a significant component a human-caused global change. **New Zealand Journal of Ecology**, 21: 1-16.
- WILCOVE, D.S.; CHEN, L.Y. (1998). Management costs for endangered species. **Conservation Biology**, 12: 1405-1407.

WILDI, O.; ORLÓCI, L. (1996). **Numerical exploration of community patterns: A guide to the use of Mulva-5**. 2.ed. Amsterdam: SPB Academic Publishing. 171p.

WILD, O. (1994). **Data analysis with Mulva-5**. Draft version. WSL. 80p.

CAPÍTULO II

ANÁLISE DO EFEITO DA CINZA LEVE DE CARVÃO MINERAL NO CRESCIMENTO E NA CONCENTRAÇÃO DE METAIS PESADOS EM MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.)

A presença de metais pesados nas cinzas de carvão mineral é um dos fatores que pode dificultar o estabelecimento de plantas em áreas de depósito deste material (Adriano et al., 1980; El-Mogazi et al., 1988). A utilização de espécies com maior tolerância a metais pesados pode ser uma estratégia importante para o início da revegetação. Espécies mais tolerantes podem ser utilizadas tanto para a imobilização física do contaminante, pela redução da erosão, quanto para imobilização química, pela fixação do contaminante nos tecidos vegetais. A utilização da vegetação com este propósito é definida como fitoestabilização, sugerida como uma técnica eficiente para locais onde a contaminação é moderada (Pilon-Smits, 2005). O uso da técnica depende de espécies capazes de tolerar a presença de concentrações elevadas de metais pesados.

Como discutido no primeiro capítulo, espécies herbáceas e arbustivas devem fazer parte da etapa inicial da revegetação. A mamona (*Ricinus communis* L.) mostrou ter uma função importante dentro do processo de revegetação, ocorrendo tanto em áreas jovens com em áreas mais antigas do depósito de cinzas, as quais mostraram-se quimicamente diferentes. Além disso, segundo Khan et al. (1998) e Romeiro et al. (2006), a mamona apresenta rápido crescimento, sistema radical abundante e capacidade de tolerar metais pesados como zinco e chumbo.

Em condições naturais, como no depósito de cinza estudado, vários fatores podem influenciar as respostas fisiológicas das plantas, tornando difícil a identificação dos efeitos da cinza. Desta forma, o objetivo desta etapa foi avaliar sob condição de maior controle experimental, em casa de vegetação, a influência da cinza de carvão mineral no crescimento e na concentração de metais pesados nas plantas de *R. communis*, bem como, na fotossíntese das plantas. A fotossíntese é um dos processos mais sensíveis aos danos por estresses abióticos, especialmente aqueles causados por elevadas concentrações de metais pesados (Prasad, 2004). Por este motivo foram realizadas medidas de trocas gasosas como forma de monitorar o efeito dos tratamentos nas plantas

MATERIAS E MÉTODOS

Tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, e as plantas de *R. communis* foram cultivadas em vaso. Os seguintes tratamentos (substratos de cultivo) foram utilizados:

- 1- Solo (S), utilizado como controle;
- 2- Cinza leve de carvão mineral (C);
- 3- 20 cm de solo na superfície do vaso + 60 cm de cinza (C + S). Este tratamento simula a condição frequentemente utilizada em projetos de recuperação de áreas de depósito, que recobrem as cinzas com uma camada de solo; e
- 4- Cinza + solução nutritiva, composta somente por macronutrientes (C + SN). Foi utilizado para avaliar o efeito das cinzas no crescimento das plantas sem deficiência de macronutrientes.

Coleta das cinzas leves e do solo

A cinza leve foi coletada na saída do ciclone (equipamento utilizado para a retenção das cinzas) na usina Termelétrica de São Jerônimo, RS. Com o objetivo de obter uma amostra representativa da cinza leve, sub-amostras foram coletadas durante uma semana. A cada turno de trabalho, ou seja, a cada 4 horas, foram coletadas aproximadamente 4 kg de cinza totalizando 168 kg de cinza leve, as quais foram armazenadas em sacos plásticos. A cinza foi transportada para a casa de vegetação do departamento de Fitossanidade da Faculdade de Agronomia, UFRGS, onde foi novamente misturada para melhor homogeneização e distribuída nos vasos para o cultivo das plantas. Uma sub-amostra de 400 g foi retirada para a análise química.

O solo utilizado neste experimento foi coletado na Estação Experimental Agrônômica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (EEA/UFRGS), localizada no município de Eldorado do Sul. O solo, classificado como Argilosolo vermelho distrófico típico, foi coletado na camada 0-20 cm. Este solo foi escolhido por estar sob a mesma formação geológica que as áreas de depósito de cinza, porém sem influência de fontes contaminantes. Após a coleta, o solo foi transportado para a casa de vegetação em Porto

Alegre onde foi seco (ao sol) e peneirado em malha de 1cm² para ser utilizado no experimento. Uma amostra de 400 g do solo foi retirada para análise química.

As análises químicas da cinza e do solo foram realizadas no laboratório de Análises de Solo na Faculdade de Agronomia, UFGRS. As seguintes variáveis foram analisadas: pH, CTC, condutividade elétrica, carbono orgânico, teor total de N, P e K extraível, Ca trocável e S-SO₄ segundo metodologia descrita em Tedesco (1995). Os teores totais e ambientalmente disponíveis (AMD) dos metais pesados (Fe, Al, Cu, Cr, Ni e Pb) foram determinados seguindo as metodologias USEPA 3052 (1986) e USEPA 3050 (1986), respectivamente. As determinações foram feitas por espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Os resultados foram expressos mg kg⁻¹ de peso seco.

Coleta das sementes

As sementes de mamona foram coletadas em aproximadamente 30 plantas presentes no depósito de cinzas na termelétrica de São Jerônimo. Optou-se por utilizar as sementes da área do depósito, porque estas, poderiam apresentar maior tolerância, devido ao fato, de estarem expostas a condições de maior estresse em relação às plantas de variedades cultivadas. Para maior padronização, as sementes foram selecionadas visualmente pelo tamanho e posteriormente germinadas em areia. Após 20 dias da emergência, as plantas foram transferidas para os vasos definitivos.

Montagem do experimento

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação sem controle de temperatura e umidade relativa do ar e com radiação fotossinteticamente ativa de 1300 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

As plantas foram cultivadas em vasos de PVC (80 cm de altura e 30 cm de diâmetro), entre os meses de novembro de 2004 e março de 2005. No fundo do vaso foi acoplada uma pequena mangueira conectada a uma garrafa para a coleta da água de lixiviação. Em cada vaso foi cultivada uma planta. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 8 repetições (8 plantas), totalizando 32 plantas.

A concentração de macronutrientes utilizada no tratamento C + SN foi: N- 224, P- 62 e K-235, Ca- 160, Mg-24 e S-32 mg l⁻¹. O volume de solução aplicado foi calculado em função do volume necessário para atingir a concentração de 60 kg N/ha, conforme

recomendado por Azevedo et al. (1997). A solução foi adicionada semanalmente, de forma manual e a rega foi realizada diariamente conforme a necessidade verificada, utilizando-se água destilada e deionizada para evitar a adição de íons de forma não controlada na solução.

Para analisar as mudanças de pH e da condutividade elétrica do lixiviado dos tratamentos, foram feitas lixiviações aos 30, 90 e 112 dias após o plantio. Nos vasos com cinza foram adicionados 4 litros de água destilada, enquanto, que nos vasos com solo foi necessária à adição de 5 litros. Este volume foi determinado como necessário para a coleta de 1 litro de lixiviado até 12 horas após a adição da água no vaso. O pH e a condutividade elétrica do lixiviado foram medidos no laboratório Geral do Centro de Ecologia/ UFRGS.

Análises

Para avaliar o efeito das cinzas no crescimento das plantas e a possível interferência dos fatores estressores deste substrato nos processos fisiológicos, foram realizadas as seguintes análises:

(a) Taxa de crescimento relativo em altura (TCRa)

Foi calculada adaptando-se a equação de Bleadle (1985), utilizando-se medidas da altura das plantas em substituição a biomassa seca, como proposto pelo autor. A altura, distância entre o primeiro e o último nó, foi medida semanalmente com auxílio de uma régua.

(b) Fotossíntese

A medida da taxa fotossintética foi realizada em intervalos regulares de 15 dias (a partir de 45 dias após o transplante), sob condições controladas de concentração de CO₂ e luz, usando um medidor portátil de trocas gasosas por infravermelho LI-6400 (Li-Cor, Lincon, USA). A densidade de fluxo de fótons foi mantida em 1500 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e a concentração de referência de CO₂ em 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. As medidas foram realizadas na folha mais jovem completamente expandida de cada planta. Em cada planta foi feita uma

medida, totalizando oito repetições. Com as medidas das taxas fotossintéticas, também foram obtidos os valores das taxas de transpiração (E).

Para entender melhor os possíveis danos da cinza na fotossíntese foram feitas curvas de respostas ao CO₂. Os fatores estressores podem causar danos em diferentes etapas da fixação de CO₂. A utilizações de modelos permitem a separação das limitações da fotossíntese relacionadas à atividade da enzima ribulose-1,5-bisfosfato-carboxilase-oxigenase (Rubisco) e das limitações relacionadas com as taxas de regeneração da ribulose 1,5- bisfosfato (RuBP) (Von Caemmerer, 2000). A partir da curva de resposta ao CO₂, a qual relaciona a assimilação de CO₂ com a concentração interna de CO₂ na folha é possível determinar a velocidade máxima de carboxilação (VCmax) que é o parâmetro diretamente relacionado com atividade da Rubisco e a taxa de transporte de elétrons (Jmax) que está relacionado com a taxa de regeneração da ribulose 1,5-bifosfato (Figura 1).

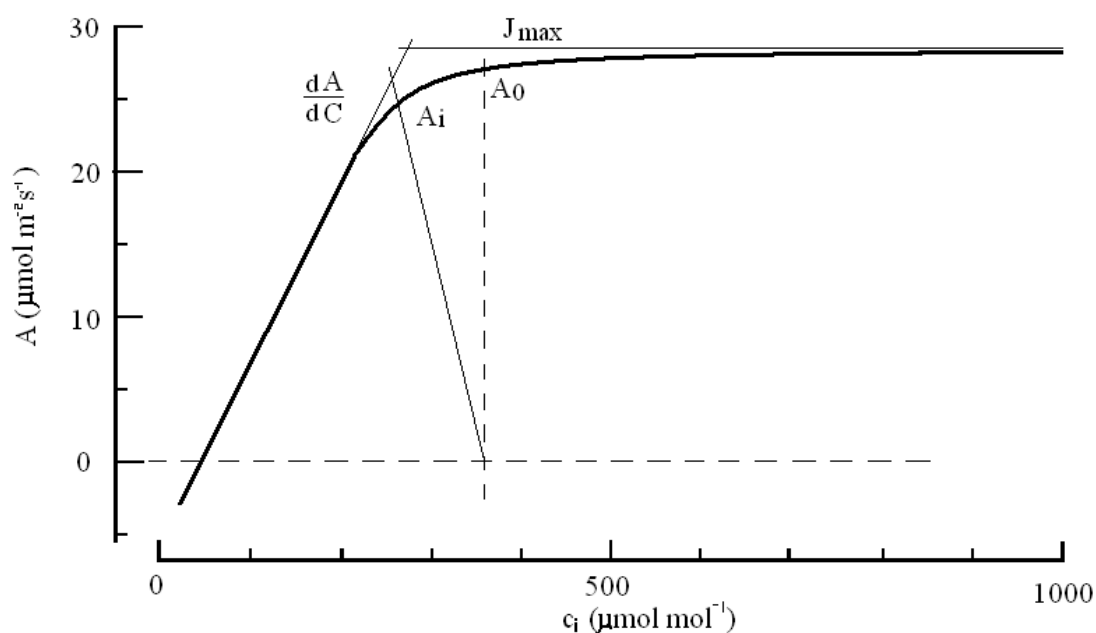


Figura 1. Curva típica de resposta a CO₂ e os parâmetros obtidos. dA/dc_i (VCmax)= velocidade de carboxilação da rubisco (mol m⁻² s⁻¹); Jmax= taxa máxima de regeneração da RUBP (μmol m⁻² s⁻¹). Adaptado de (Beadle,1985).

As curvas de respostas ao CO₂ foram obtidas próximo aos 60 dias em condição ambiente da casa de vegetação, entre 8:30 e 14 horas. Em função do número de repetições (4) por tratamento, foi necessário fazer as medidas em 2 dias. As medidas foram iniciadas após a estabilização da umidade e demais parâmetros na câmara do analisador. Estes

procedimentos foram adotados a fim de evitar o fechamento estomático durante a realização das medidas. Foram utilizadas nove concentrações de CO₂ para a leitura da assimilação: 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 800 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. A densidade de fluxo de fótons utilizada foi de 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

(c) Biomassa seca

Durante o cultivo, muitas folhas sofreram abscisão. Estas foram coletadas, separadamente para cada indivíduo, e após lavagem em água foram secas em estufa para posterior determinação da biomassa, a qual foi denominada de biomassa seca de abscisão. Após 112 dias de cultivo as plantas foram coletadas, separadas em raiz e parte aérea (folhas + caule). Devido à grande quantidade de raízes extremamente finas nos tratamentos com cinza e a forte aderência desta nas raízes, não foi possível determinar a massa seca das raízes. Desta forma, somente a massa seca da parte aérea foi determinada. Após a coleta, caule, folhas e inflorescências foram lavados, secos em estufa (60 °C por 72 horas) e a biomassa seca foi determinada em balança analítica.

(d) Concentração de metais pesados

Para a determinação da concentração de metais pesados nas raízes, uma amostra das raízes de cada planta foi retirada no momento da coleta das plantas. As raízes foram lavadas em água destilada e submetidas a banho de ultra-som 1 minuto para a retirada de solo e/ou cinza aderida. Em seguida as raízes foram secas em estufa (60 °C por 72 horas). Foram sorteadas quatro amostras para a determinação das concentrações dos metais. Após a secagem, as folhas e as raízes foram moídas em gral de porcelana e aproximadamente 0,5 g de material foi utilizado para a determinação das concentrações de Pb, Cr, Cu e Ni. As amostras foram digeridas com 5 ml de HNO₃ e 3 ml de água tridestilada. As concentrações de Pb, Cr e Ni foram determinadas por espectrometria de absorção atômica em forno de grafite e a concentração de cobre foi por espectrometria de absorção atômica em chama de ar acetileno. Os resultados foram expressos por $\mu\text{g g}^{-1}$ de biomassa seca.

(e) Análise dos dados

Os resultados foram expressos como médias das variáveis dependentes seguidas do erro padrão da média (\pm erro padrão). Os dados foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando programa *Statistic* (Lewick, 2007).

RESULTADOS

Caracterização química dos substratos

A cinza apresentou pH alcalino, elevada condutividade elétrica e maior teor de carbono orgânico em relação ao solo utilizado (Tabela 1). A maior porcentagem de carbono orgânico na cinza, em relação ao solo, é decorrente da presença de resíduos de carvão que não foram completamente queimados. Segundo análises preliminares realizadas pela Prof^ª. Dr^ª. Débora Dick do departamento de Química /UFRGS, o carbono presente nesta cinza apresenta características hidrofóbicas e possivelmente pouco contribui para o aumento da CTC (capacidade de troca de cátions) da cinza (comunicação pessoal).

As concentrações de macronutrientes foram maiores na cinza do que no solo (Tabela 1). A concentração na cinza de nitrogênio total, a qual inclui as formas orgânicas e inorgânicas, foi maior que o dobro da encontrada no solo. A concentração de fósforo extraível foi igual na cinza e no solo enquanto as concentrações de K extraível, cálcio trocável e enxofres foram maiores nas cinzas do que no solo.

As concentrações de Cr, Cu e Ni na cinza foram acima dos valores encontrados no solo. Somente as concentrações de chumbo, tanto total quanto AMD, foram maiores no solo, mas estas se encontram dentro das faixas de normalidade (Tabelas 1). As concentrações totais dos metais pesados (Cr, Cu, Ni e Pb) na cinza estão dentro das faixas consideradas normais para os solos mundiais não contaminados: Cr: 7- 221 mg kg⁻¹, Cu: 6-80 mg kg⁻¹, Ni: 4-55 mg kg⁻¹, Pb: 10-84 mg kg⁻¹ (McBride, 1994). Porém, considerando valores de referência estipulados pelas CETESB (2001) para os solos de São Paulo, a

concentração de níquel ambientalmente disponível (AMD) está acima do valor de referência de 13 mg kg⁻¹. A concentração ambientalmente disponível para os demais metais está dentro dos valores de referência estipulados pela CETESB.

Tabela 1. Propriedades químicas do solo e das cinzas leves de carvão minerais utilizadas no experimento.

Propriedades químicas	solo	cinza	Metodologia			
CTC cmol _c kg ⁻¹	7,4	12,0	extração acetato de amônio 1M			
pH	5,6	8,2	água 1:5			
Condutividade elétrica (μS/cm)	40	1081	extração em água 1:5			
Carbono orgânico (%)	0,89	4	Combustão úmida Walkey Black			
Nitrogênio (%)	0,07	0,18	TKN-Kjeldahl			
Fósforo (mg dm ⁻³)	13	13	<i>Mehlich I</i>			
Potássio (mg dm ⁻³)	82	200	<i>Mehlich I</i>			
Cálcio (cmol _c dm ⁻³)	2,2	3,9	KCl 0,1 mol l ⁻¹			
Enxofre -SO ₄ ⁻ (mg dm ⁻³)	7,6	99	CaHPO ₄ 500 mg l ⁻¹ P			
	Total	AMD*	Total	AMD	Total	AMD
Ferro (%)	1,0	0,78	1,2	0,68	EPA 3052	EPA 3050
Alumínio (%)	5,4	1,5	0,94	0,27	EPA 3052	EPA 3050
Cobre (mg kg ⁻¹)	5,0	4	25	8,1	EPA 3052	EPA 3050
Cromo (mg kg ⁻¹)	12	5	28	21	EPA 3052	EPA 3050
Níquel (mg kg ⁻¹)	< 5	3	26	21	EPA 3052	EPA 3050
Chumbo (mg kg ⁻¹)	24	16	10	8,5	EPA 3052	EPA 3050

* AMD - Ambientalmente disponível

As análises de lixiviação realizadas ao longo do cultivo mostraram que o pH e a condutividade elétrica do lixiviado do solo foram menores que a dos demais tratamentos (Figura 2). O pH do lixiviado do solo sofreu a maior redução em relação aos demais tratamentos, passando de 7,2 aos 30 dias para 5,8 aos 112 dias de cultivo. Nos demais tratamentos o pH do lixiviado também diminuiu em função do tempo, entretanto os valores mantiveram-se acima de 7 (Figura 2). A condutividade elétrica, a qual indica a quantidade de íons em solução também foi menor no lixiviado do solo em relação aos demais tratamentos (Figura 2). Observou-se uma queda acentuada da condutividade elétrica entre 30 e 112 dias em todos os tratamentos com cinza. As maiores reduções foram observadas no lixiviado do tratamento C + S, possivelmente porque neste tratamento as plantas tiveram maior crescimento que as plantas cultivadas somente em cinza; logo, absorveram mais íons. Além disso, neste tratamento não houve o acréscimo

de íons com no tratamento C + SN, reduzindo assim a quantidade de íons no lixiviado (Figura 2).

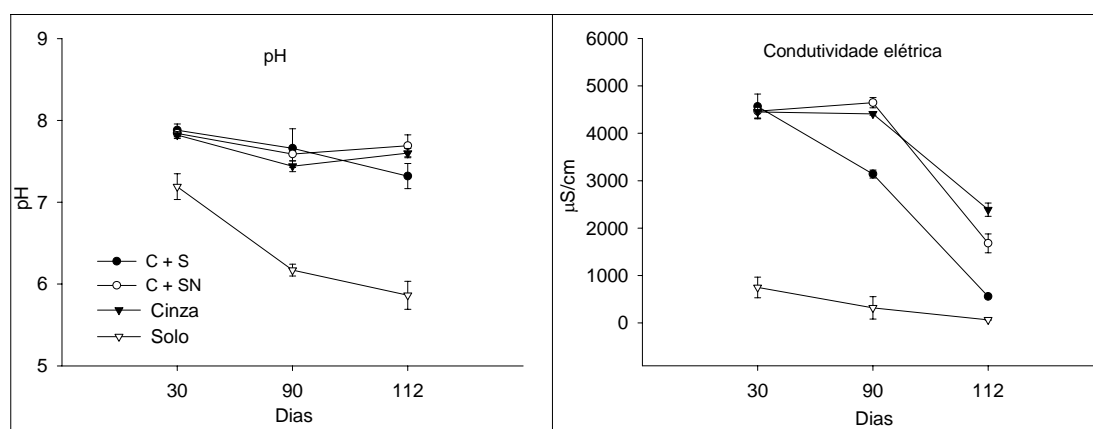


Figura 2. pH e condutividade elétrica da solução lixiviada durante o cultivo de *R. communis* em diferentes tratamentos: C + S (cinza + solo); C + SN (cinza + solução nutritiva); cinza; solo; Barras (desvio padrão da média) n = 4.

Taxa de crescimento relativo em altura e biomassa seca

As plantas cultivadas no solo mostraram as maiores taxas de crescimento até 45 dias após o transplante em relação aos demais tratamentos (Figura 3). A partir deste período, a redução no crescimento foi possivelmente devido a mudanças nas fases de crescimento. As plantas cultivadas no solo emitiram flores aproximadamente aos 75 dias de cultivo, o mesmo não ocorreu nas plantas dos demais tratamentos. As plantas cultivadas somente em cinza mostram as menores taxas de crescimento durante todo o período de avaliação (Figura 3 e 4). As plantas cultivadas neste tratamento tiveram um número reduzido de folhas, as quais praticamente não desenvolveram (Figura 3).

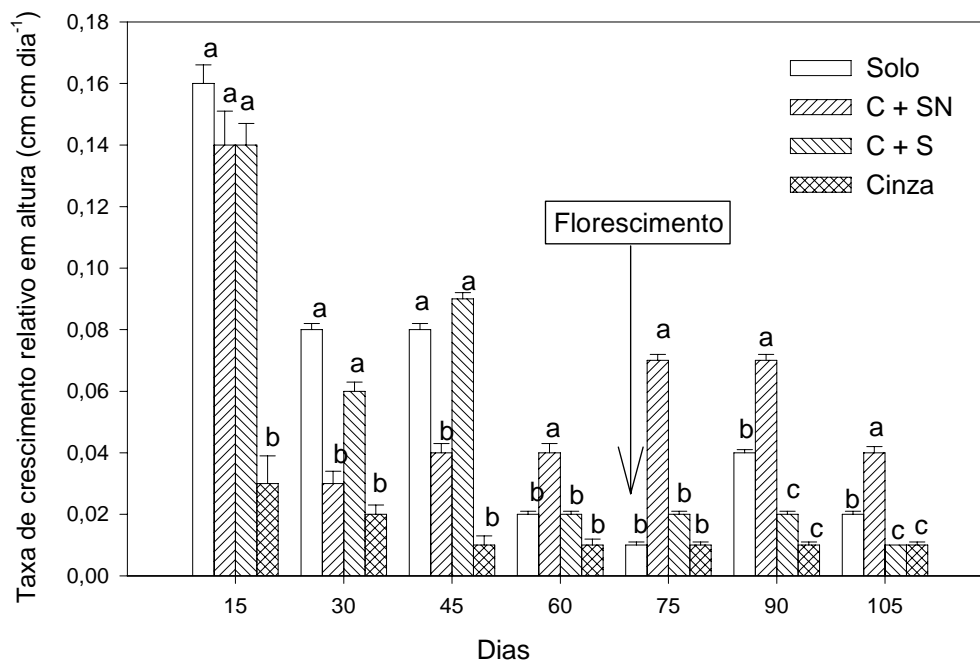


Figura 3. Taxa de crescimento relativo em altura de *R. communis* cultivadas em diferentes tratamentos: solo, cinza, (C +SN) cinza solução nutritiva e (C + S) cinza + solo. Médias (em cada dia) seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras (erro padrão da média), n = 8.

A adição de solo na superfície da cinza (C + S) promoveu o crescimento da mamona, em taxas similares às observadas nas plantas cultivadas no solo especialmente até os 75 dias (Figura 3). Entretanto, como se observa na figura 4, as plantas cultivadas em C + S mantiveram um menor número de folhas e as folhas mais velhas apresentaram uma coloração verde menos intensa, comparado as folhas dos tratamentos solo ou C + SN, o que sugere uma possível deficiência de nitrogênio (Figura 4). As plantas cultivadas em solo apresentaram mudanças fenológicas mais rápidas em relação às plantas cultivadas em C + SN. Assim, neste tratamento as plantas apresentaram um leve aumento nas taxas de crescimento entre 60 e 90 dias, período em que as plantas cultivadas no solo tiveram certa estabilização da taxa de crescimento (Figura 3).

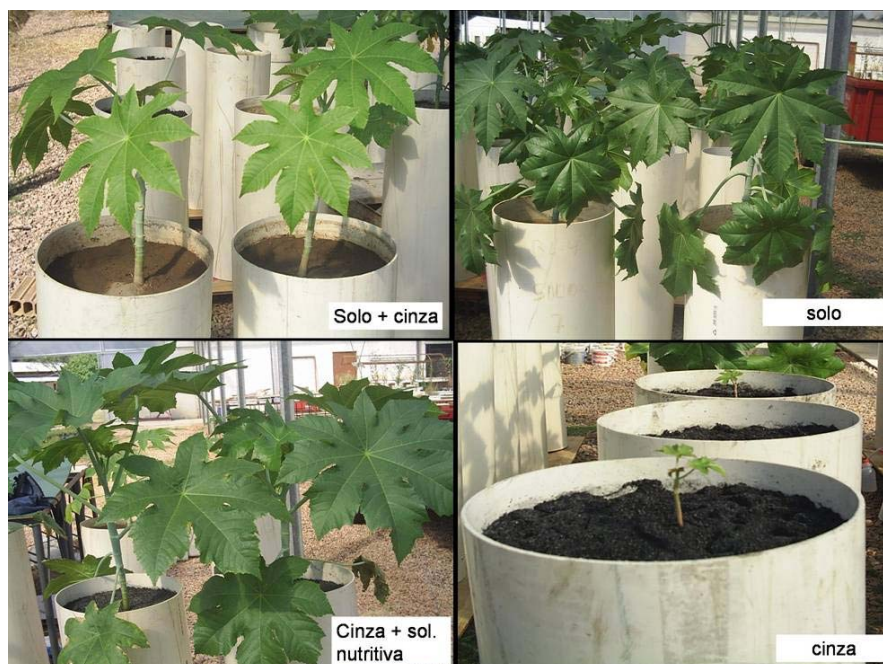


Figura 4. Plantas de *R. communis* após 90 dias de cultivo em diferentes tratamentos com solo e cinza de carvão mineral.

Após 112 dias de cultivo, a biomassa seca da parte aérea das plantas foi significativamente diferente entre os tratamentos, exceto entre os tratamentos C + SN e solo (Figura 5 A). Na figura 5B observa-se a biomassa seca das folhas que sofreram abscisão durante o cultivo. A massa seca destas folhas foi em média aproximadamente 40, 12, 12, e 30% maior que a biomassa seca da parte aérea no final do experimento para os tratamentos C + SN, solo, C + S e cinza, respectivamente. A biomassa total, obtida pela soma da biomassa seca das folhas (abscisão) e a biomassa seca da parte aérea no final do experimento, mostraram diferenças significativas entre todos os tratamentos (Figura 5C). Considerando esta biomassa total, as plantas cultivadas em C + SN, solo e C + S tiveram em média uma biomassa 99,6, 99,4 e 98,9% maior do que as plantas cultivadas em cinza, respectivamente (Figura 5C).

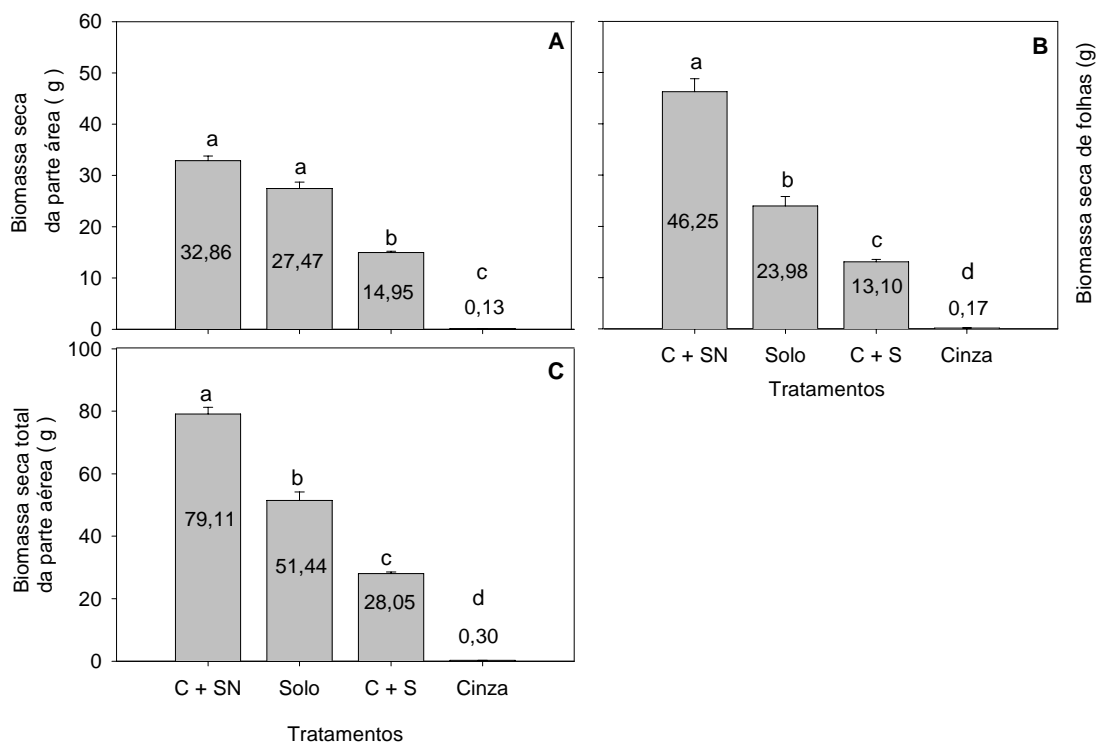


Figura 5- Biomassa seca da parte área de plantas de *R. communis* cultivadas em diferentes substratos. **(A)**- Biomassa seca (folhas + caule + inflorescência), após 112 dias de cultivo. **(B)**- Biomassa seca das folhas que sofreram abscisão durante o experimento. **(C)**- Biomassa total (folhas abscisão + parte aérea no final do experimento). Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras (erro padrão da média), n = 8.

Concentração e distribuição dos metais pesados em mamona

Na tabela 2 observa-se que as concentrações de chumbo e de cobre nas raízes das plantas cultivadas no solo foram significativamente maiores em relação aos demais tratamentos. Para o cromo, a maior concentração foi observada nas raízes das plantas cultivadas na cinza, enquanto a concentração radical de níquel foi maior nas plantas cultivadas em C + SN (Tabela 2). Por outro lado, nas folhas, as maiores concentrações de chumbo e cromo foram observadas nas plantas cultivadas na cinza, enquanto as maiores concentrações de níquel e de cobre foram observadas nas plantas cultivadas em C + SN (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração de metais pesados nas raízes e folhas de plantas de *R. communis* cultivadas em diferentes tratamentos com cinza de carvão mineral.

Tratamentos	Concentração de metal (mg kg ⁻¹)			
	Chumbo	Cromo	Níquel	Cobre
----- Raiz -----				
Solo	10,95 (±1,03) a	0,720 (±0,04) b	1,49 (±0,05) b	22,80 (±0,96) a
Cinza	2,17 (±0,26) b	10,91 (±1,27) a	10,77 (±0,94) a	9,01 (±1,27) bc
C + SN	2,29 (±0,15) b	2,30 (±0,14) b	12,82 (±0,85) a	7,26 (±0,14) c
C + S	3,70 (±0,22) b	2,16 (±0,19) b	4,26 (±0,19) b	15,05 (±0,19)b
----- Folhas -----				
Solo	0,32 (±0,02) b	0,10 (±0,01) b	0,64 (±0,04) b	4,76 (±0,08) b
Cinza	0,81 (±0,10) a	1,10 (±0,13) a	12,47 (±1,09) a	4,50 (±0,07) b
C + SN	0,28 (±0,03) b	0,12 (±0,01) b	18,27 (±1,24) a	8,81 (±0,37) a
C + S	0,25 (±0,01) b	0,10 (±0,01) b	4,20 (±0,06) b	3,70 (±0,06) b

Valores seguidos pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. (± erro padrão da média) n= 4.

As concentrações de níquel nas folhas das mamonas cultivadas nos tratamentos cinza e C + SN foram superiores às concentrações propostas como normais (0,1-5,0 mg kg⁻¹) por Kabata-Pendias, (2000) (Tabela 2). As concentrações foliares de cromo nas plantas cultivadas somente na cinza também apresentaram valores superiores aos indicados por Kabata-Pendias (2000) como normais (0,1- 0,5 mg kg⁻¹). Diferentemente, as concentrações foliares de cobre, exceto no tratamento C + SN, estão abaixo da faixa de normalidade de 5-30 mg kg⁻¹ Kabata-Pendias (2000). Em relação às concentrações foliares de chumbo, as plantas cultivadas no solo apresentaram concentrações inferiores às das plantas cultivadas na cinza. Para todos os tratamentos as concentrações foliares de chumbo estão dentro das faixas de normalidade de (5-10 mg kg⁻¹) proposta por Kabata-Pendias (2000).

Na figura 6 observa-se que as distribuições de chumbo e cromo entre raiz e folha apresentaram comportamentos semelhantes entre si. A razão da concentração nas folhas:concentração nas raízes para estes dois elementos foi menor que 0,4 em todos os tratamentos. Por outro lado, para níquel esta razão foi próxima a 1,0 para as plantas

cultivadas na cinza, C + SN e C + S, respectivamente. Para o cobre a maior razão (1,2) foi observada nas plantas cultivadas em C + SN e a menor razão (0,20) foi nas plantas cultivadas no solo.

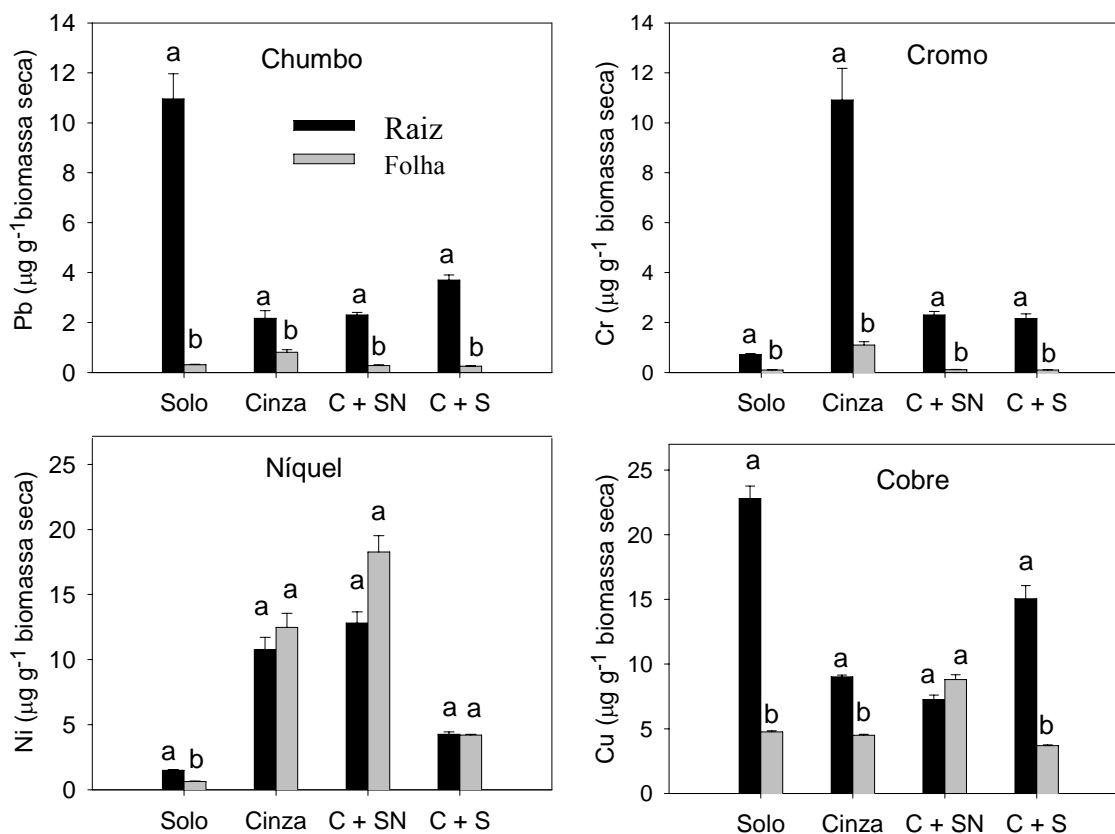


Figura 6. Concentração de metais pesados nas raízes e folhas de plantas de *R. communis* após 112 dias de cultivo em diferente tratamentos: solo; cinza; (C + SN) cinza + solução nutritiva; (C + S) cinza + solo. Médias (em cada tratamento), seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras (erro padrão da média), n= 4.

Fotossíntese

A taxa fotossintética das plantas cultivadas na cinza foi menor que a dos demais tratamentos durante todo o experimento (Tabela 3). Até 75 dias as taxas fotossintéticas das plantas cultivadas no solo e em C + S foram significativamente maiores que as dos demais tratamentos. Após este período a taxa fotossintética das plantas cultivadas em C + SN aumentou. Observou-se uma tendência de diminuição das taxas fotossintéticas das

plantas cultivadas no solo e na C + S, ao longo do tempo. Essa diminuição possivelmente foi devido à mudança do estado fenológico destas plantas (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa fotossintética de *R. communis* expostas a diferentes tratamentos.

Dias	Solo	Cinza	C + SN	C + S
----- Taxa fotossintética $\mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ -----				
45	26,2 ($\pm 0,96$) a	6,0 ($\pm 1,22$) c	14,4 ($\pm 0,93$) b	29,3 ($\pm 0,55$) a
60	27,8 ($\pm 1,11$) a	15,0 ($\pm 1,75$) b	15,3 ($\pm 1,96$) b	27,8 ($\pm 1,18$) a
75	20,3 ($\pm 1,26$) ab	9,1 ($\pm 1,26$) c	19,1 ($\pm 1,65$) bc	22,8 ($\pm 0,74$) a
90	27,5 ($\pm 0,96$) a	12,8 ($\pm 0,73$) c	24,8 ($\pm 1,18$) ab	21,8 ($\pm 0,80$) b
105	22,2 ($\pm 0,64$) a	13,4 ($\pm 2,38$) b	22,2 ($\pm 0,41$) a	18,0 ($\pm 0,92$) ab

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey. (\pm erro padrão da média), n= 8.

Analisando as curvas de respostas das plantas ao CO_2 , verificou-se que tanto a velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}) quanto a taxa máxima de transporte de elétrons (J_{max}) foram menores nas plantas cultivadas somente em cinza (Tabela 4). A adição de solo na superfície da cinza e, especialmente, de macronutrientes promoveu aumentos significativos de V_{cmax} e J_{max} quando comparados com os valores obtidos no tratamento cinza (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros da curva de resposta a CO₂, velocidade máxima de carboxilação (V_{cmax}) e taxa de transporte de elétrons (J_{max}) de plantas de *R. communis* cultivadas em diferentes substratos.

Tratamentos	Parâmetros da curva de resposta ao CO ₂	
	V _{cmax}	J _{max}
Solo	151,6 (± 5,6) a	257,5 (± 12,1) a
Cinza	47,3 (± 3,9) b	86,3 (± 7,1) b
C + SN	125,8 (± 6,1) a	221,6 (± 11,5) a
C + S	105,6 (± 3,3) a	182,5 (± 4,1) a

Valores seguidos pela mesma letra em coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade. (± erro padrão da média), n= 4.

As taxas transpiratórias (E) das plantas expostas às cinzas foram menores que as taxas das plantas do tratamento solo, exceto aos 75 e 90 dias onde não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 7). De modo geral, as taxas transpiratórias diminuíram ao longo do tempo para todos os tratamentos.

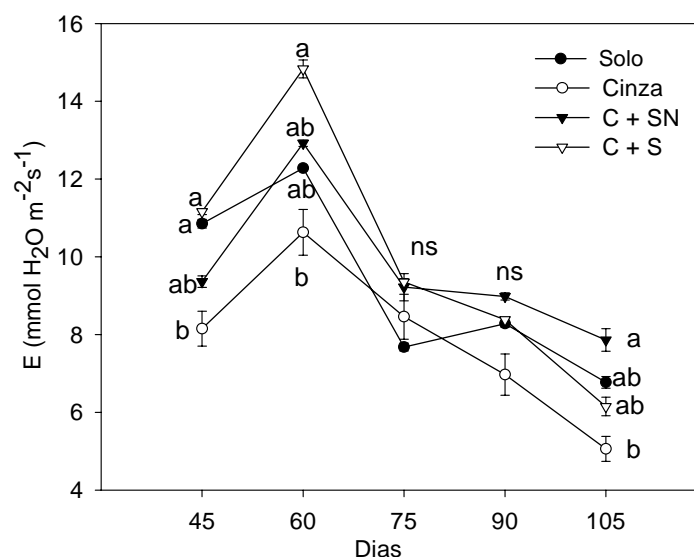


Figura 7. Taxa transpiratória (E) de *R. communis* cultivadas em diferentes substratos. Médias seguidas de mesma letra, em cada dia, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras (erro padrão da média), n = 7.

DISCUSSÃO

As análises químicas mostram que a cinza apresentou valores superiores de todos os macronutrientes analisados em relação ao solo utilizado. Assim, era esperado que o desenvolvimento das plantas na cinza não fosse limitado pelos teores de macronutrientes. Entretanto, todas as plantas cultivadas somente em cinza tiveram reduções significativas, tanto da taxa de crescimento quanto na produção de biomassa, o mesmo não ocorrendo nas plantas cultivadas em cinza com adição de macronutrientes. Esta constatação torna evidente que os valores apresentados na Tabela 1 não refletem a real característica química das cinzas, principalmente em termos de teores disponíveis de macronutrientes para as plantas.

A concentração total de nitrogênio não pode ser diretamente relacionada com o teor disponível de N, o qual depende da mineralização da matéria orgânica e da imobilização de formas minerais. Estes processos dependem da disponibilidade de resíduos orgânicos, de fatores climáticos e de características do próprio substrato (Raij, 1991). Em termos de fertilidade as concentrações de fósforo são consideradas médias para solos e baixas para as cinzas, segundo o manual de Recomendação de Adubação e Calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (1994), isto porque, o teor de argila no solo (19%) foi superior ao teor de argila na cinza (3%). As concentrações de potássio extraível, de cálcio trocável e de enxofre encontradas no solo estão dentro das faixas consideradas alta, média e suficiente para os solos, respectivamente. Na cinza a concentração destes três elementos foi maior que as concentrações encontradas no solo e estariam dentro das mesmas faixas limites descritas para o solo, porém com teores elevados de potássio e principalmente enxofre.

Os teores de P e K extraível, Ca trocável e S os quais são utilizados como parâmetros para a recomendação de adubação de solos no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, mostraram não ser bons parâmetros para a avaliação da fertilidade da cinza. Estes elementos estão dentro das faixas suficientes, médias e altas de fertilidade, porém as plantas só apresentaram crescimento adequado quando estes elementos foram acrescentados às cinzas. Do mesmo modo, os valores elevados de carbono orgânico e de nitrogênio total, não asseguram que os teores de nitrogênio disponíveis às plantas nas cinzas sejam suficientes. Conforme comentado anteriormente, o carbono presente nas cinzas parece não conter as mesmas propriedades do carbono orgânico encontrado no solo (Prof. Débora Dick, comunicação pessoal).

Trabalhos realizados por Chaudhuri et al. (2001) na Índia, também mostraram concentrações totais de P, K, S, bem como, os teores disponíveis de P e K e carbono orgânico maiores nas cinzas do que no solo utilizado no experimento, entretanto, o teor de nitrogênio disponível na cinza foi nulo. Os autores mostram que a adição de 52 ton ha⁻¹ da cinza, em condições de campo, promoveu aumento da produtividade de arroz e amendoim em relação às plantas cultivadas somente em solo ou solo com adição de NPK. Porém, os autores discutem somente a contribuição da cinza para a melhoria do pH do solo, e não abordam a contribuição dos macronutrientes no aumento da produtividade das culturas.

A resposta das plantas cultivadas em C + SN, em relação às plantas cultivadas somente em cinza, demonstrou que a disponibilidade de macronutrientes nas cinzas foi o principal fator limitante para o crescimento da mamona em cinza. A baixa concentração de fósforo e nitrogênio disponíveis nas cinzas é sugerida por outros autores como sendo um dos fatores limitantes ao estabelecimento da vegetação (Carlson & Adriano, 1993; Tripathi et al., 2004). O trabalho realizado por Plank e Martens (1973) *apud* Gupta et al. (2002) mostram que plantas crescendo em cinza de carvão mineral podem apresentar deficiência de potássio em função dos elevados níveis de Ca e Mg. Aumento nos níveis disponíveis de Ca e Mg, sem aumento similar dos níveis disponíveis de potássio, pode causar menor absorção de K pelas raízes em função do efeito antagônico de Ca e Mg na absorção de K.

A adição de macronutrientes em forma de solução nutritiva é uma fonte disponível destes elementos. Entretanto, não se podem ignorar as complexas reações que estes elementos estão sujeitos quando em contato com as cinzas. Estes elementos podem ser adsorvidos nas partículas das cinzas e/ou formar diferentes complexos com os elementos presentes na solução, deslocando o equilíbrio de muitas reações. Assim, a quantidade de elementos presentes na solução possivelmente não foi resultado exclusivo da quantidade adicionada via solução, mas das complexas reações que regem a dinâmica dos nutrientes no solo ou outro substrato como a cinza. A adição de macronutrientes pode ter interferido na disponibilização ou adsorção de outros elementos, nutrientes ou não, presentes nas cinzas.

A camada superficial de solo sobre as cinzas favoreceu o desenvolvimento da mamona em comparação com as plantas cultivadas somente em cinza. Entretanto, a camada de solo não foi suficiente para permitir um bom desenvolvimento das plantas e a produção de biomassa seca foi inferior às plantas cultivadas somente no solo. Isto mostra que a longo prazo o crescimento das plantas pode ficar comprometido. A camada de solo

favoreceu o estabelecimento das plantas, já que as raízes, inicialmente, não entraram em contato com as cinzas. Porém, com o crescimento das plantas, possivelmente, os recursos da camada de solo tornaram-se limitantes e as plantas reduziram o crescimento. É importante salientar que não foi observada uma concentração de raízes na camada de solo. O sistema radical se estendeu por todo o vaso, atingindo o fundo como foi observado nos demais tratamentos. Weinstein et al. (1989) também observaram que as raízes de *Brassica napus* L. cultivadas em depósito de cinza recoberto com solo atingiram as cinzas, e isso resultou no aumento da concentração de selênio nas plantas.

Observou-se que a cinza levou a aumentos significativos das concentrações foliares de Pb, Cr e Ni na mamona, em relação às plantas cultivadas somente em solo. Tripathi et al. (2004) também observaram aumento das concentrações foliares de Ni, Cu, Zn em plantas de *Cassia siamea* Lamk cultivadas em solo com diferentes proporções de cinza de carvão. No presente trabalho, as concentrações foliares de níquel de 12,5 e 18,3 mg kg⁻¹ nas mamonas cultivadas em cinza e C + S, respectivamente, foram superiores às concentrações consideradas normais (0,1-5,0 mg kg⁻¹) e dentro das faixas consideradas fitotóxicas (10-100 mg kg⁻¹) para muitas espécies (Kabata-Pendias, 2000). O níquel é um elemento móvel na planta, podendo ser transportado para a parte aérea, e algumas espécies podem acumulá-lo em concentrações próximas a 1% do peso seco da folha. Porém, a maioria das espécies é sensível aos efeitos do Ni. O Ni pode inibir o crescimento radical (Kozhevnikova et. al, 2007), interferir na absorção de ferro, levando a planta à deficiência deste nutriente (Miller & Cumming, 2000). O excesso de níquel pode causar reduções das taxas fotossintéticas por substituição do átomo de Mg da molécula de clorofila (Küpper et al., 1998) e inibição da atividade de enzimas do ciclo de Calvin (Sheoran et al., 1990).

A menor taxa fotossintética observada nas plantas cultivadas na cinza parece não estar relacionada com os teores foliares de Ni, acima dos normais, observados neste tratamento. Isto porque as plantas cultivadas em C + SN também apresentaram teores foliares de Ni acima dos considerados normais e as taxas fotossintéticas atingiram valores similares aos observados nas plantas cultivadas no solo. Os valores elevados da velocidade de carboxilação (V_{cmax}) e das taxas de transporte de elétrons (J_{max}) nas plantas cultivadas em C + SN mostraram que os teores de níquel nas folhas não causaram efeitos tóxicos à mamona. A baixa taxa fotossintética observada nas plantas cultivadas na cinza, bem como a redução de V_{cmax} e de J_{max}, foram possivelmente decorrentes da

deficiência de macronutrientes, os quais são requeridos em todas as fases da fotossíntese (Marschner, 1995).

Acredita-se que as maiores concentrações foliares de chumbo e cromo observados nas plantas cultivadas nas cinzas não tenham causado efeitos tóxicos às plantas, porque estas concentrações estão bem abaixo das concentrações consideradas fitotóxicas para a maioria das plantas (Pb: 30-300 mg kg⁻¹; Cr: 5-30 mg kg⁻¹) (Kabata Pendias, 2000). Portanto, o efeito dos metais pesados analisados não parece ter sido a causa principal da redução de cerca de 99% da produção de biomassa seca da mamona cultivada na cinza em relação às plantas cultivadas em solo e C + SN. Novamente a falta de macronutrientes disponíveis na cinza parece ter sido o principal fator de estresse para o crescimento das plantas.

As taxas fotossintéticas observadas nas plantas cultivadas no solo foram similares as obtidas em outros experimentos com mamona (Romeiro et al., 2006). As taxas fotossintéticas também podem ser reduzidas por fatores que diminuam as taxas de difusão de CO₂. O fechamento estomático, causado por déficit hídrico pode levar a menor difusão de CO₂ e, conseqüentemente, a redução das taxas fotossintéticas. As taxas fotossintéticas das plantas cultivadas em C + SN foram maiores do que as plantas cultivadas em cinza. Isto indica que a baixa taxa fotossintética observada nas plantas cultivadas na cinza não está relacionada com restrições na difusão estomática de CO₂, mas por outras etapas da fotossíntese, as quais parecem ter sido alteradas pela deficiência de macronutrientes.

A eficiência do uso da água é uma característica importante que promove informações sobre a adaptação potencial da espécie para condições de estresse hídrico (Farquar & Sharkey, 1982). A taxa transpiratória da mamona foi elevada, especialmente aos 60 dias, possivelmente devido às altas temperaturas e maior déficit de pressão de vapor, mas a fotossíntese manteve-se elevada.

Considerações ecológicas

As cinzas de carvão podem levar a aumentos significativos dos teores foliares de metais pesados como mostrado neste experimento. Em termos absolutos, considerando somente a concentração foliar, as plantas cultivadas nas C + SN, C + S foram capazes de concentrar em média 600 e 62,8µg de Ni, respectivamente, bem acima do observado nas plantas cultivadas no solo que foi de 17,7 µg de Ni. A maioria dos metais pesados tem sua disponibilidade aumentada com o decréscimo de pH do solo (Adriano, 2001). As cinzas que inicialmente tem pH alcalino podem, a longo prazo, tornarem-se ácidas. Como

mostrado no experimento, a solução de lixiviação mostrou uma tendência de redução de pH. No caso do níquel, que apresentou concentrações foliares acima do normal, a disponibilidade deste elemento pode aumentar com a redução de pH das cinzas. Segundo McBride (1994), pH menor do que seis favorece as formas trocável e solúvel de Ni. Desta forma, o maior intemperismo da cinza poderia levar a reduções do pH com aumento da disponibilidade de Ni podendo aumentar a concentração deste elemento nas plantas.

A maior condutividade elétrica, observada no lixiviado de todos os tratamentos com cinza em relação ao lixiviado do solo, sugere que em condições naturais a lixiviação da cinza pode contribuir para o aumento de íons em solução os quais podem causar danos aos recursos hídricos adjacentes. Uma camada superficial de solo parece não contribuir para a redução da perda de íons e pode comprometer o desenvolvimento das plantas a longo prazo, como mostrado no tratamento C + S.

Portanto, a utilização da cinza na agricultura como condicionante de pH deve ser feita com cuidado, bem como a utilização das áreas de depósito de cinza para o cultivo de pastagens, práticas comum em algumas áreas abandonadas de depósito.

Assim como no primeiro capítulo, a concentração de níquel nas folhas foi maior do que nas raízes, descartando a hipótese que a maior concentração de níquel observada nas folhas de mamona na área do depósito seria devido à poluição aérea do local. Por outro lado, pode-se evidenciar neste trabalho que a mamona parece ter capacidade de acumular níquel nas folhas, induzindo à hipótese de que a mamona poderia ser uma espécie acumuladora deste metal.

CONCLUSÕES

A cinza de carvão mineral inibiu o crescimento de *R. communis*. Esse efeito é decorrente da falta de macronutrientes disponíveis na cinza resultando em danos no aparato fotossintético e conseqüente redução do crescimento.

A concentração de metais nas cinzas levou ao aumento da concentração de metais pesados na mamona, especialmente de níquel. Porém, o crescimento normal das plantas cultivadas em C + SN permite concluir que as concentrações disponíveis de metais nas cinzas não são tóxicas para a mamona. Portanto, a espécie poderia ser utilizada para a

revegetação das cinzas após melhorias das condições nutricionais deste substrato, contribuindo para o recobrimento da área e fixação de metais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADRIANO, D.C. (2001). **Trace elements in terrestrial environments**. Biochemistry, bioavailability, and risks of metals. 2 ed. New York: Springer. 866p.
- ADRIANO, D.C.; PAGE, A.L.; ELSEEWI, A.A.; CHANG, A.C.; STRUGHAN, I. (1980). Utilization and disposal of fly ash and other coal residues in terrestrial ecosystems: a review. **Journal of Environmental Quality**, 9: 333-334.
- AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S. (1997). **Recomendações técnicas para o cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) no Brasil**. (Embrapa – CNPA. Circular Técnica, 25). Campina Grande: Embrapa – CNPA, 1997. 52 p.
- BEADLE, C.L. (1985). Plant Growth Analysis. In: COOMBS, J.; HALL D.; LONG, S.P.; SCURLOCK, J.M.O. (eds). **Techniques in bioproductivity and photosynthesis**. 2 ed. Exeter: Pergamon Press.
- CARLSON, C.L.; ADRIANO, D.C. (1993). Environmental impacts of coal combustion residues. **Journal of Environmental Quality**, 22: 227-247.
- CHAUDHURY, D.; TRIPATHY, H.; VEERESH, H.; POWELL MA, HART, B.R. (2001). Heavy metal distribution and bioavailability in coal ash and sludge amended acid lateritic soil under field conditions. In: SAJWAN, K.S.; ALVA, A.K.; KEFFER, R.F. (eds). **Chemistry of trace elements in fly ash**. Ontario: University of Guelph. p.289-306.
- COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC (1994). **Recomendação de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 3.ed. Passo Fundo: SBCS Núcleo Regional Sul; EMBRAPA, CNPT, 1995. 223p.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. (2001). **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB. 232p.
- EL-MOGAZI D.; LISK, D.J.; WEINSTIN, L.H. (1988). A review of physical, chemical and biological properties of fly-ash and effects on agricultural ecosystems. **Science Total Environmental**, 74: 1-37.
- ELSEEWI, A.A.; BIGHAM, F.T.; PAGE, A.L. (1978). Availability of sulfur in fly ash to plants. **Journal of Environmental Quality**, 7: 69-73.
- FARQUHAR, G.D.; SHARKEY, T.D. (1982). Stomatal conductance and photosynthesis. **Annual Review of plant Physiology**, 33: 317-345, 1982.
- GUPTA, D.K.; RAI, U.N.; TRIPATHI, R.D.; IOUHE, M. (2004). Impacts of fly-ash on soil and plant responses. **Journal of Plant Research**, 115: 401-409.
- KABATA – PENDIAS, A. (2000). **Trace elements in soils and plants** 3 ed. Boca Raton: CRC Press. 413p.

- KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S.; HAYES, N.J. (1998). Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, 41: 197-207.
- KOZHEVNIKOVA, A.D.; SEREGIN, I.V.; BYSTROVA, E.I.; IVANOV, V.B. (2007). Effects of heavy metals and strontium on division of root cap and meristem structural organization. **Russian Journal of Plant Physiology**, 54: 257-266.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. (1998). In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. **Photosynthetica Research**, 58: 123-133.
- LEWICKI, P.; HILL T. (2007) **STATISTICS: Methods and Applications**. Tulsa: StatSoft Inc. (<http://www.statsoft.com>).
- MARSCHNER H. (1995). **Mineral nutrition of higher plants**. 2 ed. London: Academic Press.
- McBRIDE, M.B. (1994). **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University Press. 406p.
- MILLER, S.P.; CUMMING, J.R. (2000). Effects of serpentine soil factors on Virginia pine (*Pinus virginiana*) seedlings. **Tree Physiology**, 20: 1129-1135.
- PILON-SMITS, E. (2005). Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**. 56: 16-38.
- PLANK, C.O.; MAERTENS, D.C. (1973). Amelioration of soil with fly-ash. **Journal of Soil and Water Conservation**, 28: 43-48.
- PRASAD, M.N.V. (2004). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2 ed. Indian: Springer-Verlang. 461p.
- RAIJ, B.V. (1991). **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Editora Ceres. 343p.
- ROMEIRO, S.; LAGÔA, A.M.M.A.; FURLANI, P.R.; ABREU, C.A.; ABREU, M.F.; ERISMAN, N.M. (2006). Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18: 483-489.
- SHEORAN, I.S.; AGGARWALA, N.; SINGH, R. (1990). Effects of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Plant and Soil**, 129: 243-249.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. (1995). **Análises de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 2. ed. rev.e ampl. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 174 p.
- TRIPATHI, R.D.; VAJPAYEE, P.; SINGH, N.; RAI, U.N.; KUMAR, A.; ALI, M.B.; KUMAR, B.; YUNUS, M. (2004). Efficacy of various amendments for amelioration of

fly-ash toxicity: growth performance and metal composition of *Cassia siamea* Lamk. **Chemosphere**, 54: 1581-1588.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA (1986a). Method 3050B-Acid digestion of sediments sludges, soils and oils. **Test Methods for evaluating solid waste- SW 846**. 3 ed. Washington: Office of Solid Waste and Emergency Response. Disponível em: (http://www.ehso.com/ehso.php?URL=http%3A%2F%2Fwww.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3_series.htm).

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA (1986b). Method 3052- Microwave assisted acid digestion of siliceous and organically based matrices. **Test Methods for evaluating solid waste- SW 846**. 3 ed. Washington: Office of Solid Waste and Emergency Response. Disponível em: (http://www.ehso.com/ehso.php?URL=http%3A%2F%2Fwww.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3_series.htm)

VON CAMMERER S. (2000). **Biochemical models of leaf photosynthesis**. Victoria: CSIRO publishing. 165p.

WEINSTEIN, L.H.; OSMELOSKI, J.F.; RUTZKE, M.; BEERS, A.O.; MCCAHAN, J.B.; BACHE, C.A.; LISK, D.J. (1989). Elemental analysis of grasses and legumes growing on soil covering coal fly ash landfill sites. **Journal Food Safety**, 9: 291-300.

CAPÍTULO III

CONCENTRAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE NÍQUEL E CROMO EM MAMONA (*RICINUS COMMUNIS* L.) CULTIVADA EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

As espécies vegetais respondem de formas diferentes ao aumento da concentração de metais pesados no solo (Baker, 1981). A maioria das plantas é sensível a elevadas concentrações de metais pesados, não tolerando o efeito tóxico destes elementos. Entretanto, algumas espécies desenvolveram estratégias para tolerar concentrações excessivas de metais pesados. As plantas exclusoras restringem o transporte de metais para a parte aérea, evitando assim, danos no aparato fotossintético. No caminho oposto, algumas espécies, denominadas de hiperacumuladoras, são capazes de acumular grandes quantidades de metal nos tecidos. Ambas as espécies, exclusoras e hiperacumuladoras são importantes para projetos de fitorremediação (Prasad, 2006). Porém, as mesmas são utilizadas com diferentes objetivos. As plantas exclusoras podem promover a fitoestabilização do contaminante enquanto as plantas hiperacumuladoras podem promover a fitoextração (Lasat, 2002), por isso é importante conhecer a capacidade de absorção, acúmulo e distribuição de metais nas espécies vegetais.

A distribuição dos metais dentro da planta é uma consequência dos mecanismos fisiológicos e das características específicas do metal. Segundo Broadley et al. (2001), a concentração de metal na parte aérea é determinada (i) pela absorção e seqüestro do metal na raiz, (ii) transporte no xilema e floema e (iii) diluição dentro da parte aérea em função do crescimento. Características específicas do elemento, como tamanho do raio iônico e estado de oxidação determinam a maior ou menor mobilidade do metal na planta. Em função disto, certos metais, por exemplo, como Zn, Ni, B, são mais uniformemente distribuídos entre raiz e parte aérea, enquanto metais como Pb, Ag e Cr são pouco transportados para a parte aérea. As plantas podem apresentar diferentes mecanismos que permitem o maior ou menor transporte de metais para a parte aérea (Salt, 2001). Plantas hiperacumuladoras de chumbo, como *Thlaspi rotundifolium* capaz de acumular 8200 mg

kg-1 (Cunningham & Ow, 1996), é um exemplo evidente de que a capacidade de transporte de um elemento é muito variável entre as espécies.

No capítulo II, verificou-se que as plantas de mamona (*Ricinus communis* L.) cultivadas em cinza mostraram capacidade de concentrar níquel nas folhas em concentrações acima das estabelecidas como normais para a maioria das plantas. Tanto em condições naturais quanto em casa de vegetação não foram verificados sintomas de toxidez na parte aérea decorrentes da concentração de níquel nas folhas. Isto indica que a espécie pode ter capacidade de acumular níquel na parte aérea. Além disso, os resultados demonstraram que a mamona também parece ter capacidade de transportar cromo para a parte aérea.

Níquel e cromo apresentam diferentes características químicas. O níquel pode apresentar diferentes estados de oxidação, que variam de 0 a + 3. A forma mais comum é a divalente (+ 2), sendo encontrada em compostos como acetato, sulfato e sais de nitrato (Adriano, 2001). O níquel é considerado um nutriente essencial para plantas, sendo que, em plantas superiores, ele é componente da enzima urease, responsável pela conversão de uréia em amônia e dióxido de carbono (Dixon et al., 1975). O níquel também é importante para as plantas leguminosas, fixadoras de nitrogênio, pois é componente da enzima hidrogenase de bactérias simbiontes (Stults et al., 1984). Segundo Brown et al. (1988), o níquel é requerido pelas plantas em concentrações muito baixas, $1,7 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ ou menos em tecidos foliares e por isso a deficiência de níquel é raramente observada. Comparado com outros metais pesados essenciais, o intervalo entre a concentração necessária para o metabolismo normal da planta e a concentração tóxica é amplo, e por isso o níquel é classificado como ultranutriente (Asher, 1991; Küpper & Kroneck, 2007). A concentração de níquel nas plantas pode ser muito variável. Em plantas cultivadas e em vegetação natural a concentração pode variar de 0,1 a $5 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ da massa seca. Em geral, concentrações entre 10 e $100 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ na massa seca são consideradas fitotóxicas (Kabata-Pendias, 2000). Os sintomas comuns de toxidez de níquel são inibição do crescimento e clorose internerval (Moya et al., 1993; Seregin et al., 2003; Seregin & Kozhevnikova, 2006).

Em relação ao cromo, a maior ou menor toxidez dependem do estado de oxidação. O cromo pode ocorrer em diferentes estados de oxidação, sendo as formas hexavalente (Cr VI) e trivalente (Cr III) as mais estáveis e freqüentes na natureza. No solo a conversão de Cr (III) para Cr (VI) e vice-versa pode ocorrer simultaneamente, dependendo das condições redox e do pH (Adriano, 2001). Embora o Cr (III) seja essencial para animais e humanos, a forma hexavalente é extremamente tóxica e possui propriedades

carcinogênicas (Mei et al., 2002). Em plantas, o cromo não apresenta funções nutricionais conhecidas e a forma mais fitotóxica também é Cr (VI) (Han et al., 2004). A concentração de cromo em plantas é variável; entretanto, valores de 0,02 a 0,2 $\mu\text{g g}^{-1}$ são comuns em plantas de locais não contaminados (Kabata-Pendias, 2000). Segundo Macnicol & Becker (1985), concentrações na planta entre 1 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ da massa seca são fitotóxicas para a maioria das plantas, enquanto que para Kabatia- Pendias (2000) estas concentrações são entre 5 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os sintomas de toxidez de cromo em plantas incluem clorose foliar e manchas amarronzadas (Barceló & Poschenrieder, 1985; Sharma et al., 2003). Comparado a outros metais, o cromo tem recebido pouca atenção da pesquisa, e as respostas de poucas espécies vegetais foram testadas para este metal.

Dada a importância da mamona para a revegetação de áreas impactadas por cinza de carvão mineral é importante analisar qual a resposta da espécie para o aumento da concentração de metais, avaliando a sua capacidade de estabilizar ou extrair metais do ambiente. Neste contexto, esta etapa do trabalho foi realizada com objetivo de avaliar a distribuição de níquel e cromo (VI) em *R. communis* e avaliar as concentrações fitotóxicas destes metais para a espécie.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta e germinação das sementes

As sementes de *Ricinus communis* foram coletadas de aproximadamente 30 plantas de uma população que cresce em área de depósito de cinza descrita no capítulo I. Após a colheita, foram expostas ao sol em casa de vegetação durante dois dias para facilitar a deiscência das cocas. As sementes foram selecionadas visualmente pelo tamanho para promover maior homogeneização da amostras, e posteriormente lavadas em água corrente em água destilada para a retirada de possíveis resíduos de cinza de carvão aderido à superfície. As sementes foram desinfetadas com etanol 70% (1min) e hipoclorito de sódio 20% (15 min) e lavadas com água destilada. Para a germinação foram utilizados frascos de 30 ml contendo areia, em câmara de germinação com temperatura de 25 ± 4 °C e fotoperíodo de 12:12 horas luz/escuro. Após a germinação, os frascos foram transferidos para casa de vegetação durante oito dias para a adaptação das plântulas. Posteriormente as

plântulas foram retiradas da areia, lavadas em água destilada e transferidas para frascos contendo 1 litro de solução nutritiva.

Cultivo em solução nutritiva

As plantas foram mantidas por duas semanas em solução nutritiva sem adição de níquel (Ni) ou cromo hexavalente (Cr VI) para adaptação das plantas em solução. Os metais foram separadamente adicionados na forma de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e $\text{Na}_2\text{CrO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, (PA Merk, Alemanha) na seguinte solução nutritiva de Hoagland modificada: Cu 0,5 μM ; Mo 0,5 μM ; Cl 50 μM ; B 25 μM ; Zn 2 μM ; Fe 1,6 μM ; Mn 2 μM ; N 16 mM; K 6 mM; Ca 4 mM; P 2 mM; S 1 mM e Mg 1 mM. As plantas com 21 dias de idade foram expostas aos seguintes tratamentos (Tabela 1):

Tabela 1. Concentração e fontes de metais pesados utilizados no experimento.

Tratamentos	Concentração						Fonte
	μM			mg l^{-1}			
Controle	-			-			-
Ni^{+2}	30	60	120	1,75	3,50	7,00	$\text{Ni}(\text{NO}_3)_2$
Cr^{+6}	10	30	90	0,52	1,56	4,7	Na_2CrO_4

As concentrações de níquel foram utilizadas com base em teste preliminares onde concentrações maiores foram testadas, sendo que as plantas apresentaram severos efeitos tóxicos. As concentrações de cromo utilizadas foram com base em trabalhos da literatura que utilizaram plantas não hiperacumuladoras. A solução foi calibrada para pH 5 com adição de KOH ou HCl, substituída a cada quatro dias e mantida constantemente aerada com auxílio de compressor de ar. O pH da solução foi ajustado para 5 porque neste pH a solubilidade do Cr^{+6} é elevada (Kabata-Pendias, 2000). Após 12 dias de exposição, período que foi evidenciado severos efeitos tóxicos nas plantas expostas a 120 μM , as plantas foram colhidas, separadas em raiz e parte aérea e lavadas cinco vezes em água destilada e secas em estufa (60 °C durante 72 horas) para a determinação da massa seca e da concentração de cromo e níquel.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com 10 repetições por tratamento, sendo cada planta considerada uma repetição totalizando 70 plantas.

Análises

(a)-Taxa de crescimento relativo

Segundo Köhl & Lösch (2004), a produção de massa seca, bem como a taxa de crescimento relativo são variáveis facilmente mensuráveis e são amplamente usadas para monitorar o efeito dos metais pesados em plantas. A taxa de crescimento relativo em altura (TCRa) foi obtida pela altura das plantas, medindo-se a distância entre o primeiro e último nó do caule. A TCRa foi calculada adaptando-se a equação de Blackman (Beandle, 1985), descrita a seguir

$$TCRa = (\ln a_2 - \ln a_1) / (t_2 - t_1)$$

Onde = a_1 é a altura inicial; a_2 é a altura final; t_1 é o tempo inicial e t_2 é o tempo final (dias).

(b)-Medidas da fluorescência da clorofila a

Diferentes métodos são utilizados para avaliar a toxidez dos metais nas plantas. O conhecimento de que o aparato fotossintético é um dos locais mais afetados pelos metais pesados (Cljisters H, Assche, 1985; Küpper et al., 2005; Küpper et al., 2006) tem levado ao uso de métodos não invasivos, como a fluorescência da clorofila a, para o monitoramento do efeito dos metais nas plantas. Por outro lado, este método também permite avaliar qual a ação do metal no aparato fotossintético (Joshi & Mohanty, 2004).

A fluorescência da clorofila a é um método eficiente para avaliar o estado fotossintético das plantas e é baseada no conhecimento que quando moléculas de clorofila absorvem a energia luminosa elas alteram temporariamente as suas configurações eletrônicas, passando do estado basal para o estado excitado (nível de energia mais alto), denominado de *singlet 1*. Este estado excitado é muito instável e de vida muito curta ($\approx 10^{-8}$ s). Desta maneira, estes pigmentos fotossintéticos, após receberem energia dos fótons dissipam esta energia proveniente da luz por meio de três vias, as quais são competidoras entre si:

(i)-Dissipação fotoquímica: é a utilização da energia luminosa para os processos fotoquímicos da fotossíntese, onde os elétrons provenientes da molécula de água são doados para um aceptor denominado NADP. Este processo é a base para a formação do

poder redutor e da molécula de ATP, os quais serão utilizados na fase bioquímica do processo fotossintético. Essa dissipação de energia é representada pelo *quenching* fotoquímico (qP).

(ii)- Fluorescência: emissão de radiação na região do visível (vermelho e vermelho distante); e

(iii)- Dissipação não-fotoquímica: é a produção de calor na forma de radiação infravermelha. Essa energia é representada pelo *quenching* não-fotoquímico (qNP).

Sendo assim, alterações na fluorescência indicam alterações no processo fotossintético.

As medidas de fluorescência da clorofila a foram obtidas em condições de luz e temperatura ambiente, utilizando-se fluorômetro modulado (Hansatech-FMS2, Inglaterra), após 4 e 12 dias de exposição aos tratamentos. Foram utilizadas 10 plantas por tratamento, sendo cada planta considerada uma repetição. O método adotado foi de pulso de saturação (Schreiber et al., 1994) (Figura 1). Após a adaptação da folha por 30 min no escuro uma luz de baixa intensidade ($>1\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicada para a determinação da fluorescência basal (F_0), que é a fluorescência obtida quando todos os receptores primários do fotossistema II estão oxidados. Nessa condição todos os centros de reação estão abertos para a conversão de energia. F_0 é um parâmetro importante porque caracteriza a perda da energia de excitação antes de qualquer reação fotoquímica (Laisk & Oja, 1998). Após as medidas de F_0 , um pulso de luz saturante ($8000\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) foi aplicado para a determinação da fluorescência máxima (F_m), a qual representa a fluorescência produzida quando todos os centros de reação do fotossistema II estão fechados. Os centros são fechados porque os elétrons, os quais foram doados por separação de cargas anteriormente ainda ocupam os orbitais do aceptor primário Q_a (quinona). Um centro de reação fechado não pode absorver a energia de excitação e ela continua em ressonância na antena até ela ser dissipada termalmente ou emitida como fluorescência (Laisk & Oja, 1998). A partir destas variáveis foram calculados os valores de fluorescência variável [$F_v = (F_m - F_0)$] e da eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m). O parâmetro F_v/F_m tem sido amplamente utilizado para detectar perturbações no aparato fotossintético induzido por estresses. Segundo Björkman & Demming (1987) valores de F_v/F_m próximos a 0,83 são considerados ótimos. Reduções em F_v/F_m podem indicar o fenômeno de fotoinibição (Maxwell & Johnson, 2000).

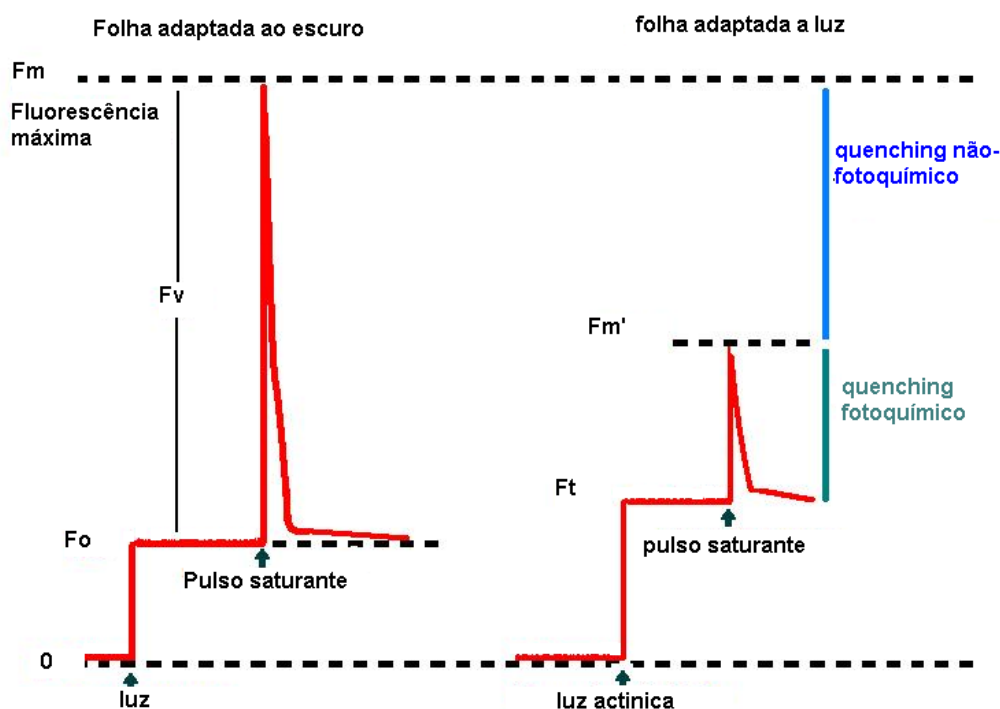


Figura 1. Curva típica de fluorescência da clorofila. Após adaptação da folha no escuro uma luz fraca é ligada e a fluorescência basal (F_o) é determinada. Na sequência um pulso de luz saturante é dado e determina-se o valor da fluorescência máxima (F_m). A diferença entre F_o e F_m é a fluorescência variável. Aplicando-se uma luz fotossinteticamente ativa (luz actínica) e novamente um pulso de luz saturante é possível determinar o *quenching* fotoquímico e não fotoquímico a partir das variáveis: F_m' (fluorescência máxima na luz), F_o' (fluorescência basal na luz) e F_t (fluorescência no estado de equilíbrio). (Modificado de Maxwell & Johnson, 2000).

(c)-Conteúdo de Clorofila

Após as medidas de fluorescência da clorofila a, discos foliares foram retirados para determinação do conteúdo de clorofila a e b, das mesmas folhas usadas para as medidas de fluorescência. A extração foi realizada em etanol 100% (Knudson et al., 1977), e a leitura das absorbtâncias em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 649 e 665 nanômetros. Após a extração, os discos foliares foram secos em estufa para a determinação da massa seca. A concentração de clorofila foi calculada de acordo com as equações de Wintermann & De Mots (1965). Os resultados foram expressos em mg g^{-1} de massa seca.

(d)-Determinação da concentração de metais pesados

Aproximadamente 0,5 g de material seco foi digerido em 5 ml de HNO₃ e 3 ml de água tridestilada em sistema fechado a 200 °C durante 1 hora. Ao material digerido foi adicionada água tridestilada para completar 50 ml. As concentrações de Cr e Ni foram determinadas por espectrofotômetro de absorção atômica em forno de grafite (Perkin Elmer- SIMAA 600, Alemanha) e em chama com ar de acetileno, respectivamente. Foram utilizadas quatro plantas por tratamento, aleatoriamente selecionadas, sendo cada planta considerada uma repetição, exceto para o tratamento Ni-120 µM, que, devido à quantidade de material insuficiente, foi necessário fazer uma amostra composta por duas plantas. Para o cromo, foi verificada grande variação na concentração, possivelmente devido aos baixos teores. Assim, para melhor avaliação, foi determinada a concentração em mais três amostras, totalizando assim, sete repetições. Todo o procedimento foi realizado no laboratório de absorção atômica do Centro de Ecologia-UFRGS.

(e)-Índice de transporte e potencial de acúmulo

Para avaliar a capacidade de transporte de níquel e cromo da mamona para a parte aérea, foi calculado o índice de transporte (IT), segundo a equação de Abichequer e Bohnen (1998):

$$IT = \frac{\text{(concentração de metal na parte aérea)}}{\text{(concentração total do metal na planta)}}$$

Para o cálculo da concentração absoluta de metal na planta foi utilizada a massa seca das plantas correspondentes às amostras utilizadas para a quantificação dos metais pesados.

Análise dos dados

Os resultados foram expressos como médias das variáveis dependentes seguidas do erro padrão da média (± erro padrão). Os dados foram submetidos à análise de variância e

comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando programa *Statistic* (Lewick, 2007).

RESULTADOS

Sintomas de toxidez e o efeito de níquel e de cromo (VI) na taxa de crescimento

A resposta de *R. communis* foi diferente com relação ao metal Ni ou Cr presentes na solução nutritiva. Nas concentrações utilizadas, o níquel promoveu maior redução do crescimento do que o cromo. Plantas expostas a Ni-60 e 120 μM apresentaram intensa clorose internerval que aumentou progressivamente, ocupando toda a lâmina foliar. Manchas necróticas foram restritas às plantas tratadas com 120 μM de níquel e foram visíveis a partir de oito dias de tratamento (Figura 2). Nesse tratamento as folhas mais velhas foram progressivamente secando, resultando em abscisão precoce das mesmas. Diferentemente dos tratamentos com níquel, as plantas tratadas com cromo não apresentaram sintomas visuais de toxidez nas folhas. No entanto, foi observada redução na altura das plantas (Figura 2).

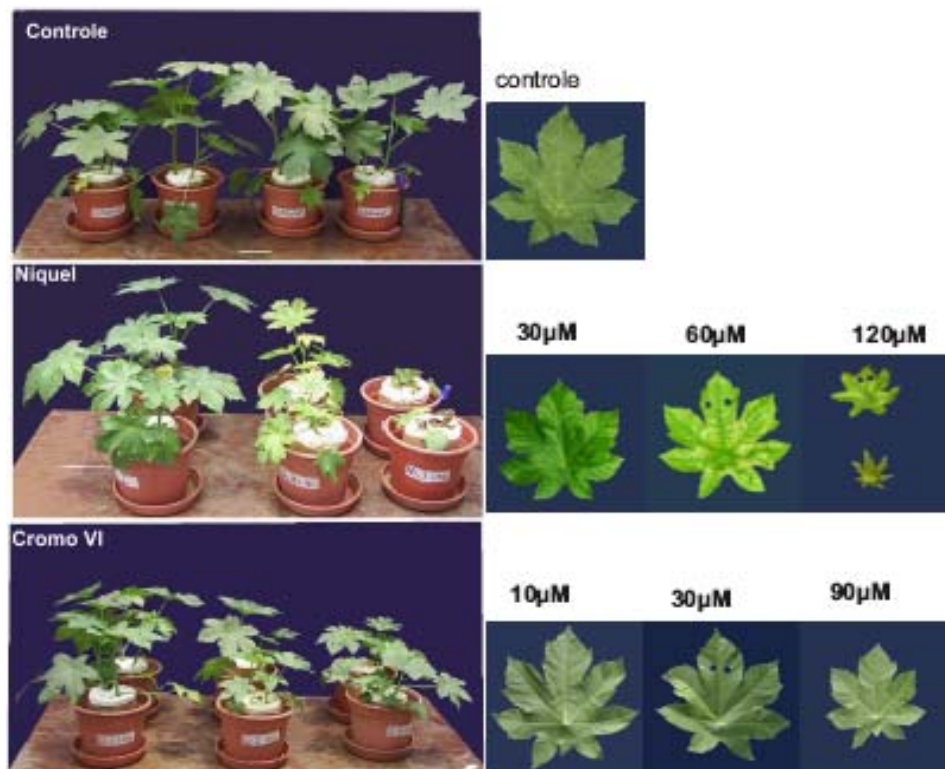


Figura 2. Sintomas visuais de toxidez em plantas de *R. communis* após 12 dias de exposição a diferentes concentrações de níquel (II) ou cromo (VI).

Sintomas de toxidez foram evidentes no sistema radical das plantas expostas a Ni-120 μM . Embora não tenham sido realizadas medidas de crescimento das raízes, foi possível observar que nessa concentração o sistema radical apresentou menor crescimento e a emissão das raízes laterais foi inibida (Figura 3). Nas plantas expostas a cromo não foram observados sintomas visuais de toxidez nas raízes (Figura 3).

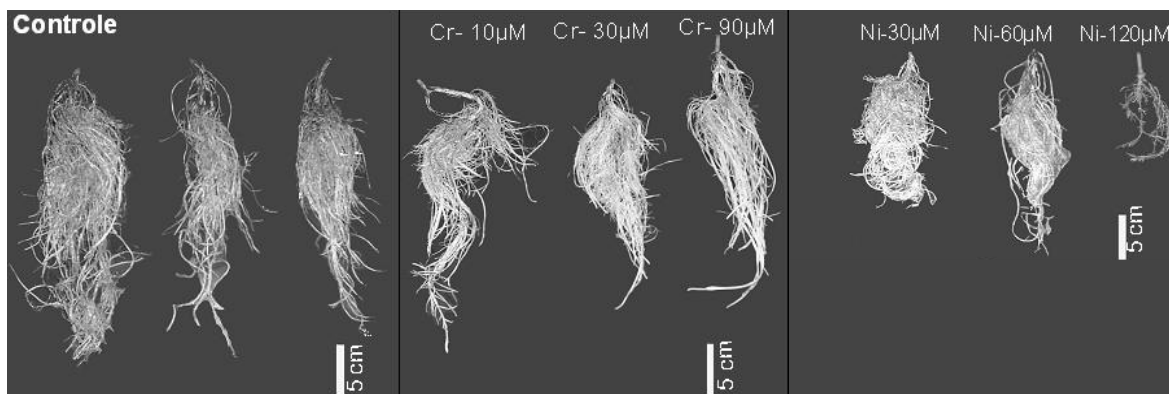


Figura 3. Efeitos de cromo (VI) ou níquel (II) em raízes de *R. communis* após 12 dias de cultivo em solução nutritiva.

Os efeitos negativos do níquel na mamona foram também verificados através da redução significativa da taxa relativa de crescimento para as plantas expostas a Ni-60 e 120 μM (Figura 4). As plantas expostas a Ni-20 μM apresentaram uma taxa de crescimento 63,8 e 78,5% menor que a observada para as plantas controle, aos 8 e 12 dias, respectivamente. Para as plantas expostas a cromo, a TRCa foi significativamente menor (25,5%) nas plantas expostas a Cr-90 μM em relação ao controle, aos oito dias de exposição. Aos 12 dias, as plantas expostas a Cr-90 μM apresentaram taxa de crescimento relativo 21,4 % menor que a TCRa do tratamento controle (Figura 4).

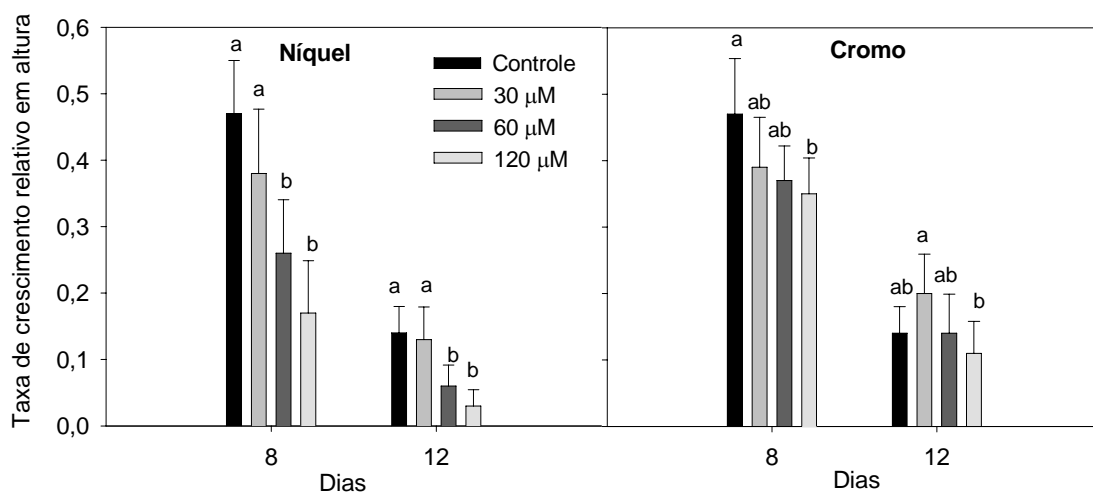


Figura 4. Taxa de crescimento relativo em altura de plantas de *R. communis* cultivadas em solução nutritiva com a adição de diferentes concentrações de níquel ou cromo (VI). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Barras = (desvio padrão da média), n= 10.

Efeitos de níquel e de cromo (VI) na produção de massa seca

Os sintomas de toxidez visualizados nas plantas expostas a níquel foram acompanhados por decréscimos significativos da massa seca nos tratamentos com 60 e 120 μM de níquel (Tabela 2). Comparada ao controle, a massa seca total (raiz + parte aérea) das plantas expostas a níquel 30, 60 e 120 μM diminuiu 18, 58 e 81%, respectivamente. A razão raiz/parte aérea aumentou com o acréscimo de níquel na solução, indicando que o níquel promoveu maior dano na produção de massa seca da parte aérea (Tabela 2). Na concentração de Ni-120 μM a massa seca das raízes reduziu 70% em relação ao controle enquanto a massa seca da parte aérea reduziu 86 %.

Tabela 2. Massa seca de *R. communis* após 12 dias de exposição em diferentes concentrações de níquel. Parte aérea (caule + folhas); total (raiz + parte aérea) e razão raiz/parte aérea (R/PA).

Ni⁺² na solução nutritiva (μM)	Raiz	Parte aérea	Total	R/PA
	----- massa seca (g) -----			
0	0,72 ($\pm 0,10$) a	1,72 ($\pm 0,30$) a	2,44 ($\pm 0,39$) a	0,44 ($\pm 0,01$) a
30	0,72 ($\pm 0,71$) a	1,27 ($\pm 0,10$) a	1,99 ($\pm 0,13$) a	0,58 ($\pm 0,02$) a
60	0,35 ($\pm 0,03$) b	0,68 ($\pm 0,06$) b	1,03 ($\pm 0,09$) b	0,52 ($\pm 0,01$) a
120	0,22 ($\pm 0,02$) b	0,25 ($\pm 0,04$) b	0,46 ($\pm 0,06$) b	1,28 ($\pm 0,10$) b

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (\pm erro padrão da média), n= 10.

A massa seca das plantas expostas a cromo não foi estatisticamente diferente da massa seca das plantas mantidas no controle, embora em média, as plantas expostas a cromo tiveram menor produção de matéria seca (Tabela 3).

Tabela 3. Massa seca de *R. communis* após 12 dias de exposição em diferentes concentrações de cromo (VI). Parte aérea (caule + folhas); total (raiz + parte aérea) e razão raiz/parte aérea (R/PA).

Cr⁺⁶ na solução nutritiva (μM)	Raiz	Parte aérea	Total	R/PA
	----- massa seca (g) -----			
0	0,72 (±0,10) a	1,72 (±0,30) a	2,44 (±0,39) a	0,44 (±0,01) a
10	0,78 (±0,07) a	1,52 (±0,15) a	2,30 (±0,22) a	0,52 (±0,01) a
30	0,64 (±0,07) a	1,16 (±0,10) a	1,80 (±0,12) a	0,73 (±0,07) a
90	0,57 (±0,07) a	1,07 (±0,20) a	1,64 (±0,26) a	0,60 (±0,03) a

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (± erro padrão da média) n= 10.

Concentração e distribuição de níquel e cromo nas plantas

O aumento na concentração de níquel e cromo na solução nutritiva levou ao aumento das concentrações destes elementos nas plantas. As plantas expostas a níquel tiveram maior concentração desse metal nas raízes em comparação com a parte aérea (Figura 5). Do mesmo modo, as maiores concentrações de cromo foram observadas nas raízes em relação à parte aérea (Figura 5). Em termos de quantidade absoluta, nas plantas expostas a Ni-30 μM foi verificado em média 651,7 μg de níquel para as raízes e 100,8 μg de níquel a parte aérea. Enquanto que para as plantas expostas a Ni-60 e 120 μM esta quantidade foi menor, 393,1 e 274,9 μg de níquel para as raízes e 75,5 e 70,2 μg de níquel para a parte aérea, respectivamente. Isto ocorreu em função da redução significativa da massa nesses dois últimos tratamentos. As quantidades absolutas de cromo foram baixas em todos os tratamentos. A maior quantidade absoluta de cromo foi verificada para as plantas expostas a Cr-90 μM. Neste tratamento, a quantidade absoluta de cromo nas raízes foi 120,5 μg e 0,60 μg nas folhas.

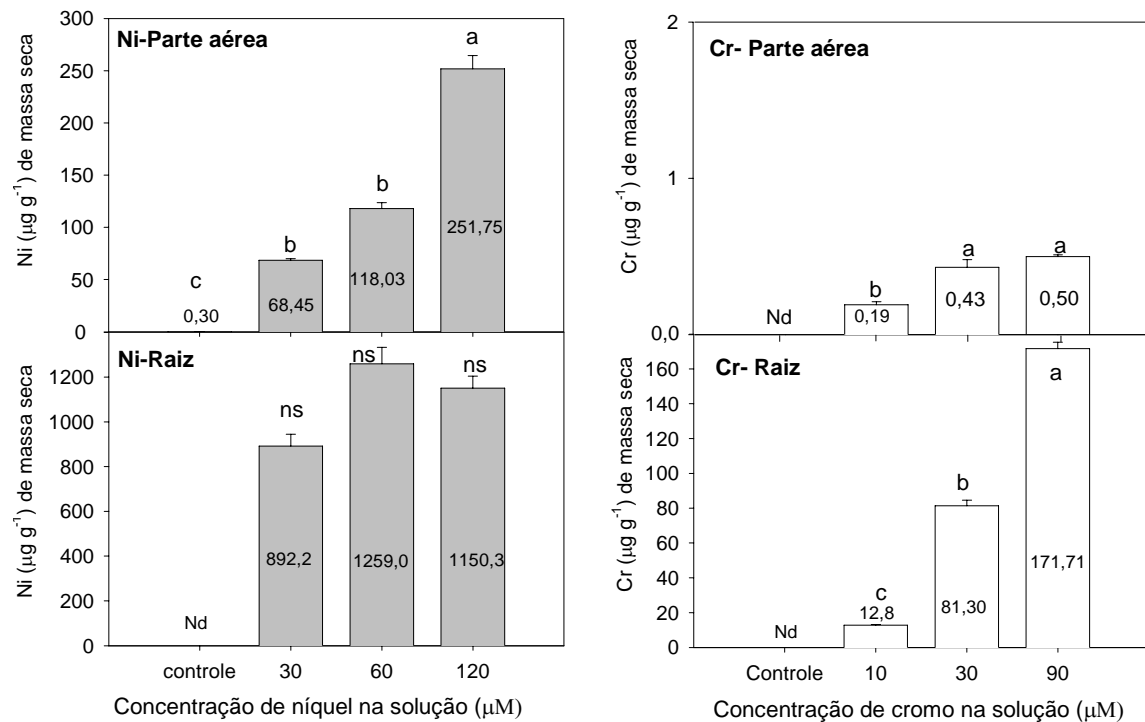


Figura 5. Concentrações de níquel e cromo na parte aérea e raiz de *R. communis* após 12 dias de cultivo em solução nutritiva com adição de níquel ou cromo (VI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras= erro padrão da média, ns= não significativo; Nd= não detectado.

Embora, para ambos os metais tenham sido verificadas maiores concentrações na raiz em relação à parte aérea, o índice de transporte (IT) mostra que o transporte de níquel é superior ao do cromo (Figura 6). Observou-se que para o níquel o transporte aumenta significativamente com o aumento da concentração do metal na solução. Porém, para o cromo o inverso ocorre, sendo que o maior índice foi observado nas plantas expostas a Cr-10 µM (Figura 6).

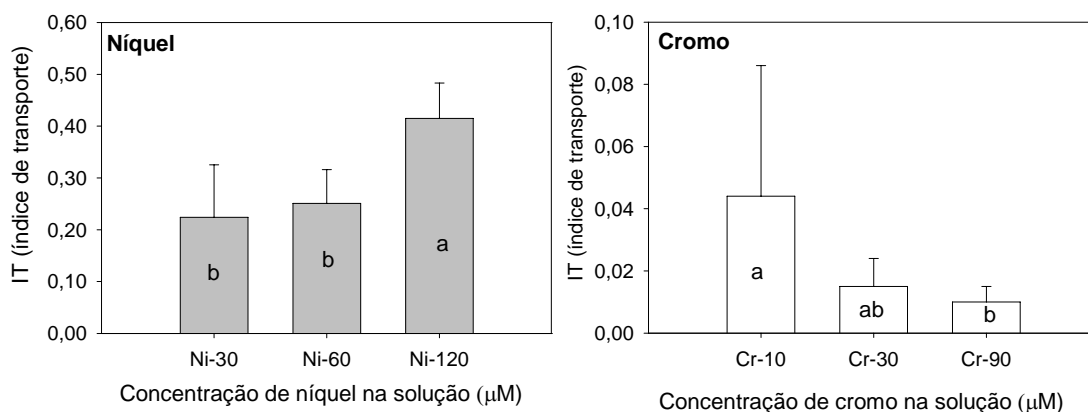


Figura 6. Índice de transporte de níquel e cromo de plantas de *R. communis* cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de níquel ou cromo (VI). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Barras (desvio padrão da média).

A concentração de níquel na parte aérea mostrou uma relação linear com a concentração de níquel em solução (Figura 7), o que está de acordo com o aumento de IT observado. Diferentemente, a relação entre a concentração de cromo (VI) em solução e a concentração de cromo na parte aérea da mamona mostrou baixa correlação (Figura 7). O valor do coeficiente angular da equação da curva de regressão linear foi de 0,00038 mostrando que os valores são praticamente constantes no intervalo estudado.

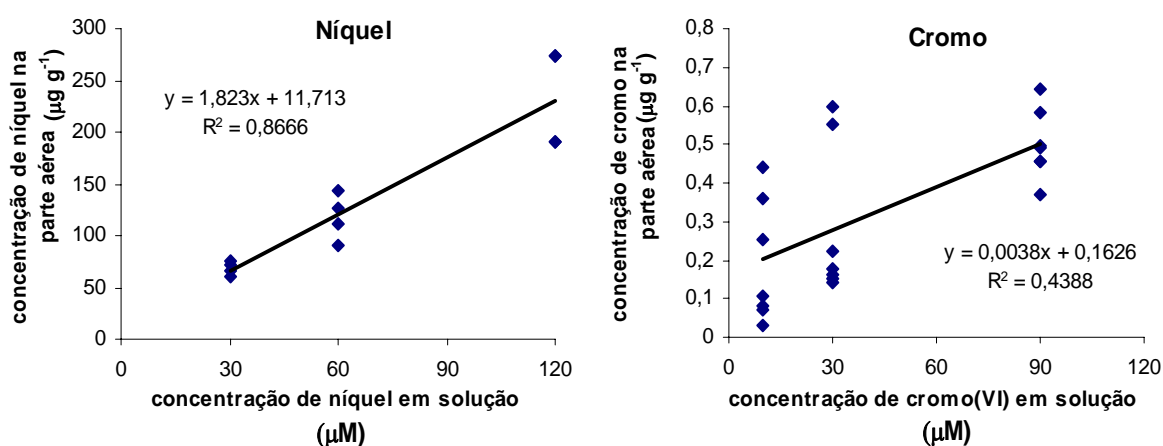


Figura 7. Relação entre a concentração de níquel em solução e a concentração de níquel na parte aérea.

Embora a concentração de níquel na parte aérea tenha sido menor que a concentração nas raízes, a parte aérea sofreu maiores perdas de massa seca. A parte aérea mostrou ser mais sensível ao níquel que as raízes. Observa-se na Figura 8 que a parte aérea mostrou uma redução exponencial da massa seca com o aumento da concentração de níquel nesta parte da planta. Por outro lado, a massa seca das raízes tende a diminuir linearmente com o aumento da concentração de níquel no sistema radical (Figura 8).

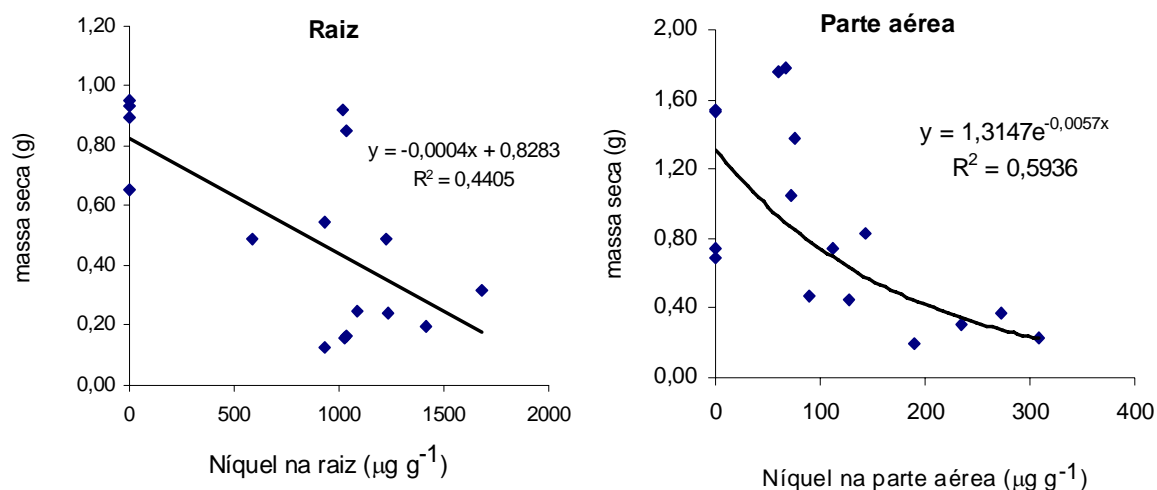


Figura 8. Redução da massa seca de raiz e parte aérea de plantas de *R. communis* em função da concentração de níquel em cada parte da planta.

Para as concentrações de cromo estudadas, não foram observadas relações entre a produção da matéria seca e a concentração deste metal em cada uma das partes das plantas (Figura 9).

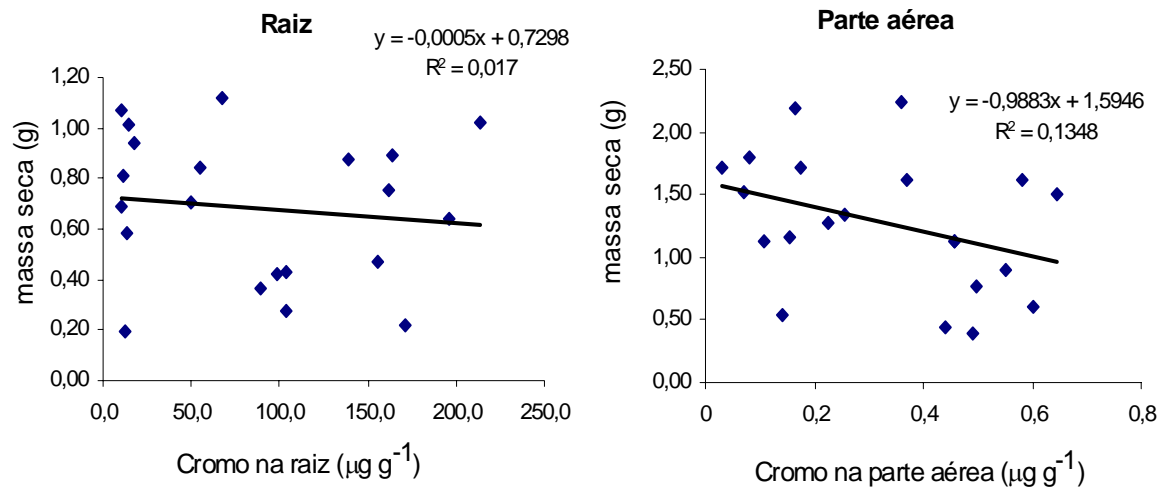


Figura 9. Relação entre a concentração de cromo (VI) em solução e a concentração de cromo na parte aérea de plantas de *R. communis*.

Influência dos metais no teor de clorofila

Nas concentrações testadas o níquel causou maior redução dos teores de clorofila do que o cromo. Os teores de clorofila a e b nas plantas expostas a níquel foram significativamente menores do que as concentrações das plantas controle, aos quatro e doze dias (Tabela 4). Aos quatro dias de tratamento, o teor de clorofila a das plantas expostas a Ni-30, 60 e 120 μM reduziu em média 44, 52 e 54% em relação ao controle, respectivamente. A concentração da clorofila b, também foi afetada pelo níquel com decréscimos significativos em relação ao controle (Tabela 4). Aos quatro dias, a concentração de clorofila b, das plantas expostas a Ni-30, 60 e 120 μM , foi em média 42, 52 e 40% menor que a concentração das planta controle, respectivamente. Após dozes dias, as plantas expostas a 30, 60 e 120 μM tiveram redução de 35, 68 e 71 % da clorofila a e de 36, 71 e 68 % da clorofila b, respectivamente.

A concentração total de clorofila (a + b) das plantas expostas a níquel diminuiu significativamente em relação ao controle (Tabela 4). Porém, a razão de clorofila a/b não mostrou diferenças significativas em relação ao controle até quatro dias de exposição (Tabela 4). Isto mostra que até quatro dias de exposição o níquel não interferiu na proporção das clorofilas, mas somente na quantidade das mesmas. Já aos doze dias foram verificadas reduções significativas da razão a/b nas plantas expostas a Ni-120 μM (Tabela 4).

Tabela 4. Teores de clorofila a e b em folhas de *R. communis* expostas a diferentes concentrações de níquel.

Concentração de Ni na solução (μM)	Concentração de clorofila (mg g^{-1})			
	a	b	a+b	a/b
4 dias				
0	13,08 ($\pm 0,23$) a	5,10 ($\pm 0,16$) a	18,18 ($\pm 0,39$) a	2,58 ($\pm 0,04$) a
30	7,38 ($\pm 0,46$) b	2,97 ($\pm 0,02$) b	10,35 ($\pm 0,64$) b	2,51 ($\pm 0,04$) a
60	6,30 ($\pm 0,14$) b	2,42 ($\pm 0,08$) b	8,72 ($\pm 0,16$) b	2,63 ($\pm 0,10$) a
120	6,04 ($\pm 0,12$) b	3,06 ($\pm 0,22$) b	9,11 ($\pm 0,29$) b	2,21 ($\pm 0,12$) a
12 dias				
0	11,99 ($\pm 0,22$) a	3,95 ($\pm 0,12$) a	15,94 ($\pm 0,33$) a	3,06 ($\pm 0,06$) a
30	7,76 ($\pm 0,12$) b	2,53 ($\pm 0,05$) b	10,29 ($\pm 0,17$) b	3,08 ($\pm 0,03$) a
60	3,80 ($\pm 0,25$) c	1,14 ($\pm 0,10$) c	4,94 ($\pm 0,35$) c	3,41 ($\pm 0,09$) a
120	3,49 ($\pm 0,53$) c	1,26 ($\pm 0,19$) c	4,75 ($\pm 0,72$) c	2,82 ($\pm 0,03$) b

Valores seguidos pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. (\pm erro padrão da média) n= 5.

Nas plantas expostas ao cromo, os teores de clorofila a e b sofreram menores reduções que as observadas para as plantas expostas a níquel. Aos quatro dias o teor de clorofila a das plantas expostas a Cr-10, 30 e 90 μM tinha reduzido 5, 6 e 6%, em relação ao controle, respectivamente (Tabela 5). A concentração de clorofila b também sofreu pequena redução em função da presença de cromo na solução. Porém, tanto aos quatro quanto aos doze dias não foram observadas diferenças significativas dos teores de clorofila das plantas expostas a cromo em relação ao controle (Tabela 5).

Tabela 5. Teores de clorofila *a* e *b* em folhas de *R. communis* expostas a diferentes concentrações de cromo (VI).

Concentração de Cr ⁺⁶ na solução (μM)	Concentração de clorofila (mg g ⁻¹)			
	a	b	a+b	a/b
4 dias				
0	13,08 (±0,23) a	5,10 (±0,16) a	18,18 (±0,39) a	2,58 (±0,04) a
10	12,40 (±0,37) a	4,49 (±0,11) a	16,90 (±0,47) a	2,76 (±0,06) a
30	12,27 (±0,49) a	4,52 (±0,23) a	16,79 (±0,72) a	2,74 (±0,04) a
90	12,27 (±0,37) a	5,02 (±0,20) a	17,29 (±0,58) a	2,46 (±0,03) a
12 dias				
0	11,99 (±0,22)	3,95 (±0,12) a	15,94 (±0,33) a	3,06 (±0,06) a
10	10,66 (±0,65)	3,74 (±0,27) a	14,40 (±0,92) a	2,88 (±0,04) a
30	9,95 (±0,21)	3,35 (±0,05) a	13,29 (±0,26) a	2,97 (±0,01) a
90	9,27 (±0,70)	3,15 (±0,23) a	12,42 (±0,92) a	2,94 (±0,02) a

Valores seguidos de mesma letra não apresentam diferenças significativas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 ou 10% de probabilidade. (± erro padrão da média) n= 5.

Fluorescência da clorofila

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* apresentaram diferenças significativas entre as plantas expostas a níquel e as plantas mantidas no controle. Aos quatro dias, a fluorescência basal (Fo) das plantas expostas a Ni-120 μM foi significativamente maior do que das plantas controle (Figura 10). Sendo Fo a fluorescência produzida independente de qualquer reação fotoquímica (Maxwell & Johnson 2000), o aumento no valor dessa variável indica destruição do centro de reação do fotossistema II (FSII) ou diminuição da capacidade de transferência de energia de excitação da antena para o centro de reação do fotossistema.

Aos 4 dias também observou-se tendência de redução da fluorescência máxima (Fm) em função do acréscimo de Ni na solução. Essa redução em Fm e o aumento em Fo

tendem a diminuir a fluorescência variável (Fv). Entretanto, até quatro dias não foram observadas reduções significativas para esta variável (Figura 10). Aos 12 dias, Fo das plantas expostas a Ni-30 e 60 μM foi significativamente menor que o controle, enquanto que para Ni-120 μM Fo manteve-se semelhante ao controle (Figura 10). Nesse período foram observados decréscimos significativos de Fm em todos os tratamentos de níquel em relação ao controle. Também se observou decréscimos significativos de Fv nas plantas expostas a Ni-60 e 120 μM , em relação ao controle (Figura 10).

As plantas expostas ao cromo não apresentaram variações significativas para as variáveis Fo, Fm e Fv durante o período de avaliação (Figura 10). Aos doze dias observou-se somente uma leve tendência de diminuição de Fv como resultado do decréscimo em Fm (Figura 10).

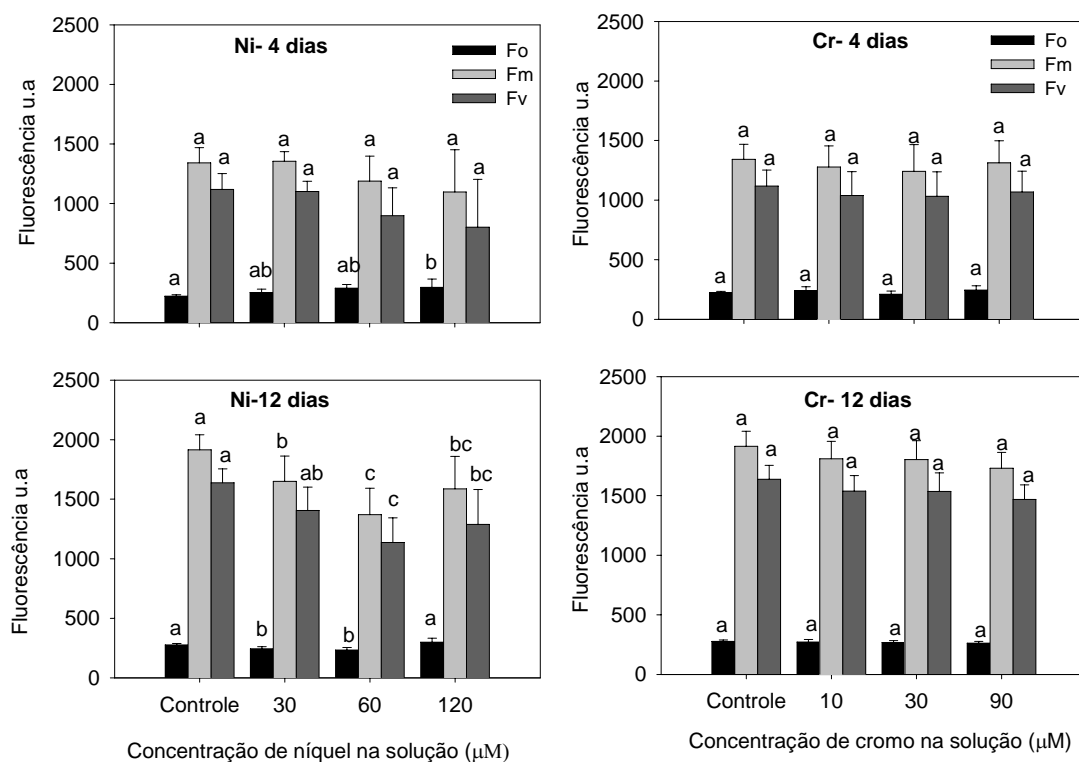


Figura 10. Parâmetros da fluorescência da clorofila a de plantas de *R. communis* expostas a diferentes concentrações de níquel ou cromo (VI). Fo (fluorescência basal); Fm (fluorescência máxima) e Fv (fluorescência variável= Fm-Fo). Valores seguidos pela mesma letra, para cada variável, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade Barras = (erro padrão da média), n= 10.

Nas concentrações estudadas, o níquel interferiu na eficiência quântica máxima do FSII, especialmente aos quatro dias (Figura 11). Isto pode ser analisado pela redução da razão (Fv/Fm) das plantas expostas ao níquel, especialmente nas concentrações de 90 e 120 μM . O aumento da concentração de níquel na solução também levou a redução em Fv/Fm aos 12 dias, entretanto, com menor amplitude que a observada aos quatro dias (Figura 11). As plantas expostas a cromo (VI) não sofreram reduções significativas dos valores de Fv/Fm, em relação ao controle, em ambos os períodos de análise, quatro e doze dias (Figura 11).

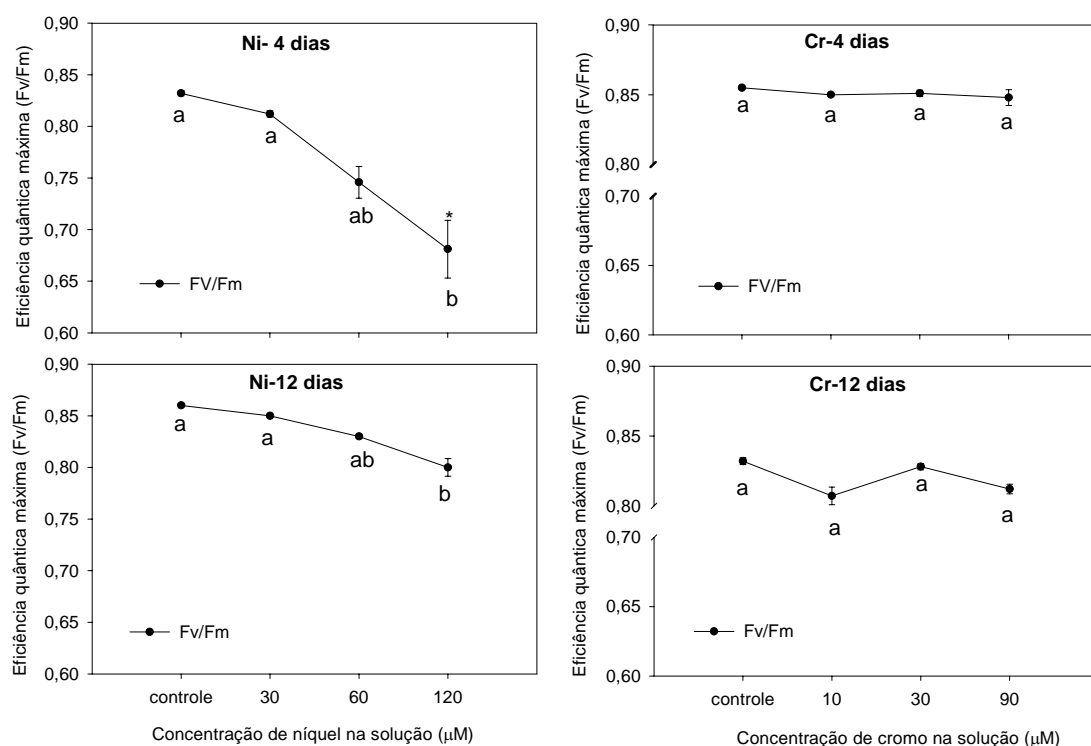


Figura 11. Eficiência quântica máxima (Fv/Fm) de plantas de *R. communis* expostas a diferentes concentrações de níquel ou cromo. Valores seguidos pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade Barras= (erro padrão da média), n= 10, * n= 5.

DISCUSSÃO

Respostas de R. communis ao níquel

Embora o níquel seja um micronutriente essencial para as plantas, em concentrações elevadas ele pode causar inúmeros danos às plantas, como foi observado neste experimento. As concentrações de 60 e 120 μM mostraram-se tóxicas a *R. communis*, causando redução superior a 50%, da massa seca das plantas (Tabela 2). A concentração de níquel que leva a reduções significativas da biomassa é variável entre as espécies. Paiva et al. (2001) observaram redução de 48% da massa seca total (raiz + parte aérea) de plantas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.) expostas a 42,5 μM de níquel após 40 dias de cultivo. Em *Thlaspi arvense*, uma espécie não hiperacumuladora, a concentração de 10 μM de níquel causou uma redução de 40 % na massa seca das plantas após sete dias de exposição (Krämer et al., 1997). O aumento da razão massa seca R/PA (Tabela 2) nas planta expostas a níquel mostrou que a parte aérea sofreu maior redução de massa seca em relação à raiz. Dados semelhantes foram observados por Ahmand et al. (2007). Em duas cultivares de *Vigna radiata* (L) Wilczek, a massa seca da parte aérea sofreu maior redução do que a massa das raízes quando as plantas foram expostas a concentrações variando entre 95 e 152 μM de sulfato de níquel. A redução na produção de massa seca possivelmente é resultado dos inúmeros efeitos diretos e indiretos do níquel que levam a alterações da estrutura e metabolismo celular, levando a planta a perder sua capacidade ótima de crescimento.

As raízes foram severamente afetadas pelo níquel, especialmente nas plantas expostas a 120 μM . Foi possível observar que nesta concentração o níquel inibiu severamente a emissão de raízes laterais e reduziu o crescimento das raízes já formadas. A inibição do crescimento das raízes pelo Ni também foi verificada em outros trabalhos. Em milho (*Zea mays* L.), depois de sete dias de exposição a 15, 20, 25 e 35 μM de níquel, a emissão de raízes laterais foi completamente inibida (Seregin et al., 2003). Segundo os autores, o níquel não afeta o crescimento das células, mas sim a divisão celular. Entretanto, Demchenko et al. (2005) observaram em plântulas de trigo (*Triticum aestivum*) que, em concentrações elevadas de níquel (100 μM), ambas, divisão e expansão celular, são inibidas, levando à redução do crescimento das raízes. Gonnelli et al. (2001) também verificaram um decréscimo de 15% do crescimento radical em tipo sensível de *Silene paradoxa* exposta a 2,5 μM de Ni. Possivelmente, a inibição da emissão das raízes laterais

nas plantas de mamona expostas a 120 μM de níquel esteja associada com a localização do níquel nas células do periciclo, como observado por (Seregin et al., 2003). Os autores verificaram que a elevada concentração de níquel nas células do periciclo inibe a divisão celular deste tecido e, conseqüentemente, inibe a formação de raízes laterais, já que o periciclo é o tecido de origem destas raízes.

A concentração de 60 μM de níquel causou reduções na massa seca das raízes, mas a emissão de raízes laterais parece não ter sido afetada. Nesta concentração o níquel parece ter causado somente redução do crescimento. É possível que neste tratamento a concentração de níquel no periciclo não tenha sido suficiente para causar inibição das divisões celulares, porém tenha afetado o crescimento das células da região meristemática das raízes já formadas. O efeito do níquel na inibição da divisão celular na região meristemática tem sido observado em outros trabalhos (Demchenko et al., 2005; Kozhevnikova et al., 2007).

O efeito tóxico do níquel nas raízes pode ter contribuído para os danos observados na parte aérea. A clorose observada em ambos os tratamentos, 60 e 120 μM , e a necrose restrita à concentração mais elevada (Figura 2), podem ser resultado de ação indireta do níquel na planta. Indiretamente, a clorose e mais severamente a necrose podem ser resultado da interferência do níquel na absorção e transporte de outros nutrientes essenciais, como ferro e cobre, levando à deficiência destes elementos (Foy 1978; Ewais, 1997; Miller & Cumming, 2000; Prasad et al., 2005). Por outro lado, os sintomas observados nas folhas podem ser resultado da ação direta do níquel na inibição de enzimas da rota biossintética da clorofila dentre elas ALA sintase, ALA desidratase, como mostrado em *Hordeum vulgare* por Shalygo e colaboradores (1999). Além disso, o níquel pode induzir a síntese da enzima clorofilase, envolvida na degradação da clorofila como observado em algas (Abel-Basset et al., 1995).

No presente experimento, embora não se possa afirmar qual o tipo de ação predominante do níquel na mamona, se direta e/ou indireta, acredita-se que em função do transporte do níquel para a parte aérea o níquel tenha causado danos diretos nas folhas. A redução do conteúdo de clorofila nas plantas expostas, especialmente, a 60 e 120 μM deve estar associada ao efeito do níquel na síntese da clorofila e na degradação da mesma, pois a clorose foi verificada tanto nas folhas jovens quanto nas folhas velhas. Com o aumento do período de exposição, a redução na razão da clorofila a/b mostrou que a clorofila a foi mais sensível ao efeito do níquel em mamona do que a clorofila b. Estes dados estão de acordo com os observados por Panda & Shaney (2002). Porém, Gajewska et al. (2006) observaram

que em plantas *Triticum aestivum* expostas a 200 μM de níquel a clorofila b foi mais sensível aos efeitos deletérios do níquel. Isto mostra que os efeitos do níquel podem variar entre as espécies.

A elevada sensibilidade do aparato fotossintético ao excesso de níquel pode ser um dos fatores que mais contribuíram para a maior redução da massa seca da parte aérea. Segundo Küpper & Kroneck (2007), a fotossíntese é um dos processos mais sensíveis ao efeito tóxico dos metais pesados. As análises de fluorescência da clorofila a mostraram que o níquel interferiu negativamente no processo fotossintético das plantas de mamona e os danos possivelmente foram maiores no fotossistema II. O aumento na fluorescência mínima (F_0), especialmente após 4 dias de exposição, sugere que o níquel causou danos no centro de reação do fotossistema II e/ou diminuição da capacidade de transferência de energia de excitação da antena para o centro de reação do fotossistema II. Segundo Bolhár-Nordenkampf et al. (1989), o aumento em F_0 pode indicar alterações estruturais nos pigmentos fotossintéticos que levam à perda da capacidade de transferência de energia, resultando no aumento de F_0 . A redução da concentração de clorofila observada nas plantas expostas a níquel reforça a idéia que o processo de transferência de energia na fotossistema II pode ter sido comprometido. O aumento de F_0 também foi observado em plantas expostas a outros metais pesados: alumínio (Moustakas et al., 1993; Konrad et al., 2005), chumbo (Banaszak et al., 2001), cádmio (Krupa et al., 1992; Larsson et al., 1998).

Em trabalho *in vitro* com fragmentos de membrana do tilacóide de espinafre (*Spinacia oleraceae* L.) expostos a concentrações de níquel entre 0,2 e 1,6 mM (Boisvert et al., 2007), não foi relatada variação em F_0 , mas sim na fluorescência máxima (F_m), levando à redução da fluorescência variável (F_v). Em mamona, F_v também diminuiu em função do aumento da concentração de níquel devido ao aumento de F_0 . Embora F_m tenha reduzido em função do aumento de níquel em solução, esta variável não pode ser analisada separadamente porque inúmeros fatores podem causar variações nesta variável (Baker & Rosenqvist, 2004).

As concentrações de 60 e 120 μM comprometeram a atividade fotoquímica das plantas, ou seja, as plantas cultivadas nestes tratamentos tiveram menor eficiência na conversão de energia de excitação para a energia química, indicado pela redução de F_v/F_m , especialmente aos 4 dias. Nossos dados estão de acordo com os dados obtidos *in vitro* por Boisvert e colaboradores (2007). Estes autores também verificaram que o níquel promoveu redução da eficiência quântica máxima do FSII. Entretanto, em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) expostas a concentrações de 100, 200 e 500 μM não foram

verificadas variações em Fv/Fm (Krupa et al., 1993). As diferentes condições experimentais e a espécie estudada podem explicar estas diferenças. Aos 12 dias de exposição das plantas ao níquel, os valores de Fv/Fm tiveram menor redução que a observada aos 4 dias. Isto possivelmente pode indicar certa aclimação das plantas ao estresse.

Além dos efeitos nos pigmentos, alterações estruturais nos cloroplastos podem ter afetado todo o aparato fotossintético. Segundo Molas (1997), o níquel pode causar mudanças estruturais nas membranas dos tilacóides. A integridade dessas membranas é fundamental para o eficiente transporte de elétrons na fotossíntese. Os danos nas membranas dos tilacóides pode ser resultado da peroxidação de lipídeos causado pelo aumento de radicais livres induzido pelo níquel (Pandolfi et al 1992). Este conjunto de efeitos possivelmente levou à perda da capacidade de transferência de elétrons, causando a redução da eficiência quântica (redução Fv/Fm).

O transporte de níquel para a parte aérea contribuiu de forma significativa para os danos na mamona. O níquel é usualmente transportado pelo xilema como complexo orgânico, sendo móvel na planta. Nas plantas hiperacumuladoras, a ligação do níquel com o aminoácido histidina permite o transporte e a hiperacumulação do níquel nas folhas (Krämer et al., 1996). Em estudo com soja (*Glycine max*), Cataldo et al. (1978) observaram que, na senescência, mais de 70% do níquel presente na parte aérea foi remobilizado para as sementes, mostrando a mobilidade do elemento. No presente experimento, a maior concentração de níquel foi observada nas raízes, mas o transporte aumentou com o aumento de níquel na solução. Segundo Baker (1981), uma razão entre concentração de metal na folha/ concentração de metal nas raízes menor que 1 indica exclusão do metal das folhas, sugerindo que a espécie seja uma exclusora. Na mamona, esta razão foi inferior a 0,3 para todas as concentrações estudadas, o que levaria a classificar a planta como exclusora. Entretanto, segundo o mesmo autor as plantas que apresentam uma relação linear entre, a concentração de metal na parte aérea e concentração no solo, são chamadas de plantas indicadoras. Desta forma, embora a mamona tenha mostrado certa capacidade de exclusão do níquel para a parte aérea, esta exclusão não foi suficiente para restringir o aumento da concentração de níquel na parte aérea e a planta se comporta como planta indicadora de níquel como mostrou a Figura 7. A quantidade de níquel transportado para a parte aérea, quando a mamona foi exposta a 60 e 120 μM , atingiram níveis fitotóxicos causando severos danos ao desenvolvimento das plantas.

A capacidade de absorção e de acúmulo de níquel varia com a espécie. Plantas de arroz (*Oriza sativa* L.cv Bahia), cultivadas por 10 dias em solução nutritiva com adição de 500 μM de NiCl_2 , acumularam em média 49,54 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Ni, sendo que deste total, 40,09 $\mu\text{g g}^{-1}$ foi acumulado na parte aérea (Rubio et al., 1994). Para a maioria das espécies, concentrações na planta entre 10 e 100 $\mu\text{g g}^{-1}$ na massa seca causam fitotoxicidade (Kabata-Pendias, 2000). Observa-se que para a mamona as concentrações fitotóxicas ficaram bem próximas a estes valores. As concentrações foliares das plantas expostas a Ni- 60 e 120 μM foram de 118,02 e 231,5 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Estas concentrações foliares foram suficientes para causar severos danos ao metabolismo da mamona e estão abaixo das concentrações de 1000 e 38000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de níquel na massa seca das folhas, encontradas em espécies hiperacumuladoras de níquel: por exemplo, *Alyssum bertolonii*, (Brooks, 1998).

Desta forma, embora a mamona tenha apresentado elevada capacidade de acúmulo, a mesma não pode ser considerada uma planta hiperacumuladora, sendo somente tolerante a concentrações próximas a 30 μM de níquel, nas quais a concentração foliar de níquel é cerca de 68,5 $\mu\text{g g}^{-1}$. É importante salientar que, para ser considerada uma espécie hiperacumuladora, a planta deve acumular metais em elevadas concentrações na parte aérea mesmo quando exposta a solos com baixas concentrações do metal e não deve apresentar sintomas de toxidez (Baker, 1981; Callahan et al., 2006). Por esta definição, a mamona não poderia ser considerada uma planta hiperacumuladora de chumbo como proposto por Romeiro et al. (2006), já que as plantas cultivadas apresentaram elevada concentração deste elemento na parte aérea, mas um decréscimo significativo da massa seca.

Respostas da planta ao cromo

As concentrações de cromo testadas não foram fitotóxicas à mamona. Os sintomas típicos de toxidez de Cr, cloroses em folhas jovens e colorações vermelho-amareladas (Kabata-Pendias & Pendias, 2000; Panda & Choudhury, 2005; Shanker et al., 2005) não foram visualizados nas plantas expostas a Cr, durante os 12 dias de observação. Além disso, a massa seca das plantas tratadas com cromo não diferiu das plantas mantidas no controle. Dentre as variáveis analisadas, somente, a taxa de crescimento relativo em altura mostrou que o cromo pode ter influenciado o desenvolvimento normal das plantas, especialmente na maior concentração (90 μM). O efeito do Cr (VI) na redução no

crescimento das plantas também foi verificado em inúmeros outros trabalhos (Vajpayee et al., 2001, Chatterjee & Chatterjee, 2000).

As maiores concentrações de cromo foram observadas nas raízes das plantas de mamona em comparação com a parte aérea. A maior concentração de cromo nas raízes em relação à parte aérea foram observadas em plantas aquáticas (Gupta et al., 1994; Vajpayee, 2000;), em milho (Sharma et al., 2003) e outras espécies (Zayed et al., 1998; Mei et al., 2002; Han et al., 2004). A menor concentração de cromo na parte aérea em relação às raízes foi provavelmente resultado da redução do Cr (VI) para Cr (III) nas raízes, o qual tem mobilidade reduzida das raízes para parte aérea. Segundo Zayed et al. (1998) o Cr (VI) é ativamente absorvido via transportadores de sulfato e é imediatamente reduzido pela enzima redutase férrica. O Cr (III) forma complexos com grupos- COOH, restringindo o transporte do metal da raiz para a parte aérea (Marschner 1995).

O índice de transferência (IT) de cromo para a parte aérea foi menor do que 0,05 e diminuíram com o aumento de cromo em solução. Estes valores são inferiores aos observados em *Brassica juncea*, a qual é considerada uma espécie com baixo transporte de cromo para as folhas (Han et al., 2004). Os valores de IT para *B. juncea* variaram de 0,2 a 0,8 e também diminuíram com o aumento de cromo em solução, indicando um possível mecanismo da planta para sobreviver em solos com elevadas concentrações de cromo.

A capacidade de absorção e transporte de Cr (VI) difere muito entre as espécies, mas de modo geral o transporte para a parte aérea é restrito (Tabela 6). Nessa tabela os dados de alguns trabalhos foram reunidos a fim de facilitar a visualização e as comparações. Observa-se que a mamona apresenta uma forte restrição de transporte de Cr para a parte aérea. A razão da concentração entre parte aérea e raiz da mamona foi similar a de *Helianthus annuus* L., porém esta espécie é capaz de acumular maior concentração de cromo na raiz que a mamona. As concentrações de cromo nas raízes da mamona foram similares às concentrações nas raízes de *Zea mays* L.; entretanto, nesta espécie a elevada concentração de cromo transportada para as folhas causou danos severos às plantas.

Tabela 6. Concentração de cromo em raiz e parte aérea de diferentes espécies expostas a cromo (VI).

Espécie	Concentração utilizada em solução Cr ⁺⁶ (µM)	Concentração nas raízes (µg g ⁻¹)	Concentração na folha (µg g ⁻¹)	Razão (PA/Ra)	Tempo de exposição (dias)	Ref.
<i>Zea mays</i> L.	50	129,6	18,8	0,145	16	Sharma et al., (2003)
	100	187,2	28,8	0,153	16	
<i>Glycine max</i> L	40	700	27	0,039	14	Mei et al., (2002)
<i>Helianthus annuus</i> L.	40	1800	6	0,003	14	
<i>Brassica oleraceae</i> L.	19,2	400	2	0,04	7	Zayed et al., (1998)
<i>Nymphaea alba</i>	10	279,1	147,9	0,530	12	Vajpyee et al., (2000)
<i>Ricinus communis</i> L.	10	14,78	0,19	0,013	12	neste trabalho
	30	93,58	0,43	0,005	12	
	90	258,75	0,50	0,002	12	

Assim, devido à baixa razão entre a concentração de cromo na parte aérea e concentração de cromo na raiz, a mamona pode ser classificada como exclusora de cromo, segundo a classificação de Baker, (1981). Observa-se na Figura 7 que a correlação entre concentração de cromo na solução e concentração na parte aérea não é significativa. Porém, entende-se que este resultado deve ser visto com certa restrição, já que o número de concentrações testadas e o intervalo entre elas foram relativamente pequenos.

As baixas concentrações de cromo na planta não foram suficientes para causarem distúrbios significativos na concentração de clorofila e no aparato fotossintético, não resultando em alterações dos parâmetros da fluorescência da clorofila (Figuras 10 e 11). Assim, as menores taxas de crescimento observadas nas plantas após 12 dias de tratamento possivelmente sejam resultado da ação indireta do cromo nas plantas. O cromo, devido à sua similaridade estrutural com alguns elementos essenciais, pode afetar a absorção e o transporte desses elementos na planta. Em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), o transporte de P,

K, Zn e Fe, foi reduzido quando as plantas foram expostas a Cr^{+6} (Barceló et al., 1985). Chatterjee & Chatterjee (2000) também mostraram a redução do transporte de P, S, Mn, Zn e Cu da raiz para a parte aérea em plantas de couve-flor expostas a 500 μM . Possivelmente, a redução moderada do transporte destes elementos tenha sido a causa principal da redução do crescimento das plantas expostas a cromo, e não a ação direta do metal na parte aérea, já que não foram observados sintomas típicos de toxidez nas folhas e nenhuma alteração das variáveis de fluorescência.

Estratégias de respostas *R. communis* a níquel e a cromo e a e as implicações do uso da espécie na fitorremediação de solos contaminados.

Os diferentes índices de transporte observados para níquel e cromo deixam claro que o níquel é mais facilmente transportado para a parte aérea do que o cromo. Concentrações na parte aérea acima de $68\mu\text{g g}^{-1}$ de níquel foram fitotóxicas para a mamona e a mesma apresentou reduções drásticas do crescimento. A mamona parece ter algum mecanismo como, concentração de metal no vacúolo das raízes, que restringe o transporte de níquel para a parte aérea, entretanto, com o aumento da concentração ocorrem danos nas raízes que elevam a perda da eficiência deste mecanismo e concentrações fitotóxica de níquel atingem a parte. Por outro lado, nas concentrações estudadas, o cromo absorvido foi praticamente todo retido nas raízes e os danos à mamona não foram drásticos, permitindo o crescimento das plantas.

Comparativamente, a mamona se mostra uma espécie interessante para a imobilização de níquel nas raízes, somente em áreas onde as concentrações não sejam elevadas. Concentrações elevadas de níquel no solo levarão possivelmente ao transporte de quantidades tóxicas de níquel para as folhas, interferindo no crescimento das plantas. Em relação ao cromo nas concentrações estudadas, a mamona mostrou ter capacidade de restringir o transporte deste elemento para a parte aérea. Portanto, a espécie poderia auxiliar nos processos de imobilização deste metal em solos contaminados. Porém, são necessários estudos com concentrações mais elevadas de cromo para avaliar de forma definitiva o potencial de fitoestabilizador da mamona para este metal.

CONCLUSÃO

Nas concentrações estudadas, a mamona apresenta maior concentração de níquel e cromo nas raízes em relação à parte aérea. Porém, com o aumento da concentração de níquel nas raízes, o crescimento radical é afetado e possivelmente a capacidade de restrição de transporte de níquel para a parte aérea é perdida e a espécie mostra comportamento de uma planta indicadora de níquel. Assim, o níquel foi transportado em concentrações fitotóxicas para a parte aérea, afetando o processo fotossintético e levando a perdas significativas da massa seca das plantas. O mesmo não foi observado para o cromo. O aumento da concentração de cromo nas raízes não levou a níveis fitotóxicos de cromo nas folhas, mostrando que as concentrações estudadas não são fitotóxicas para *R. communis*. Nestas concentrações a mamona mostrou ser uma exclusora de cromo para a parte aérea.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL-BASSET, R.; ISSA, A.A.; ADAM, M.S. (1995). Chlorophyllase activity-effects of heavy metals and calcium. **Photosynthetica**, 31: 421-425.
- ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H. (1998). Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 22: 21-26.
- ADRIANO, D.C. (2001). **Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals**. 2.ed. New York: Springer-Verlag. 886p.
- AHMAD, M.S.A.; HUSSAIN, M.; SADDIQ, R.; ALVI, A.K. (2007). Mungbean: A nickel indicator, accumulator or excluder ? **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 78: 319-324.
- ASHER, C.J. (1991). **Micronutrientes in Agriculture**. 2 ed. Madison: Soil Science Society of America. SSSA Book series, n.4. p- 703-723.
- BANASZAK, A.; NAPIERALSKA, A.; WOZNY, A. (2001). Inhibition of greening of *Lemma minor* by Pb⁺⁺. **Biologia**, 56: 111-116.
- BARCELÓ, J.; POSCHENIEDER, B.G. (1985). Effect of chromium VI on mineral element composition of bush beans. **Journal of Plant Nutrition**, 8: 211-217.
- BAKER, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, 3: 643-654.
- BARKER, N.R.; ROSENQVIST, E. (2004). Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, 55: 1607-1621.
- BEADLE, C.L. (1985). Plant Growth analysis. In: COOMBS, J.; HALL, D.O.; LONG, S.P.; SCURLOCK, J.M.O. (eds). **Techniques in bioproductivity and photosynthesis**. 2 ed. Exeter: Pergamon Press. p.20-25.
- BJÖRKMAN, O.; DEMMING, B. (1987). Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. **Planta**, 170: 489-504.
- BOISVERT, S.; JOLY, D.; LECLERE, S.; GOVINDACHARY, S.; HARNOIS, J.; CARPENTIER, R. (2007). Inhibition of the oxygen-evolving complex of photosystem II and depletion of extrinsic polypeptides by nickel. **Biometals** (*In press*).
- BOLHÀR-NORDENKAMPF, H.R.; LONG, S.P.; BAKER, N.R.; OQUIST, G.; SCHREIBERS, U.; LECHNER, E.G. (1989). Chlorophyll fluorescence as a probe of the photosynthetic competence of leaves in the field: a review of current instrumentation. **Functional Ecology**, 3: 497-514.

- BROADLEY, M.R.; WILLEY, N.J.; WILKINS, J.C.; BAKER, A.J.M.; PHILIP, A.M. (2001). Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. **New Phytologist**, 152: 9-27.
- BROOKS, R.R. (1998). Geobotany and hyperaccumulators. In: BROOKS, R.R. (ed). **Plants that hyperaccumulate heavy metals, their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining**. Cambridge: CAB International. p. 55-94.
- BROWN, P.H.; WELCH, R.M.; CARY, E.E. (1988). Nickel: a micronutrient essential for higher plants. **Plant Physiology**, 85: 801-803.
- CALLAHAN, D.L.; BAKER, A.J.M.; KOLEV, S.D.; WEDD, A.G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 11: 2-12.
- CATALDO, D.A.; GARLAND, T.R.; WILDUNG, R.E.; DRUCKER, H. (1978). Nickel in plants- Distribution and chemical form in soybean plants. **Plant Physiology**, 62: 566-570
- CHATTERJEE, J. CHATTERJEE, C. (2000). Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. **Environmental Pollution**, 109: 69-74.
- CLJSTERS, H.; ASSCHE, F.V. (1985). Inhibition of photosynthesis by metals. **Photosynthesis Research**, 7: 31-40.
- CUNNINGHAM, S.D.; OW, D.W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, 110: 715-719.
- DEMCHENKO, N.P.; KALIMOVA, I.B.; DEMCHENKO, K.N. (2005). Effect of nickel on growth, proliferation and differentiation of root cells in *Triticum aestivum* seedlings. **Russian Journal of Plant Physiology**, 52: 220-228.
- DIXON, N.E.; GAZZOLA, C.; WATTERS, J.J.; BLAKLEY, R.L.; ZERNER, B. (1975). Jack Bean Urease (EC 3.5.1.5) A metalloenzyme. A simple biological role for nickel? **Journal of the American Chemical Society**, 97: 4131-4133.
- EWAIS, E.A. (1997). Effects of cadmium, nickel and lead on growth, chlorophyll content and proteins of weeds. **Biologia Plantarum**, 39: 403-410.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 29: 511-566.
- GAJEWSKA, E.; SKLODOWSKA, M.; SLABA, M.; MAZUR, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities proline and chlorophyll contents in wheat shoots. **Biologia Plantarum**, 50: 653-659.
- GONNELLI, C.; GALARDI, F.; GABRIELLI, R. (2001). Nickel and copper tolerance and toxicity in three Tuscan populations of *Silene paradoxa*. **Physiologia Plantarum**, 113: 507-514.

- GUPTA, M.; SINHA, S.; CHANDRA, P. (1994). Uptake and toxicity of metal in *Scripus lacustris* L. e *Bacopa monnieri* L. **Journal of Environmental. Science and Health**, 29: 2185-2202.
- HAN, F.X.; SRIDHAR, B.B.M.; MONTS, D.L.; SU, Y. (2004). Phytoavailability and toxicity of trivalent and hexavalent chromium to *Brassica juncea*. **New Phytologist**, 162: 489-499.
- JOSHI, M.K.; MOHANTY, P. (2004). Chlorophyll a Fluorescence as a Probe of Heavy metal ion toxicity in plants. In: PAPAGEORGIOU, G.C.; GOVINDJEE (eds), **Chlorophyll a Fluorescence: A Signature of Photosynthesis**. The Netherlands: Springer, p.637-661.
- KABATA – PENDIAS, A. (2000). **Trace elements in soils and plants**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press. 413p.
- KNUDSON, L.L.; TIBBILIS, T.W.; EDWARDS, G.E. (1977). Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. **Plant Physiology**, 60: 606-608.
- KOZHEVNIKOVA, A.D.; SEREGIN, I.V.; BYSTROVA, E.I.; IVANOV, V.B. (2007). Effects of heavy metals and strontium on division of Root Cap and Meristem Strucutural organization. **Russian Journal of Plant Physiology**, 54: 257-266.
- KÖHL, K.I.; LÖSCH, R. (2004). Experimental characterisation of metal tolerance. In: PRASAD, M.N.V.; HAGEMEYER, J. (eds). **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystem**. Berlin: Springer-Verlang. p.434-453.
- KONRAD, M.L.F.; SILVA, J.A.B.; FURLANI, P.R.; MACHADO, E.C. (2005). Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio. **Bragantia**, 64: 339-347.
- KRÄMER, U.; SMITH, R.D.; WENZEL, W.; RASKIN, I.; SALT, D.E. (1997). The role of metal transport and tolerance in nickel hperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. **Plant Physiology**, 115: 1641-1650.
- KRÄMER, U.; COTTER-HOWELLS, J.D.; CHARNOCK, J.M.; BAKER, A.J.M.; SMITH, J.A.C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Nature**, 379: 635-638.
- KRUPA, Z.; ÖQUIST, G.; HUNER, N.P.A. (1992). The influence of cadmium on primary photosystem-II photochemistry in bean as revealed by chlorophyll a fluorescence –A preliminary study. **Acta Physiologiae Plantarum**, 14: 71-76.
- KRUPA, Z.; SIEDLEKA, A.; MAKSYMIEC, W.; BASZYNSKI, T. (1993) In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. **Journal of Plant Physiology**, 142: 664-668.
- KÜPPER. H.; KRONECK, P.M.H. (2005). Heavy metal uptake by plants and Cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K. (eds). **Metal Ions in Biological Systems**. Boca Raton: Taylor & Francis. v.44, p. 97-144.

- KÜPPER, H.; KRONECK, P.M.H. (2007). Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K. (eds). **Metal Ions in Life Sciences**. New York: John Wiley & Sons, Ltd. v.2, p.31-62.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F.C.; SPILLER, M. (2006). Heavy-metal-chorophylls formed in vivo during heavy metal stress and degradation products formed during digestion, extraction and storage of plant material. In: GRIMM, B.; PORRA, R.; RÜDIGER, W.; SCHEER, H. (eds). **Chorophylls and bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications**. The Netherlands: Springer. pp.66-77.
- LAISK, A.; OJA, V. (1998). Dynamics of leaf photosynthesis: rapid – response Measurements and their Interpretations. **Series Techniques in plant sciences**, n.1, CSIRO, Collingwood.
- LARSSON, E.H.; BORNMAN, J.F.; ASP, H. (1998). Influence of UV-B radiation and Cd⁺² on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in *Brassica napus*. **Journal of Experimental Botany**, 49: 1031-1039.
- LASAT, M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, 31: 109-120.
- LEWICKI, P.; HILL T. (2007) **STATISTICS: Methods and Applications**. Tulsa: StatSoft Inc. (<http://www.statsoft.com>).
- MACNICOL, R.D.; BECKER, P.H.T. (1985). Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. **Plant and Soil**, 85: 107-129.
- MARSCHNER, H. (1995). **Mineral nutrition of higher plants**. 2ed. London: Academic Press.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. **Jornal of Experimental Botany**, 51: 659-668.
- MEI, B.; PURYEAR, J.D.; NEWTON, R.J. (2002). Assessment of Cr tolerance and accumulation in selected plant species. **Plant and Soil**, 247: 223-231.
- MILLER, S.P.; CUMMING, J.R. (2000). Effects of serpentine soil factors on Virginia pine (*Pinus virginiana*) seedlings. **Tree Physiology**, 20: 1129-1135.
- MOLAS, J. (1997). Changes in morphological and anatomical structure of cabbage (*brassica oleracea* L.). Outer leaves and in ultrastructure of their cholorplasts caused by an In vitro excess of nickel. **Photosynthetica**, 34: 513-522
- MOUSTAKAS, M.; OUZOUNIDOU, G.; LANNOYE, R. (1993). Rapid screening for aluminum tolerance in cereals by use of the chlorophyll fluorescence test. **Plant Breeding**, 111:343-346.
- MOYA, J.L.; ROS, R.; PICAZO, I. (1993). Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. **Photosynthesis Research**, 36: 75-80.

- PAIVA, H.N.; CARVALHO, R.; SILVA, F.P.; CARVALHO, J.G.; MELLONI, R. (2001). Influência de doses de níquel sobre o crescimento de mudas de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr.All.) em solução nutritiva. **Cerne**, 7: 114-121.
- PANDEY, N.; SHARMA, C.P. (2002). Effects of heavy metals Co^{2+} , Ni^{2+} and Cd^{2+} on growth and metabolism of cabbage. **Plant Science**, 163: 753-758, 2002.
- PANDA, S.K.; CHOUDHURY, S. (2005). Chromium stress in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 95-102.
- PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant, Cell and Environment**, 15: 719-725.
- PRASAD, S.M.; DWIVEDI, R.; ZEESHAN, M. (2005). Growth, photosynthetic electron transport, and antioxidant responses of young soybean seedlings to simultaneous exposure of nickel and UV-B stress. **Photosynthetica**, 43: 177-185.
- PRASAD, M.N.V. (2006). Plants that accumulate and /or exclude toxic trace elements play an important role in phytoremediation. In: PRASAD, M.N.V.; SAJWAN, K.S.; NAIDU, R. (eds.). **Trace elements in the environment-biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation**. Boca Raton: Taylor & Francis Group. 523-547.
- ROMEIRO, S.; LAGÔA, A.M.M.A.; FURLANI, P.R.; ABREU, C.A.; ABREU, M.F.; ERISMAN, N.M. (2006). Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18: 483-489.
- RUBIO, M.I.; ESCRIG, I.; MARTINEZ-CORTINA, C.; LÓPEZ-BENET, FJ, SANZ A (1994) Cadmium and nickel accumulation in rice plants. Effects on mineral nutrition and possible interactions of abscisic and gibberellic acids. **Plant Growth Regulation**, 14: 151-157.
- SALT, D.E. (2001). Responses and adaptations of plants to metal stress. In: HAWKESFORD, M.J.; BUCHNER, P. (eds). **Molecular analysis of Plant Adaptation to the Environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. p.159-179.
- SCHREIBER, U.; BILGER, W.; NEUBAUER, C. (1994). Chlorophyll fluorescence as non intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: SCHULZE, E.D.; CALDWELL, M.M, (eds). **Ecophysiology of Photosynthesis**. (Ecological studies, 100). Berlin: Springer. pp.49-70.
- SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D.; KAZYUMINA, E.M.; IVANOV, V.B. (2003). Nickel toxicity and distribution in Maize roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, 50: 711-718.
- SEREGIN, A.D.; KOZHEVNIKOVA, A.D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, 53: 257-277.
- SHALYGO, N.V.; KOLESNIKOVA, N.V.; VORONETSKAYA, V.V.; AVERINA, N.G.; (1999). Effect of Mn, Fe, Co and Ni on chlorophyll accumulation and early stages of

- chlorophyll formation in greening barley seedlings. **Russian Journal of Plant Physiology**, 46: 496-501.
- SHANKER, A.K.; CERVANTES, C.; LOZA-TAVERA, H.; AVUDAINAYAGAM, S. (2005). Chromium toxicity in plants. **Environmet International**, 31: 739-753.
- SHARMA, D.C.; SHARMA, C.P.; TRIPATHI, R.D. (2003). Phytotoxic lesions of chromium in maize. **Chemosphere**, 51: 63-68.
- STULTS, L.W.; O'HARA, E.B.; MAIER, R.J. (1984). Nickel is a component of Hydrogenase in *Rhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, 159: 153-158.
- VAJPAYEE P, RAI UN, ALI MB, TRIPATHI RD, YADAV V, SINHA S, SINGH SN (2001). Chromium-induced physiological changes in *Vallisneria spirallis* L. and its role in phytoremediation of tannery effluent. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 67: 246-56.
- VAJPAYEE, P.; TRIPATHI, R.D.; RAI, U.N.; ALI, M.B.; SINGH, S.N. (2000). Chromium (VI) accumulation reduces chlorophyll biosynthesis, nitrate reductase activity and protein content in *Nynphaea alba* L. **Chemosphere**, 41: 1075-1082.
- WINTERMANS, J.F.G.M.; MOTS, A. (1965). Spectrophotometric characteristics of chlorophylls *a* and *b* and their pheophytins in ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, 109: 448-453.
- ZAYED, A.; MEL LYTLE, C.; JIN-HONG, Q.; TERRY, N. (1998). Chromium accumulation, translocation and chemical speciation in vegetable crops. **Planta**, 206: 293-299.

CAPÍTULO IV

LOCALIZAÇÃO DE NÍQUEL E MUDANÇAS ANATÔMICAS EM RAÍZES DE MAMONA (*RICINUS COMMUNIS L.*)

Em mamona, como mostrado no capítulo anterior, o níquel em concentrações de 60 e 120 μM causou danos severos às plantas com reduções significativas da massa seca. Os efeitos tóxicos do níquel podem resultar da ação direta deste na inibição da atividade de enzimas, na alteração da estrutura celular bem como na substituição de elementos em moléculas como a clorofila (Küpper & Kroneck, 2007) e/ou ser um dano indireto, causado pela redução da absorção e transporte de micronutrientes essenciais como ferro (Parida et al., 2003).

Um dos efeitos típicos da toxidez de níquel é a inibição do crescimento das raízes laterais (Seregin et al., 2003). Esta inibição pode ser resultado tanto da inibição da divisão celular quanto da redução da expansão celular e depende da concentração de níquel no meio de cultivo solução (Demchenko et al., 2005). A localização de níquel na região do periciclo, que é o local de origem das raízes laterais, tem sugerido que o níquel inibe as divisões celulares desta área inibindo a formação de novas raízes (Seregin et al., 2003). A concentração de níquel capaz de causar estes danos nas raízes é variável dependendo da espécie.

Em mamona foi observado que as concentrações de 60 e 120 μM reduziram o crescimento do sistema radical. Entretanto, até 12 dias de exposição, a inibição na emissão de raízes laterais foi visualizada somente na concentração de 120 μM . Na concentração de 60 μM a biomassa reduziu, porém a emissão das raízes laterais parece não ter sido inibida. Sabe-se que o efeito dos metais pesados depende da concentração, do tempo de exposição e do estágio de desenvolvimento da planta (Kabata-Pendias, 2000; Peralta-Videa et al., 2004). Assim, para entender melhor, a resposta de uma espécie a determinado elemento é necessário avaliar o efeito temporal da exposição do metal.

Na literatura não foram encontrados trabalhos avaliando a influência do níquel no crescimento das raízes de mamona (*Ricinus communis L.*) e a localização de níquel nos tecidos de raízes e folhas. Por este motivo, para melhor entender o efeito do níquel na mamona, especialmente, no crescimento radical, este trabalho foi realizado com os

seguintes objetivos: (i) determinar a localização de níquel nos tecidos de raízes e de folhas; (ii) avaliar o efeito deste metal nas mudanças anatômicas e (iii) avaliar a influência do níquel no transporte de outros nutrientes (Cu, Fe, Zn). Esta etapa do trabalho foi desenvolvida no departamento Botânica e Evolução de Plantas na Universidade de Bochum, e no Instituto para Ciências Analíticas (ISAS), ambos na Alemanha.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo e procedimento de coleta

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade de Bochum, Alemanha. A temperatura mantida durante o cultivo foi de $24 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa $70 \pm 4\%$ sob condições de luz natural. As sementes (coletadas na área do depósito de cinza em São Jerônimo) foram germinadas em areia e após 21 dias as plântulas foram transferidas para frascos contendo um litro de solução nutritiva modificada de Hoagland (conforme descrito no capítulo III). Após duas semanas de adaptação na solução, o níquel foi adicionado na forma de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ nas concentrações de 0 (controle), 30 e 60 μM . Na figura 1 é possível observar o cultivo das plantas. Até 20 dias de cultivo, a solução foi substituída a cada oito dias. A partir deste período, em função do crescimento das plantas, a solução foi substituída a cada três dias.

As plantas, quatro de cada tratamento, foram coletadas aos 8, 16, 24 e 40 dias e foram separadas em raiz, caule e folha. As folhas e caules foram lavados em água destilada. A lavagem das raízes foi realizada da seguinte forma: cinco enxágües em água destilada, 5 minutos em solução 20 mM de EDTA, e posteriormente novamente três enxágües em água destilada. Este procedimento foi adotado para permitir a retirada do níquel adsorvido a superfície das raízes, segundo Cosio et al. (2005).



Figura 1. Sistema de cultivo utilizado no experimento.

Análises

(a) Crescimento radical

Como o objetivo de monitorar o efeito do níquel no crescimento das raízes, foram feitas medidas do crescimento das raízes. Entretanto, neste experimento não foi possível utilizar esta variável devido ao grande volume do sistema radical da mamona. As raízes, especialmente a pivotante e as laterais de primeira ordem, emitidas antes da exposição ao níquel, tiveram seu crescimento alterado em função do espaço do recipiente (vaso). Por isso, embora tenham sido feitas medidas do comprimento das raízes nos primeiros períodos de coleta, os valores foram muito variáveis não possibilitando a análise dos mesmos.

(b) Quantificação do conteúdo de metais pesados

Para a quantificação do conteúdo de metais (Ni, Cu, Fe e Zn), 0,2 g de material seco foi digerido com 6 ml de uma mistura de $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}_2$ (5:1) em sistema de vasos fechados em microondas (Anton Paar, Austria). O programa utilizado para a digestão foi 10 min de aquecimento em 800 W (temperatura máxima 200 °C), 20 min em 800 W e 20

min para resfriamento do sistema. As amostras digeridas foram completadas com água Milli-Q para 50 ml e analisadas em ICP-MS - espectrofotômetro de massa com plasma indutivamente acoplado usando curva interna de calibração com Rh (10 ng ml^{-1}) com padrão interno.

A concentração de níquel foi determinada aos 8, 16, 24 e 40 dias de exposição, enquanto as concentrações dos outros metais (Fe, Cu, e Zn) foram determinadas somente aos 16 dias, período que iniciaram os sintomas de toxidez. Foram utilizadas quatro plantas por tratamento, para cada dia de coleta, determinando-se a concentração nas raízes, caule e folhas. Cada planta foi considerada uma repetição, totalizando 48 plantas no experimento.

(c) Localização de níquel em raízes e identificação de mudanças anatômicas

O níquel foi localizado nas raízes, utilizando-se uma solução de 1% de dimetilglioxima em uma solução de 1,5 % de NaOH contendo 0,05 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$, pH, 9.8 conforme Seregin et al. (2003). Esta solução não destrói os tecidos e pode ser armazenada por uma semana. Dimetilglioxima reconhece os íons de níquel com sensibilidade e seletividade. Este método permite a localização do níquel solúvel existente na amostra pela formação de uma coloração vermelho-amarronzada, devido à complexação do níquel com dimetilglioxima (Figura 2). Segundo Seregin et al. (2003), a formação de uma coloração visível é possível até a concentração mínima de 0,1 mM de níquel. O desenvolvimento da cor ocorre logo após a adição de dimetilglioxima, mantendo-se estável por até 15 min. Depois deste período, a intensidade da coloração diminui lentamente.

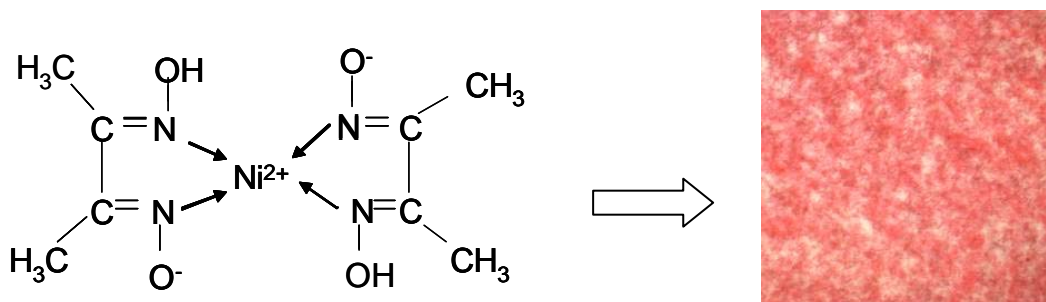


Figura 2. Complexo de níquel com dimetilglioxima (esquerda). Coloração vermelho-amarronzada do complexo formado com a adição de uma gota de dimetilglioxima em solução de níquel (direita).

Após 40 dias de exposição das plantas ao níquel, amostras das raízes secundárias (2 cm a partir do ápice radical) foram coletadas. Cortes transversais a partir do ápice foram manualmente obtidos, com auxílio de um pequeno micrótomo manual. Os primeiros 20 cortes transversais foram colocados em lâmina de vidro e duas gotas da solução de dimetilglioxima foram adicionadas sobre os cortes. Os cortes foram recobertos com lamínula de vidro e analisados em microscópio óptico (Axioplan-Zeiss, Alemanha). As fotomicrografias foram obtidas usando uma câmera digital (Color view) com auxílio do programa Analysis-Soft Image System.

Para análise das mudanças anatômicas, segmentos de 0-4 cm do ápice das raízes secundárias foram coletados aos 8, 16, 24 e 40 dias de exposição. Inicialmente foi utilizado somente um segmento de 1 cm a partir do ápice radical. Estas amostras foram fixadas em FAA 50, desidratadas em série isopropílica e incluídas em parafina. Uma série seqüencial de cortes a partir do ápice foi realizada em micrótomo rotativo (Zeiss, Alemanha). Os cortes transversais de 7 μ m de espessura foram corados com safranina e astrablau e montados em lâminas semipermanentes com Entellan. A análise dos cortes e a obtenção das fotomicrografias foram os mesmos descritos acima. As fotomicrografias de fluorescência foram obtidas utilizando o mesmo microscópio e a mesma câmera, entretanto com filtro G 365, FT 395 e LP 420.

(d) Localização de níquel nas folhas

Para localizar o níquel nas folhas, foi desenvolvido um novo método de análise utilizando-se espectrômetro de massa por ionização acoplado por plasma com femto-segundos laser ablação (ft-LA-ICPMS). A seguir são descritas, resumidamente, as principais etapas do método, conforme o fluxograma da Figura 3. A descrição detalhada do método é objeto de um artigo que está em preparação (Azzolini et al., em prep.).

Após a lavagem das folhas em água deionizada, uma parte de cada folha foi retirada e deixada secando ao ar. Após a secagem foram cortadas pequenas amostras de aproximadamente 1cm². Cada amostra foi fixada com uma fita carbônica, em uma pequena placa metálica. Esta placa foi introduzida na câmara de ablação equipada com uma câmera de vídeo. Após o ajuste da posição desejada da folha, o pulso de laser foi aplicado sobre a face adaxial da amostra, formando uma cratera. O pulso teve uma duração de aproximadamente $\tau \approx 120$ fs, com energia de $E \approx 0,8$ mJ/pulso, e comprimento de onda de $\lambda = 800$ nm. O material ablacionado pelo laser foi conduzido por fluxo de gás

para o espectrômetro de massa, onde a composição do material foi determinada. A forma e o volume da cratera feitos pelo laser foram analisados em microscópio óptico e eletrônico de varredura.

Devido à heterogeneidade da folha, o volume e a forma de cada cratera feita pelo laser na folha não é uniforme. Desta forma, a determinação da concentração de outro elemento com distribuição mais homogênea na folha é necessária para possibilitar a correção. Assumiu-se que o fósforo seria um elemento com distribuição mais homogênea na folha e foi utilizado como elemento de correção. Para melhor avaliar a eficiência do método, também determinou-se a concentração de magnésio. Sendo o magnésio o átomo central da clorofila, espera-se que o magnésio tenha uma distribuição diferenciada entre os tecidos das folhas em função da maior concentração de clorofila no parênquima paliçádico. Foram realizados dois experimentos para a localização do níquel na folha:

- Distribuição horizontal do níquel na lamina foliar. Para este experimento foi utilizada uma amostra de 1cm^2 . Nesta amostra foram traçadas quatro linhas e em cada linha foram feitos 10 pontos de ablação (crateras). A profundidade média das crateras a partir da epiderme adaxial foi $50\ \mu\text{m} \pm 10\ \mu\text{m}$. Os dados foram integrados possibilitando a construção dos mapas de distribuição. Para melhor avaliar o método, também foi feito o mapa de distribuição do magnésio.
- Localização do níquel nos tecidos. Neste experimento foram utilizadas duas amostras de 1cm^2 . Foram traçados (virtualmente) nove linhas, cada linha com 10 pontos. Nas primeiras cinco linhas, foi aplicado somente um pulso de laser em cada ponto, atingindo a profundidade média de $50\ \mu\text{m}$ a partir da epiderme adaxial. Foi possível observar que na maioria destes pontos a epiderme e uma porção do parênquima paliçádico foram ablacionados. Nas outras linhas foram aplicados dois pulsos consecutivos de laser de forma a atingir os tecidos mais profundos da lâmina foliar. Nestes pontos a profundidade média foi de $82,5\ \mu\text{m}$. Nas análises em microscópio de varredura, foi possível observar que os pulsos atingiram a epiderme adaxial, o parênquima paliçádico e parte do parênquima esponjoso. Calculou-se a concentração média para os pontos que receberam um pulso e os pontos que receberam dois pulsos, em cada amostra da folha.

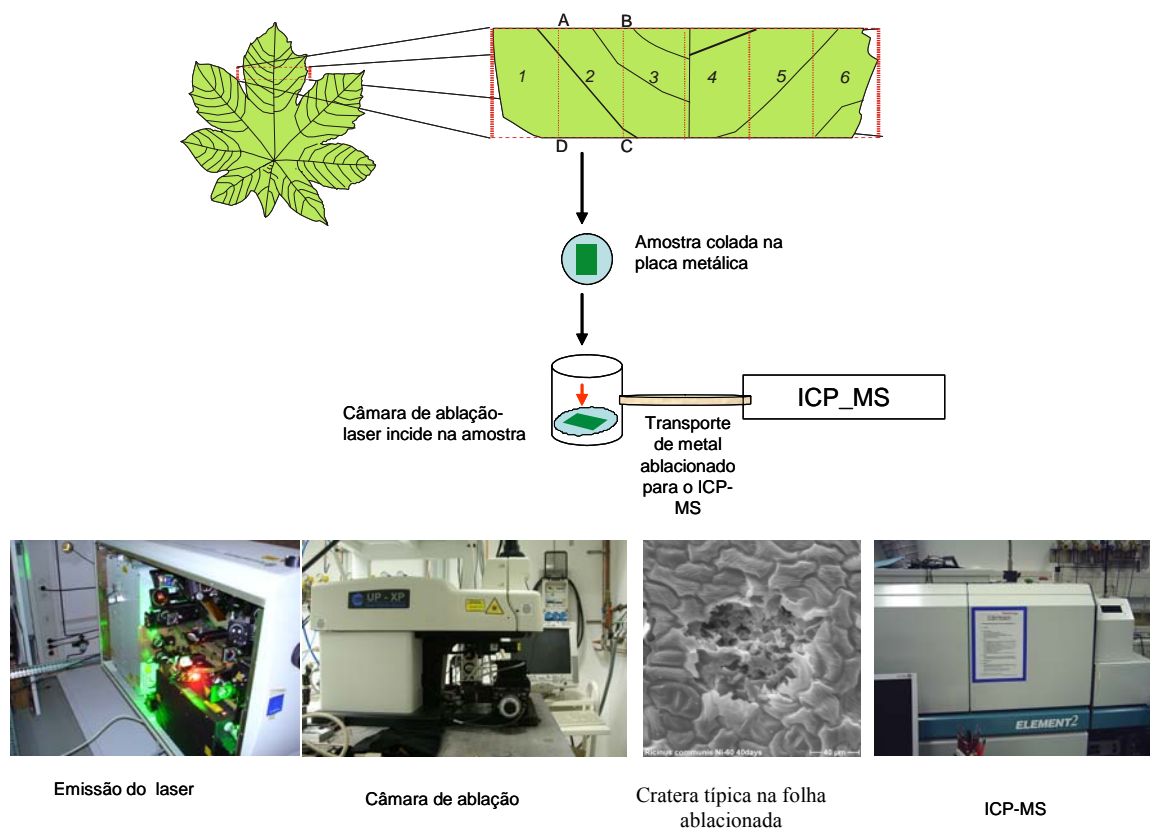


Figura 3: Na parte superior fluxograma para a determinação da localização de níquel em folhas de *R. communis* com o uso de ft-LA ICP-MS. Na parte inferior, fotos dos equipamentos utilizados para a determinação da localização de níquel na folha e da cratera (MEV) feita pelo laser na superfície em uma folha de *R. communis*.

Análise dos dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Fitotoxicidez de níquel

Sintomas de toxidez de níquel foram visualizados tanto no sistema radical quanto nas folhas das plantas expostas à concentração de 60 μM níquel (Figura 4 e 5). Os sintomas foram visualizados após 16 dias de tratamento. Inicialmente intensas manchas cloróticas foram visíveis, e após 24 dias foi possível visualizar o aparecimento de manchas necróticas entre as nervuras (Figura 4). Nas plantas expostas a 30 μM , não foi observado o aparecimento de manchas necróticas ou cloróticas.

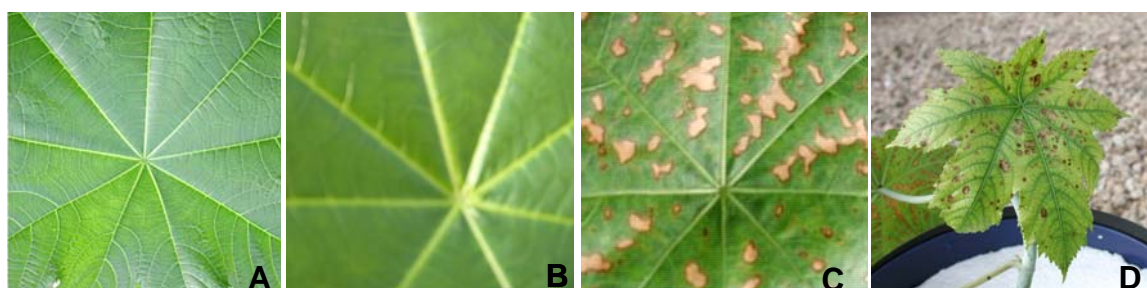


Figura 4. Sintomas de toxidez de níquel em folhas de *Ricinus communis*, após 40 de exposição a níquel. A- controle; B- Ni 30 μM ; C e D- Ni 60 μM .

Nas raízes, os sintomas de toxidez foram observados tanto nas plantas expostas a 30 μM como a 60 μM de níquel. Foi possível observar que o desenvolvimento das raízes, especialmente, das raízes laterais, foi negativamente afetado pelo níquel. Na concentração de 30 μM , as raízes laterais de terceira ordem tiveram o crescimento parcialmente reduzido, em comparação ao controle, enquanto na concentração de 60 μM o crescimento dessas raízes foi completamente inibido (Figura 5).

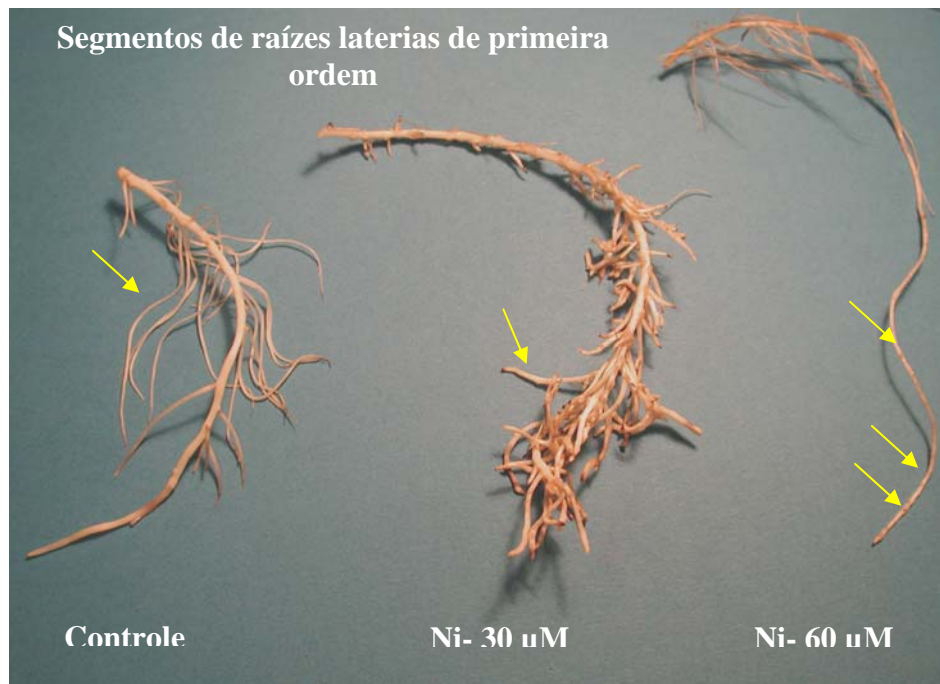


Figura 5. Efeitos do níquel no crescimento de raízes laterais de *R. communis* após 40 dias de cultivo em solução nutritiva. Setas indicam as raízes laterais nos segmentos das raízes secundárias.

Outro efeito observado, nas raízes das plantas expostas a 60µM de níquel, foi a emissão de raízes acima do nível da solução nutritiva (Figura 6). Estas raízes também tiveram o crescimento inibido quando entraram em contato com a solução nutritiva.

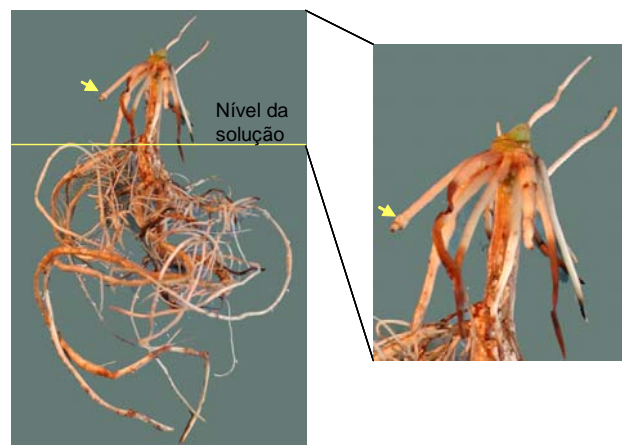


Figura 6. Emissão de raízes acima do nível da solução nutritiva em plantas de *R. communis* expostas a 60µM de Ni. Setas indicam danos nas raízes

Massa seca

A massa seca das plantas expostas a 60 μM de níquel foi significativamente menor que a massa das plantas mantidas no controle (Figura 7). Até 8 dias de exposição, as plantas expostas a níquel não mostravam diferenças visuais no crescimento em relação ao controle (Figura 8A), e a massa seca foi semelhante entre os tratamentos (Figura 7). Porém, a partir dos 16 dias, a massa seca das raízes e folhas das plantas expostas a 60 μM foi significativamente menor que a massa dos demais tratamentos. A maior diferença na massa seca entre os tratamentos foi observada aos 40 dias de exposição (Figuras 7 e 8B) Para o caule, as diferenças significativas foram observadas somente aos 40 dias, embora a massa das plantas expostas a 60 μM tenha sido menor que a dos demais tratamentos desde os 16 dias (Figura 7).

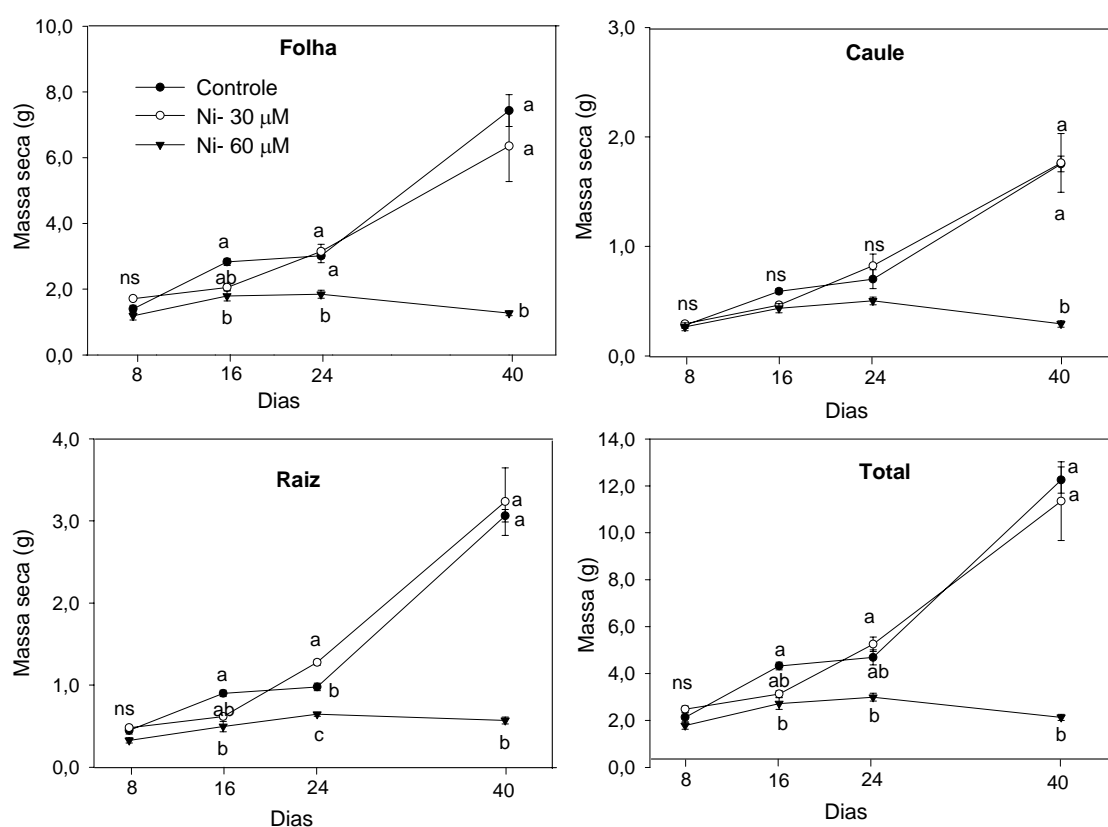


Figura 7. Massa seca de plantas de mamona exposta a diferentes concentrações de níquel. Médias que compartilham de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 % de significância. ns= (não significativo). Barras= (erro padrão da média). n= 4.

Aos 40 dias, as plantas expostas a Ni 30 μM não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. Observou-se a redução de somente (14%) da massa seca das folhas e um aumento de 0,5 % e 5,6 % da massa seca do caule e das raízes, respectivamente. Neste mesmo período a massa seca das folhas, caule e raízes das plantas expostas a 60 μM de níquel foi 83, 83 e 81 %, menor em relação à massa das plantas do controle, respectivamente. Na figura 8B observa-se o severo efeito tóxico da concentração de 60 μM de níquel no crescimento das plantas. As plantas neste tratamento tiveram intensa queda de folhas e pouca expansão da lâmina foliar.

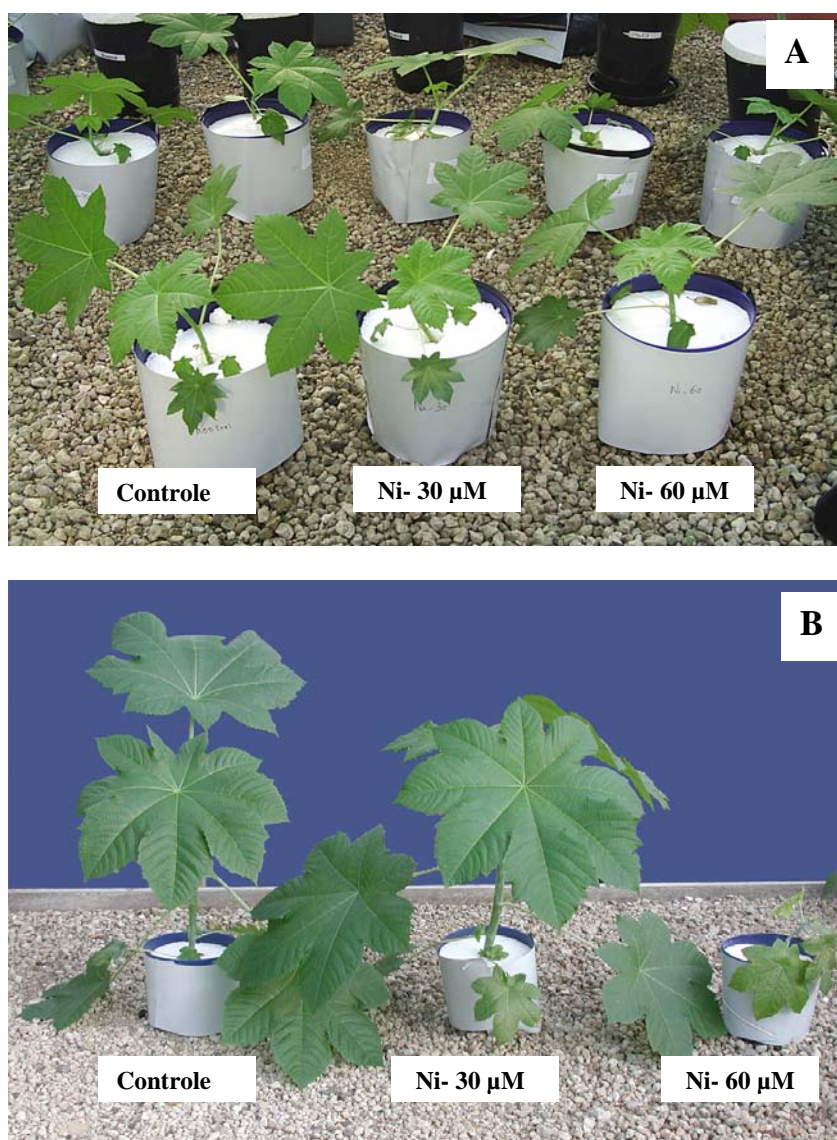


Figura 8. Plantas de *Ricinus communis* cultivadas em solução nutritiva com adição de níquel. (A)- 8 dias de exposição; (B) 40 dias de exposição.

Concentração de níquel e outros nutrientes

A concentração de níquel nas plantas do tratamento controle foi próxima a zero e foi significativamente menor que a concentração nas plantas expostas a níquel (Figura 9). As plantas expostas a níquel acumularam-no especialmente nas raízes. A concentração de níquel nas folhas e no caule das plantas expostas a níquel aumentou durante todo o período de observação. Nas raízes, a concentração de níquel das plantas expostas a 30 μ M manteve-se praticamente estável entre 16 e 24 dias. Nas plantas expostas a 60 μ M, observou-se uma redução da concentração de níquel entre 8 e 24 dias. Essa redução pode ter sido resultado da combinação de dois fatores: (i) baixo volume de solução, devido à frequência de troca insuficiente da solução; (ii) aumento do transporte para a parte aérea e menor capacidade de absorção pelas raízes. Observou-se que após 24 dias a concentração de níquel nas raízes das plantas expostas a níquel aumentou. Neste período a troca da solução foi realizada a cada três dias. Observou-se também que as concentrações de níquel no caule e nas folhas das plantas expostas a níquel aumentaram durante todo o período, o que indica que o transporte de níquel para a parte aérea foi mantido (Figura 9).

A concentração de níquel no caule das plantas expostas a níquel foi maior que a concentração na folha. Após 40 dias de exposição, a 30 e 60 μ M de níquel, a concentração de níquel nas folhas foi de aproximadamente de 88 e 200 μ g g⁻¹ e no caule foi de 122 e 226 μ g g⁻¹, respectivamente. Nas plantas expostas a 30 μ M, essas concentrações não causaram danos severos às plantas.

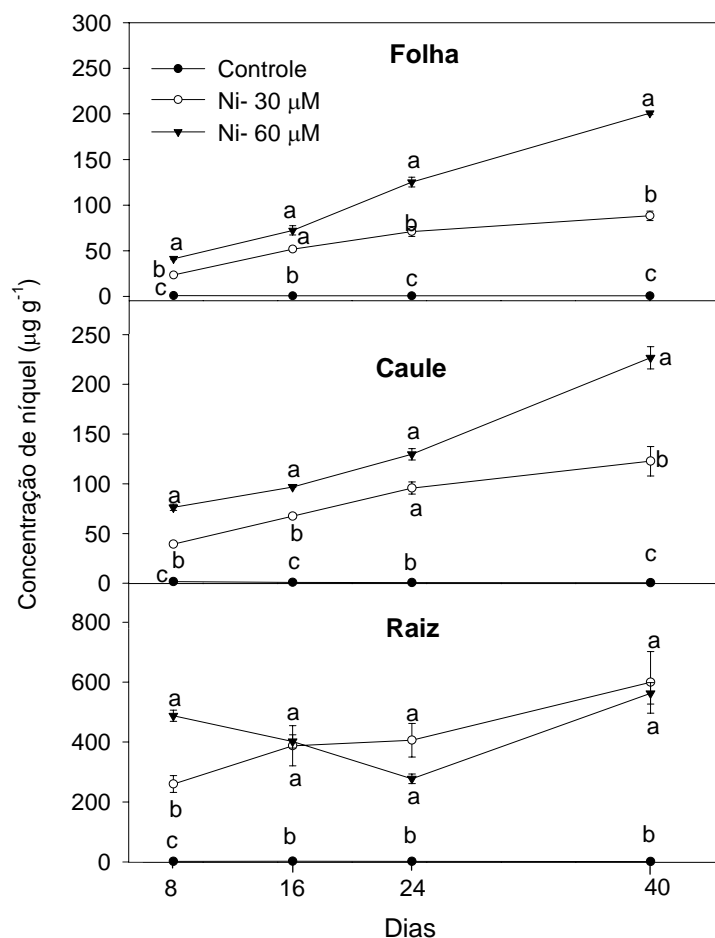


Figura 9. Concentração de níquel em plantas de *R. communis* cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de níquel. Médias seguidas da mesma letra (entre tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Barras= (desvio padrão da média). n= 4.

Para verificar a interferência do níquel na absorção e transporte de outros nutrientes, as concentrações de ferro, de cobre e de zinco foram analisadas aos 16 dias, período em que foram visualizados os primeiros sintomas de toxidez nas folhas (Figura 10). As plantas expostas a 60 µM de níquel apresentaram reduções do transporte de cobre e zinco para a parte aérea. As plantas mantidas neste tratamento mostraram reduções significativas das concentrações de Cu e Zn na parte aérea, em relação ao controle. O ferro parece que foi acumulado nas raízes das plantas expostas a 60 µM de níquel, mas nas folhas observou-se pouca variação em relação ao controle. A concentração foliar de ferro das plantas expostas a 30 µM foi significativamente maior do que as concentrações observadas nas folhas das plantas expostas a 60 µM (Figura 10).

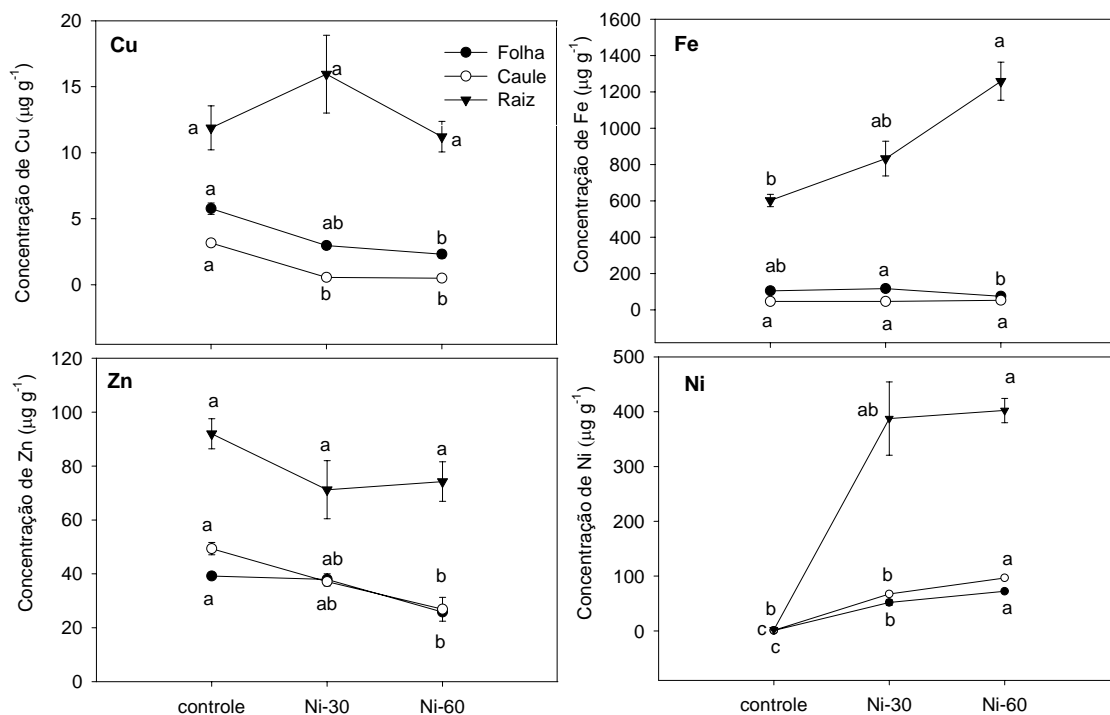


Figura 10. Concentrações de micronutrientes em raízes, caules e folhas de *R. communis* cultivadas em solução nutritiva com diferentes concentrações de níquel. Médias seguidas de mesma letra (entre tratamentos) não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância. Barras = desvio padrão da média. n= 4, exceto para ferro n= 3.

Alterações anatômicas e localização de níquel em raízes de R. communis

Após 8 dias de exposição ao níquel, as raízes não mostraram sintomas visuais de toxidez, porém alterações anatômicas foram verificadas. Neste período as plantas expostas a 60 μM de níquel apresentaram maior espessamento da endoderme o que não foi visualizado nos demais tratamentos, para a mesma região da raiz, dificultando então, a localização da endoderme nos cortes (Figura 11).

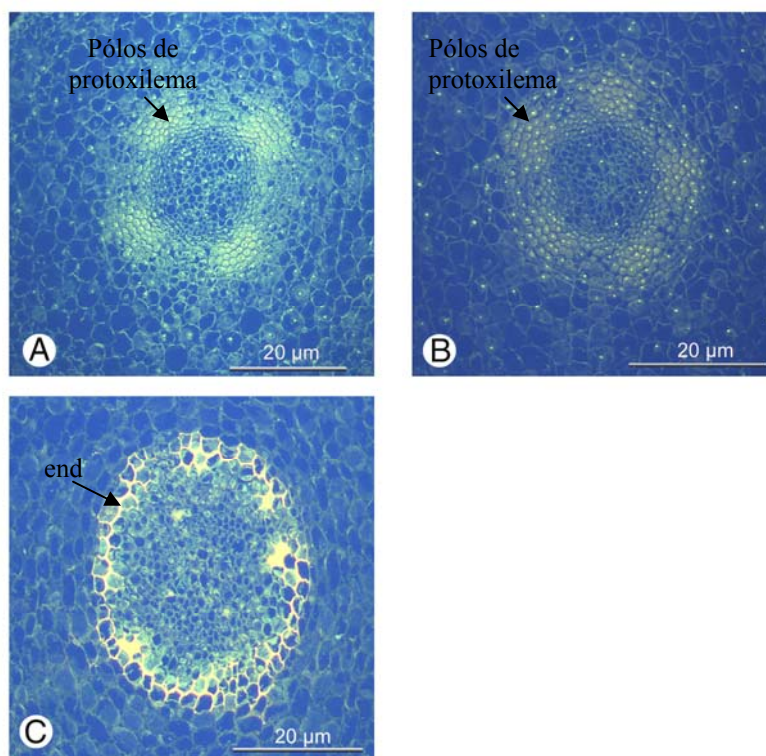


Figura 11. Cortes transversais da região meristemática de raízes laterais primárias de plantas de *R. communis* após 8 dias de exposição em diferentes tratamentos com níquel: (A)- Controle, (B)- Ni- 30 μM e (C)- 60 μM . end= endoderme.

As raízes expostas a níquel 60 μM parecem ter apresentado metabolismo mais acelerado, resultando em diferenciação mais rápida das células em relação às plantas mantidas no controle ou expostas a 30 μM de níquel. Na figura 12 observa-se que as raízes das plantas expostas a 60 μM apresentam células mais desenvolvidas (diferenciadas) com núcleos menos aparentes. Neste tratamento, os elementos vasculares, especialmente de xilema, mostraram-se diferenciados, enquanto que nos demais tratamentos somente os pólos de protoxilema são visíveis. Importante salientar que os cortes foram obtidos na mesma distância do ápice da raiz (300 μm).

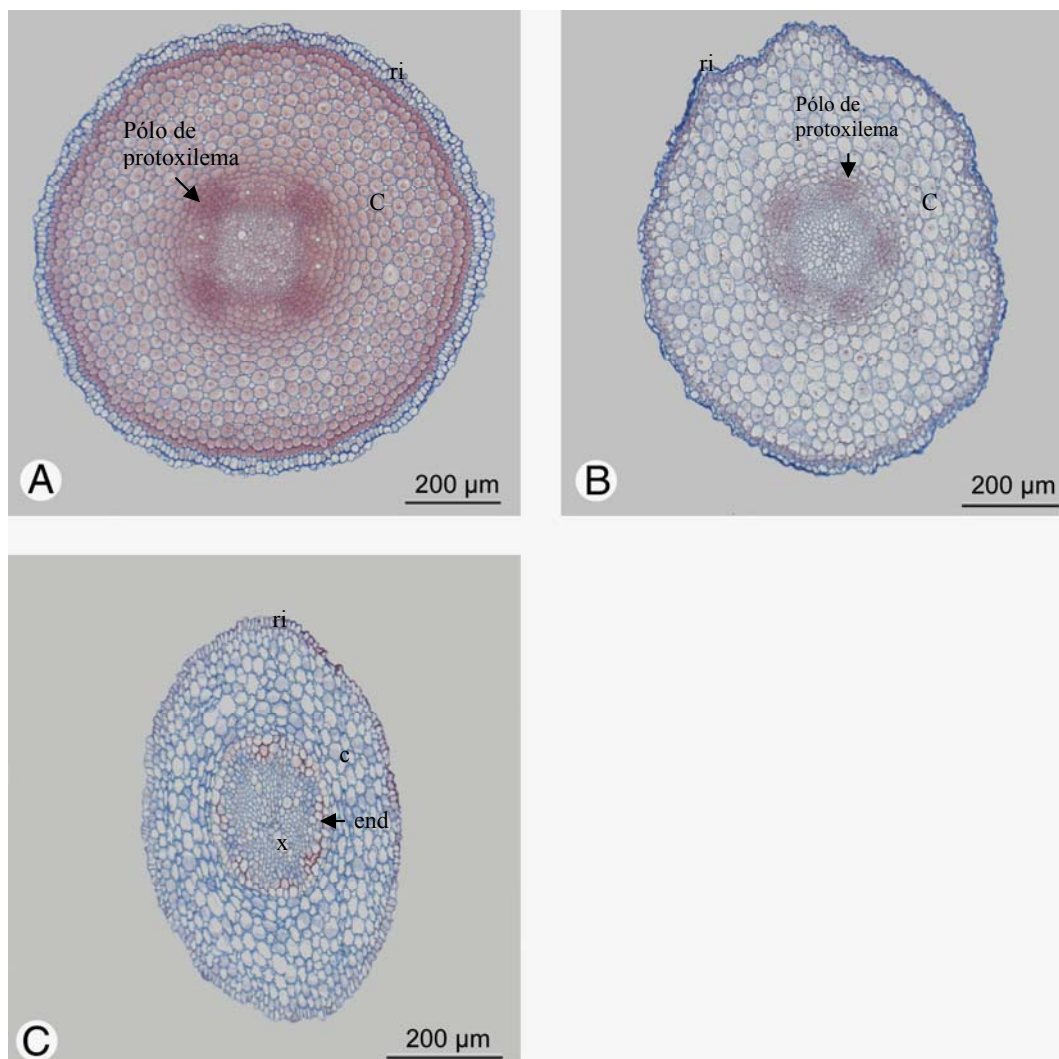


Figura 12. Corte transversal de raízes laterais primárias de *R. communis* cultivadas durante 8 dias em solução nutritiva com diferentes concentrações de níquel. (A)- controle; (B)- Ni-30 μM ; (C)- Ni 60 μM . ri-rizoderme; end-endoderme; x- xilema; c- córtex.

Após 40 dias de exposição aos tratamentos, foram feitas as análises para a localização do níquel. O método utilizado permitiu a localização deste elemento nas raízes das plantas expostas a 60 μM (Figura 13). Nas raízes das plantas expostas a 30 μM observou-se mudança na coloração em relação ao controle; no entanto, a coloração desenvolvida não foi intensa e foi homogênea em todo o corte, não permitindo localizar o níquel (Figura 13 C-D). Na região intercelular das células parenquimáticas do córtex, observou-se uma coloração mais intensa indicando maior concentração de níquel neste espaço (Figura 13 E). Na região do cilindro central o níquel parece estar amplamente distribuído nos tecidos vasculares. Na figura 13 F, observa-se um detalhe das células

parenquimáticas da região do córtex. É possível visualizar que o níquel está tanto no espaço intercelular como internamente nas células.

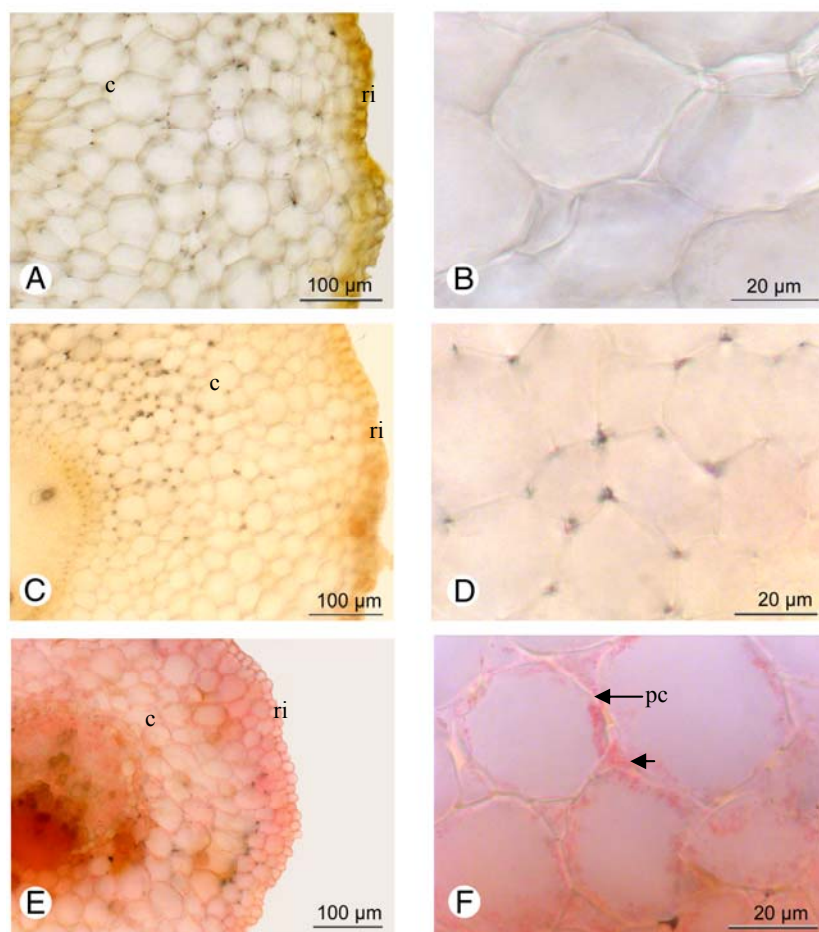


Figura 13. Cortes transversais de raízes laterais primárias de *R. communis* cultivadas em solução nutritiva durante 40 dias. Secções anatômicas, coradas com dimetilgloxima 1%. (A-B)- controle; (C-D)- Ni-30 µM e (D-F)- Ni-60 µM. ri- rizoderme; c córtex; pc- parede celular.

Nas plantas expostas a 60 µM de níquel, foi observado o desenvolvimento de coloração vermelha intensa nos primórdios radiculares de raízes laterais de segunda ordem, indicando forte acúmulo de níquel nesta região (Figura 14 B e C).

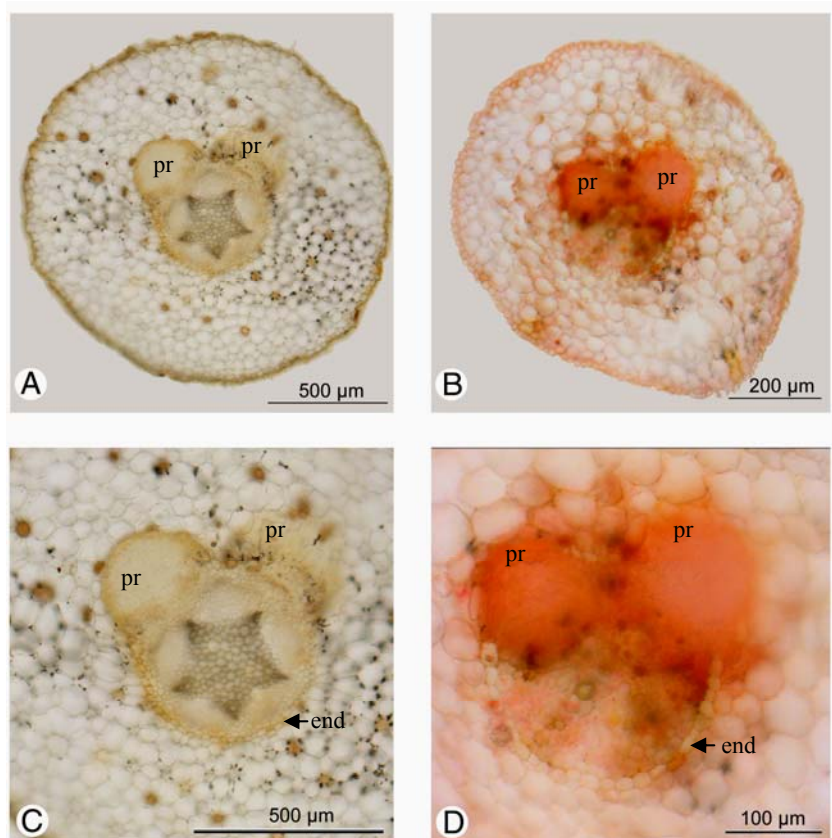


Figura 14. Cortes transversais de raízes laterais primárias de *R. communis* cultivadas em solução nutritiva durante 40 dias, Secções anatômicas, coradas com dimetilglioxima 1%. (A-C) Controle; (B-D) Ni-60 μM . pr- primórdio radical; end- endoderme.

Na figura 15, observa-se o desenvolvimento de uma raiz lateral de segunda ordem. O níquel não interferiu na emissão da raiz, mas esta tem seu crescimento paralisado, como mostrado na figura 5. Observa-se o acúmulo de níquel no ápice do primórdio da raiz. Observa-se também a concentração de níquel na rizoderme e na endoderme.

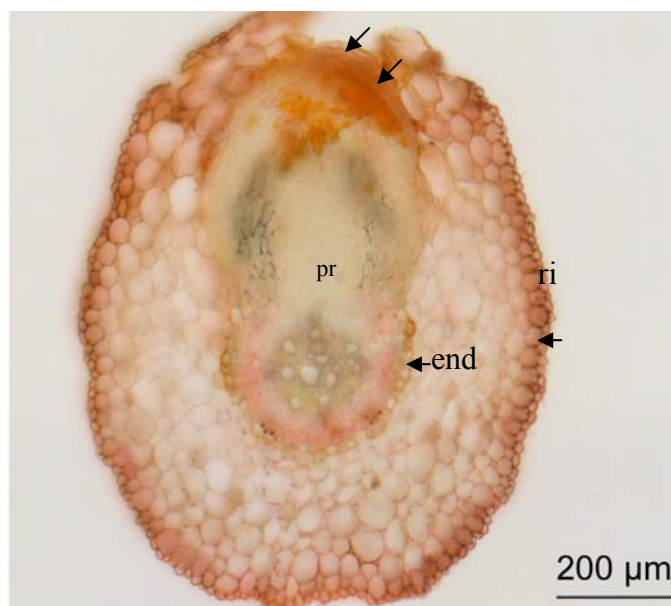


Figura 15. Corte transversal de raiz lateral de primeira ordem de *R. communis*, exposta a 60 μM de níquel, mostrando a distribuição do níquel em todos os tecidos e no primórdio de uma raiz lateral de segunda ordem. ri- rizoderme; end- endoderme; pr - primórdio radical.

A análise de localização de níquel nas folhas mostrou que o mesmo está presente em todos os tecidos da folha. Na figura 16, observa-se que o níquel ocorreu independente da profundidade da folha, ou seja, o níquel pode ser encontrado na epiderme, e nos tecidos do mesofilo. Comparativamente, o Mg mostrou uma tendência de redução da concentração em função da profundidade da folha (Figura 16). O que era de certa forma esperado, já que grande parte dos cloroplastos, logo, da clorofila é localizada no parênquima paliádico em relação ao parênquima esponjoso.

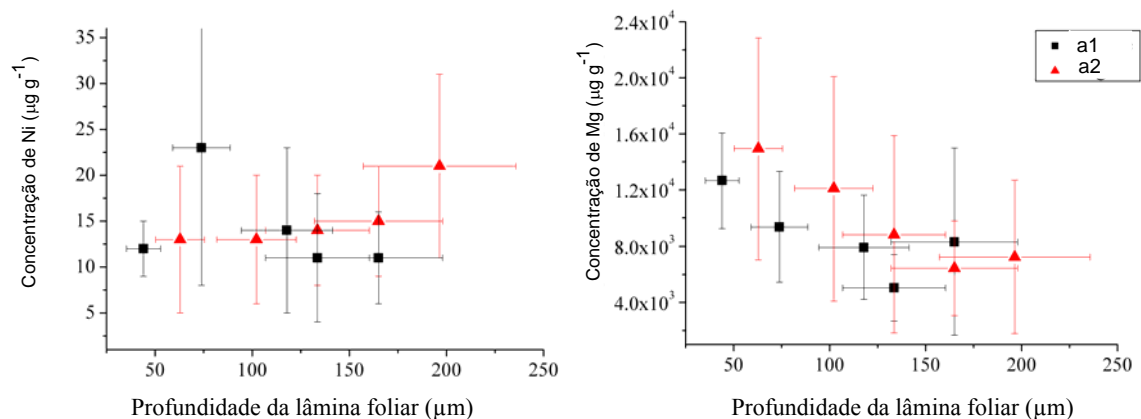


Figura 16. Distribuição de níquel e magnésio em diferentes tecidos foliares de *R. communis* obtida por ft- LA ICP-MS. Valores médios obtidos em duas amostras (a1 e a2) com diferente seqüência de ablação com laser a partir da face adaxial da lâmina foliar.

Considerando a distribuição horizontal do níquel na lâmina foliar, observou-se que a distribuição do níquel é heterogênea (Figura 17) na folha. Não foi possível estabelecer uma relação entre os pontos de maior concentração de níquel com alguma característica da folha. A hipótese de que nas áreas necrosadas haveria maior concentração de níquel não foi confirmada pela análise. Observa-se que na linha três os pontos 3 e 4 estão localizados em uma área necrosada da folha, porém o gráfico mostra uma elevada concentração de níquel somente no ponto 3 (Figura 17). Outro ponto com elevada concentração de níquel foi o ponto 8 da linha 4. Este ponto está localizado próximo à nervura central, mas o ponto 9 está localizado sobre a nervura e não apresenta uma concentração elevada (Figura 17). É possível que diferentes fatores determinem a concentração de níquel em alguns pontos na folha. Neste experimento não foi possível estabelecer algum fator que determina ou está associado com concentrações mais elevadas de níquel em determinado local na folha.

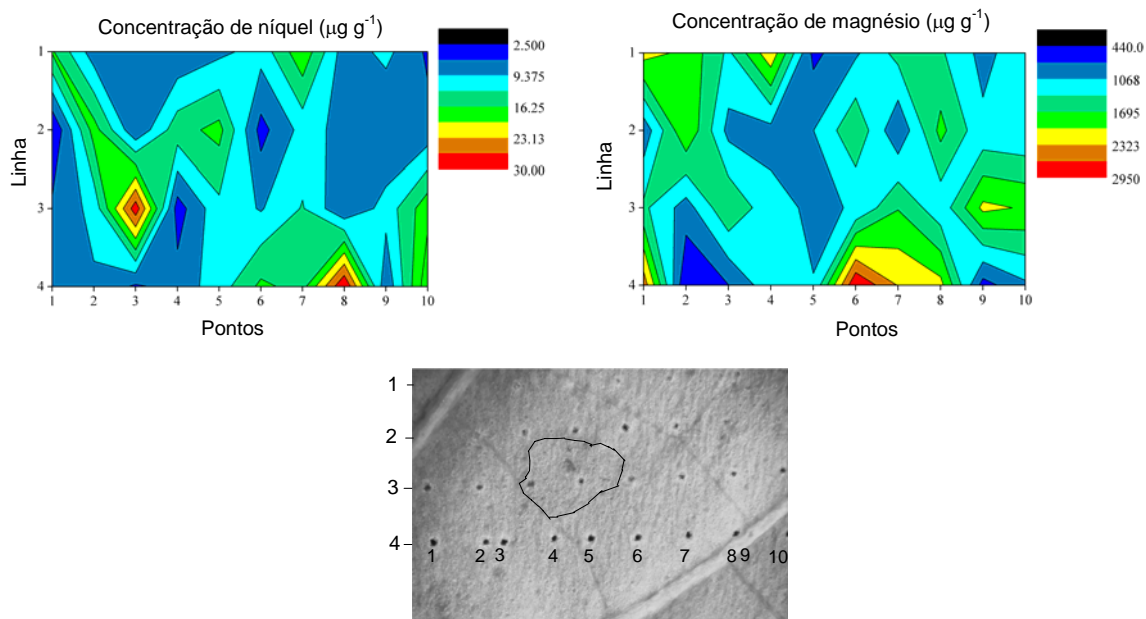


Figura 17. Distribuição horizontal (superfície adaxial) de níquel e magnésio em folhas de *R. communis* cultivadas em 60µM durante 40 dias.

DISCUSSÃO

O aumento do tempo de exposição não causou danos severos às plantas expostas a 30 µM de níquel, não apresentando diferenças significativas de massa seca em relação ao controle, aos 40 dias de exposição. Por isso considerou-se que esta concentração não é fitotóxica para *R. communis*, confirmando os dados observados no capítulo III. Comparativamente, plantas de *Lactuca sativa* L (Heikal et al., 1989) e *Phaseolus vulgaris* L. (Piccini & Malavolta, 1992) tiveram perdas semelhantes de massa quando expostas a concentrações menores de níquel, 10 µM e 17 µM, respectivamente. Por outro lado, a concentração de 60 µM de níquel causou danos severos às plantas. Estes danos se intensificaram com o aumento do tempo de exposição das plantas ao níquel. Observou-se que, embora tenha ocorrido redução na concentração de níquel nas raízes, entre 8 e 24 dias nas plantas expostas a 60 µM de níquel, a concentração no caule e nas folhas continuou aumentando e os sintomas de toxidez foram mais intensos. O que mostra que aumento da concentração de níquel na parte aérea é determinante para o aumento do efeito tóxico nas plantas

O efeito tóxico do níquel levou a reduções significativas da massa seca das plantas. Porém, no capítulo III mostramos que a exposição da mamona a 60 μM de níquel causou uma redução de 58 % na massa seca após 12 dias de exposição. No presente experimento, até os 16 dias as perdas foram menores (37%). Isto possivelmente ocorreu porque no primeiro trabalho as temperaturas foram mais elevadas (acima de 27 °C) que as utilizadas no presente experimento, resultando em um metabolismo mais acelerado com maior absorção em menor tempo de exposição e, conseqüentemente, maior dano à planta. Em *Avena sativa*, Aschmann & Zasoski (1987) verificaram que a máxima absorção de níquel em função da temperatura ocorre entre 23 e 30 °C. Segundo os autores, a absorção metabólica de níquel é maior que a absorção passiva; portanto, alterações no metabolismo modificam a quantidade de metal absorvida.

As reduções no crescimento da parte aérea das plantas associada com a toxidez de níquel são geralmente sugeridas como efeito direto e indireto do níquel (Kopittke et al., 2007). A deficiência de micronutrientes, especialmente de ferro, induzida pelo excesso de níquel tem sido observada por outros autores em diferentes espécies (Parida et al., 2003; Rahman et al., 2005; Kopittke et al., 2007). No presente estudo foram observadas concentrações limitantes de cobre, zinco e ferro nas folhas de *R. communis* expostas a níquel. Na figura 10, observou-se que, nas plantas expostas a 30 e 60 μM , a concentração de cobre foi inferior a 5 $\mu\text{g g}^{-1}$, a qual é considerada limitante (Kabata-Pendias, 2000). O cobre participa de inúmeras reações importantes; por exemplo, no transporte de elétrons durante a fase fotoquímica da fotossíntese e na respiração mitocondrial. Atua também como co-fator de muitas enzimas, por exemplo, Cu/Zn superóxido dismutase (SOD), citocromo c oxidase e polifenol oxidase (Marschner, 1995).

Quanto ao zinco, a concentração nas folhas (25,7 $\mu\text{g g}^{-1}$) das plantas expostas a 60 μM de níquel não é considerada limitante. Porém, esta concentração foi inferior à observada nas plantas mantidas no controle. O zinco é constituinte de várias enzimas, por exemplo, anidrase carbônica, e é requerido como co-fator de várias enzimas. As plantas de *R. communis* expostas a 60 μM de níquel também tiveram concentração foliar de ferro considerada limitante (75,1 $\mu\text{g g}^{-1}$). O ferro é componente de importantes enzimas envolvidas em reações redox, além de ser requerido para a síntese de proteínas ligadas a biossíntese de clorofila (Marschner, 1995). Embora deficiente nas folhas, a concentração de ferro nas raízes foi crescente com o aumento de níquel em solução, indicando que o transporte para a parte aérea foi reduzido. Resultados semelhantes são reportados por Piccini & Malavolta (1992) e Kopittke et al. (2007). Assim, a toxidez do níquel em

mamona está associada à deficiência induzida desses micronutrientes, especialmente na parte aérea. Segundo Mihucz et al. (2001) a inibição do níquel na absorção e transporte de outros nutrientes deve ser devido à competição do níquel tanto por locais de ligação em proteínas transportadoras quanto por proteínas transportadoras. Porém, pouco se sabe a respeito destes mecanismos, já que até o momento não são conhecidos transportadores específicos de níquel.

Embora as plantas de *R. communis* tenham sofrido severos danos quando expostas à maior concentração de níquel (60 μM), as plantas mostraram modificações que estão associadas à exclusão do transporte de íons para a parte aérea. As plantas expostas a 60 μM de níquel tiveram aumento do espessamento das paredes da endoderme já aos oito dias de exposição (Figura 11 C). O maior espessamento da endoderme em *R. communis* também foi verificada em plantas cultivadas em solução com 100 mM de NaCl (Schreiber et al., 2005). Os autores verificaram intensa deposição de suberina na endoderme das raízes. No mesmo experimento, plantas de *R. communis* cultivadas em solução com deficiência de nitrogênio mostraram pouca deposição de suberina na endoderme. Segundo os autores, a maior ou menor deposição de suberina é uma estratégia eficiente para o controle do transporte apoplástico de íons.

A função da endoderme como uma barreira ao transporte apoplástico é resultado da deposição de diferentes materiais na parede celular destas células. Dependendo das características da deposição de materiais na parede celular, a endoderme pode apresentar-se em três estados: estado I- quando as células apresentam deposição de suberina e/ou lignina nas paredes anticlinais formando uma faixa chamada de estria de Caspary; estado II- quando uma camada de suberina é depositada na parede primária da parede celular; e estado III- quando uma camada espessa de celulose é depositada entre a lamela de suberina e a membrana plasmática, ocorrendo ainda lignificação. O espessamento freqüentemente apresenta o formato de “U” (Esau, 1965).

Nas plantas expostas a 60 μM de níquel a endoderme parece apresentar-se em estado III. Diferentemente, Zeier et al. (1999) e Schreiber et al. (2005) observaram a endoderme em estado II em *R. communis*. Estes autores verificaram que a suberina foi o material predominante na composição da parede celular das células endodérmicas. Em *Allium cepa* e *Iris germanica* com espessamento em estado III, as paredes celulares foram basicamente compostas por deposição de celulose lignificada sem deposição de suberina (Zeier et al., 1999).

Embora seja conhecido que fatores ambientais podem levar ao maior espessamento da parede das células endodérmicas, os mecanismos pelos quais isto ocorre não são conhecidos. Trabalhos têm verificado que o níquel promove a síntese de lignina. Pandolfi et al. (1992), Diaz et al. (2001) e Gajewska et al. (2006) mostraram que concentrações tóxicas de níquel induzem a atividade extracelular de enzimas peroxidases que atuam na produção de compostos fenólicos, dentre eles a lignina. O aumento da síntese de lignina é indicado por estes autores como um mecanismo que serve para reduzir a permeabilidade das células das raízes. Recentemente, Mesjasz-Przybylowicz et al. (2007) sugeriram que plantas não hiperacumuladoras de níquel apresentaram composição diferente das estrias de Caspary em relação às plantas hiperacumuladoras e por isso, as primeiras seriam mais eficientes na exclusão do metal. No presente trabalho é possível que o níquel tenha induzido a síntese de lignina e, que esta tenha contribuído para o espessamento da endoderme. Porém, novos estudos são necessários para esclarecer estes mecanismos.

Segundo Barceló & Poschenrieder (2004), o aumento da suberização e da lignificação é uma das principais mudanças estruturais que diversos metais pesados causam no sistema radicular. Em raízes de milho, Degenhardt & Gimmler (2000) também verificaram mudanças no espessamento das células da rizoderme, da exoderme e da endoderme de plantas cultivadas em solo com adição de lodo de esgoto. No presente experimento, o espessamento da endoderme foi insuficiente para evitar o transporte de níquel para a parte aérea, porque com o maior tempo de exposição, as células tiveram danos estruturais. A concentração de níquel na parte aérea das plantas expostas a níquel, aumentou durante todo o período causando severos danos às mesmas. Porém, os efeitos poderiam ter sido mais drásticos se não tivesse ocorrido o espessamento da endoderme.

As análises de distribuição do níquel mostraram que nas raízes, após 40 dias de exposição a 60 μM o níquel estava presente em todos os tecidos. O níquel foi encontrado tanto no apoplasto quanto no simplasto. Porém, não foi possível identificar se a concentração apoplástica foi maior que a protoplasmática. Dados semelhantes foram obtidos por Seregin et al. (2003) em plântulas de milho. Estes autores observaram que após dois dias de exposição das plantas a 15, 30 e 35 μM de níquel, o mesmo foi encontrado em todos os tecidos da raiz. Porém, estes autores verificaram maior concentração de níquel protoplástico. Em mamona, a ampla distribuição de níquel nos tecidos das raízes mostra que os mecanismos de exclusão do níquel da parte aérea não são eficientes.

A alta mobilidade do níquel nas raízes também parece contribuir para a inibição do crescimento das raízes laterais. Segundo Seregin et al. (2003) a alta concentração de níquel na endoderme e nas células do periciclo é a causa da redução e/ou inibição da emissão das raízes laterais. Em mamona, também foi possível observar a presença de níquel nestes tecidos. Além disso, de forma inédita, observou-se o acúmulo de níquel nos primórdios das raízes laterais (Figura 14). Embora não seja possível afirmar o motivo para a maior concentração de níquel nesta região, nossa hipótese é de que as células desta região estão em intenso metabolismo e demandam mais recursos energéticos. Portanto, estas células funcionariam como dreno, favorecendo o deslocamento do níquel e de outros elementos nutricionais para esta região. Em mamona acredita-se que a presença de níquel na região meristemática (ápice) das raízes laterais seja a causa da paralisação do crescimento destas raízes. Na figura 15 observa-se que, embora o níquel esteja concentrado no ápice, a formação da raiz lateral não foi inibida. Porém, na figura 5 observa-se que as raízes terciárias não se desenvolveram além desta fase. Demchenko et al. (2005) observaram que o níquel não influencia o processo que leva as células do periciclo a reassumir os ciclos mitóticos para a formação das raízes laterais. A hipótese de que o acúmulo de níquel no ápice dos primórdios radiculares foi uma das causas principais que levou à inibição do crescimento das raízes laterais é reforçada pela observação de que a mamona emitiu raízes laterais acima do nível da solução (Figura 6). Estas raízes, porém, tiveram o crescimento paralisado quando entraram em contato com a solução. A emissão de raízes acima do nível da solução também foi observada em *Vigna unguiculata* L. (Kopittke et al., 2007).

O níquel pode inibir tanto a divisão celular quanto a expansão celular. Em plântulas de *Triticum aestivum* expostas a 100 μM de níquel (Demchenko et al., 2005), a redução no crescimento das raízes foi devido à diminuição na taxa relativa de expansão das células e à inibição do crescimento celular na direção acrópeta. As células da endoderme do periciclo e de outros tecidos do cilindro central mantiveram a capacidade de divisão, enquanto que na região meristemática ocorreu inibição da divisão celular na direção acrópeta. A diferenciação das células do metafloema e do xilema, bem como a formação dos primórdios das raízes laterais, foram iniciadas mais próximas ao ápice da raiz (Demchenko et al., 2005). Em mamona, também foi observado que a diferenciação do xilema ocorreu mais próxima ao ápice da raiz em relação às plantas controle e as expostas a 30 μM (Figura 12). Isto sugere que o níquel induz ao envelhecimento precoce dos tecidos.

Nas folhas o níquel também parece estar distribuído em todos os tecidos. Análise por espectrômetro de massa por ionização acoplado por plasma com femto-segundos laser ablação (ft-LA-ICPMS) mostrou que em folhas de *R. communis* o níquel está presente tanto na epiderme quanto no mesofilo (Figura 15). Possivelmente, a presença do níquel no mesofilo causou danos diretos no processo fotossintético, síntese de pigmentos e danos estruturais nas células, levando aos sintomas de toxidez observados nas folhas. A distribuição do níquel nas folhas de *R. communis* é bem diferente da observada em plantas hiperacumuladoras de níquel. Em folhas da espécie hiperacumuladora de *Thlaspi goesingense*, o níquel foi acumulado no vacúolo das células da epiderme (Küpper et al., 2001). Esta é uma forma eficiente, segundo os autores, de evitar que o níquel cause danos ao aparato fotossintético.

Considerando a distribuição horizontal do níquel na superfície adaxial da folha, observou-se que o níquel apresenta uma distribuição heterogênea (Figura 16). Alguns pontos na folha possuem elevadas concentrações de níquel. Não foi possível estabelecer nenhuma relação da presença de elevada concentração de níquel nestes pontos com alguma característica anatômica da planta. A distribuição de magnésio foi mais homogênea do que a do níquel.

Muitos dos trabalhos com níquel estão voltados à resposta de plantas a elevadas concentrações deste metal, já que o maior número de plantas hiperacumuladoras são conhecidas para níquel (Seregin & Kozhevnikova, 2006). Um menor número de trabalhos é concentrado nas respostas de plantas às concentrações moderadas de níquel e no entendimento dos mecanismos de toxidez. Este trabalho contribui para esclarecer as respostas da espécie *R. communis* ao níquel e mostra de forma inédita que a inibição do crescimento das raízes laterais está associada à elevada concentração de níquel na região meristemática, bem como, pela primeira vez, foi demonstrado o potencial de uso do ft-LA-ICPMS para a determinação de metais pesados em plantas.

CONCLUSÕES

Após 40 dias de exposição a 30 μM de níquel as plantas não apresentaram reduções significativas da massa seca em relação ao controle, o que permite considerar que esta concentração não é tóxica a mamona, o mesmo não podendo ser dito para concentrações de 60 μM de níquel.

Os dados obtidos neste capítulo permitem concluir que a mamona responde ao aumento da concentração de níquel na solução com o aumento do espessamento das paredes da endoderme. Esse espessamento é uma forma da planta restringir o transporte de metal para a parte aérea. Porém, possivelmente, o níquel causa dano à estrutura celular, o que leva à perda da capacidade de restrição de transporte e a concentração de níquel na folha aumenta. Os danos são severos na folha porque o níquel é amplamente distribuído nos tecidos fotossintéticos. A ampla distribuição do níquel nos tecidos radicais e, especialmente, o acúmulo na região meristemáticas das raízes em formação levam à inibição do crescimento das raízes laterais. Mas a capacidade das células do periciclo em reassumir as divisões celulares parece não ser afetada pelo níquel e a formação das raízes é mantida, porém estas não se desenvolvem, possivelmente porque o níquel é acumulado na região meristemática destas raízes.

A deficiência induzida de ferro e cobre nas plantas expostas a 60 μM permitem concluir que a toxidez do níquel é resultado da ação direta e indireta do níquel na planta, confirmando os dados obtidos no capítulo II.

Análise por espectrômetro de massa por ionização acoplado por plasma com femto-segundos laser ablação (ft-LA-ICPMS) mostrou ser uma técnica eficiente para a determinação da concentração de metais em plantas. Quanto à localização do metal em tecidos vegetais a técnica se mostra promissora. Porém, melhorias deverão ser feitas para aumentar a resolução espacial do equipamento para a localização com maior precisão os elementos de interesse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASCHMANN, S.G.; ZASOSKI, R.J. (1987). Nickel and Rubidium uptake by whole Oat Plants in solution culture. **Physiologie Plantarum**, 71: 191-196.
- AZZOLINI, M.; GUREVICH, L.; POLATAJKO, A.; PORTO, M.L.P.; STÜETZEL, T.; HERGENRÖDER, R. (*em prep.*). **Measurement of nickel distribution in leaves of *Ricinus communis* L. by means of femto-second LA-ICP-MS.**
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.H. (2004). Structural and ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. PRASAD, M.N.V.; HAGEMEYER, J. (eds). **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystem.** Berlin: Springer-Verlang. p.223-247.
- COSIO, C.; SANTIS, L.; FREY, B.; DIALLO, S.; KELLER, C. (2001). Distribution of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, 56: 765-775.
- DIAZ, J.; BERNAL, A.; POMAR, F. MERINO, F. (2001). Induction of shikimate dehydrogenase and peroxidase in pepper (*Capsicum annum* L.) seedlings in response to copper stress and its relation to lignification. **Plant Science**. 161: 179-188.
- DEMCHENKO, N.P.; KALIMOVA, I.B.; DEMECHENKO, K.N. (2005). Effect of nickel on growth, proliferation, and differentiation of root cells in *Triticum aestivum* Seedlings. **Russian Journal of Plant Physiology**, 52: 220-228.
- ESAU, K.(1965). Plant Anatomy. 2 ed.Singapore: Toppan Company LTD.767p.
- GAJEWSKA, E.; SKŁODOWSKA, M.; SLABA, M.; MAZUR, J. (2006). Effect of nickel on antioxidative enzyme activities proline and chlorophyll contents in wheat shoots. **Biologia Plantarum**, 50: 653-659.
- HEIKAL, M.M.D.; BERRY, W.L.; WALLACE, A.; HERMAN, D. (1989). Alleviation of nickel toxicity by calcium salinity. **Soil Science**, 147: 413-415.
- KABATA – PENDIAS, A. (2000). **Trace elements in soils and plants.** 3ed. Boca Raton: CRC Press. 413p.
- KOPITTKE, P.M.; ASHER, C.J. (2007). Toxic effects of Ni²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, 292: 283-289.
- KÜPPER, H.; KRONECK, P.M.H. (2007). Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K. (eds). **Metal Ions in Life Sciences.** New York: John Wiley & Sons, Ltd. v.2, p.31-62.
- KÜPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; WIESHAMMER, G.; MCGRATH, S.P. (2001). Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. **Journal of Experimental Botany**, 52: 2291-2300

- MARSCHNER, H. (1995). **Mineral nutrition of higher plants**. 2ed. London: Academic Press.
- MESJASZ-PRZYBYLOWICZ, J.; BARNABAS, A.; PRZYBYLOWICZ, W. (2007). Comparison of cytology and distribution of nickel in roots of Ni-Hyperaccumulating and non-hyperaccumulating genotypes of *Senecio coronatus*. **Plant and Soil**, 293: 61-78.
- MIHUCZ, V.G.; TATÁR, E.; VARGA, A.; ZÁRAY, G.; CSEH, E. (2001). Application of total-reflection X-ray fluorescence spectrometry and high-performance liquid chromatography for the chemical characterization of xylem saps of nickel contaminated cucumber plants. **Spectrochimica Acta**, Part B, 56: 2235-2246.
- PANDOLFINI, T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant, Cell and Environment**, 15: 719-725.
- PARIDA, B.K.; CHIBBA, I.M.; NAYYAR, V.K. (2003). Influence of nickel-contaminated soils on fenugreek (*Trigonella corniculata* L.) growth and mineral composition. **Science Horticultural**, 98: 113-119.
- PERALTA-VIDEA, J.R.; ROSA, G.; CONZALEZ, J.H.; GARDEA-TORRESDEY, J.L. (2004). Effects of the growth stage on the heavy metal tolerance of alfalfa plants. **Advances in Environmental Research**, 8: 679-685.
- PICCINI, D.F.; MALAVOLTA, E. (1992). Effect of nickel on two bean cultivars. **Journal Plant Nutrition**, 15: 2343-2350.
- RAHMAN, H.; SABREEN, S.; ALAM, S.; KAWAI, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in Barley plants grown in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**. 28: 393-404.
- SCHREIBER, L.; FRANKE, R.; HARTMANN, F. (2005). Effects of NO₃ deficiency and NaCl stress on suberin deposition in rhizo- and hypodermal (RHCW) and endodermal cell walls (ECW) of castor bean (*Ricinus communis* L.) roots. **Plant and Soil**, 269: 333- 339.
- SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D. (2006). Physiological role of nickel and its toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, 53: 257-277.
- SEREGIN, I.V.; KOZHEVNIKOVA, A.D.; KAZYUMINA, E.M.; IVANOV, V.B. (2003). Nickel toxicity and distribution in Maize roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, 50: 711-718.
- ZEIER, J.; GOLI, A.; YOKOYAMA, M.; KARAHARA, I.; SCHREIBER, L. (1999). Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. **Plant, Cell and Environment**, 22: 271-279.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A comunidade vegetal que se estabeleceu espontaneamente na área do depósito de cinza de carvão proporcionou rápida cobertura da área e permitiu o avanço da sucessão vegetal e, portanto, pode ser considerada como um bom modelo para iniciar a revegetação de áreas de depósito de cinza que vise à restauração ecológica. As diferenças químicas no substrato, observadas entre as áreas do depósito possivelmente foi resultado da contribuição do avanço da vegetação nestas áreas. Porém, este processo de melhoria da qualidade do substrato é lento e, possivelmente, por este motivo, não foi possível verificar claras tendências para os elementos estudados entre as áreas do depósito. Sabe-se que a vegetação contribui não só com a adição de matéria orgânica, que é fundamental para a melhoria química e física do substrato, mas é fundamental também para: (i) a redução do escoamento superficial, (ii) controle da temperatura da cinza e (iii) para o aumento da complexidade do sistema, devido às condições que oferece para a entrada de insetos e animais na área.

Dentro do processo de sucessão da comunidade estudada, a mamona mostrou ser uma espécie importante, pois é uma espécie arbustiva de rápido crescimento, contribuindo assim, para o rápido recobrimento da área. A queda constante das folhas possivelmente promove a reciclagem mais rápida de nutrientes e aumenta o conteúdo de matéria orgânica no solo. A elevada capacidade da espécie em ocorrer em faixas amplas de variações químicas do solo, como mostraram as análises de afinidade de ocorrência (cap. I), permite que a espécie ocorra em condições que não são favoráveis a outras espécies. Além disso, o rápido crescimento e o porte arbustivo são características importantes dentro do processo de sucessão da comunidade, porque promovem o controle do crescimento de gramíneas como *Cynodon dactylon*. As gramíneas são fundamentais no início da revegetação porque proporcionam a cobertura das cinzas. Porém, o crescimento das mesmas precisa ser controlado para que não ocorra uma predominância permanente destas espécies na área, o que impediria a sucessão vegetal (arbustivas- arbóreas)

Os resultados do capítulo II mostraram que em condições controladas o crescimento da mamona é severamente reduzido pela cinza, devido à falta de macronutrientes disponíveis. Isto afeta todo o metabolismo da planta levando a reduções significativas da fotossíntese. As concentrações dos metais pesados, níquel, chumbo, cobre e cromo presente nas cinzas não foram tóxicas para *R. communis*, porém as cinzas

causam o aumento da concentração destes elementos na mamona em relação às plantas cultivadas em solo. Diferente do esperado, a mamona, embora, apresente acúmulo de níquel especialmente nas raízes, não pode ser considerada hiperacumuladora, porque em concentrações foliares acima de $68 \mu\text{g g}^{-1}$ as plantas apresentam sintomas severos de toxidez que levam a uma redução superior a 50% da massa seca. Em relação ao cromo, o baixo índice de transporte apresentado pela mamona não levou a aumentos significativos deste elemento na parte aérea e, para as concentrações entre 10 e $90 \mu\text{M}$, a mamona não apresentou sintomas de toxidez.

Os resultados dos capítulos III e IV permitem concluir que o níquel interfere no processo fotossintético, causando danos nos pigmentos fotossintéticos, levando à perda da capacidade de captação e/ou transferência de energia para o centro de reação do fotossistema II. Os danos nos pigmentos fotossintéticos são causados tanto pela interferência do níquel no processo de transporte de elementos essenciais para a parte aérea, como ferro e cobre, quanto pelo efeito direto do níquel nestes pigmentos e possivelmente na desestabilização das membranas, já que o níquel foi encontrado no mesófilo foliar. O níquel em concentrações fitotóxicas acumula-se na região meristemática das raízes laterais e, por este motivo possivelmente causa paralisação das divisões celulares causando a inibição do crescimento das raízes.

As respostas de *R. communis* a níquel e a cromo sugerem que a espécie poderá atuar como fitoestabilizadora em locais onde as concentrações destes metais não sejam elevadas. Portanto, em áreas com cinza de carvão a mamona poderá ser utilizada promover a fixação destes elementos, evitando a saída dos mesmos por lixiviação, já que as concentrações de níquel e cromo na cinza não ultrapassam os limites fitotóxicos para a mamona.

Este trabalho procurou demonstrar que as observações de sistemas naturais podem servir de excelentes modelos para a formação de uma vegetação em áreas severamente degradadas, onde é necessária a implantação da vegetação, já que esta é completamente removida dos locais de depósito. Associado a isto, os estudos em condições controladas permitem identificar a função de determinada espécie dentro do sistema. No caso da mamona ficou claro que esta apresenta características importantes para sistemas de revegetação em função das características de crescimento e potencial de ocorrência em áreas com diferentes condições químicas. Embora não tenha apresentado capacidade de hiperacumulação dos metais pesados estudados, ela mostrou ser capaz de concentrar metais nas raízes, o que poderia contribuir para a fixação destes nas áreas. A rusticidade

da espécie, que é um aspecto importante para a revegetação, possivelmente é resultado das suas características genéticas: (i) que levam a alterações rápidas de estruturas, como foi observado no espessamento da endoderme; (ii) capacidade de neutralizar efeitos de fatores de estresse, por exemplo, via sistemas antioxidantes eficientes. Além disso, deve estar relacionado com possíveis associações com micorrizas. A falta de associação com micorrizas poderia ser uma das explicações que levaram à redução severa do crescimento da mamona quando esta foi cultivada em cinza em casa de vegetação.

Considerando os grandes incentivos que a atividade carbonífera vem recebendo recentemente, que levarão em um curto prazo a instalação de novas termelétricas no sul do Brasil, é incontestável que muitos esforços deverão ser feitos para evitar que esta fonte de energia seja responsável pela contaminação e degradação de extensas áreas. Acredita-se que a implantação de sistemas de revegetação, que sigam princípios mais ecológicos e não puramente técnicos, sejam fundamentais para que as áreas de depósito de cinza e de rejeito não se tornem apenas áreas de florestamento, que não cumprem a função de restauração do ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, S.F. (1973). **Recursos minerais no Brasil**. São Paulo: Edgar Blücher 2.v. 324p.
- ADRIANO, D.C.; PAGE, A.L.; ELSEEWI, A.A.; CHANG, A.C.; STRUGHAN, I. (1980). Utilization and disposal of fly ash and other coal residues in terrestrial ecosystems: a review. **Journal of Environmental Quality**, 9: 333-334.
- ADRIANO, D.C. (2001). **Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability and risks of metals**. 2º.ed. New York: Springer –Verlag. 886p.
- AKERS, D.; DOSPOY, R. (1994). Role of coal in control of air toxics. **Fuel processing Technology**. v. 39:73-86.
- ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J.M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. (2004). Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead and arsenic. **Review Environment Science Biotechnology**, 3: 71-90.
- ALLOWAY, B.J.; AYRES, D.C. (1996). **Schadstoffe in der Umwelt**. Berlim: Spektrum Akademischer Verlag.382p.
- ALLOWAY, B.J. (1995). **Heavy metal in soils**. 2º. ed. Glasgow: Blackie A&P. 368p.
- AMAZARRAY, M.T.M.R. (1985). Medida enzimática para a avaliação indireta de metais pesados. **6º Simpósio de Ecologia**. Porto Alegre. p.9.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA E ELETRICIDADE, ANEEL. (2003). **Atlas de energia elétrica** 2º ed. p. 119-126.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. (1987a). **Resíduos sólidos; classificação**: NBR 10004. Rio de Janeiro. 63p.
- (1987b). **Lixiviação de resíduos**: NBR 10005. Rio de Janeiro. 10p.
- (1987c). **Solubilização de resíduos**: NBR 10006. Rio de Janeiro. 2p.
- BAKER, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, 3: 643-654.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.H. (1990). Plant water relations as affected by metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, 13: 1-37.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C.H. (2004). Structural and Ultrastructural changes in heavy metal exposed plants. In: PRASAD M.N.V. 2º.ed.. **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**,. Indian:Springer-Verlang. p. 223-241.

- BENITO, Y.; RUIZ, M.; COSMEN, P.; MERINO, J.L. (2001). Study of leaches obtained from the disposal of fly ash from PFBC and AFBC processes. **Journal of Chemical Engineering**, 84: 167- 171.
- BINOTTO, R.B.; TEIXEIRA E.C.; SÁNCHEZ, J.C.D.; NAMMI, A.S., FERNANDES, I.D.; MIGLIAVACA, D.M. (1999). **Avaliação ambiental da Região do Baixo Jacuí: localização, descrição e caracterização dos resíduos provenientes das atividades de processamento de carvão**. Porto Alegre: FEPAM/CIENTEC. 40p.
- BLAYLOCK, M.J.; SALT, D.E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHAROVA, O.; GUSMAN, C.; KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B.D.; RASKIN, I. (1997). Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. **Environmental Science and Technology**, 31: 860-865.
- BRADSHAW, A.D. (1984). Ecological principles and land reclamation practice. **Landscape Planning**, 11: 35-48.
- BROWN, S. LUGO, A.E. (1994). Rehabilitatin of tropical lands: a key to sustaining development. **Restoration Ecology**, 2: 97-111.
- BROOKS, R.R. LEE, J.; REEVES, R.D.; JAFFRÉ, T. (1977). Detection of nickeliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants. **Journal of Geochemical Exploration**, 7: 49-77.
- BROOKS, R.R. (1998). Geobotany and hyperaccumulators. In: BROOKS, R.R. (ed). **Plants that hyperaccumulate heavy metals, their role in phytoremediation, microbiology, archeology, mineral exploration and phytomining**. Cambridge: CAB International. p. 55-94.
- BUGIN, A. (2002). Introdução à recuperação de áreas degradadas. In: Teixeira, E.C.; Pires, M.J.R. **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização. Cadernos de Planejamento e gestão Ambiental**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM. n.2, p 93-98.
- CALLAHAN, D.L.; BAKER, A.J.M.; KOLEV, S.D.; WEDD, A.G. (2006). Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 11: 2-12.
- CARLSON, C.L.; ADRIANO, D.C. (1993). Environmental impacts of coal combustion residues. **Journal of Environmental Quality**, 22: 227-247.
- CARSON, C.D.; FAMMING, D.S.; DIXON, J.B. (1982). Alfisols and ultisols with acid sulfate weathering features in Texas. In: KITTRICK, J.A.; FAMMING, D.S.; HOSSNER, L.R. **Acid sulfate weathering**. Madison: Soil Science Society America, p.127-146.
- CARDOSO, P.L.; GRATÃO, P.L.; GOMES-JUNIOR, R.A.; MEDICI, L.O.; AZEVEDO, R.A. (2005). Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 267-272.

- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB (2006) **Relação de áreas contaminadas no Estado de São Paulo**. Disponível em: (<http://www.cetesb.sp.gov.br>).
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB (2001). **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB. 232p. Disponível em: (<http://www.cetesb.sp.gov.br>).
- COMPANHIA DE GERAÇÃO TÉRMICA DE ENERGIA ELÉTRICA- CGTEE. (2007). **Carvão**. Disponível em :(<http://www.cgtee.gov.br/curiosidades/carvão.phd>).
- CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE – CONAMA. (2006). **Minuta de resolução CONAMA, que dispõe sobre o estabelecimento de critérios e valores orientadores referentes à presença de substâncias químicas, para a proteção da qualidade do solo s sobre as diretrizes e procedimentos para o gerenciamento de áreas contaminadas**. http://www.mma.gov.br/port/conama/cgt/gt.cfm?cod_g=134
- COSTA, S.; FRANK, E. M.; CITADINI-ZANETTE, V.; MENEZES, C. T. B.; LOPES, R. P; ZOCHE, J. J. (2006).Técnicas de recuperação ambiental e estudo de alternativas para uso futuro na área das bacias de decantação de finos carbonosos do lavador de capivari (LAVACAP), Capivari de Baixo (SC). **Revista de Tecnologia e Ambiente**, 1:1-2
- CHANEY, R.L. (1983). Plant uptake of inorganic waste. In: PARR, L.E.; MARSH, P.B.; KLA, J.M. (eds). **Land Treatment of Hazardous Wastes**. Park Ridge: Noyes Data Corp. p. 50-76.
- CHEUNG, K.C.; WONG, J.P.K.; ZHANG,Z.Q.; WONG, W.C.;WONG, M.H. (2000). Revegetation of lagoon ash using the legume species *Acacia auriculiformis* and *Leucaena leucocephala*. **Environmental Pollution**, 109: 75-82.
- CHOUDHURY, S.,; PANDA, S.K. (2004). Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Scwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity. **Water Air & Soil pollution**, 167: 73-90.
- CITADINI-ZANETTE,V. (1999). Diagnóstico ambiental da Região Carbonífera de Santa Catarina: recuperação de áreas degradadas pela mineração. **Revista de Tecnologia e Ambiente**, 5: 51-61.
- CLEMENS, S. (2001). Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, 212: 475-486.
- CLEMENS, S.; PALMGREN, M.G.; KRÄMER, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, 7: 309-315
- CLJISTERS, H.; ASSCHE, F.V; (1985). Inhibition of photosynthesis by metals. **Photosynthetica Research**, 7: 31-40.

- CRONQUIST, A. (1968). **The evolution and classification of flowering plants**. Boston: Houghton Mifflin Company.
- DAVIS, R.D.; BECKETT, P.H.T.; WOLLAN, E. (1978). Critical levels of twenty potentially toxic elements in young spring barley. **Plant and Soil**, 49: 395
- DE CANDOLLE, A.P. (1836). **Prodromus systematis naturalis regnis vegetabilis**. Paris: Argentorali & Londini., v.5. p.187-203.
- DJURDJEVIC, M.; MITROVIC, P.; PAVLOVIC, G.; GAJIE, O.; KOSTIC. (2006). Phenolic acids as bioindicators of fly ash deposit revegetation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 50: 488-495.
- DWIVEDI, S.; TRIPATHI, R.D.; SRIVASTAVA, S.; MISHARA, S.; SHUKLA, M.K.; TIWARI, K.K.; SINGH, R.; RAI, U.N. (2007). Growth performance and biochemical responses of three rice (*Oryza sativa* L.) cultivars grown in fly-ash amended soil. **Chemosphere**, 67: 140-151.
- EIDE, D.; BRODERIUS, M.; FETT, J.; GUERINOT, M.L. (1996). A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. **Proceeding of the Natural Academy Science**, 93: 5624-5628.
- ENGEL, V.L.; PARROTA, J.A. (2003). Definindo a restauração ecológica: tendência e perspectivas mundiais. In: KAGEYAMA, P.Y.; OLIVEIRA, R.E.; MORAES, L.F.D.; ENGEL, V.L.; GANDARA, F.B. **Restauração ecológica de ecossistemas naturais**. Botucatu: FEPAF, 340p.
- ERNEST, W.H.O. (1972). Ecophysiological studies on heavy metal plants in South Central Africa. **Kirkia**, 8: 125-146.
- FERRET, L.S.; CASTELLAN, J.L.; ENDRES, C.T.; MARTINELLI, S. (2002). Gaseificação e tratamento de efluentes. In: TEIXEIRA, E.C.; PIRES, M.J.R. **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização. Cadernos de Planejamento e gestão Ambiental**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM. n.2, p.480- 491.
- FONTQUER, P. (1979). **Plantas Medicinales- el dioscorides renovado**. 5º ed. Barcelona: Labor, 1979, p- 187-1888.
- FOY, C.D.; CHANEY, R.L.; WHITE, M.C. (1978). The physiology of metal toxicity in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, 29: 511-566.
- FREY, B.; KELLER, C.; ZIEROLD, K.; SCHULIN, R. (2000). Distribution of Zn in functionally different leaf epidermal cells of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Cell and Environment**, 23: 675-687.
- FURR, A.K.; STOEWESAND, G.S.; BACHE, C.A; GUTENMANN, W.H.; LISK, D.J. (1975). Multielement residues in tissues of guinea pigs fed sweet clover grown on fly ash. **Archives of Environmental Health**, 30: 244-248.

- GAIVIZZO, L.B.; VIDOR, C.; TEDESCO, J.M.; Recuperação de áreas utilizadas para depósitos de rejeitos de minas de carvão. In: Centro de Ecologia. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. **Carvão e Meio Ambiente**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. p.18-25.
- GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2006). Nickel elicits a antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, 44: 420-429
- GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2005a). Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, 32: 481-494.
- GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2005). Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology** 17: 53-64.
- GREGER, M. (2004). Metal availability, uptake, transport and accumulation in plants. In: Prasad, M.N.V. 2.ed. **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to Ecosystems**. India: Springer- Verlag. p.1-27.
- GROTZ, N.; FOX, T.; CONNOLLY, E.; PARK, W.; GUERINOT, M.L.; EIDE, D. (1998). Identification of a family of zinc transporter genes from *Arabidopsis* that respond to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy Sciences**, 95: 7220-7224.
- GUERRA, T. (2000). Geologia. In: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Biociências. Centro de Ecologia. **Carvão e Meio Ambiente**. Porto Alegre: UFRGS. p.18-25.
- GUPTA, D.K.; RAI, U.N.; TRIPATHI, R.D.; INOUHE, M. (2002). Impacts of fly-ash on soil and plant responses. **Journal of Plant Research**, 115: 401-409.
- GUPTA, D.K.; TRIPATHI, R.D.; RAI, U.N.; DWIVEDI, S.; MISHARA, S.; SRIVASTAVA, S.; INOUHE, M. (2006). Changes in amino acid profile and metal content in seeds of *Cicer arietinum* L (chickpea) grown under various fly-ash amendments. **Chemosphere**, 65: 939-935.
- GUPTA, A.K.; SINHA, S. (2007). Decontamination and/or revegetation of fly ash dykes through naturally growing plants. **Journal of Hazardous Materials (im press)**.
- HALL, J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, 53: 1-11.
- HAYDON, M.J.; COBBET, C.S. (2007). Transporters ligands for essential ions in plants. **New Phytologist**, 174: 499-506.
- HASSNEN, V.H.; TERVAHAUTA, A.I.; HALIMAA, P.; PLESSI, M.; PERÄNIEMI, S.; SCHAT, H.; AARTS, M.G.M.; SERVOMAA, K.; KÄRENLAMPI, S.O. (2007). Isolation of Zn-responsive genes from two accessions of the hyperaccumulator plant *Thlaspi caerulescens*. **Planta**, 225: 977-989.

- HEUMANN, H-G. (2002). Ultrastructural localization of zinc tolerant *Armeria maritime* ssp. *halleri* by autometallography. **Journal of Plant Physiology**, 159: 191-203.
- HÖRCSIK, Z.T.; KOVÁCS, L.; LÁPOSI, R.; MÉSZÁROS, I.; LAKATOS, G.; GARAB, G.(2007). Effect of chromium on photosystem II in the unicellular green alga, *Chlorella pyrenoidosa*. **Photosynthetica**, 45: 65-69.
- HOWARD-WILLIAMS C (1970). The ecology of *Becium homblei* in central Africa with special reference to metalliferous soils. **Journal of Ecology**, 58: 745-763.
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY- IEA. (2004). **World Energy Outlook**. <http://www.worldenergyoutlook.org>
- INTERNATIONAL ENERGY AGENCY- IEA. (2007). **World Energy Outlook**. <http://www.worldenergyoutlook.org>.
- IYER, R. (2002). The surface chemistry of leaching coal fly ash. **Journal of Hazard Materials B**, 93: 321-329.
- JALA. S.; GOYAL, D. (2006). Fly ash as a soil ameliorant for improving crop production-a review. **Bioresource Technology**, 97: 1136-1147.
- KABATA – PENDIAS, A. (2000). Trace elements in soils and plants 3^{ed}. Boca Raton: CRC Press. 413.
- KERVEB, L.; KRÄMER, U. (2003). The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. **Plant Physiology**, 131: 716-724.
- KHAN, A.G.; CHAUDURY, T.M.; HAYES, W.J.; KHOO, C.S.; HILL, L.; FERNANDEZ, R.; GALHARDO, P. (1998). Physical, chemical and biological characterisation of a steelworks waste site at ort Kembla, NSW Australia. **Water air soil Pollution**, 104: 389-402.
- KIM, S.; GUERINOT, M. (2007). Mining iron: uptake and transport in plants. **FEBS Letters**, 581: 2273-2280.
- KOCHIAN, L.V. (1995). Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. **Annual Review of Plant Physiology of Plant Molecular Biology**, 46: 237-260.
- KÖHL, K.K.; LÖSCH, R. Experimental characterisation of metal tolerance. In: PRASAD M.N.V. (ed). 2^{ed}. **Heavy metal stress in Plants from biomolecules to ecosystems**. Indian: Springer-verlang. p. 434-448.
- KOPITTKE, P.M.; ASHER, C.J. (2007). Toxic effects of Ni²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Soil**, 292: 283-289.
- KOZHEVNIKOVA, A.D.; SEREGIN, I.V.; BYSTROVA, E.I.; IVANOV, V.B. (2007). Effects of heavy metals and strontium on division of root cap and meristem structural organization. **Russian Journal of Plant Physiology**, 54: 257-266.

- KRÄMER, U.; COTTER-HOWELLS, J.D.; CHARNOCK, J.M.; BAKER, A.J.M.; SMITH, J.A.C. (1996). Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel. **Nature**, 379: 635-638.
- KRÄMER, U.; PICKERING, I.J.; PRINCE, C.R.; RASKIN, I.; SALT, D.E. (2000). Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. **Plant Physiology**, 122: 1343-1353.
- KRUPA, Z.; SIEDLEKA, A.; MAKSYMIEC, W.; BASZYNSKI, T. (1993). In vivo response of photosynthetic apparatus of *Phaseolus vulgaris* L. to nickel toxicity. **Journal of Plant Physiology**, 142: 664-668.
- KÜPPER, H.; KRONECK, P.M.H. (2005). Heavy metal uptake by plants and Cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K. (eds). **Metal Ions in Biological Systems**. Boca Raton: Taylor & Francis. v.44, p. 97-144.
- KÜPPER, H.; KRONECK, P.M.H. (2007). Nickel in the environment and its role in the metabolism of plants and cyanobacteria. In: SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R.K. (eds). **Metal Ions in Life Sciences**. New York: John Wiley & Sons, Ltd. v.2, p.31-62.
- KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. (1998). *In situ* detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. **Photosynthetica Research**, 58: 123-133.
- KÜPPER, H.; LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; WIESHAMMER, G.; MCGRATH, S.P. (2001). Cellular compartmentation of nickel in the hyperaccumulators *Alyssum lesbiacum*, *Alyssum bertolonii* and *Thlaspi goesingense*. **Journal of Experimental Botany**, 52: 2291-2300.
- KÜPPER, H.; ZHAO, F.; MCGRATH, S.P. (1999). Cellular compartmentalization of zinc in leaves of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, 119: 305-311.
- LASAT, M.M.; BAKER, A.J.M.; KOCHIAN, L.V. (1998). Altered zinc compartmentation in the root symplasm and stimulated zinc absorption into the leaf as mechanisms involved in Zn hyperaccumulation in *Thlaspi caerulescens*. **Plant Physiology**, 118: 875-883.
- LASAT, M.M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, 31: 109-120.
- LI, T-Q.; YANG, X-E.; YANG, J-Y.; HE, Z-L. (2006). Zn accumulation and subcellular distribution of Zn hyperaccumulator *Sedum alfredii* Hance. **Pedosphere**, 16: 616-623.
- LI, Y.; CHEN, J. (2006). Leachability of trace metals from sandy or rocky soils amended with coal fly ash. In: SAJWAN, K.; TWARDOWSKA, I.; PUNSHON, T.; ALVA, A.; **Coal combustion byproducts and environmental issues**. New York: Springer
- LIAO, M.T.; HEDLEY, M.J.; WOOLLEY, D.J.; BROOKS, R.R.; NICHOLS, M.A. (2000). Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L.cv. Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cv. Rony) plants grown

- in NFT system. I.Copper uptake and distribution in plants. **Plant and Soil**, 221:135-142.
- LIDON, F.C.; HENRIQUES, F.S. (1993). Changes in the contents of the photosynthetic electron carriers, RNase activity and membrane permeability triggered by excess copper in rice. **Photosynthetica**, 28: 99-108.
- LINSTOW, V. O. (1929). Bodenanzeigende pflanzen. Abh. Preuss. **Geology Land**, 114:1-105.
- MACNAIR, M.R.; BAKER, A.J.M. (1994). Metal tolerance in plants: Evolutionary Aspects. In: FARAGO, M.E. (ed). **Plants and Chemical Elements**. Weinheim: VCH. p 68-86.
- MACNAIR, M.R.(1993). The Genetics of Metal Tolerance in Vascular Plants. **New Phytologist**, 124: 541-559.
- MAHARAJ, S.; BARTON, C.; KOO, B.; NEWMAN, L. (2006). Phytoavailability of trace elements from a landfill containing coal combustion waste. In: SAJWAN, K.; TWARDOWSKA, I.; PUNSHON, T.; ALVA, A. **Coal combustion byproducts and environmental issues**. New York: Springer. p.195-202.
- MAITI, S.K.; NANDHINI, S. (2006). Bioavailability of metals in fly ash and their bioaccumulation in naturally occurring vegetation: A Pilot Scale study. **Environmental Monitoring and Assessment**, 116: 263-273.
- MALYUGA, D.P.; MALASHIRKINA, N.S.; MAKAROVAM A.I.(1959).Biogeochemical investigations at Kadzharan, Armenien SSR. **Geokmiya** 5.
- MALYUGA, D.P. (1964) **Biogeochemical methods of prospecting**. New York: Consultants Bureau, 205p.
- MARCOMIN, F.E.; PORTO, M.L. (1998). A ecologia de paisagem e o sistema de informações geográficas (GIS) na avaliação ambiental do Rio Tubarão, SC. **Episteme**, 5: 97-119.
- MARKERT, B. (1994). Plants as biomonitors- potential advantages and problems. In: ADRIANO DC, CHEN, Z.S.; YANG, S.S. (eds) **Biogeochemistry of trace elements**. Northwood: Science and Technology Letters. p. 601-613.
- MARSCHNER H (1995) Mineral nutrition of higher plants 2 ed. London: Academic Press.889p.
- MARTENSSON, A.M.; WITTER, E. (1990). Influence of various soil amendments on nitrogen fixing soil microorganisms in a long term field experiment, with special reference to sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, 22: 77-982.
- MARTINS, A.F. (2002). Elementos- traço em matrizes ambientais. In: TEIXEIRA, E.C.; PIRES, M.J.R. **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização**.

Cadernos de Planejamento e gestão ambiental Fundação Estadual de Proteção Ambiental- FEPAM. n.2 p. 229-233.

McBRIDE, M.B. (1994). **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University Press.406p.

McGRATH, S.P.; DUNHAM, S.; CORRELL, R.L. (2000). Potential for phytoextraction of zinc and cadmium from soils using hyperaccumulator plants. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (eds). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Boca Raton: CRC Press LLC. p.109-127.

MENDES, A.R.; ZOCHE, J. J.; ZOCHE, P. S. de.(2007). Solos construídos em áreas mineradas de carvão no sul de Santa Catarina e o cultivo de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae). In: 58 Congresso Nacional de Botânica, 2007, São Paulo. Resumos do 58 Congresso Nacional de Botânica. São Paulo, 2007. v.1.

MIGUZZI, C.; VERGANO, O. (1948). II contenuto di nichel nelle ceneri di *Alyssum bertolonii* Desv. **Memorie dagli Società Toscana di Scienze Naturali serie A**, 55: 49-79.

MINTER/IBAMA (1990). **Manual de recuperação de áreas degradadas pela mineração: técnicas de revegetação**. Brasília: IBAMA, 96p.

MINOZZO, M. (2006). **Avaliação da Contaminação das águas subterrâneas por cinzas de carvão na área da usina termelétrica de São Jerônimo, RS**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação). Porto Alegre. Instituto de Geociências. Departamento de Geologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 114p.

MITSIOS, I.K.; DANALATOS, N.G. (2006). Bioavailability of trace elements in relation to root modification in the rhizosphere. In: PRASAD, M.N.V.; SAJWAN, K.S.; NAIDU, R. **Trace elements in the environment: biogeochemistry, biotechnology, and bioremediation**. Boca Raton: CRC Taylor & Francis. p. 25-37.

MITTRA, B.N.; KARMAKAR. S.; SWAIN, D.K.; GHOSH, B.C. (2005). Fly-ash a potential source of soil amendment and a component of integrates plant nutrient supply system. **Fuel**, 84:1447-1451.

MONNET, F.; VALLIANT, N.; VERNAY, P.; COUDRET, A.; SALLANON, H.; HITMI, A (2001). Relationship between PS II activity, CO₂ fixation and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perene* under zinc stress. **Journal of Plant Physiology**, 158: 1137-1144.

MULHERN, D.W.; ROBEL, R.J.; FURNESS, J.C.; HENSLEY, D.L. (1989). Vegetation of waste disposal areas at a coal-fired power plant in Kansas. **Journal Environmental Quality**, 18: 285-292.

MYSLIWA-KURDIZEL, B.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. (2004). Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In Prasad M.N.V (ed), 2^o.ed. **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. Indian: Springer-verlang. p.147-181.

- NATUSCH, D.F.S.; WALLACE, J.R.; EVANS, C.A. Jr. (1974). Toxic trace elements: Preferential concentration in Respirable Particles. **Science**, 183: 202-204.
- NIEBOER, F.; RICHARDSON, D.H.S. (1980). The replacement of the non-descriptive term “ heavy metal” by a bilogically and chemically significant classification of metals ions. **Environmental Pollution Serie. B**, 1: 3-26.
- OSÓRIO, E.; VILELA, A.C.F. (2002). Utilização do carvão na siderurgia. In: TEIXEIRA EC.; PIRES, M.J.R. **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização. Cadernos de Planejamento e Gestão Ambiental**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM. n.2 p. 149-171.
- PAGE, A.L.; ELSEEWI, A.A.; STRAUGHAN, I.R. (1979). Physical and chemical propriets of fly ash from coal-fired power plants with reference to environmental impacts. **Residue Reviews**, 71: 83-120.
- PANDA, S.K. (2003). Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in *Taxithelium* sp. **Current Science**, 84: 631-633.
- PANDA, S.K.; COUDHURY, S. (2005). Chromium stress in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 95-102.
- PANDA SK, PATRA HK (2000). Does Cr (III) produces oxidative damage in excised wheat leaves. **Journal of Plant Biology**, 27: 105-110.
- PANDOLFINI. T.; GABBRIELLI, R.; COMPARINI, C. (1992). Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant, Cell and Environmment**, 15: 719-725.
- PARAMESWARAN, A.; LEITENMAIER, B.; YANG, M.; KRONECK, P.M.H.; WELTE, W.; LUTZ,G.; PAPOYAN, A.; KOCHIAN, L.; KÜPPER, H.(2007).A native Zn/Cd pumping P18 ATPase from natural overexpression in a hyperaccumulator plant. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 363: 51-56.
- PAVLOVIC, P.; MITROVIC, M.; DJURDJEVIC, L.; (2004). An ecophysiological study of plants growing on the fly ash deposits from the “ Nikola Testa-A” thermal power station in Serbia. **Environmental Management**, 33: 654-663.
- PICKERING, I.J.; PRINCE, R.C.; GEORGE, J.M.; SMITH, R.D.; GEORGE, G.N.; SALT, D.E. (2000). Reduction and coordination of arsenic in *Indiam mustard*. **Plant Physiology**, 122: 1171-1177.
- PILON-SMITS, E. (2005). Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**. 56: 16-38.
- PINTO, L.F.S. (1997). Potencial de acidificação e neutralização dos materiais geológicos para a composição do solo construído em áreas de mineração de carvão. Tese (Doutorado- em Ciência do solo) Faculdade de Agronomia, UFRGS.

- PIRES, M.; FIEDLER, H.; TEIXEIRA, E.C.; (2002). Distribuição geoquímica de elementos-traço no carvão. Utilização do carvão na siderurgia. In: TEIXEIRA EC.; PIRES, M.J.R. **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização. Cadernos de Planejamento e Gestão Ambiental**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental – FEPAM. n.2 p. 238-274.
- PUHSHON, T.; SEAMAN, J.C.; SAJWAN, K.S. (2003). The production and use of coal combustion products. In: SAJWAN, K.S.; ALVA, A.K.; KEEFER, R.F (eds.). **Chemistry of trace elements in fly ash**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. p.1-11.
- PLANK, C.O.; MARTENS, D.C. (1973). Amelioration of soil with fl-ash. **Journal of soil and water conservation**, 28: 43-48.
- PORTO, M.L. (1981). **Beiträge zur Schwermetallvegetation von Rio Grande do Sul, Brasilien**. Dissertação (Doutor der Naturwissenschaften). Ulm: Fakultät für Naturwissenschaften und Matematik der Universität Ulm. 76p.
- PORTO, M.L. (1986). Vegetação metalófila e o desenvolvimento do setor mineral. In: **1 Simpósio do Trópico úmido**. Belém: EMBRAPA-CPATU. v.II, p.171-183.
- PORTO, M.L. (1989 a). Plantas detectoras de metais. **Ciência Hoje**, 10: 8-9.
- PORTO, M.L. (1989 b). Tolerância ao cobre em ecótipo de *Schinus lentiscifolius* March (Anacardiaceae) de plantas de áreas mineradas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, 3: 23-31.
- PORTO, M.L. (2002). **Estudo complementar ao Diagnóstico ambiental da Usina Termelétrica de São Jerônimo**- CGTEE (documento não publicado).
- PRASAD, M.N.V. (2004). **Heavy metal stress in Plants from biomolecules to ecosystems**. 2.ed. Indian: Springer-Verlang, 461p.
- PRASAD, M.N.V. (2005). Nickelophilous plants and their significance in phytotechnologies. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 17: 113-128.
- PRASAD, M.N.V.; MALEC, P.; WALOSZEK, A.; BOJKO, M.; STRZALKA, K. (2001). Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (Duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. **Plant Science**, 161: 881-889.
- PSARAS, G.K.; CONSTANTINIDIS, T.H.; COTOSOPOULOS, B.; MANETAS, Y. (2000). Relative abundance of nickel in the leaf epidermis of eight hyperaccumulators: evidence that the metal is exclude from both guard cells and trichomes. **Annals of Botany**, 86: 73-78.
- RAM, L.C.; SRIVASTAVA, N.K.; JHA, S.K.; SINHA, A.K.; MASTO, R.E.; SELVI, V.A. (2007). Management of lignite fly ash for improving soil fertility and crop productivity. **Environmental Management**, 40:438-452.

- RASKIN, I.; SMITH, R.D.; SALT, D.E. (1997). Phytoremediation of metals: using plants to remove pollutants from the environment. **Current Opinion in Biotechnology**, 8: 221-226.
- RAHMAN, H.; SABREEN, S.; ALAM, S.; KAWAI, S. (2005). Effects of nickel on growth and composition of metal micronutrients in Barley plants grown in nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, 28: 393-404.
- RAUSER, W.E. (1999). Structure and function of metal chelatorss produced by plants. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 31: 19-48.
- RIGOTTI, N. (2002). Recuperação de áreas degradadas: estudo de caso. In: TEIXEIRA EC.; PIRES, M.J.R. **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização. Cadernos de Planejamento e Gestão Ambiental**. Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental- FEPAM n.2, p.99-113.
- RISSATO, A.O. (1982). Materiais alternativos para a construção civil a partir de resíduos do carvão. **Carvão, Informação e Pesquisa**, 5: 268-275.
- RESENDE, A.V.; KONDO, M.K. (2001). Leguminosas e recuperação de áreas degradadas. **Informe Agropecuário**, 22: 46-56.
- RODRIGUES, D.E.; R.F.O.; OLIVEIRA, F.; FONSECA, A.M. (2002). As folhas de Palma Christi - *Ricinus communis* L. Euphorbiaceae Jussieu. Revisão de conhecimentos. **Revista Lecta**, 20: 183-194.
- ROHDE, G.M. (1995) **Epistemologia das ciências ambientais as cinzas de carvão no baixo Jacuí, RS**. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre. Curso de Pós-graduação em Ecologia. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ROMEIRO, S.; LAGÔA, A.M.M.A.; FURLANI, P.R.; ABREU, C.A.; ABREU, M.F.; ERISMAN, N.M. (2006). Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, 18: 483-489.
- RÖMHELD, V.; MARSCHNER, H. (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosderopores in roots of grasses. **Plant Physiology**, 80: 175-180.
- SALT, D.E. (2001). Responses and adaptations of plants to metal stress. In: HAWKESFORD, M.J.; BUCHNER, P. (eds). **Molecular analysis of Plant Adaptation to the Environment**, p.159-179.
- SALT, D.E.; BLAYLOCK, M.; NANDA KUMAR, P.B.A.; DUSHENKOV, S.; ENSLEY, B.D.; CHET, I.; RASKIN, I. (1995). Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology**, 13: 468-474.
- SALT, D.E.; KATO, N.; KRÄMER, U.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. (2000). The role of root exudates in nickel hyperaccumulation and tolerance in accumulator and non-accumulator species of *Thlaspi*. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (eds).

- Phytoremediation of contaminated soil and water.** Boca Raton: CRC Press LLC. p.191-202.
- SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; BAKER, A.J.M.; RASKIN, I.; PICKERING, I.J. (1999). Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. **Environmental Science Technology**, 33: 713-717.
- SALT, D.E.; RAUSER, W.E. (1995). MgATP-dependent transport of phytochelatins across the tonoplast of oat roots. **Plant Physiology**, 107: 1293-1301.
- SALT, D.E.; SMITH, R.D.; RASKIN, I. (1998) Phytoremediation: **Annual Review Plant Physiology of Plant and Molecular Biology**, 49: 643-668.
- SAMPAIO, C. H. (2002). Beneficiamento. In: TEIXEIRA, E.C.; PIRES, M.J.R **Meio ambiente e carvão: Impactos da exploração e utilização. Cadernos de Planejamento e gestão Ambiental.** Porto Alegre: Fundação Estadual de Proteção Ambiental - FEPAM. n.2 p.29-43.
- SANITÁ DI TOPPI, L.; FOSSATI, F.; MUSETTI, R.; MIKEREZI, I.; FAVALI, M.A. (2002). Effects of hexavalent chromium on maize, tomato and cauliflower plants. **Journal of Plant Nutrition**, 25: 701-717.
- SARITA, S.; GUPTA, A.K. (2005). Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L. Ritz: Effect on antioxidants. **Chemosphere**, 61: 1204-1214.
- SCANLON, D.H.; DUGGAN, J.C. (1979). Growth and element uptake of woody plants on fly ash. **Environmental Science Technology**, 13: 311-315.
- SEREGIN, I.V.; IVANOV, V.B. (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on the higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, 48: 606-630.
- SHARMA, D.C.; PANT, R.C. (1994). Chromium uptake its effects on certain plant nutrients in Maize (*Zea mays* L. CV. Ganga 5). **Journal of Environmental Science Healthy A**, 29: 941-948.
- SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. (2004). Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: Prasad MNV (ed). 2^o.ed. **Heavy metal stress in Plants from biomolecules to ecosystems.** Indian: Springer-Verlang. p.85-125.
- SHEN, Z.G.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. (1997). Uptake and transport of zinc in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescences* and the non-hyperaccumulator *Thlaspi ochroleucum*. **Plant Cell Environment**, 20: 898-906.
- SHEORAN, I.S.; AGGARWALA, N.; SINGH, R. (1990). Effects of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Plant Soil**, 129: 243-249.

- SINHA, S.; RAI, U.N.; BHATT, K.; PANDEY, K.; GUPTA, A.K. (2005). Fly-ash-induced oxidative stress and tolerance in *Prosopis juliflora* L. grown on different amended substrates. **Environmental Monitoring and Assessment**, 102: 447-457.
- SINHA, S.; GUPTA, A.K. (2005). Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L. Ritz: Effect on antioxidants. **Chemosphere**, 61: 1204-1214.
- STIBOROVA, M.; DITRICOVA, M.; BENZINOVA, A. (1988). Mechanism of action of Cu^{++} , Co^{++} , and Zn^{++} on ribulose- 1,5-biphosphate carboxylase from barley (*Hordeum vulgare* L.). **Photosynthetica**, 22:161-167.
- STOEWSAND, G.S.; ANDERSON, J.L.; WEINSTEIN, L.H.; OSMELOSKI, J.F.; GUTENMANN, W.H.; LISK, D.J. (1990). Selenium in tissues of rats fed rutabagas grown on soil covering a coal fly ash landfill. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, 44: 681-685.
- THOMINE, S.; WANG, R.; WARD, J.M.; CRAWFORD, N.M.; SCHROEDER, J.L. (2000). Cadmium and iron transport by members of a plant metal transport family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. **Proceeding of the Natural Academy Science**, 97: 49991-4996.
- TRIPATHI, R.D.; VAJPAYEE, P.; SINGH, N.; RAI, U.N.; KUMAR, A.; ALI, M.B.; KUMAR, B.; YUNUS, M. (2004). Efficacy of various amendments for amelioration of fly-ash toxicity: growth performance and metal composition of *Cassia siamea* Lamk. **Chemosphere**, 54: 1581-1588.
- TWARDOWSKA, I.; TRIPATHI, P.S.M.; SINGH, G.; KYZIOL, J. (2003). Trace elements and their mobility in coal ash/fly ash from Indian power plants in view of its disposal and bulk use in agriculture. In: SAJWAN, K.S.; ALVA, A.K.; KEEFER, R.F. **Chemistry of trace elements in fly ash**. New York: Springer p.25-44.
- VAJPAYEE, P.; RAI, U.N.; CHOUDHARY, S.K.; TRIPATHI, R.D.; SINGH, S.N. Management of fly ash land fills with *Cassia surattensis* Burm.: a case study. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 65: 675-682. 2000.
- VAN DER ZAAL, B.J.; NUTEBOOM, L.W.; PINAS, J.E.; CHARDONNES, A.N.; SCHAT, H.; VERKLEJI, J.A.C.; HOOYKAAS, P.J.J. (1999). Overexpression of a novel Arabidopsis gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. **Plant Physiology**, 119: 1047-1055.
- VAN RENSBURG, L.; MORGENTHAL, T.L.; VAN HAMBURG, H.; MICHAEL, M.D. (2003). A comparative analysis of the vegetation and topsoil cover nutrient status between two similarly rehabilitated ash disposal sites. **The Environmentalist**, 23:285-295.
- VÖGELI-LANG, R. WAGNER, G.J. (1990). Subcellular localization of cadmium and cadmium-binding peptides in tobacco leaves. **Plant Physiology**, 92: 1086-1093.

- VITÓRIA, A.P.; CUNHA, M. AZEVEDO, R.A. (2006). Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, 58: 47-52.
- WEINSTEIN, L.H.; OSMELOSKI, J.F.; RUTZKE, M.; BEERS, A.O.; MCCAHAN, J.B.; BACHE, C.A.; LISK, D.J. (1989). Elemental analysis of grasses and legumes growing on soil covering coal fly ash landfill sites. **Journal Food Safety**, 9: 291-300.
- WIERZBICKA, M. (1987). Lead accumulation and its translocation barriers in roots of *Allium cepa* L. autoradiographic and ultrastructural studies. **Plant Cell and Environment**, 10: 17-26.
- YANG, X.; FENG, Y.,; HE, Z.; STOFFELLA, P.J. (2005). Molecular mechanisms of heavy metal hyperaccumulation and phytoremediation, **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, 18: 339-353.
- ZANARDI, Jr. W.; PORTO, M.L.P. (1991). Avaliação do sistema de Lagoas em áreas de mineração de carvão a céu aberto: metais pesados em águas, plantas e substrato. **Boletim do Instituto de Biociências**, 49: 1-83.
- ZAYED, A.; PILON-SMITS, E.; SOUZA, M.; LIN, Z.; TERRY, N. (2000). Remediation of selenium-polluted Soils and waters by phytovolatilization. In: In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (eds). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**. Boca Raton: CRC Press LLC. p. 61-81.
- ZOCHE, J.J. (1989). **Comunidades vegetais de campo e sua relação com a concentração de metais pesados no solo e nas plantas em áreas de mineração do carvão a céu aberto, Butiá, RS**. Dissertação (Mestrado). Porto Alegre: Programa de Pós-graduação em Botânica. Instituto de Biociências. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ZOCHE J.J.; PORTO M.L. (1993). Florística e fitossociologia de campo natural sobre banco de carvão e áreas mineradas, Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, 6: 47-84.
- ZOCHE, J.J. (2005). Metais pesados (Fe, Mn, Zn) no solo construído e na vegetação das antigas bacias de decantação do lavador de Capivari, Capivari de Baixo, SC. In: **6 Simpósio Nacional e Congresso Latino- Americano de Recuperação de Áreas Degradadas**, Curitiba:SOBRADE, p.117-123.
- ZOCHE, J. J.; BITENCOURT, F.de; COSTA, S.; ZOCHE, P. S.de.; MENDES, A.R.(2007). Nucleação por *Mimosa bimucronata* (DC.) O. Kuntze em áreas degradadas pela mineração de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**, 5: 750-752.

