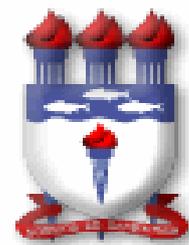


Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Química e Biotecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia
PPGQB



**Estudos Sobre o Potencial do Bambu *Guadua angustifolia* Kunz.
Para a Fitorremediação dos Metais Pesados Zinco e Cádmiio**

Andréa Carla de Almeida Barros

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de mestre em Química.

Orientadora : Prof^ª Márcia Pletsch

Maceió / AL

Junho 2007

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- B277e Barros, Andréa Carla de Almeida.
Estudos sobre o potencial do bambu *Guadua angustifolia* Kunz. para a fitorremediação dos metais pesados zinco e cádmio / Andréa Carla de Almeida Barros. – Maceió, 2007.
62 f. : il. tabs., grafs.
- Orientadora: Márcia Pletsch.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió 2007.
- Bibliografia: f. 49-59.
Apêndices: f. 60-62.
1. Fitorremediação. 2. Metais pesados. 3. Bambu. I. Título.

CDU: 628.5



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**
Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Andréa Carla de Almeida Barros, intitulada: “**Estudos Sobre o Potencial do Bambu *Guadua angustifolia* Kunz. para a Fitorremediação dos Metais Pesados Zinco e Cádmio**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 11 de junho de 2007, às 13h30 na sala de Multimeios do bloco 14 da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Profª. Drª. Márcia Pletsch
Orientadora – IQB/UFAL

Dr. Itamar Soares de Melo
Embrapa Meio Ambiente/Jaguariúna – SP

Profª. Drª. Sônia Salgueiro Machado
IQB/UFAL

O Senhor é meu pastor
Nada me falta.
Em verdes pastagens me faz repousar;
Para fontes tranqüilas me conduz.
E restaura minhas forças.
Ele me guia por bons caminhos, por causa do seu nome.
Embora eu caminhe em um vale tenebroso,
Nenhum mal temerei, pois junto a mim estás;
Teu bastão e teu cajado me deixam tranqüilo.
Diante de mim preparas a mesa,
à frente dos meus opressores;
unges minha cabeça com óleo, e minha taça transborda.
Sim, felicidade e amor me acompanham
Todos os dias de minha vida.
Minha morada é a casa do Senhor,
Por dias sem fim.

Salmo 22

Agradeço

A Deus minha fonte inspiradora,
que enviou seu filho Jesus Cristo
para nos contar as mais lindas
histórias de amor e perseverança
sendo luz em minha caminhada.

SUMÁRIO

	Pag
RESUMO	iv
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABELAS	ix
INDÍCE DE APÊNDICE	x

1: INTRODUÇÃO

1.1. Contaminação inorgânica e fitorremediação	02
1.2. Poluição metálica: causas e riscos	04
1.3. A poluição metálica no Brasil	07
1.4. Mecanismos de resistência e tolerância a metais	07
1.5. Aplicabilidade da fitorremediação na remoção metais	11
1.6. Generalidades sobre o bambu e a espécie <i>Guadua angustifolia</i>	12
1.7. Justificativa do trabalho	14
1.8. Objetivos do trabalho	15
1.8.1. Objetivo Geral	15
1.8.2. Objetivos Específicos	15

2: METODOLOGIA

2.1. Material vegetal e multiplicação das mudas de <i>Guadua angustifolia</i>	17
---	----

2.2. Análise dos metais Zn e Cd na fração biodisponível do solo	18
2.3. Investigação sobre os processos de absorção, translocação e acumulação de Zn e Cd pelo bambu.....	18
2.4. Investigação sobre a acumulação de Zn e Cd nos tecidos de bambu cultivado em solo contaminado	20
2.5. Digestão das amostras e determinações quantitativas de Zn e Cd	20
2.6. Digestão das amostras de solo e determinação quantitativa de Zn e Cd	21
2.7. Análise do crescimento das plantas	22
2.8. Cálculo dos fatores de bioconcentração e translocação	22
2.9. Quantificação das proteínas totais presentes nos extratos das raízes	23
2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	24
2.11. Voltametria cíclica	25
2.12. Análises estatísticas	25
 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO	
3.1. Análise dos substratos e água de irrigação	27
3.2. Distribuição de Zn e Cd nos tecidos de <i>G. angustifolia</i>	27
3.2.1. Translocação e acumulação de Zn	27
3.2.2. Translocação e acumulação de Cd	31

3.3. Translocação e acumulação de zinco e cádmio nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> cultivada em solo contaminado	34
3.4. Bioconcentração e translocação de Zn e Cd em <i>G. angustifolia</i>	39
3.5. Crescimento da <i>G. angustifolia</i> em solo contaminado com Zn ou Cd	41
3.6. Mecanismo de transporte de Zn e Cd nos tecidos de <i>G. angustifolia</i>	42
CAPÍTULO 4: CONCLUSÕES	
4.1. Experimentos futuros.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
APÊNDICE	59

RESUMO

A fitorremediação é considerada uma tecnologia economicamente promissora e ecologicamente correta porque utiliza processos físico-químicos e bioquímicos naturais para a limpeza de áreas degradadas. A *Guadua angustifolia* (Bambusoideae, Poacea), um bambu nativo da América do Sul e Central, que apresenta colmos robustos, altos e espinhosos, apresenta considerável potencial para a fitorremediação de metais tóxicos pelas seguintes razões: a) possui extraordinária capacidade de multiplicação e reprodução vegetativa; b) pode resgatar CO₂ da atmosfera eficientemente, contribuindo para a diminuição do chamado 'efeito estufa'; c) não faz parte da cadeia alimentar; d) possui atributos ornamentais que podem ser utilizados no paisagismo de áreas poluídas, como aquelas previamente ocupadas pelos lixões; e) a biomassa aérea pode ser aproveitada na construção civil ou na indústria moveleira, após cumprido o papel fitoextrator. O objetivo do presente estudo foi investigar o potencial da *G. angustifolia* para a fitorremediação dos metais pesados zinco e cádmio. Os processos de absorção e translocação dos metais das raízes para as partes aéreas e sua distribuição nos diferentes tecidos foram analisados. Além disso, a produção de proteínas transportadoras de metal (fitoquelatinas) e a formação de complexos de metal com compostos orgânicos de baixo peso molecular foram investigados. Os experimentos com *G. angustifolia* foram conduzidos tanto em condições hidropônicas, quanto no solo. O solo artificialmente contaminado com soluções de sulfato de zinco ou cádmio foi distribuído em saquinhos de plástico perfurados. As mudas de bambu, previamente mantidas em vermiculita, foram transplantadas para o solo contaminado e conservadas na casa de vegetação, à temperatura ambiente, durante 180 dias, com regas periódicas. As plantas foram então lavadas e dessecadas à temperatura ambiente e as amostras de raízes, colmos, folhas e solo foram digeridas com uma mistura de ácido nítrico e ácido perclórico (3:1; v/v) durante 3 h à temperatura ambiente e posteriormente por 3 a 4 h à 120 °C. A determinação da concentração de zinco e cádmio nas diferentes amostras foi realizada através de espectroscopia de absorção atômica a 213,9 e 228,8 nm respectivamente. Com base nos valores médios absolutos da concentração, os fatores de bioconcentração (FBC) e de translocação (FT) foram calculados. O acúmulo de zinco e cádmio nas plantas cultivadas no solo obedeceram à ordem raízes > colmos > folhas. O acúmulo de zinco nas raízes do bambu foi de 57,2% (2720 mg/kg peso seco), enquanto que

nas partes aéreas foi de 42,8% (2032 mg/kg peso seco). O acúmulo de cádmio nas raízes foi de 79,9% (770 mg/kg) e nas partes aéreas foi de 20,1% (194 mg/kg). As análises demonstraram que ocorreu uma redução de 65,5% na concentração de zinco e 60,2% na concentração de cádmio, no solo contaminado, após o cultivo com bambu. No que diz respeito ao zinco, os altos valores de FBC (> 1) indicaram que as raízes e os tecidos aéreos ainda não haviam sido saturados e/ou os sistemas de transporte ainda estavam ativos nas condições experimentais empregadas e uma quantidade ainda maior de metal poderia ser absorvida e transportada. Com relação ao cádmio, os valores de FBC indicaram que ainda não havia ocorrido saturação e/ou a inativação dos sistemas de transporte nas raízes, ao contrário dos tecidos aéreos que já se encontravam saturados. Os valores de FT para ambos os metais foram baixos (< 1) indicando que o sistema de transporte de zinco e cádmio nos tecidos da *G. angustifolia* não são muito eficientes. Assim, a *G. angustifolia* atende um dos critérios usados para definir plantas hiperacumuladoras, em que a concentração de zinco nas partes aéreas das plantas desenvolvidas em substrato contaminado foi aproximadamente 20.2 vezes maior do que o valor médio encontrado em plantas desenvolvidas em solos não poluídos, enquanto que a concentração de cádmio foi 194 vezes maior. Outras análises mostraram que a concentração de zinco no solo contaminado, que havia sido cultivado com bambu, foi reduzida em 65,5%, enquanto que o nível de cádmio foi reduzido em 60,2%. Um dos maiores obstáculos ao emprego da *G. angustifolia* para a fitorremediação desses metais parece estar relacionado com a translocação nos tecidos, principalmente dos colmos para as folhas. Embora esses aspectos limitam a aplicação da *G. angustifolia* na fitorremediação do zinco e cádmio, podemos afirmar que essa espécie apresenta grande potencial, visto que a maior parte da biomassa da planta é representada pelos colmos. Esse potencial poderia ser explorado através do uso de técnicas agronômicas adequadas para viabilizar o crescimento das plantas em solos poluídos e de técnicas de engenharia genética para facilitar a mobilidade dos metais das raízes para as folhas.

ABSTRACT

Phytoremediation is considered to be an economically promising and an ecologically correct technology for the removal of toxic materials from the environment since it employs natural physico-chemical and biochemical processes for the clean up of degraded areas. *Guadua angustifolia* (Bambusoideae, Poacea), a bamboo that is native in Central and South America and which presents tall, robust and prickly culms, shows considerable potential in the phytoremediation of toxic metals for the following reasons: a) it presents an extraordinary capacity for multiplication and vegetative reproduction; b) it is efficient at fixing CO₂ from the atmosphere, thus contributing to the reduction in the so-called 'greenhouse effect'; c) it is not part of the human food chain; d) it presents ornamental traits that can be used to advantage in the landscaping of polluted areas, such as those previously occupied by landfills; and e) the aerial biomass may be used either in civil construction or in the furniture industry after completing its phytoextractive function. The objective of the present study was to investigate the potential of *G. angustifolia* for the phytoremediation of zinc and cadmium. The absorption and translocation of these metals from roots to leaves, together with their distribution in the different tissues, were analysed. Additionally, the production of metal transporter proteins (phytochelatins) and the formation of complexes between metals and low molecular weight organic compounds were investigated. The experiments were conducted in hydroponic and soil conditions. Soil that had been artificially contaminated with zinc or cadmium sulphate solutions, was distributed in perforated plastic bags. Bamboo shoots, previously maintained in vermiculite, were transplanted to the contaminated soil and kept in the greenhouse at room temperature for 180 days with periodical watering. The washed plants were dried at room temperature and root, culm, leaf and soil samples were digested with a mixture of nitric and perchloric acids (3:1; v/v) for 3 h at room temperature and for 3 – 4 h at 120°C. The determination of zinc and cadmium in the samples was performed using atomic absorption spectroscopy at 213.9 and 228.8 nm respectively. Based on the absolute average concentration values, the bioconcentration and translocation factors (BCF and TF, respectively) were calculated. The accumulation of metals in organs of the plants cultivated in contaminated soil followed the order roots > culms > leaves. The accumulation of zinc in the roots was 57.2% (2720 mg/kg dry weight), whilst in the aerial parts it was 42.8% (2032 mg/kg). The accumulation

of cadmium in the roots was 79.9% (770 mg/kg), whilst in the aerial parts it was 20.1% (194 mg/kg). Thus, *G. angustifolia* fulfils one of the criteria employed to define hyperaccumulator plants in that the concentration of zinc in the aerial parts of plants grown in contaminated substrate was approximately 20.2-fold higher than the average value found in plants grown under control (non-polluted) conditions, whilst the concentration of cadmium was 194-fold higher than the control value. Further analyses showed that the concentration of zinc in contaminated soil that had supported the cultivation of bamboo was reduced by 65.5%, whilst the level of cadmium was reduced by 60.2%. The high values of BCF (> 1) related to zinc indicated that the roots and aerial tissues had not attained saturation and/or that the transport systems were still active under the experimental conditions employed such that even larger quantities of metal could be absorbed and transported. Regarding cadmium, the values of BCF indicated that saturation and/or inactivation of roots had not been attained, as in the case of zinc, whereas this was not valid for the aerial tissues. TF values for both metals were low (< 1) indicating that zinc and cadmium transport in *G. angustifolia* tissues was not very efficient. One of the greatest obstacles to the use of *G. angustifolia* in phytoremediation of these metals appears to be related to the translocation in the tissues, mainly from culms to leaves. Although this aspect limits the applicability of *G. angustifolia* in the phytoremediation of zinc and cadmium, it is clear that this species offers significant potential since the larger portion of its biomass is represented by the culms. Such potential could be exploited by using appropriate agronomic techniques in order to allow the growth of plants in polluted soils, and genetic engineering technology to facilitate the mobility of metals from roots to shoots.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Mudas de <i>Guadua angustifolia</i>	17
Figura 2.2. Sistema hidropônico usado nos experimentos	19
Figura 2.3. Bloco digestor usado na extração de cádmio e zinco das amostras de tecidos vegetais	21
Figura 2.4. Espectrômetro de absorção atômica	22
Figura 2.5. Exemplo de uma curva de calibração para dosagem de proteínas totais nos extratos vegetais, usando-se como padrão a albumina do soro bovino. Cada ponto representa a média de três amostras	24
Figura 3.1. Concentração de Zn nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> , após exposição às soluções de zinco (0, 50, 100 e 150 mg/L): raízes (▨), colmo (■) e folhas (■). Letras minúsculas iguais acima das barras indicam que os valores das concentrações não são significativamente diferentes ($\rho \leq 0,05$)	28
Figura 3.2. Porcentagem relativa de Zn nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> ao longo de 27 dias de exposição à solução de sulfato de zinco (150 mg/mL)	30
Figura 3.3. Concentração de Cd encontradas nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> , após exposição às soluções de cádmio (0, 5, 10 e 15 mg/L): raízes (▨) colmo (■) e folhas (■). As letras minúsculas iguais acima das barras indicam que os valores das concentrações não são significativamente diferentes ($\rho \leq 0,05$)	32
Figura 3.4. Porcentagem relativa de Cd nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> ao longo de 27 dias de exposição a soluções de cádmio (15 mg/mL)	33
Figura 3.5. Porcentagem relativa de Zn e Cd nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> após seis meses de exposição a concentrações elevadas de metais no solo	36
Figura 3.6. Comportamento redox da solução padrão de Zn (A) e do extrato bruto de raízes de <i>Guadua angustifolia</i> cultivada em solo contaminado com Zn (B) à 100 mV/s, analisando através de voltametria cíclica	44

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Exemplos de espécies vegetais hiperacumuladoras	03
Tabela 1.2. Fontes dos principais poluentes metálicos e riscos para a saúde humana e animal	06
Tabela 1.3. Áreas contaminadas por metais no Brasil	08
Tabela 1.4. Espécies vegetais que apresentam capacidade acumulativa para metais	13
Tabela 3.1. Concentração de zinco (mg/kg) nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> durante 27 dias de tratamento com solução de sulfato de zinco 150 mg/L	31
Tabela 3.2. Fatores de translocação calculados com base nas concentrações de zinco acumuladas pelos tecidos durante 27 dias de exposição a solução de sulfato de zinco	33
Tabela 3.3. Concentrações de Zn e Cd na fração biodisponível do solo decorridos seis meses de conservação na casa de vegetação	35
Tabela 3.4. Acúmulo de zinco e cádmio nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> cultivadas em solo artificialmente contaminado com os metais	36
Tabela 3.5. Distribuição de Zn e Cd nos tecidos de algumas espécies vegetais obtidas de solos contaminados	37
Tabela 3.6. Comparação entre os fatores de bioconcentração e translocação da <i>Guadua angustifolia</i> com os de outras espécies	40
Tabela 3.7. Desenvolvimento das mudas de <i>Guadua angustifolia</i> cultivadas em solo contaminado com Zn ou Cd	41

ÍNDICE DE APÊNDICE

Apêndice A.1. Solução de Hoagland	60
Apêndice A.2: Preparação para quantificação de proteínas.....	61
Apêndice A.3: Preparação de PBS (<i>phosphate buffered saline</i>).....	61
Apêndice A.4: Concentração de zinco nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> , após 72 h de tratamento com sulfato de zinco.....	61
Apêndice A.5: Concentração de cádmio nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> , após 72 h de tratamento com sulfato de cádmio.....	62
Apêndice A.6: Concentração de zinco nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> , após 27 dias de tratamento com sulfato de zinco.....	62
Apêndice A.7.: Concentração de cádmio nos tecidos de <i>Guadua angustifolia</i> , após 27 dias de tratamento com sulfato de cádmio.....	62

1 INTRODUÇÃO

1.1. Contaminação inorgânica e fitorremediação

A fitorremediação é uma tecnologia que faz uso da associação entre plantas e microrganismos para descontaminar ambientes poluídos, utilizando assim processos físico-químicos e bioquímicos naturais (Cunningham *et al.*, 1996; Brooks, 1998). Compostos sintéticos que não são normalmente produzidos pelos organismos vivos e são liberados no ambiente pelas atividades humanas são designados xenobióticos e compreendem as mais variadas classes de substâncias, como metais, compostos inorgânicos, elementos químicos radioativos, hidrocarbonetos derivados do petróleo, pesticidas, herbicidas, explosivos, solventes clorados e resíduos orgânicos industriais. A contaminação do solo e água por esses produtos causa impactos negativos sobre a biosfera danos a saúde do homem e dos animais. Os poluentes inorgânicos que podem ser eliminados ou reduzidos através de fitorremediação incluem nitratos e fosfatos (macronutrientes vegetais), Cr, Cu, Fe, Mn, Mo e Zn (micronutrientes vegetais), As, Cd, Co, F, Hg, Se, Pb, V e W (elementos não essenciais à vida) e ainda isótopos radioativos como ^{238}U , ^{137}Cs , ^{90}Sr (Pilon-Smits, 1999).

O primeiro relato completo sobre a capacidade das plantas terrestres de acumular metais data de meados de 1800 e foi publicado na obra de J. Sachs intitulada *Handbuch der Physiologischen*. Este compêndio inclui dados analíticos sobre o conteúdo de Zn nas plantas *Thalis alpestre* var. *calaminare*, *Viola calaminaria*, *Armeria vulgaris* e *Silene inflata*, encontradas numa área rica em calamina (silicato básico de Zn) próxima a Aachen, na Alemanha. Através das obras de Cunningham e Brooks, na década de 80, esta tecnologia tornou-se popular passando a ser pesquisada em inúmeras instituições públicas e privadas (Cunningham *et al.*, 1996; Brooks, 1998).

No solo, os metais distribuem-se em cinco frações principais: a) fração solúvel contendo íons e complexos metálicos livres; b) fração contendo as partículas do solo nas quais os metais estão adsorvidos e onde ocorrem trocas iônicas; c) fração contendo complexos organometálicos; d) fração contendo precipitados de óxidos, hidróxidos ou carbonatos metálicos; e) fração contendo agregados metálicos de silicatos com metais. Vários métodos físicos e químicos podem ser usados para minimizar a contaminação metálica em cada uma dessas frações, porém esses métodos são caros e envolvem o transporte do material contaminado até o local de tratamento. A fitorremediação é uma

tecnologia de baixo custo, que pode ser aplicada *in situ*. Contudo, somente os metais presentes nas duas primeiras frações estão disponíveis para absorção pelas raízes e, por essa razão, a fitorremediação só é eficiente na remoção de metais destas frações. Dentre os diferentes processos de fitorremediação, quatro deles podem ser empregados para eliminar ou minimizar a poluição causada por metais. São eles a fitoextração, fitoestabilização, rizofiltração e fitovolatilização.

A fitoextração emprega espécies vegetais hiperacumuladoras¹, requerendo plantas especialmente selecionadas, a correção apropriada do solo para permitir o desenvolvimento dessas plantas, e em certos casos, a adição de substâncias quelantes para facilitar a solubilização do metal. Tais plantas devem ser capazes de tolerar e absorver altas concentrações de metais nas raízes, translocá-los para as partes aéreas e produzir abundante biomassa. Na Tabela 1.1 são apresentados alguns exemplos de espécies hiperacumuladoras de metais. A fitomineração, que é uma forma de fitoextração, permite que metais valiosos possam ser separados facilmente das cinzas originadas do material vegetal incinerado, sendo bastante útil para minérios pobres em metais preciosos.

Tabela 1.1. Exemplos de espécies vegetais hiperacumuladoras

Espécie	Elemento	Referências
<i>Alyssum murale, Brassica juncea,</i> <i>Thlaspi caerulescens</i>	Cd e Zn	Schulin <i>et al.</i> , 1999
<i>Arabidopsis halleri</i>	Zn	Dahmani-Muller <i>et al.</i> , 1999
<i>Zea mays</i>	Cu e Pb	Eun <i>et al.</i> , 2000
<i>Brassica juncea</i>	Se	Souza <i>et al.</i> , 1998

A fitoestabilização emprega espécies vegetais perenes para formar uma barreira que estabiliza ou imobiliza os metais no solo, impedindo seu contato direto com o homem e os animais, evitando a erosão do solo e a disseminação dos metais tóxicos para outras áreas (Raskin e Enley, 2000). A fitoestabilização pode ocorrer através da absorção, adsorção, precipitação, complexação ou redução dos metais, sendo muito útil no tratamento dos solos contaminados com Pb, As, Cd, Cr, Cu e Zn. Exemplos de plantas cultivadas com esse

¹ Plantas hiperacumuladoras são aquelas capazes de acumular metais em concentrações equivalentes a 0,1 - 1 % do peso seco, dependendo do metal (McGrath *et al.* 1998).

propósito são *Haumaniastrum*, *Eragrostis*, *Ascolepis*, *Gladiolus* e *Alyssum*. (Dinardi *et al.*, 2003).

A rizofiltração faz uso do sistema radicular vegetal para absorver, concentrar e/ou precipitar os contaminantes de um meio aquoso, particularmente metais pesados ou elementos radioativos, podendo ser usada para a remoção de Pb, Cd, Cu, Ni, Zn, e Cr. Esta técnica é apropriada para grandes volumes de água com baixas concentrações de metais. Por exemplo, na Ucrânia tem-se empregado girassóis (*Helianthus annuus*) para extrair ^{137}Cs e ^{90}Sr de pequenos lagos poluídos da região próxima a usina nuclear de Chernobyl (Schnoor, 1998).

A fitovolatilização envolve a absorção do metal e sua transformação em formas voláteis, que podem ser liberadas para a atmosfera através da transpiração. A desvantagem dessa técnica é que o metal liberado na atmosfera pode precipitar e depositar-se novamente em lagos e oceanos. A fitovolatilização pode ser empregada para minimizar a contaminação por Hg, As e Se. A volatilização do Se tem sido estudada em várias espécies vegetais, particularmente em *Brassica juncea* (Terry *et al.*, 1992; Bañuelos *et al.*, 1997), enquanto que a volatilização do Hg foi apenas observada em *Arabidopsis thaliana* transgênica para o gene *mer*, cujo produto da expressão é capaz de converter Hg^{2+} em Hg^0 (Raskin e Enley, 2000).

1.2. Poluição metálica: causas e riscos

Os elementos metálicos ocorrem naturalmente na crosta terrestre e na atmosfera, porém sua concentração vem gradativamente aumentando em consequência das atividades humanas, como mineração, descargas de esgotos industriais e municipais, produção e aplicação de defensivos agrícolas e uso de explosivos para fins militares.

Uma vez introduzidos no ambiente os metais permanecem inalterados, ao contrário das moléculas orgânicas, que sofrem degradações. As únicas exceções são o Hg e o Se, que podem ser transformados e volatilizados pela ação dos microrganismos. Os metais disponíveis no meio ambiente podem ser carregados pelas águas das chuvas e ventos, resultando na contaminação do solo, rios, lagos e, até mesmo, do lençol freático. A penetração na cadeia alimentar ocorre devido à mobilização e deposição superficial dos metais, colocando em risco os organismos vivos (Raskin e Enley, 2000). Os malefícios

causados à saúde do homem e dos animais são normalmente decorrentes da exposição crônica através da água contaminada e da transferência dos metais na cadeia alimentar. Alguns metais pesados (densidade $\geq 5 \text{ g/cm}^3$) são essenciais ao metabolismo vegetal e animal, sendo necessários em pequeníssimas quantidades, porém sua deposição excessiva nos tecidos causa enormes danos a saúde. O efeito tóxico resulta da combinação do metal com um ou mais grupos reativos de moléculas essenciais para as funções fisiológicas normais (proteínas, aminoácidos, carboidratos, lipídios). A Tabela 1.2 mostra as principais fontes de poluição metálica e os riscos causados à saúde.

No caso do Cd, que é pouco absorvido no intestino, o transporte pelo sangue ocorre pela ligação com as células sanguíneas, albumina ou metalotioneína (proteína de baixo peso molecular com afinidade por metais), atingindo primeiramente o fígado e depois os rins. Os danos causados às células renais e glomérulos (na concentração de $200 \mu\text{g/g}$) produzem proteinúria e induzem resposta auto-imune. A meia-vida do Cd no corpo é de 10 a 30 anos. O envenenamento geralmente resulta da inalação de poeira e fumaça de óxido de cádmio e a ingestão de sais do metal, sendo a dose letal aproximadamente 1 g. Os sintomas agudos mais freqüentes são náuseas, vômito, salivação excessiva, diarreia e câimbras abdominais, enquanto que a exposição crônica resulta no comprometimento dos rins principalmente (Duarte *et al.*, 2000).

As propriedades químicas do Zn são semelhantes as do Cd. É um elemento essencial para a maioria dos seres vivos, especialmente animais e plantas, pois atua como cofator de inúmeras enzimas. É considerado o 25º elemento mais abundante na crosta terrestre, ocorrendo em vários minerais e em diferentes formas (sulfetos ou carbonatos de zinco). A necessidade diária do homem adulto é de 15 mg, enquanto que na lactação este valor sobe para 25 mg. A absorção excessiva de Zn pelo organismo pode levar a um quadro de intoxicação, resultando em sintomas como vômito, diarreia e cólicas. A inalação de vapor de Zn produzido no processo de solda e fabricação de ligas de Zn causa grande irritabilidade e lesões no sistema respiratório (Sacramento *et al.*, 1998).

Tabela 1.2. Fontes dos principais poluentes metálicos e riscos para a saúde humana e animal.

Metais	Aplicações e fontes poluidoras	Riscos a saúde
As	Aditivos em ligas metálicas de chumbo e latão, conservantes de madeiras, constituintes de inseticidas e herbicidas.	As concentrações acima de 10µg/L de água potável pode provocar câncer de pele, pâncreas e pulmão, além de causar mal formações neurológicas e aborto.
Cd	Constituinte de pigmentos de tintas (amarelo cádmio), presente em certos plásticos, baterias de cádmio-níquel, usado na galvanização.	Metal bastante tóxico mesmo em concentrações pequenas. Quando presente em alimentos, cigarros e ar, pode acarretar patologias como enfisema pulmonar, problemas neurológicos e imunológicos.
Cr	Presente em corantes e pinturas, aumenta a resistência de produtos metalúrgicos à corrosão.	Os compostos de cromo são tóxicos e carcinogênicos, podendo também causar irritação nos olhos, pele e mucosas.
Fe	Presente em diversos minerais. Empregado na produção de aços. Aplicado em pinturas, na obtenção de magnetita e óxido de ferro III e produtos magnéticos.	O ferro reage com peróxidos produzindo radicais livres. Em excesso esse metal pode ser acumulado no fígado, baço e pâncreas, provocando danos à saúde.
Hg	Entra na composição de amálgamas, componentes de instrumentos de medidas.	À temperatura ambiente transforma-se em vapores tóxicos.
Mn	Entra na composição de ligas metálicas e tintas.	Exposições prolongadas a compostos de manganês podem provocar problemas neurológicos e respiratórios.
Pb	Utilizado na indústria extrativa e petrolífera, entra na composição de tintas e corantes, usado na produção de cerâmicas e armas bélicas.	Presente nos vapores emitidos por veículos automotores e indústrias.
Se	Utilizado em processos elétricos e eletrônicos, como catalisadores em reações de desidrogenação, constituinte de inseticidas e herbicidas.	Em altas doses pode ocasionar perda de cabelos e amolecimento das unhas.
Zn	Empregado em galvanização, produção de baterias, fertilizantes, constituinte de tintas, plásticos, borrachas, cosméticos e produtos farmacêuticos.	A absorção excessiva causa problemas gastrintestinais. A inalação de vapores pode causar irritabilidade e lesões respiratórias.

Dados obtidos da Environmental Protection Agency (2006)

1.3. A poluição metálica no Brasil

Não existe um levantamento detalhado sobre as áreas contaminadas por metal no Brasil, mas apenas alguns estudos esparsos que em sua maioria foram conduzidos na região sudeste (Tabela 1.3). É evidente que a poluição metálica se concentra principalmente nas áreas altamente urbanizadas e industrializadas do país, em decorrência dos efluentes domésticos e industriais.

A aplicação excessiva de agrotóxicos também é uma das causas de poluição metálica, como no caso da microbacia de Caetés, cuja contaminação foi decorrente da lixiviação de fertilizantes e pesticidas (Ramalho *et al.*, 2000; Almeida *et al.*, 2001). Esses estudos revelaram que nem sempre os metais encontrados nos sedimentos retirados dos córregos, açudes e lagoas estavam sob formas biodisponíveis, enquanto que a água continha concentrações acima dos padrões máximos estabelecidos pelo Ministério da Saúde

Os ecossistemas aquáticos são quase sempre os mais atingidos pela poluição e aqueles que causam maior preocupação, visto que os peixes, moluscos e algas são importantes constituintes da cadeia alimentar humana. Por esta razão, estes organismos servem como biosensores da qualidade do ambiente e vem sendo usados para monitorar tanto a magnitude, quanto às variações sazonais da contaminação metálica na costa do Rio de Janeiro (Lima Junior *et al.*, 2002; Ferreira *et al.*, 2004).

1.4. Mecanismos de resistência e tolerância a metais

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram estratégias para maximizar a absorção de íons essenciais em situações de suficiência ou deficiência metálica, através da liberação de substâncias quelantes ou através da alteração do pH da rizosfera. Algumas gramíneas, por exemplo, liberam exudatos ricos em fitosideróforos ou fitometalóforos, que formam respectivamente complexos com Fe^{3+} e outros metais. Nas situações em que existe excesso de metal, a produção de fitosideróforos ou fitometalóforos pela planta possivelmente diminui (Alam *et al.*, 2000). No caso das dicotiledôneas e monocotiledôneas não gramináceas, são os exudatos vegetais ricos em ácidos orgânicos (malato, acetato, citrato e oxalato) que promovem a acidificação da rizosfera e aumentam a disponibilidade dos cátions metálicos através da troca com H^+ . Sob condições de estresse metálico,

entretanto, a absorção pode ser limitada pela complexação dos íons metálicos com os ácidos orgânicos e sua conseqüente precipitação na vizinhança das raízes (Pellet *et al.*, 1995).

Tabela 1.3. Áreas contaminadas por metais no Brasil

Local	Metais	Referência
Aterro controlado do Morro do Céu, (Niterói, RJ)	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Ni, Zn	Sisinno e Moreira, 1996
Baía da Guanabara (Niterói, RJ)	Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Ni, Zn	Batista Neto <i>et al.</i> , 2000
Complexo lagunar de Jacarepaguá, (Rio de Janeiro, RJ)	Zn, Cu, Pb, As, Ba, Co, Cr, Ni	Almeida <i>et al.</i> , 2001
Córrego e açude Caetés (Paty Alferes, RJ)	Cd, Mn e Pb	Ramalho <i>et al.</i> , 2000
Baía de Vitória (Vitória, ES)	Cu, Pb, Zn, Mn, Hg	Joyeux <i>et al.</i> , 2004
Ilha Vitória (ES)	Al, Cu, Cr, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Zn	Jesus <i>et al.</i> , 2004
Baía de Ubatuba (Ubatuba, SP)	Cd, Cr, Cu, Pb, Zn	Avelar <i>et al.</i> , 2000
Sistema Tietê-Pinheiros – represas Billings, Pirapora, Kasgão e Barra Bonita (São Paulo, SP)		Silva <i>et al.</i> , 2002
Represa da Pampulha, (Belo Horizonte, MG)	Cu, Mn, Fe, Zn	Reitzler <i>et al.</i> , 2001
Triângulo Mineiro (MG)	Cd, Cu, Pb, Zn	Oliveira e Costa, 2004
Mangue (litoral do Amapá)	Cr, Co, Cu, Fe, Ni	Andrade e Patchineelam, 2000

A biodisponibilidade dos metais no solo pode ser influenciada pela presença de microrganismos. A redução do estado de oxidação do metal ou a sua ligação com as paredes celulares negativamente carregadas dos microrganismos resulta na imobilização do metal no solo (Blake *et al.*, 1993; Galli *et al.*, 1994). A situação inversa também pode

ocorrer, isto é, os microrganismos presentes na rizosfera podem aumentar a mobilidade dos metais através da excreção de compostos orgânicos (Crowley *et al.*, 1991).

A adição de quelantes artificiais (Ex: ácido etilenodiaminotetraacético - EDTA) ao solo é um recurso que vem sendo investigado intensivamente com o fim de aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade dos metais, sobretudo do Pb (Vassil *et al.*, 1998; Kirkham, 2000). Infelizmente, a percolação através do solo dos complexos altamente solúveis de Pb-EDTA aumenta os riscos de contaminação das águas subterrâneas.

Os elementos essenciais são absorvidos, translocados e armazenados através de mecanismos específicos, que envolvem a passagem dos metais através das membranas. Esse processo é seletivo e mediado por proteínas transportadoras. Há evidências de que as proteínas transmembrana não diferenciam alguns íons essenciais dos não essenciais. Por exemplo, a absorção e transporte do metal tóxico Cd^{2+} através das membranas é mediada pelas mesmas proteínas que carregam o seu análogo químico essencial Zn^{2+} (Hart *et al.*, 1998). Dessa forma, a concentração intracelular de íons é mantida dentro dos níveis fisiológicos e não excede as necessidades metabólicas da planta. Pequenas concentrações de elementos não essenciais podem até estimular os processos biológicos nos organismos, mas altas concentrações de qualquer dos elementos causam efeitos tóxicos. As plantas reagem ao estresse metálico através da aclimatização (resistência²) ou adaptação (tolerância³) ao meio em que vivem.

Um dos aspectos da fisiologia vegetal mais explorados pela fitorremediação é a capacidade das plantas de absorver os contaminantes da rizosfera e translocá-los para as folhas, cuja biomassa pode ser então colhida e posteriormente processada (incinerada ou usada para compostagem, por exemplo). A identificação de mais de 200 espécies terrestres capazes de tolerar e acumular altas concentrações de metais pesados nas folhas indica que a fitorremediação depende muito do potencial genético da planta. Além de acumular altos níveis de metais essenciais, as espécies hiperacumuladoras absorvem e acumulam elementos não essenciais em níveis 100 vezes maior que aqueles normalmente encontrados

² Depende de características não herdadas, que podem ser perdidas, quando a causa do estresse for removida.

³ Depende de características que evoluíram através da seleção natural de indivíduos em resposta à exposição a concentrações excessivamente altas de metal no ambiente. Tolerância é a capacidade do indivíduo de manter a homeostase quando submetido a determinadas condições ambientais e depende do seu potencial genético.

nas plantas comuns, isto é, > 100 mg/kg de Mn ou Cd, > 1000 mg/kg de Co, Cu, Cr ou Pb e > 10000 mg/kg de Ni ou Zn (Lasat, 2000).

Os mecanismos sugeridos até o momento para explicar a hiperacumulação de metais estão relacionados com os sistemas de transporte, com a compartimentalização intracelular e com a captura dos metais na parede celular. A capacidade de hiperacumular metais pode ser determinada em algumas espécies pela velocidade de translocação do metal das raízes para as folhas. A existência de tal mecanismo foi demonstrada através do trabalho de Lasat e colaboradores (2000), os quais compararam *Thlaspi caerulescens* e *T. arvense*. A primeira acumula altas concentrações de Zn nas folhas (até 3% do peso seco), enquanto que a segunda é uma espécie normal ou não hiperacumuladora. Os autores demonstraram que o fluxo de Zn através da membrana plasmática das células das raízes é maior em *T. caerulescens* do que em *T. arvense*, assim como o fluxo através das células das folhas e pelo xilema. As análises mostraram que o aumento da velocidade de transporte de Zn em *T. caerulescens* é resultado do nível elevado da proteína transportadora de Zn (ZNT1) nas raízes e folhas, enquanto que em *T. arvense*, o nível de ZNT1 é muito menor e somente induzido pela deficiência de Zn.

No caso de *T. goesingense*, sua extraordinária capacidade para tolerar e armazenar altas concentrações de Ni está relacionada com o transporte eficiente do metal para dentro do vacúolo e a compartimentalização do mesmo nesta organela na forma de complexos com ácidos orgânicos (Kramer *et al.*, 1997). Em *T. goesingense* o transporte de Ni através do tonoplasto é facilitado pela ligação com um quelante citoplasmático, a histidina, e o armazenamento no vacúolo resulta da complexação com malato e citrato, promovida pelo pH ácido daquela organela. Ao contrário, *T. arvense* possui uma capacidade limitada de acumular Ni no vacúolo, de maneira que o mesmo fica acumulado no citoplasma das células das raízes. A hiperacumulação vacuolar de Zn também foi observada em *T. caerulescens*, cujas folhas armazenam o metal sob a forma de complexos de citrato e oxalato (Lasat *et al.*, 2000).

Entre os mecanismos que permitem a acumulação de metais pesados inclui-se a produção de fitoquelatinas, peptídeo rico em cisteína, cuja fórmula estrutural é $(\gamma\text{Glu-Cis})_2\text{-}_11\text{Gli}$. A síntese das fitoquelatinas é induzida por vários metais (Zn, Pb, Cu e principalmente Cd) e é catalisada pela fitoquelatina sintase, que media a transferência consecutiva de

unidades glutamil cisteinil para a glutationa (γ Glu-Cis-Gli). Possivelmente, as fitoquelatinas funcionam como carreadores citoplasmáticos, que facilitam o transporte do metal para o vacúolo através do tonoplasto, minimizando desta forma a ação tóxica sobre as células. A evidência para tal hipótese partiu do trabalho de Salt e Rauser (1995), que identificaram nas células de *Avena sativa* (aveia) uma proteína capaz de transportar fitoquelatinas e seus complexos com Cd do citoplasma para o vacúolo. Outro grupo menos conhecido de proteínas ricas em cisteína envolvidas no transporte de metais em plantas terrestres são as metalotioneínas (Murphy e Taiz, 1995). No caso das espécies *T. caerulescens* e *T. arvense* mencionadas anteriormente, não foram observados complexos de coordenação do Ni com S, confirmando que as fitoquelatinas não estão envolvidas na acumulação de Ni em nenhuma dessas espécies.

A parede celular também funciona como um importante reservatório de metais devido à existência de inúmeros sítios de ligação com cátions. De acordo com Kramer e colaboradores (1997), a espécie hiperacumuladora *T. goesingense* parece ter maior capacidade de acumular Ni na parede celular do que *T. arvense*, quando expostas a concentrações tóxicas desse metal. Supõe-se que essa propriedade é devida à presença de uma parede celular mais espessa ou com a matriz modificada, que permite maior número de ligações com o Ni.

Embora as espécies naturais possuam extraordinários atributos no que diz respeito a hiperacumulação, a possibilidade de empregá-las em fitorremediação é limitada pelo crescimento vagaroso, baixo porte e preferência por habitats restritos. Entretanto, existem perspectivas encorajadoras para se contornar estes obstáculos, visto que inúmeros experimentos envolvendo a produção de plantas transgênicas tolerantes a concentrações tóxicas de metais mostraram-se bem sucedidos (Van der Zaal *et al.*, 1999; Gisbert *et al.*, 2003; Sakulkoo *et al.*, 2005).

1.5. Aplicabilidade da fitorremediação na remoção metais

Nos últimos anos a fitorremediação tem sido aceita como uma tecnologia promissora, principalmente devido à integração da fitorremediação com a arquitetura e o

paisagismo, o que permite a limpeza de áreas urbanas com a criação de áreas verdes e parques de acesso público ou ainda o reflorestamento de matas selvagens (Pilon-Smits, 1999). A Tabela 1.4 ilustra alguns exemplos de plantas que tem sido investigadas com o propósito de fitorremediação.

1.6. Generalidades sobre o bambu e a espécie *Guadua angustifolia*

Bambu é o termo comumente usado para designar o grupo taxonômico das gramíneas (famílias Andropogoneae/Poacea, subfamília Bambusoideae), que compreende 90 gêneros e 1250 espécies distribuídos em todos os continentes, com exceção da Europa. São encontrados em altitudes que variam de 0 a 4800 m, resistem tanto às baixas temperaturas quanto adaptam-se bem às regiões tropicais. O bambu é considerado uma planta de valor econômico e ecológico significativo, com elevada produtividade de biomassa, quando comparado a outras espécies florestais, atingindo a plenitude produtiva entre 5 e 7 anos. Dentre as suas múltiplas funções destaca-se a eficiente capacidade de resgatar CO₂ da atmosfera, contribuindo significativamente para a diminuição do efeito estufa.

O Brasil possui a maior reserva natural de bambu do mundo, com as principais áreas concentradas nos estados do Acre (70 mil km²) e Amazonas (20 mil km²). O bambu é utilizado em paisagismo e jardinagem, como alimento (broto de bambu), como forragem, como biomassa energética, na indústria farmacêutica e de cosméticos, na indústria química em geral, na produção de celulose e papel, na indústria têxtil, na construção civil e na contenção de encostas. Portanto, o bambu pode ser utilizado para promover o desenvolvimento sustentável das áreas rurais.

Em Alagoas, existem unidades produtivas chamadas bambuzerias, organizadas em cooperativas, que se dedicam a capacitação de pessoal para a fabricação de artigos de decoração e móveis de bambu. As fábricas estão localizadas em três cidades nas proximidades da capital Maceió, sendo elas a Bambuzeria Capricho em Cajueiro, Bambuzeria René Bertholet em Coruripe e Bambuzeria Zumbi dos Palmares em União dos Palmares, as quais produzem artigos de exportação para os Estados Unidos e Holanda.

A *Guadua angustifolia* é uma espécie nativa da América do Sul e Central, sendo muito abundante na Colômbia, Equador, Peru e Venezuela, onde é conhecida pelos nomes

de caña brava, caña mansa, ipa, marona, juajua, puru puru, tarro e oate. A *G. angustifolia* é um bambu de colmos robustos, altos e espinhosos, podendo atingir 20 m em apenas 120 dias.

Tabela 1.4. Espécies vegetais que apresentam capacidade acumulativa para metais.

Espécie	Família	Teor de metal no solo	Acumulação nos tecidos	Referências
<i>Arabis alpina</i>	<i>Brassicaceae</i>	Pb (6712,8 mg/kg) Zn (13 mg/kg)	folhas (1157,6 mg/kg); raízes (3263 mg/kg) folhas (5632,8 mg/kg); raízes (4508 mg/kg)	Yanqun <i>et al.</i> (2005)
<i>Oxalis corymbosa</i>	<i>Oxalidaceae</i>	Pb (2587,3 mg/kg)	raízes (1836,1 mg/kg)	Yanqun <i>et al.</i> (2005)
<i>Arabis alpina</i> Var. <i>parviflora</i> Franch		Zn (13031,5 mg/kg)	raízes (4508,7 mg/kg)	
<i>Arabidopsis halleri</i>	<i>Brassicaceae</i>	Cu (5470 mg/kg)	caules (3-106 mg/kg)	Dahmani - Muller <i>et al</i> (1999)
<i>Amaranthus retroflexus</i>	<i>Amaranthaceae</i>	¹³⁷ Cs (2400 kBq/m ²)	caules (52 ± 26,4 kBq/m ²)	Zhu <i>et al</i> (2000)
<i>Andropogon virginicus</i>		Cd (0,7 – 20,1 mg/kg)	caules (10,2 mg/kg) raízes (10,6 mg/kg)	Pichtel <i>et al</i> 1999)
<i>Thlaspi goesingense</i>	<i>Brassicaceae</i>	Cd (500 µM)	folhas (28051 mg/kg)	Lombi <i>et al</i> (1999)
<i>Lenna polyrrhiza</i>		Pb (10 mg/L) Ni (10 mg/L)	raízes (27 mg/kg) raízes (10 mg/kg)	Sharma <i>et al</i> (1994)
<i>Sedum alfredii</i>	<i>Crassulaceae</i>	Cd (0,0672 mg/kg)	caules (5300 mg/kg) raízes (3100 mg/kg)	Zhou <i>et al</i> (2005)
<i>Lactuca sativa</i> <i>Cucumis sativa</i>	<i>Cucurbitaceae</i>	As (90,9 mg/kg) Pb (327 mg/kg)	folhas (9,8 mg/kg) raízes (<10 mg/kg)	Mattina <i>et al</i> (2003)
<i>Zea mayz</i>	<i>Poaceae</i>	Pb (0,0414 mg/kg)	raízes (1,941.10 ⁶ mg/kg)	Eun <i>et al</i> (2000)

Por ser muito resistente, sua maior aplicação é na construção civil e na fabricação de aglomerados e laminados. Seus colmos podem ser empregados inteiros ou em lascas, cortados próximos aos nós. Quando usados inteiros e ao ar livre, deve-se evitar o acúmulo de água nas extremidades livres para que, posteriormente, não ocorra o apodrecimento do material. A *G. angustifolia* é uma das principais espécies de bambu cultivadas no Brasil.

1.7. Justificativa do trabalho

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), 76% do lixo produzido nas cidades (domiciliar, comercial, industrial, especial ou perigoso e de serviços de saúde) segue para os lixões e não recebe nenhum tipo de tratamento, causando diversos problemas ao meio ambiente, entre eles a contaminação do ar com gases poluentes e dos rios e águas subterrâneas pelo chorume (líquido liberado pela decomposição do lixo). A contaminação com Zn e Cd resulta principalmente do descarte indevido de pilhas e baterias cuja composição inclui ambos os metais e da aplicação de fertilizantes que contêm micronutrientes metálicos (oriundos de resíduos industriais).

No que diz respeito a fitorremediação, a *G. angustifolia* foi selecionada para estudo por apresentar as seguintes vantagens:

- a) apresenta extraordinária capacidade de multiplicação e reprodução vegetativa, que lhe permite produzir grande quantidade de biomassa num curto espaço de tempo;
- b) a biomassa aérea pode ser removida da planta e aproveitada na construção civil, após a mesma ter cumprido seu papel na fitoextração dos contaminantes do solo e água;
- c) não faz parte da cadeia alimentar e, portanto, não há perigo de ser consumida pelo homem e outros animais herbívoros;
- d) pode ser usada com finalidades ornamentais, para recuperar e tornar mais atrativas as áreas poluídas e desagradáveis, como aquelas previamente ocupadas pelos lixões.

1.8. Objetivos do trabalho

1.8.1. Objetivo geral

- Investigar o potencial do bambu *G. angustifolia* para a fitorremediação dos metais pesados Zn e Cd.

1.8.2. Objetivos específicos

- Analisar os processos de absorção e translocação de Zn e Cd das raízes para as partes aéreas;
- Determinar os teores de Zn e Cd acumulados nas raízes, colmos e folhas das plantas cultivadas em solo contaminado;
- Verificar a capacidade da *G. angustifolia* de remover Zn e Cd de solo contaminado;
- Verificar a ocorrência de complexação dos metais com compostos orgânicos, de baixo peso molecular ou proteínas (fitoquelatinas), que facilitem seu transporte nos tecidos.

2 METODOLOGIA

2.1. Material vegetal e multiplicação das mudas de *Guadua angustifolia*

As mudas de bambu (Figura 2.1) foram obtidas da coleção do Centro de Ciências Agrárias (CECA, UFAL) e cedidas pelo Professor Eurico E. P. Lemos. As mudas de aproximadamente quatro meses encontravam-se plantadas em substrato ATA constituído por uma mistura de areia branca de riacho lavada, torta de filtro (matéria orgânica residual resultante da moagem da cana-de-açúcar), argila (ou traço) na proporção de 1:2:1. Os exemplares de bambu foram transferidos para a casa de vegetação, localizada nas proximidades do Instituto de Química e Biotecnologia, onde foram mantidas à temperatura ambiente (máxima de 30°C e mínima de 22°C), sendo regadas com água de torneira duas vezes por semana.



Figura 2.1. Mudanças de *Guadua angustifolia*

Previamente aos experimentos, cada uma das mudas foi removida do substrato ATA, as raízes foram lavadas em água corrente e a biomassa foi subdividida em duas ou

três mudas menores. Tanto as raízes quanto as folhas das novas mudas foram parcialmente cortadas com auxílio de uma tesoura, com o fim de minimizar a transpiração e permitir o desenvolvimento de novas raízes e folhas. Em seguida, as mudas foram transferidas para vermiculita e regadas duas vezes por semana com solução nutritiva de Hoagland (Apêndice A.1) constituída de macro e micronutrientes essenciais às plantas.

Após 12 semanas de cultivo, as mudas de bambu foram removidas da vermiculita, lavadas em água corrente e colocadas em recipientes contendo água da torneira onde permaneceram por 48 h. Em seguida, foram transferidas para unidades hidropônicas, contendo solução de Hoagland, especialmente projetadas para os experimentos (Figura 2.2) ou para solo contaminado com Zn ou Cd.

2.2. Análise dos metais Zn e Cd na fração biodisponível do solo

O teor de Zn e Cd presente em diferentes amostras de solo foi determinada conforme descrito no item 2.5. Essa análise foi necessária por diferentes razões, a saber: i) o substrato ATA foi analisado para determinar as condições de cultivo das plantas cedidas para os experimentos; ii) a terra vegetal adquirida comercialmente (Terra Viva Supermercado Bompreço, Maceió, AL) foi analisada para investigar a possibilidade das mudas de bambu serem transferidas para um substrato livre de Zn e Cd, antes dos experimentos, a fim de evitar que os resultados fossem mascarados pelas concentrações existentes originalmente; c) o substrato ATA contaminado artificialmente com Zn ou Cd (10000 mg/kg e 1000 mg/kg respectivamente) foi usado para os experimentos descritos no item 2.4.

2.3. Investigação sobre os processos de absorção, translocação e acumulação de Zn e Cd pelo bambu

Dois experimentos, conduzidos em condições hidropônicas (Figura 2.2.), foram planejados com o objetivo de avaliar a capacidade do bambu de absorver, translocar e acumular os metais Zn e Cd nas raízes, colmos e folhas.

O primeiro experimento consistiu da adição de alíquotas de solução aquosa concentrada de sulfato de zinco heptaidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Merck, Darmstadt, Alemanha) às quatro unidades hidropônicas, de modo que a concentração final de metal em cada uma das unidades foi de 0, 50, 100 e 150 mg/L. As plantas permaneceram expostas ao metal por 72 h. Procedimento semelhante foi conduzido com sulfato de cádmio octaidratado ($3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; Merck, Darmstadt, Alemanha), com a diferença de que a concentração final do metal nas unidades hidropônicas foi de 0, 5, 10 e 15 mg/L.

O segundo experimento também foi conduzido em condições hidropônicas, durante um período de 27 dias, usando-se concentrações de Zn e Cd equivalentes a 150 mg/L e 15 mg/L respectivamente. As amostras foram tomadas a cada seis dias, isto é, ao 3^o, 9^o, 15^o, 21^o e 27^o dia, a partir do início do experimento. Durante este período, observou-se possíveis sinais de toxicidade nas plantas. Cinco mudas de bambu foram utilizadas em cada um dos tratamentos. Após cada experimento, as plantas foram dessecadas à temperatura ambiente e as amostras de raízes, colmos e folhas foram analisadas quimicamente conforme descrito no item 2.5.



Figura 2.2. Sistema hidropônico usado nos experimentos

2.4. Investigação sobre a acumulação de Zn e Cd nos tecidos de bambu cultivado em solo contaminado

Esse experimento foi conduzido em solo artificialmente contaminado, o qual foi preparado como descrito a seguir. Inicialmente, duas porções de substrato ATA (4 kg cada) foram contaminadas separadamente com solução de Zn (10000 mg/kg) e Cd (1000 mg/kg). O substrato contaminado foi regularmente molhado com água da torneira durante 90 dias para permitir a difusão homogênea dos metais por entre as partículas de solo. A seguir a cada porção de solo foi distribuída em saquinhos de plástico perfurados (1 kg cada). As mudas de bambu, que estavam sendo mantidas em vermiculita, foram transplantadas para o solo contaminado e conservadas na casa de vegetação, à temperatura ambiente, durante 6 meses. Após o experimento, as plantas foram dessecadas à temperatura ambiente e as amostras de raízes, colmos, folhas e solo foram analisadas quimicamente conforme descrito no item 2.5.

2.5. Digestão das amostras e determinação quantitativa de Zn e Cd

As amostras de *G. angustifolia*, submetidas a tratamento com sais de Zn e Cd, foram dessecadas à temperatura ambiente até peso constante. As raízes, colmos e folhas foram separados, rotulados e cortados em fragmentos pequenos (2 - 3 mm), com auxílio de uma tesoura. As amostras de tecidos (0,3 g) foram pesadas com auxílio de uma balança analítica (Mettler Toledo, Ipiranga, SP, Brasil) e transferidas para tubos digestores de 80 mL. Em seguida, adicionou-se 8 mL de uma mistura de HNO₃ : HClO₄ (3:1; v/v), e deixou-se as amostras em repouso à temperatura ambiente por 3 h. Após esse tempo, o bloco digestor (Figura 2.3) foi aquecido gradativamente até atingir 120 °C. Essa temperatura foi mantida até que o desprendimento de vapor de NO₂ (cor castanha) cessasse, sendo então aumentada para 200 °C, quando começou a liberação de vapor de HClO₄ (cor branca).

A digestão à quente foi concluída após 3 - 4 h de incubação e os extratos (incolores) foram deixados à temperatura ambiente para esfriar. Cada amostra foi transferida para um frasco de Erlenmeyer (100 mL) e o volume completado para 25 mL. Todos os

procedimentos de digestão foram conduzidos em capela de acordo com a metodologia descrita em Silva (1999) e Potaflos (1997).

A determinação da concentração de Zn e Cd nas diferentes amostras foram realizadas através de espectroscopia de absorção atômica (modelo CG AA 7000 ABC, Scientific Instruments Ltd, Alemanha; Figura 2.4) a 213,9 e 228,8 nm respectivamente.



Figura 2.3. Bloco digestor usado na extração de Zn e Cd

As análises foram realizadas no laboratório da Central Analítica LTDA (Rua Sá e Albuquerque, 184 – Jaraguá, Maceió, AL). As análises da água de irrigação foram conduzidas utilizando-se procedimento semelhante ao descrito acima.

2.6. Digestão das amostras de solo e determinação quantitativa de Zn e Cd

As amostras de substrato ATA, onde as mudas de *G. angustifolia* foram originalmente plantadas, assim como as amostras de solo artificialmente contaminados (0,5 g) foram pesadas com auxílio de uma balança analítica (Mettler Toledo, Ipiranga, SP, Brasil) e transferidas para tubos digestores de 80 mL. Em seguida, adicionou-se 8 mL de uma mistura de HNO₃ : HClO₄ (1:1; v/v), e deixou-se as amostras em repouso à temperatura ambiente por 3 h. Após esse tempo, o bloco digestor foi aquecido gradativamente até atingir 120 °C. Essa temperatura foi mantida até que o desprendimento de vapor de NO₂

(cor castanha) cessasse, sendo então aumentada para 200 °C, quando começou a liberação de vapor de HClO₄ (cor branca).



Figura 2.4. Espectrofotômetro de absorção atômica usado nas análises

2.7. Análise do crescimento das plantas

O desenvolvimento das plantas cultivadas no solo foi avaliado levando-se em conta os seguintes parâmetros: comprimento da raiz principal (cm), comprimento do colmo (cm), número de folhas, biomassa total (g). Antes da pesagem as plantas foram removidas do solo e lavadas cuidadosamente em água corrente para eliminar restos de solo aderidos às raízes e posteriormente colocadas sobre papel absorvente a fim de remover o excesso de água. As medidas foram tomadas antes do cultivo e depois de 6 meses de cultivo. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

2.8. Cálculo dos fatores de bioconcentração e translocação

Com o fim de facilitar a análise dos processos de absorção e translocação dos metais Zn e Cd, calculou-se os fatores de bioconcentração (FBC) e os fatores de translocação (FT) definidos abaixo (Mattina *et al.*, 2003; Yanqun *et al.*, 2005). FBC leva em consideração a

absorção dos metais a partir do solo e FT leva em consideração apenas o transporte nos tecidos da planta. O primeiro foi usado para analisar o resultado dos experimentos conduzido no solo e o segundo para analisar o resultado dos experimentos conduzidos em solução e no solo.

$FBC1 = C_{raízes}/C_{solo}$	expressa a translocação do solo para as raízes
$FBC2 = C_{colmo}/C_{solo}$	expressa a translocação do solo para os colmos
$FBC3 = C_{folhas}/C_{solo}$	expressa a translocação do solo para as folhas
$FT1 = C_{colmos}/C_{raízes}$	expressa a translocação das raízes para os colmos
$FT2 = C_{folhas}/C_{colmos}$	expressa a translocação dos colmos para as folhas
$FT3 = C_{folhas}/C_{raízes}$	expressa a translocação das raízes para as folhas
$FT4 = C_{partes\ aéreas}/C_{raízes}$	expressa a translocação das raízes para as partes aéreas

2.9. Quantificação das proteínas totais presentes nos extratos das raízes

A quantificação das proteínas nos extratos vegetais foi realizado de acordo com o método de Lowry [Dawson *et al.*, 1969]. O reagente de biureto foi preparado misturando-se uma solução 0,5 % de sulfato de cobre pentaidratado (0,5 mL), uma solução 1% de tartarato de sódio e potássio (0,5 mL) e uma solução 2% de carbonato de sódio em hidróxido de sódio 0,1 M (50 mL) (Apêndice A.2).

Ao reagente de biureto (1 mL), adicionou-se o extrato protéico (200 μ L), misturando-se bem durante 2- 5 s, com auxílio de um vortex (Biomatic Aparelhos Científico LTDA, Porto Alegre, RS). A mistura foi deixada em repouso à temperatura ambiente durante 10 min, adicionando-se em seguida o reagente de Folin-Ciocalteau ((200 μ L). Após agitação em vortex por 2-5 s, a solução foi deixada novamente em repouso durante 20 min, à temperatura ambiente. Em seguida, fez-se a leitura espectrofotométrica da absorvância a 725 nm (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2, Fremont, CA, USA). Todas as dosagens foram realizadas em triplicata. O conteúdo protéico dos extratos foi expresso em mg/mL. A curva de calibração das proteínas (Figura 2.5) foi construída empregando-se albumina de soro bovino como padrão, nas concentrações de 0,06 a 0,62 mg/mL (Araújo, 2004), utilizando-se as coordenadas absorvância vs. concentração.

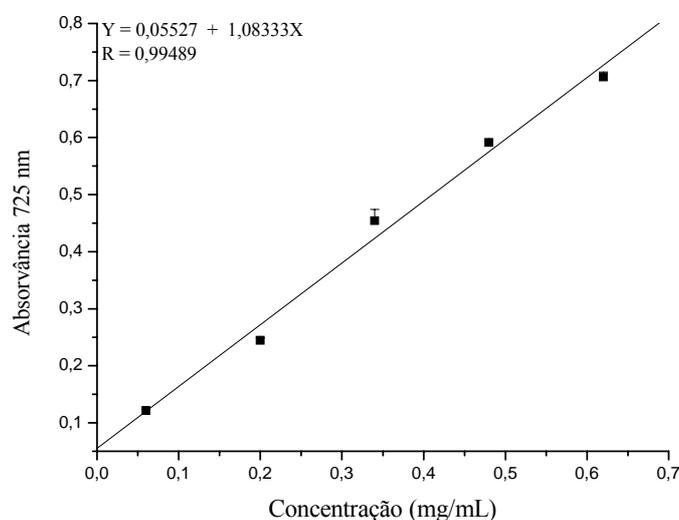


Figura 2.5. Exemplo de uma curva de calibração para dosagem de proteínas totais nos extratos vegetais, usando-se como padrão a albumina de soro bovino. Cada ponto representa a média de três amostras.

2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Com o fim de se investigar o transporte dos metais Zn e Cd nos tecidos de *G. angustifolia*, procedeu-se à extração das raízes de bambu cultivados em solo contaminado e a subsequente eletroforese dos extratos. O objetivo desse experimento foi determinar a presença de possíveis proteínas transportadoras de metal (fitoquelatinas).

Os extratos foram obtidos macerando-se manualmente uma quantidade definida de raízes (0,2 g) com tampão PBS (*phosphate buffered saline*) 0,1 M, pH 7,4 (Apêndice A.3) em banho de gelo. O homogenado de células foi centrifugado a 20000 x g com o auxílio de uma centrífuga refrigerada (Sigma 3K 30, Osterode Alemanha) a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi removido com auxílio de uma pipeta para posterior aplicação no gel de poliacrilamida.

A corrida eletroforética foi conduzida de acordo com o método descrito por Laemmli (1970) em gel de poliacrilamida 10%. As placas de vidro foram previamente limpas com álcool 70% e secadas para a montagem do gel. O gel de separação foi preparado com 1,6 mL de água deionizada, 2,8 mL de tampão tris-HCl 0,4 M, pH 8,8, 3,0

mL de acrilamida (acrilamida/biscarilamida 30:1), 75 µL SDS 10%, 20 µL de persulfato de amônio 10% e 5 µL de TEMED. O pente de Teflon foi colocado imediatamente após a aplicação do gel, aguardando-se 30 min para sua completa polimerização. Após decorrido o tempo necessário, o pente foi cuidadosamente retirado. A corrida foi realizada à temperatura ambiente em tampão tris-HCl 0,1 M, tricina 0,1 M, pH 8,25 e SDS 0,1% durante 2 h aproximadamente, em corrente de 100 V. Após a corrida, o gel foi corado com numa solução de 1% Coomassie brilliant blue R250 em água : metanol : ácido acético (4,5:4,5:1; v/v/v) por 5 min e fixado com solução de metanol : ácido acético : água (1:1:8; v/v/v) à temperatura ambiente (Schägger e Von Jagow, 1987).

2.11. Voltametria cíclica

Os estudos de voltametria cíclica foram realizados com amostras do extrato das raízes de bambu maceradas em PBS 0,05 M, utilizando-se um sistema de três eletrodos: trabalho (carbono vítrio; BAS, área 7.065 mm²), auxiliar (fio de platina) e referência (Ag/AgCl/Cl⁻ 0,1 mol/L). Nitrogênio gasoso foi borbulhado nas soluções nos intervalos entre as análises para garantir a retirada de oxigênio dissolvido no meio. Utilizou-se como eletrólito suporte um tampão de amônia 0,1 M, pH 9,5 e [Co(NH₃)₆]Cl₃ 1 mM (Fojta *et al*, 2005). As análises eletroquímicas foram realizadas com o auxílio de um potenciostato/galvanostato (modelo Autolab PGSTAT 20, Eco Chemie, Utrecht, Holanda) conectado a um microcomputador. As condições de análise foram: frequência de 230 Hz,, velocidade de escaneamento 10 mV/s, potencial inicial de 0,5 V e potencial final de 2.0 V Todos os experimentos foram desenvolvidos à temperatura ambiente. A análise dos dados foi realizada a partir de gráficos, utilizando-se o programa Origin versão 6.0.

2.12. Análises estatísticas

Os resultados relativos aos efeitos dos vários tratamentos foram analisados estatisticamente através de análise de variância (ANOVA) e do Teste de Tukey (Bishop, 1966). Todas as análises foram realizadas usando-se o programa Origin 96 (RockWare Inc, Golden, CO, USA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Análise dos substratos e água de irrigação

O substrato ATA, no qual as mudas de *G. angustifolia* haviam sido originalmente plantadas, apresentou uma concentração média de Zn e Cd na fração biodisponível equivalente a 109 ± 3 e 12 ± 4 mg/kg, respectivamente. A presença desses metais também foi detectada na fração biodisponível da terra vegetal adquirida comercialmente (67 ± 15 mg/kg de Zn e 9 ± 4 mg/kg de Cd), na qual pretendia-se multiplicar e 'limpar' as mudas de bambu.

A terra vegetal comercial foi considerada imprópria para a limpeza das mudas e, por essa razão, optou-se por transferi-las para vermiculita expandida, um silicato pertencente à família das micas composto principalmente de ferro, alumínio e cálcio. Devido a sua elevada capacidade de troca catiônica e de absorção de água e nutrientes, a vermiculita é muito utilizada na produção e no plantio de mudas, em reflorestamentos, horticultura e jardinagem. As mudas de bambu permaneceram na vermiculita por um período de 3 meses antes dos experimentos a fim de minimizar as concentrações de metal existentes nos tecidos vegetais, evitar a interferência das concentrações originalmente presentes sobre os resultados e levar a interpretação errônea dos mesmos. Como não foi detectada a presença dos metais Zn e Cd na água da torneira suprida pela Casal, esta foi considerada adequada para a irrigação das plantas, juntamente com a solução de Hoagland.

3.2. Distribuição de Zn e Cd nos tecidos de *G. angustifolia*

O primeiro e segundo experimentos foram conduzidos em solução para possibilitar o estudo do comportamento da *G. angustifolia* na ausência dos fatores interferentes existentes na complexa matriz do solo.

3.2.1. Translocação e acumulação de Zn

A Figura 3.1 (Apêndice A.4) mostra os resultados do experimento em que as mudas de bambu foram expostas a concentrações variadas de sulfato de zinco durante um período de 72 h. Pode-se observar claramente que o bambu foi capaz de absorver grandes quantidades de Zn num curto espaço de tempo. As quantidades de Zn

encontradas nas mudas controles refletem as concentrações de metal remanescentes nos tecidos, mesmo após a limpeza das mudas através do plantio em vermiculita.

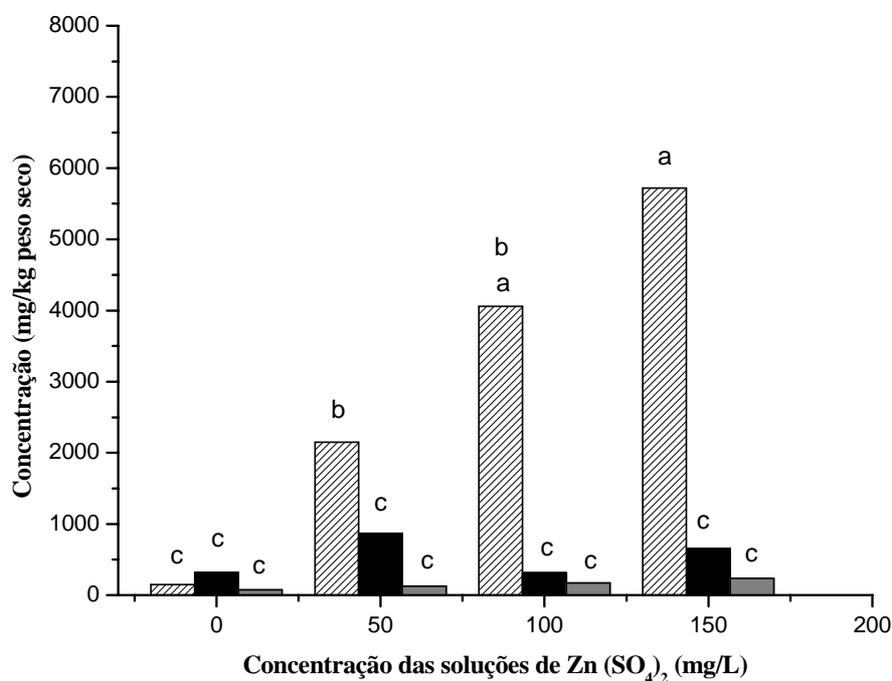


Figura 3.1. Concentração de Zn nos tecidos de *Guadua angustifolia*, após exposição às soluções de sulfato de zinco (0, 50, 100 e 150 mg/L): raízes (▨), colmo (■) e folhas (◼). Letras minúsculas iguais acima das barras indicam que os valores das concentrações não são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

De acordo com a Figura 3.1, as raízes foram os tecidos que mais acumularam Zn ao final de 72 h, com uma concentração máxima de 5722 ± 1170 mg/kg p.s., enquanto que o acúmulo nos colmos e folhas foi de 645 ± 106 e 235 ± 15 mg/kg p.s. respectivamente. Portanto, 86,6% da quantidade total de Zn encontrava-se acumulada nas raízes, enquanto que nos colmos e folhas, a quantidade acumulada foi de 9,8 e 3,6%, respectivamente.

Durante o período de 72 h, a concentração de Zn nas raízes aumentou ligeiramente, mas de forma significativa ($p \leq 0,05$), com a variação das concentrações das soluções. Nos demais tecidos a variação não foi estatisticamente significativa. O aumento da concentração de Zn nos tecidos ocorreu simultaneamente ao aumento do suprimento de Zn, fato observado em várias plantas superiores, inclusive em gramíneas, como o *Triticum aestivum* (trigo) (Santa Maria e Cogliatti, 1998). O aumento da

concentração externa de Zn, favorecido pelo potencial de membrana, produz um aumento do influxo do cátion Zn^{2+} no simplasto (conjunto de citoplasmas ligados pelos plasmodesmatas) das raízes (Santa Maria e Cogliatti, 1998).

O Zn é um micronutriente, que desempenha funções no crescimento e metabolismo normal da planta. Sua acumulação e distribuição nos tecidos vegetais são altamente reguladas em função da disponibilidade no ambiente, seja em condições de excesso ou escassez (Marschner, 1995). Assim, o Zn pode ficar acumulado sob forma não tóxica para posterior distribuição e uso, provavelmente preso à lignina, pectina e celulose da parede celular (Whitehead *et al.*, 1985; Vesik *et al.*, 1999) ou na forma de complexos com proteínas, glutatona, fitoquelatinas ou fitosideróforos (Navari-Izzo e Quartacci, 2001).

O fato da concentração de Zn não ter aumentado nas partes aéreas das plantas pode ter sido influenciada pelo desenvolvimento insuficiente da biomassa aérea durante esses três dias de experimento. O crescimento contínuo das raízes é importante para a absorção dos nutrientes e a transpiração (através das folhas) é a força motriz para a ascensão das substâncias carregadas pelo xilema (Peres, 2006; Soares *et al.*, 2001), de modo que a distribuição do metal pode ter sido comprometida.

Por essa razão, o segundo experimento foi conduzido com solução de sulfato de zinco 150 mg/L durante um período de 27 dias. Nesse experimento, manteve-se constante a concentração da solução e variou-se o tempo de exposição das mudas ao metal. Avaliando-se o perfil de acumulação (Figura 3.2; Apêndice A.5) percebe-se que a maior parte do Zn ficou acumulado nas raízes, mas a medida que os dias se sucederam ocorreu um ligeiro aumento nos colmos. Ao final de 27 dias, 85,8 % do Zn absorvido encontrava-se acumulado nas raízes e somente 14,2 % nas partes aéreas.

A rápida absorção do Zn pode ser explicada pelo sistema radicular bem desenvolvido do bambu com densa zona pilífera e inúmeras raízes secundárias, além do gradiente favorável do potencial de membrana para o influxo de Zn^{2+} , comentado anteriormente. A baixa translocação do metal para as partes aéreas talvez possa ser explicada pela dificuldade do íon de chegar ao xilema via apoplasto (paredes celulares e espaços intercelulares) ou simplasto. Todo esse processo envolve a passagem dos íons pelas membranas e o envolvimento de moléculas transportadoras específicas. No caso de muitas gramíneas são os fitosideróforos ou fitometalóforos que formam quelatos com o metais e auxiliam a passagem pelas membranas e a entrada no citoplasma.

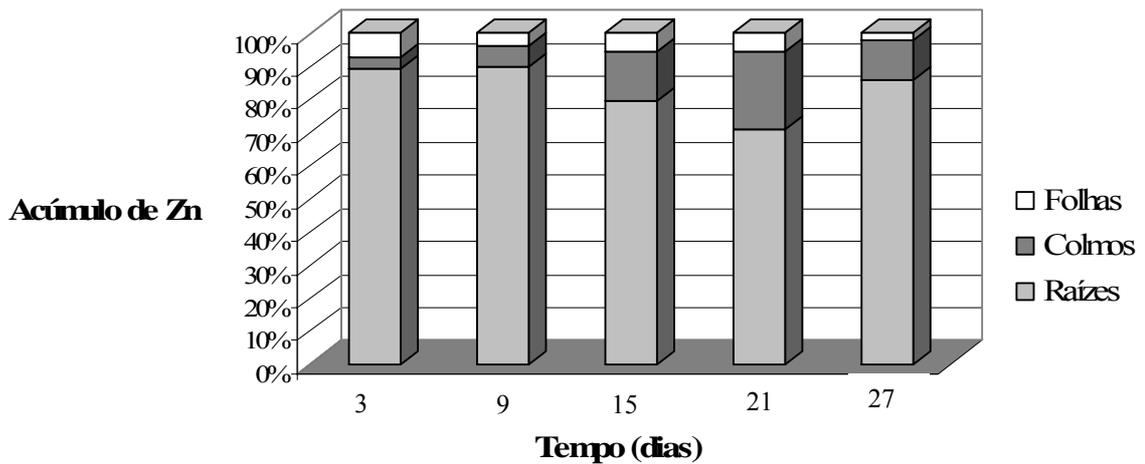


Figura 3.2. Porcentagem relativa de Zn nos tecidos de *Guadua angustifolia* ao longo de 27 dias de exposição à solução de sulfato de zinco (150 mg/L)

O cálculo dos fatores de translocação (Tabela 3.1) permite observar o seguinte perfil de comportamento: a) a velocidade de translocação do Zn das raízes para os colmos foi baixa, mas aumentou progressivamente até o 21º dia (FT1); b) a velocidade de translocação do Zn dos colmos para as folhas, inicialmente alta, diminuiu à medida que os dias transcorreram (FT2); c) a velocidade de translocação do Zn das raízes para as folhas foi muito baixa e oscilou durante o período (FT3); d) de um modo geral a translocação do Zn das raízes para as partes aéreas foi lenta, durante os 27 dias de experimento (FT4). Com base nesses resultados, pode-se afirmar que a translocação do zinco das raízes para as folhas foi bastante dificultada e quantidades pequenas de metal conseguiram chegar aos tecidos fotossintetizantes.

Por definição, as plantas que possuem um $FT > 1$ são aquelas que apresentam maior capacidade de acumular metal nas partes aéreas e, portanto apresentam potencial para a fitoextração (Zhao *et al.*, 2003., Mattina *et al.*, 2003). No caso do bambu o valor de FT3 foi inferior a 1, indicando que essa espécie de gramínea não possui atributos genéticos para a hiperacumulação de Zn. Nas plantas hiperacumuladoras a concentração de metal nas partes aéreas (especialmente nas folhas) é muito superior àquela das raízes.

Tabela 3.1. Fatores de translocação calculados com base nas concentrações de Zn acumuladas pelos tecidos durante 27 dias de exposição a solução de sulfato de zinco

Fatores de translocação	Duração do tratamento (dias)				
	3	9	15	21	27
FT1	0,03	0,07	0,19	0,33	0,14
FT2	2,35	0,64	0,35	0,24	0,16
FT3	0,08	0,04	0,06	0,08	0,02
FT4	0,12	0,11	0,26	0,41	0,16

FT1 = $C_{\text{colmos}} / C_{\text{raízes}}$ (translocação das raízes para os colmos); FT2 = $C_{\text{folhas}} / C_{\text{colmo}}$ (translocação dos colmos para as folhas); FT3 = $C_{\text{folhas}} / C_{\text{raízes}}$ (translocação das raízes para as folhas); FT4 = $C_{\text{partes aéreas}} / C_{\text{raízes}}$ (translocação das raízes para a parte aérea da planta).

3.2.2. Translocação e acumulação de Cd

A Figura 3.3 (Apêndice A.6) mostra os resultados do experimento em que as mudas de bambu foram expostas a concentrações variadas de sulfato de cádmio durante um período de 72 h. Neste caso também, as raízes foram os tecidos que mais acumularam Cd, independentemente da concentração. A concentração máxima acumulada nas raízes foi 143 ± 22 mg/kg de peso seco ao final de 72 h, constituindo 68,6% da quantidade total acumulada. A quantidade de Cd acumulada nos colmos e folhas foi 47 ± 12 e $18,5 \pm 2,9$ mg/kg de peso seco (22.5 e 8.9% respectivamente). As quantidades de Cd encontradas nas mudas controles refletem as concentrações de metal remanescentes nos tecidos, mesmo após a limpeza das mudas através do cultivo em vermiculita.

O segundo experimento foi conduzido com solução de sulfato de cádmio 15 mg/L durante um período de 27 dias, por ser a maior concentração do metal analisada no estudo. Nesse experimento, manteve-se constante a concentração da solução e variou-se o tempo de exposição das mudas ao metal.

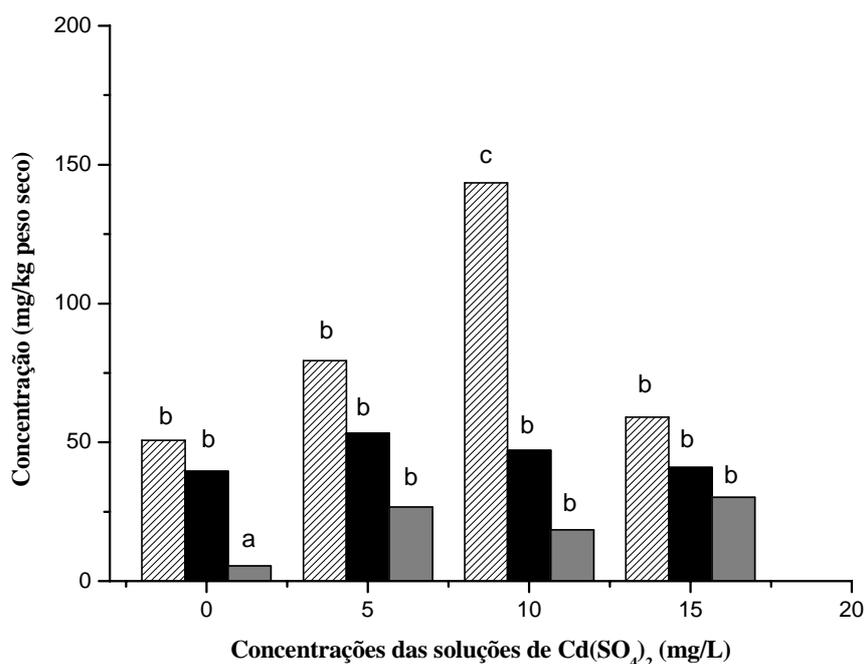


Figura 3.3 Concentração de Cd encontradas nos tecidos de *Guadua angustifolia*, após exposição às soluções de sulfato de cádmio (0, 5, 10 e 15 mg/L): raízes (▨), colmos (■) e folhas (◻). As letras minúsculas iguais acima das barras indicam que os valores das concentrações não são significativamente diferentes ($p < 0,05$)

Ao final de 27 dias de experimento, a maior parte do Cd absorvido encontrava-se acumulado nas partes aéreas (62.2%), enquanto que nas raízes o acúmulo foi de 37.8% (Figura 3.4; Apêndice A.7). Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o Cd foi absorvido rapidamente pelas raízes, translocado para os colmos onde passou a se acumular. A distribuição do Cd entre as raízes e os colmos foi mais equilibrada que no caso do Zn. Proporcionalmente, as folhas também acumularam mais Cd do que Zn (Figura 3.4).

O cálculo dos fatores de translocação (Tabela 3.2) permitiu traçar o seguinte perfil de comportamento: a) a velocidade de translocação do Cd das raízes para os colmos oscilou de forma positiva com o passar dos dias, isto é, a translocação foi mais rápida do que no caso do Zn (FT1); b) a velocidade de translocação do Cd dos colmos para as folhas foi lenta e oscilou inicialmente, mas tendeu a diminuir no final do período (FT2); c) a velocidade de translocação das raízes para as folhas foi mais ou menos estável, porém lenta durante todo o período (FT3); d) a velocidade de translocação do Cd das raízes para as partes aéreas oscilou durante o período, mas foi bastante

expressiva, ou seja, maior que 1 (FT4). Os resultados demonstram que o Cd foi translocado rapidamente para os colmos onde parece se acumular mais do que nas folhas.

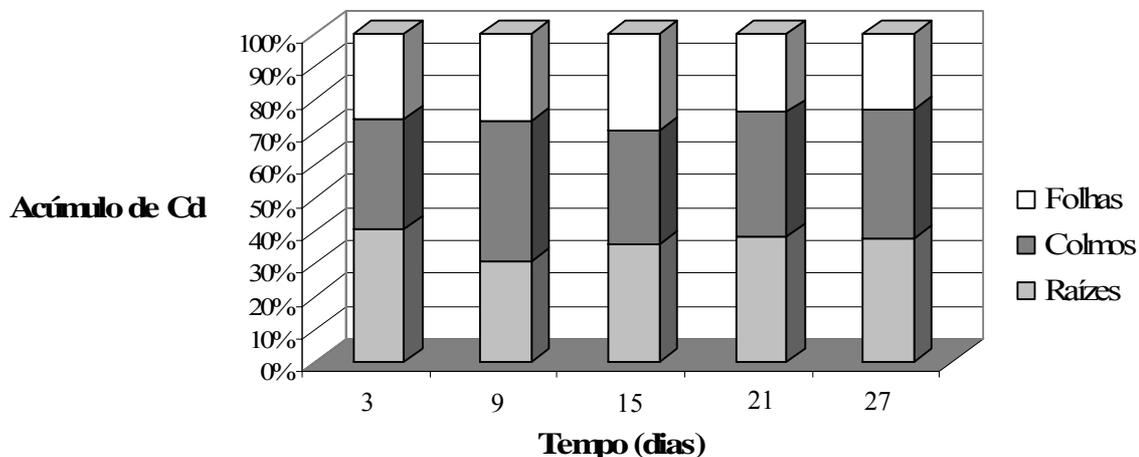


Figura 3.4. Porcentagem relativa de Cd nos tecidos de *Guadua angustifolia* ao longo de 27 dias de exposição à solução de sulfato de cádmio (15 mg/L)

Tabela 3.2. Fatores de translocação calculados com base nas concentrações de Cd acumuladas pelos tecidos durante 27 dias de exposição à solução de sulfato de cádmio

Fatores de translocação	Duração do tratamento (dias)				
	3	9	15	21	27
FT1	0.82	1.40	0.97	0.98	1.04
FT2	0,78	0,62	0,84	0,64	0,58
FT3	0,63	0,86	0,82	0.63	0.60
FT4	1.45	2.27	1.78	1.61	1.64

FT1 = $C_{\text{colmos}} / C_{\text{raízes}}$ (translocação das raízes para os colmos); FT2 = $C_{\text{folhas}} / C_{\text{colmo}}$ (translocação dos colmos para as folhas); FT3 = $C_{\text{folhas}} / C_{\text{raízes}}$ (translocação das raízes para as folhas); FT4 = $C_{\text{partes aéreas}} / C_{\text{raízes}}$ (translocação das raízes para a parte aérea da planta).

O Cd é transportado nas plantas através de rotas semelhantes às do Zn (Grant *et al.*, 1998). Acredita-se que o transporte de Cd seja mediado pelas mesmas proteínas transportadoras envolvidas no transporte de micronutrientes como Zn e Fe, conhecidas como ZNT1 e IRT1 (Benavides *et al.*, 2005). Entretanto, a maioria das plantas retém mais de 50% do cádmio absorvido nas raízes e somente pequenas quantidades são transportadas para as folhas. Em geral o conteúdo de Cd decresce na ordem: raízes > caules > folhas > frutos > sementes (Obata e Umebayashi, 1993; Page *et al.*, 2006). Os resultados dos experimentos realizados com o bambu, sob condições hidropônicas, indicaram que o Cd apresenta maior mobilidade através dos tecidos do que o Zn, resultado que parece contrariar as evidências.

Em geral, o acúmulo de um dado metal pelas plantas é função da capacidade de absorção e do estabelecimento de ligações intracelulares. Em todos os níveis, a concentração e a afinidade por moléculas quelantes, bem como a seletividade das membranas afeta a velocidade de acumulação. Uma das primeiras barreiras contra o estresse por Cd opera ao nível das raízes através da imobilização nas paredes celulares (ácidos poligalacturônicos) e carboidratos extracelulares (Ex: mucilagens). A segunda barreira é a membrana celular, através da ligação cruzada entre proteínas ricas em grupamentos sulfidríla, inibição de proteínas de membrana como a ATPase ou mudança na composição e fluidez dos lipídios de membrana (Benavides *et al.*, 2005).

3.3. Transporte e acumulação de zinco e cádmio nos tecidos de *G. angustifolia* cultivada em solo contaminado

A fim de confirmar os resultados apresentados previamente e reproduzir com mais fidelidade as condições reais de cultivo, um terceiro experimento foi desenvolvido utilizando-se o solo ATA como meio de sustentação e manutenção das mudas de bambu.

A Tabela 3.5 mostra a concentração dos metais Zn e Cd na fração biodisponível do solo original, no solo contaminado com os metais e no solo cultivado com bambu, decorrido 6 meses de conservação na casa de vegetação. O estudo foi conduzido num solo em que a biodisponibilidade de Zn e Cd encontrava-se dentro das faixas de concentração empregadas em outros estudos, i.e. 0,1 a 1500 mg/kg de Zn e 0,1 a 25 mg/kg de Cd (Salah e Barrington, 2006).

Tabela 3.3. Concentrações de Zn e Cd na fração biodisponível do solo decorridos seis meses de conservação na casa de vegetação

Metal	Concentração de metal no solo ATA*(mg/kg)		
	Solo original	Solo contaminado artificialmente	Solo cultivado com bambu
Zn	109 ± 3 ^a	598 ± 25 ^c	206 ± 32 ^b
Cd	12 ± 4 ^a	156 ± 16 ^c	94 ± 8 ^b

* Mistura de areia branca de riacho lavada, torta de cana-de-açúcar, argila (ou traço) na proporção de 1:2:1.

Numa mesma linha, letras minúsculas iguais sobrescritas indicam que os valores médios das concentrações não são significativamente diferentes ($p < 0,05$); $n = 3$ plantas.

Os resultados demonstram que ocorreu redução da concentração dos metais no solo cultivado com bambu (amostras retiradas na zona da rizosfera), sendo essa redução de 65,6% para o Zn e 60,2% para o Cd.

A distribuição dos metais nos tecidos obtidos sob condições experimentais no solo não coincidiu com aquela obtida sob condições hidropônicas, isto é, houve uma maior mobilidade do Zn na direção dos colmos e folhas, comparando-se com o Cd cuja mobilidade foi menor. A Figura 3.5 mostra que o acúmulo de Zn nas raízes do bambu foi de 57,2%, enquanto que nas partes aéreas foi de 42,8%. O acúmulo de Cd nas raízes foi de 79,9% e nas partes aéreas foi de 20,1%. O acúmulo de Zn e Cd nas plantas cultivadas no solo obedeceram à ordem raízes > colmos > folhas, que ocorre na maioria das plantas (Obata e Umebayashi, 1993; Page *et al.*, 2006).

De acordo com as evidências apresentadas na literatura, a distribuição de Zn e Cd nos tecidos do bambu cultivado no solo pode ter sido influenciada por inúmeros fatores, a saber: a) as propriedades do solo como tipo, pH, presença de matéria orgânica, presença de outros cátions que afetam a absorção pela planta, etc (Sidle *et al.*, 1976; Sauerbeck, 1991; Pinto *et al.*, 2004); b) mecanismos fisiológicos como o potencial de membrana, pH celular, presença de ligantes orgânicos tanto no solo quanto nos tecidos vegetais (White *et al.*, 1981; Checkai *et al.*, 1987; Clarkson e Lüttge, 1989; Von Wirén *et al.*, 1996); c) a redistribuição interna dentro da planta através do floema e mecanismos de influxo e efluxo dos metais (Santa-Maria e Cogliatti, 1988, 1998); d) efeitos da interação entre Cd e Zn, visto que no solo ATA ambos os elementos estavam presentes (Luo e Rimmer, 1995; Hart *et al.*, 2002; Salah e Barrington, 2006).

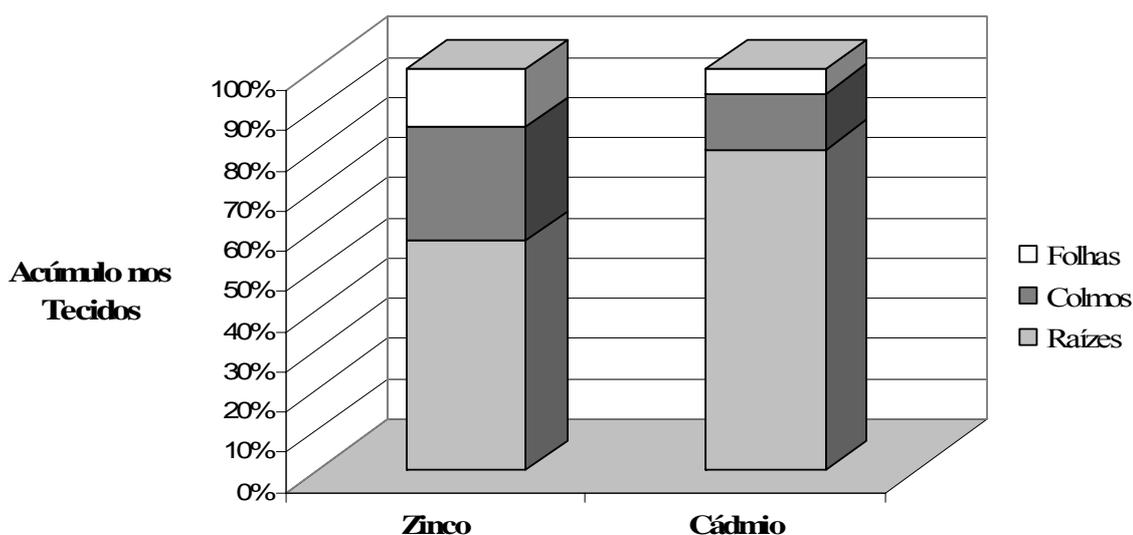


Figura 3.5. Porcentagem relativa de Zn e Cd nos tecidos de *Guadua angustifolia* após seis meses de exposição a concentrações elevadas de metais no solo

A Tabela 3.4 mostra que o Zn e Cd ficaram acumulados principalmente nas raízes. Para fins de comparação com outras espécies, compilou-se a Tabela 3.5, que inclui exemplos de espécies hiperacumuladoras de Zn e Cd.

Tabela 3.4. Acúmulo de zinco e cádmio nos tecidos de *Guadua angustifolia* cultivadas em solo artificialmente contaminado com os metais

Tecidos vegetais	Concentração de Zn (mg/kg ps)		Concentração de Cd (mg/kg ps)	
	Controle*	Após 6 meses**	Controle*	Após 6 meses**
Raízes	149 ± 83 ^a	2720 ± 1108 ^{b, c}	51 ± 6 ^b	770 ± 191 ^c
Colmos	318 ± 58 ^a	1345 ± 389 ^{b, d}	40 ± 8 ^b	134 ± 25 ^d
Folhas	82 ± 22 ^a	687 ± 208 ^b	5,4 ± 1,4 ^a	60 ± 15 ^b

* Plantas cultivadas em solo ATA original (mistura de areia branca de riacho lavada, torta de cana-de-açúcar, argila ou traço na proporção de 1:2:1).

** Plantas cultivadas em solo ATA artificialmente contaminado com Zn ou Cd.

Num mesmo grupo, letras minúsculas iguais sobrescritas indicam que os valores médios das concentrações não são significativamente diferentes ($p < 0,05$); $n = 3$ plantas.

Tabela 3.5. Distribuição de Zn e Cd nos tecidos de algumas espécies vegetais obtidas de solos contaminados

Espécies vegetais (Família)*	Zn			Cd			Referências
	Raízes	Caules	Folhas	Raízes	Caules	Folhas	
<i>Acácia mangium</i> (Mimosaceae) ²	3300	691	614	213	8,7	7,2	Soares <i>et al.</i> , 2001
<i>Arabis alpina</i> Var. <i>parviflora</i> (Brassicaceae) ¹	4508,7	-	5632,8	-	-	-	Yanqun <i>et al.</i> , 2005
<i>Corydalis pterygotata</i> (Ericaceae) ¹	5402,3	-	5959,9	311,5	-	215,0	
<i>Cordia trichotoma</i> (Boraginaceae) ¹	2057	1040	1109	55	37	16	Soares <i>et al.</i> , 2001
<i>Corydalis petrophila</i> (Ericaceae) ¹	-	-	-	301,0	-	329,8	Yanqun <i>et al.</i> , 2005
<i>Dendropanax cuneatum</i> (Araliaceae) ²	1569	674	443	9,3	58	33	Soares <i>et al.</i> , 2001
<i>Incarvillea</i> sp. (Bignoniaceae) ¹	6050,1	-	7004,3	-	-	-	Yanqun <i>et al.</i> , 2005
<i>Machaerium nictidans</i> (Fabaceae) ²	1808	1092	725	45	33	37	Soares <i>et al.</i> , 2001
<i>Peltophorum dubium</i> (Caesalpiniaceae) ²	3104	239	878	126	12	26	
<i>Plantage erosa</i> ¹	-	-	-	231,4	-	164,8	Yanqun <i>et al.</i> , 2005
<i>Potentilla fulgens</i> (Rosaceae) ¹	-	-	-	320,1	-	214,0	
<i>Picris hieracioides</i> subsp. <i>japonica krylv</i> (Asteraceae) ¹	-	-	-	354,5	-	145,2	
<i>Solanum granulosum leprosum</i> (Solanaceae) ²	3087	2115	802	128	45	55	Soares <i>et al.</i> , 2001
<i>Sedum alfredii</i> (Crassulaceae)	-	-	-	3100	5300	-	Zhou <i>et al.</i> , 2005
<i>Senna macranthera</i> (Caesalpiniaceae) ²	2805	1211	1177	25	31	35	Soares <i>et al.</i> , 2001
<i>Sonchus Asier</i> (Asteraceae) ¹	7893,9	-	5048,8	-	-	-	Yanqun <i>et al.</i> , 2005
<i>Thalspi caerulescens</i> (Brassicaceae) ¹	-	-	21000	-	-	-	Wojcik <i>et al.</i> , 2004
<i>Thalspi goesingense</i> (Brassicaceae) ¹	-	-	-	-	-	28060	Lombi <i>et al.</i> , 1999

- dados não disponíveis;

* Obtidas de solos com teores elevados de Zn (> 8000 mg/kg) e Cd (> 70 mg/kg)

¹ espécies herbáceas

² espécies arbóreas

Algumas das espécies citadas na Tabela 3.5 são do tipo herbáceas e nativas de áreas poluídas pela mineração, portanto naturalmente tolerantes a altas concentrações de metal. O gênero *Thlaspi*, por exemplo inclui espécies hiperacumuladoras de Zn, Cd, Ni e Pb e espécies não acumuladoras. *T. caerulescens*, particularmente, é uma das espécies mais eficientes para a fitorremediação, pois pode acumular grandes quantidades de Zn e Cd nas folhas (3 e 0,01% do peso seco, respectivamente) (Robinson *et al.*, 1998). Apesar desse predicado extraordinário, o uso dessa planta em escala comercial é limitado, devido ao pequeno tamanho e crescimento vagaroso. Atualmente, vários grupos de pesquisa estão se empenhando em incrementar a biomassa da *T. caerulescens* e *T. goesingense* através de seleção natural ou engenharia genética e da aplicação de fertilizantes apropriados. Entretanto, existe uma outra possibilidade, talvez mais viável, que é a transferência das características genéticas da hiperacumuladora *Thlaspi* para espécies com alta produtividade em termos de biomassa, seja através de engenharia genética, seja através de hibridização somática.

Um estudo de campo (Yanqun *et al.*, 2005) conduzido numa área de mineração na província de Yunnan na China considerou 4 das 129 espécies de plantas investigadas (*Arabis alpinal* Var. *parviflora*, *Corydalis pterygopetala*, *Incarvillea* sp. e *Sonchus asper*; Tabela 3.5) como sendo hiperacumuladoras de Zn, embora nenhuma tenha se enquadrado dentro do critério de hiperacumulação estabelecido anteriormente (Baker e Brooks, 1989; Baker *et al.*, 1994), isto é concentração de Zn nas folhas >10000 mg/kg p.s. Nesse mesmo estudo, 5 espécies hiperacumuladoras de Cd foram selecionadas (*C. petrophila*, *C. pterygopetala*, *Potentilla fulgens*, *Plantage erosa*, *Picris hieracioides* subsp. *japonica krylv*; Tabela 3.5), mas nesses casos o critério de hiperacumulação (Baker e Brooks, 1989; Baker *et al.*, 1989) foi atendido, isto é, concentração de Cd nas folhas >100 mg/kg p.s.

Soares e colaboradores (2001) estudaram a distribuição de Zn e Cd em 20 espécies arbóreas, sendo que algumas delas estão mencionadas na Tabela 3.5. *Cordia trichotoma* e *Senna macranthera* foram às espécies que apresentaram os maiores teores de Zn e Cd nas folhas. Todas as espécies investigadas apresentaram teores baixos de Cd nos tecidos, sendo que as que mais se destacaram foram *Acácia mangium* (213 mg/kg p.s. raízes), *Dendropanax cuneatum* (58 mg/kg p.s. caules) e *Solanum granulatum leprosum* (55mg/kg p.s. folhas)

3.4. Bioconcentração e translocação de Zn e Cd em *G. angustifolia*

Baseando-se nos dados apresentados nas Tabelas 3.4 e 3.5 foi possível calcular os fatores de bioconcentração (FBC1, FBC2 e FBC3) e os fatores de translocação (FT3 e FT4) do bambu cultivado no solo, os quais foram tabulados juntamente com os valores correspondentes a outras espécies, para facilitar a comparação (Tabela 3.6).

A análise dos fatores de bioconcentração (ou coeficientes de enriquecimento, como muitos autores denominam) nos permite tirar algumas conclusões, levando em consideração o solo, pois a absorção dos metais pesados pelas raízes não depende apenas das características genéticas das plantas, mas também das características do solo (concentração e formas químicas do metal, pH, tipo, quantidade de matéria orgânica, etc). Assim, os valores de FBC são importantes quando se considera o potencial de uma determinada espécie para a fitorremediação e a evidência é de que os mesmos diminuem com o aumento da concentração de metal no solo (Zhao *et al.*, 2003). Essa diminuição pode ser devida à saturação do metal nos tecidos e/ou a inativação dos sistemas de transporte de metal.

Como mostrado na Tabela 3.6, os valores de FBC1, FBC2 e FBC3 correspondentes ao Zn foram menores do que 1 para todas as espécies com exceção da *G. angustifolia* (FBC1 = 4,55; FBC2 = 2,24 e FBC3 = 1,14), sugerindo que no bambu, as raízes e os tecidos aéreos ainda não haviam sido saturados e/ou os sistemas de transporte ainda estavam ativos nas condições experimentais empregadas e uma quantidade ainda maior de metal poderia ser absorvida e transportada. Com relação ao Cd, o alto valor de FBC1 (4,93) parece indicar que ainda não havia ocorrido saturação nas raízes e/ou a inativação dos sistemas de transporte, ao contrário dos tecidos aéreos que apresentaram baixos valores de FBC2 e FBC3 (0,85 e 0,38, respectivamente). Resultados semelhantes foram obtidos para as espécies *Acácia mangium*, *Peltophorum dubium* e *Solanum granulosum leprosum* (Tabela 3.6).

A análise dos fatores de translocação nos permite avaliar a eficiência do transporte de metal das raízes para as folhas. Nas espécies hiperacumuladoras, os valores de FT são maiores do que 1, indicando que essas plantas toleram altas concentrações de metal porque possuem um sistema de transporte eficiente e conseguem aprisionar o metal em compartimentos específicos das folhas (vacúolos e apoplasto).

Tabela 3.6. Comparação entre os fatores de bioconcentração e translocação da *Guadua angustifolia* com os de outras espécies

Espécies	Zn					Cd					Referências
	FBC1	FBC2	FBC3	FT3	FT4	FBC1	FBC2	FBC3	FT3	FT4	
<i>G. angustifolia</i>	4,55	2,24	1,14	0,25	0,75	4,93	0,85	0,38	0,04	0,25	
<i>Acácia mangium</i>	0,38	0,08	0,07	0,19	0,40	2,84	0,12	0,96	0,03	0,07	Soares et al., 2001
<i>Arabis alpina</i> Var. <i>parviflora</i>	0,34	-	0,43	1,25	-	-	-	-	-	-	Yanqun et al., 2005
<i>Corydalis pterygopetala</i>	0,59	-	0,65	1,10	-	0,26	-	0,18	0,69	-	
<i>Cordia trichotoma</i>	0,23	0,12	0,13	0,54	1,05	0,73	0,49	0,21	0,29	0,96	Soares et al., 2001
<i>Corydalis petrophila</i>	-	-	-	-	-	0,16	-	0,19	1,10	-	Yanqun et al., 2005
<i>Dendropanax cuneatum</i>	0,18	0,07	0,05	0,28	0,71	0,12	0,77	0,44	3,54	9,78	Soares et al., 2001
<i>Incarvillea</i> sp.	0,69	-	0,80	1,16	-	-	-	-	-	-	Yanqun et al., 2005
<i>Machaerium nictidans</i>	0,20	0,12	0,08	0,40	1,00	0,60	0,44	0,49	0,82	1,5	Soares et al., 2001
<i>Peltophorum dubium</i>	0,35	0,03	0,10	0,28	0,36	1,68	0,16	0,35	0,20	0,30	
<i>Plantage erosa</i>	-	-	-	-	-	0,53	-	0,38	0,71	-	Yanqun et al., 2005
<i>Potentilla fulgens</i>	-	-	-	-	-	0,39	-	0,26	0,67	-	
<i>Picris hieracioides</i> subsp. <i>japonica krylv</i>	-	-	-	-	-	0,38	-	0,16	0,41	-	
<i>Solanum granulosum</i> <i>leprosum</i>	0,35	0,24	0,09	0,26	0,94	1,70	0,57	0,73	0,43	0,76	Soares et al., 2001
<i>Senna macranhtera</i>	0,32	0,14	0,13	0,42	0,85	0,33	0,41	0,47	1,4	2,64	
<i>Sonchus Asier</i>	0,60	-	0,38	0,64	-					-	Yanqun et al., 2005

FBC1 = $C_{\text{raízes}}/C_{\text{solo}}$; FBC2 = $C_{\text{caule,colmo}}/C_{\text{solo}}$; FBC3 = $C_{\text{folhas}}/C_{\text{solo}}$; FT3 = $C_{\text{folhas}}/C_{\text{raízes}}$; FT4 = $C_{\text{partes aéreas}}/C_{\text{raízes}}$

- dados não disponíveis ou impossível de ser calculado

Com relação ao transporte de Zn, as únicas espécies que apresentaram valores de $FT3 > 1$ foram *A. alpinal* Var. *parviflora*, *C. pterygopetala* e *Incarvillea* sp., enquanto que em relação ao Cd, somente *C. petrophila* e *Senna macranhtera* apresentaram $FT3$ maior do que 1 (Soares *et al.*, 2001; Yanqun *et al.*, 2005, Tabela 3.6). No caso da *G. angustifolia*, os valores de $FT3$ e $FT4$ para ambos os metais foram inferiores a 1 (Tabela 3.6), indicando que o sistema de transporte de Zn e Cd nos tecidos não é muito eficiente. Essa característica é um fator limitante para o emprego do bambu em fitorremediação, porém esse problema poderia ser contornado com o emprego de técnicas agronômicas apropriadas e de manipulação genética.

3.5. Crescimento da *G. angustifolia* em solo contaminado com Zn ou Cd

A Tabela 3.7 mostra os valores médios de alguns parâmetros analisados antes e depois do cultivo em solo contaminado (após 180 dias) e o respectivo controle.

Tabela 3.7. Desenvolvimento das mudas de *Guadua angustifolia* cultivadas em solo contaminado com Zn ou Cd

Parâmetros analisados	Valores médios ($n = 4$)					
	Solo não contaminado		Solo contaminado com Zn		Solo contaminado com Cd	
	T_i	T_f	T_i	T_f	T_i	T_f
Comprimento da raiz principal (cm)	30	68	30	53	30	53
Comprimento do colmo (cm)	43	76	38	72	41	67
Número de folhas	15	32	18	28	23	37
Biomassa total (g)	280	850	358	785	253	628

T_i = primeiro dia do experimento

T_f = último dia de experimento

Os resultados mostram que as plantas de bambu desenvolveram-se aparentemente bem em solo contaminado, embora o crescimento tenha sido afetado pelo excesso dos metais, como demonstram os parâmetros indicados na Tabela 3.7. Os efeitos tóxicos do Cd

foram mais evidentes dos que os do Zn. A fitotoxicidade do Zn manifesta-se em concentrações na faixa de 100 a 400 mg/kg p.s. (Soares *et al.*, 2001), enquanto que a do Cd na faixa de 10 a 50 mg/kg p.s. (Benavides *et al.*, 2005).

Embora os efeitos tóxicos do Cd tenham sido relatados por vários autores, não se conhece exatamente o mecanismo da toxicidade. Existem evidências de que a abertura dos estômatos, a transpiração e a fotossíntese são afetadas negativamente. Além disso, o cádmio interfere com a absorção, transporte e uso dos nutrientes (Ca, Mg, P e K) e água pelas plantas. Uma das mais recentes hipóteses é que o Cd induz o estresse oxidativo, seja através da produção de radicais livres, seja através da diminuição de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Benavides *et al.*, 2005).

3.6. Mecanismos de transporte de Zn e Cd nos tecidos de *G. angustifolia*

A presença de fitoquelatinas nas raízes do bambu foi testada através de eletroforese em gel de poliacrilamida segundo o protocolo descrito no item 2.10. Através desse protocolo, tentou-se assegurar as melhores condições (SDS-tricina) para a resolução de pequenos peptídeos (< 10 kDa), que é o caso das fitoquelatinas (Fan *et al.*, 2004). Apesar desse cuidado, não foi possível verificar a presença de bandas no gel que indicassem a possível presença dessas moléculas. É possível que, devido à presença dos grupos sulfidríla na estrutura das fitoquelatinas, as proteínas tenham sofrido oxidação. Por essa razão, seria importante testar outros tampões de extração, que incluam β -mercaptoetanol na composição, para propiciar condições redutoras e evitar a formação de dímeros (Villar *et al.*, 2006).

A complexação dos metais Zn e Cd com moléculas orgânicas possivelmente ocorridas nos tecidos do bambu também foram testadas através de método eletroquímico (voltametria cíclica). Nesse caso foram analisados os extratos brutos das raízes das plantas cultivadas em solo contaminado com Zn ou Cd juntamente com as soluções padrões de sulfato de zinco e sulfato de cádmio, usando-se uma faixa de potencial de 0,35 a 100 mV/s.

Na Figura 3.6 A, pode-se observar um par de picos referentes a oxiredução do Zn presente na solução padrão em potencial de 100 mV/s. Na Figura 3.6 B o par de picos correspondeu a oxiredução do Zn presente no extrato bruto de raízes e surgiu num potencial

um pouco menor que aquele observado para a solução padrão. O deslocamento dos picos pode ser melhor observado através da equação do gráfico. Os picos de oxiredução do Cd presente no extrato bruto das raízes também mostraram-se ligeiramente deslocados em potencial de 35 mV/s comparando-se com a solução padrão (Figura 3.6 A e B respectivamente).

O deslocamento de potencial observado para os processos redox do Zn e Cd sugere a possibilidade do metal estar complexado nos extratos brutos, embora a ocorrência de complexos organometálicos não pudesse ser confirmada através desses experimentos preliminares. Para isso, seria necessário melhorar as condições experimentais, alterando-se a concentração das soluções padrões, das amostras e a intensidade da corrente. Além disso, seria importante empregar soluções padrões apropriadas como complexos organometálicos de Zn e Cd com peptídeos ou compostos orgânicos de baixo peso molecular.

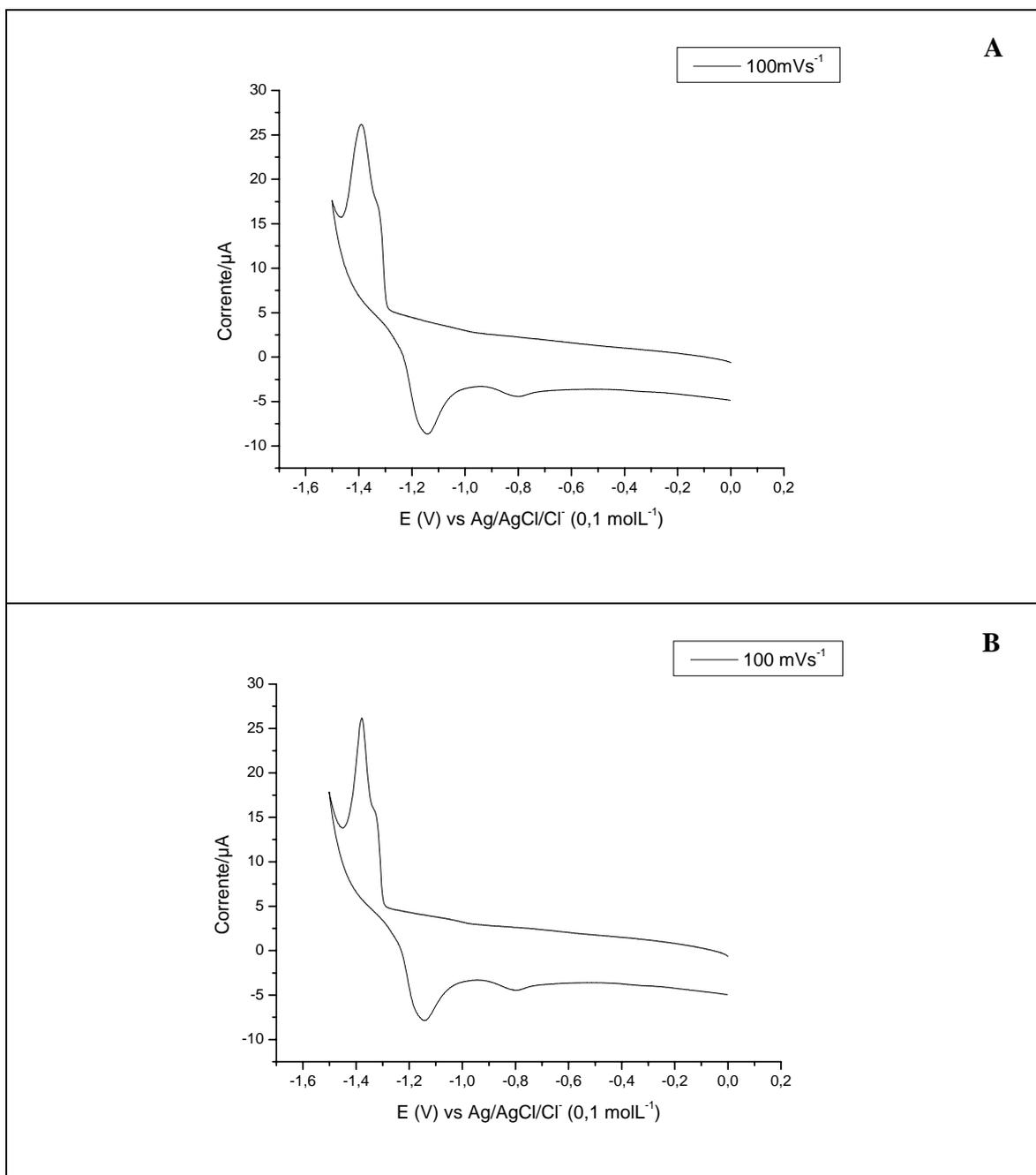


Figura 3.6. Comportamento redox da solução padrão de Zn (A) e do extrato bruto de raízes de *Guadua angustifolia* cultivada em solo contaminado com Zn (B) à 100 mV/s, analisado através de voltametria cíclica

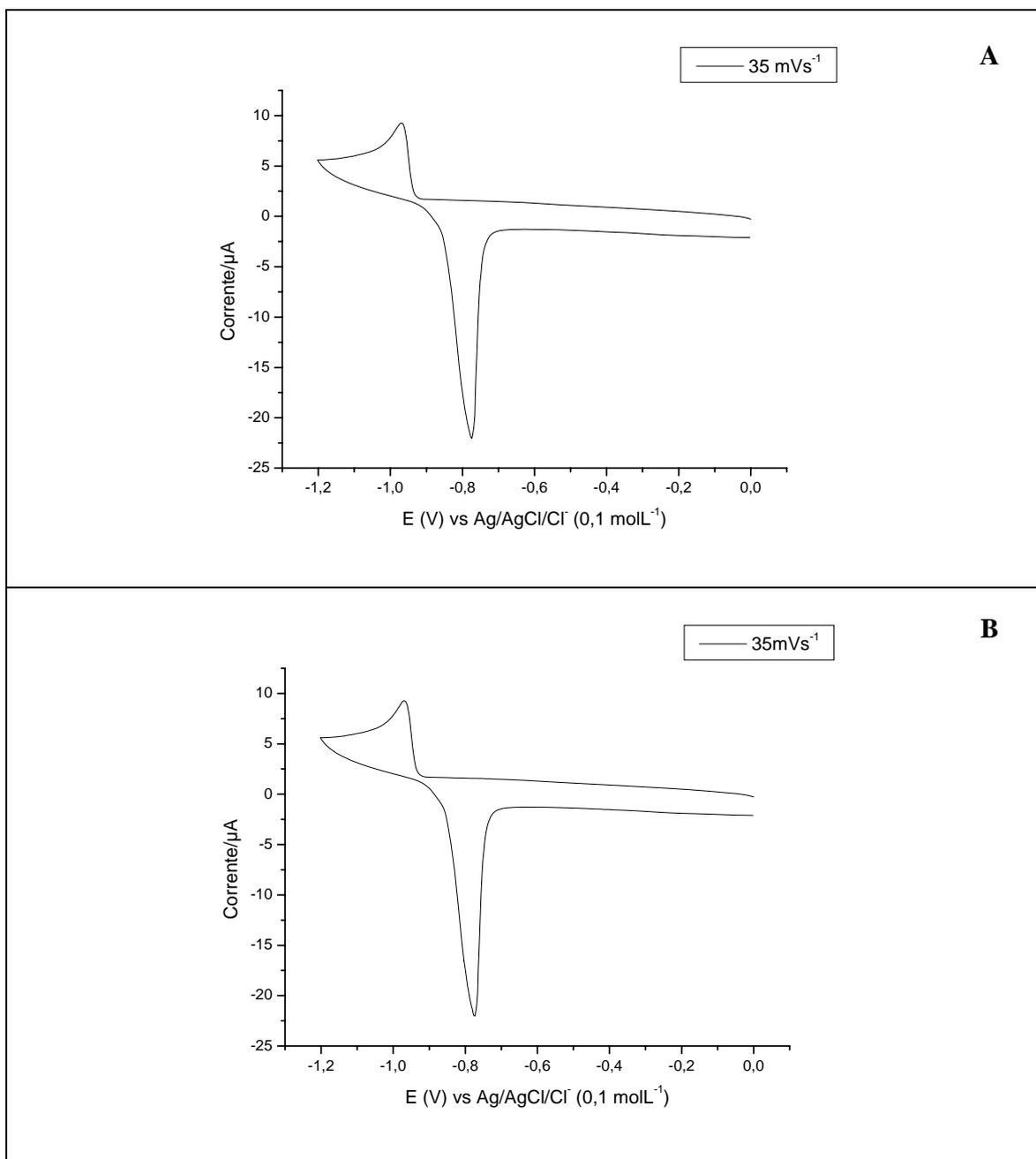


Figura 3.6. Comportamento redox da solução padrão de Cd (A) e do extrato bruto de raízes de *Guadua angustifolia* cultivada em solo contaminado com Cd (B) à 35 mV/s, analisado através de voltametria cíclica

4 CONCLUSÕES

No presente estudo, conseguiu-se estabelecer os seguintes parâmetros para a *G. angustifolia*:

a) O acúmulo de Zn nas folhas foi muito inferior ao limiar estabelecido de acordo com o primeiro critério adotado (concentrações de Zn nas folhas > 10000 mg/kg; Baker *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1994);

b) A concentração de Zn nas partes aéreas foi 20,3 vezes maior que o valor padronizado, atendendo ao segundo critério adotado (concentração nas partes aéreas deve ser 10 a 500 vezes maior do que aquela encontrada em plantas existentes em ambientes não poluídos, tomando-se como base Zn = 100 mg/kg peso seco; Shen e Liu, 1998);

c) Apesar das raízes acumularem maior quantidade de Zn que as folhas, o FBC3 ($FBC3 = C_{folhas}/C_{solo}$) foi maior que do que 1, atendendo parte do terceiro critério (a concentração de metal nas folhas deve ser invariavelmente maior que nas raízes e o fator de bioconcentração (FBC3) deve ser maior que 1, indicando uma habilidade especial da planta de absorver e transportar o metal para as partes aéreas; Baker e Brooks, 1989, Baker *et al.*, 1994);

d) O acúmulo de Cd nas folhas foi inferior ao limiar estabelecido pelo primeiro critério (concentração de Cd nas folhas > 100 mg/kg peso seco; Baker *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1994);

e) A concentração de Cd nas partes aéreas foi 194 vezes maior que o valor padronizado, obedecendo assim o segundo critério (concentração nas partes aéreas deve ser 10 a 500 vezes maior do que aquela encontrada em plantas existentes em ambientes não poluídos, tomando-se como base Cd = 1 mg/kg peso seco; Shen e Liu, 1998).

f) Os critérios científicos de classificação das plantas hiperacumuladoras não são muito claros. Esses critérios deveriam ser revistos e padrões científicos mais consistentes deveriam ser estabelecidos.

g) Um dos maiores obstáculos ao emprego da *G. angustifolia* para a fitorremediação de Zn e Cd parece estar relacionado com a translocação desses metais nos tecidos, principalmente dos colmos para as folhas;

h) Com base nos resultados apresentados podemos afirmar que essa espécie de bambu apresenta potencial para a fitorremediação de Zn e Cd. Considerando-se que a maior parte da biomassa da *G. angustifolia* é representada pelos colmos, os quais crescem muito rápido e atingem grandes alturas, a capacidade de acumular 2032 mg/kg de Zn e 194 mg/kg de Cd nas partes aéreas é bastante relevante;

i) O acúmulo de metal nos colmos não prejudica a aplicabilidade dos mesmos na construção civil, ao contrário de espécies comestíveis que não poderiam ser utilizadas para consumo humano;

j) O potencial do bambu para a fitoextração de Zn e Cd poderia ser explorado através do uso de:

- técnicas agronômicas adequadas para viabilizar o crescimento das plantas em solos poluídos, como é o caso dos terrenos ocupados por lixões;

- uso de substâncias quelantes para aumentar a solubilidade dos íons e o transporte dos mesmos nos tecidos;

- inserção de genes que codificam proteínas transportadoras de metal para facilitar a mobilidade dos mesmos das raízes para as folhas;

- o bambu poderia ser usado nos aterros sanitários como medida de prevenção à contaminação das áreas circunvizinhas.

4.1. Experimentos futuros

Considerando-se o potencial do bambu para a fitorremediação, pelo menos no que diz respeito aos metais Zn e Cd, seria interessante dar continuidade ao presente trabalho. Dentro desse contexto, alguns experimentos poderiam ser conduzidos com o objetivo de

esclarecer melhor os aspectos relacionados aos mecanismos de transporte daqueles metais e eventualmente do Pb. Os experimentos sugeridos são:

- a) Otimização das análises eletroforéticas dos extratos das raízes, colmos e folhas das plantas expostas ao Zn e Cd para tentar identificar possíveis proteínas transportadoras de metal;
- b) Otimização das análises eletroquímicas dos extratos das raízes, colmos e folhas das plantas expostas ao Zn e Cd para tentar identificar os complexos organometálicos;
- c) Experimentos envolvendo Pb, visto ser esse um metal de pouca mobilidade na maioria das plantas e um poluente prejudicial para a saúde;

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAM, S.; KAMEI, S.; KAWAI, S. Phytosiderophore release from manganese-induced iron deficiency in barley. *Journal of Plant Nutrition*. v. 23, p. 1193-1207, 2000.

ALMEIDA, M. S. S.; BORMA, L.S.; BARBOSA, M. C. Land disposal of river and lagoon dredged sediments. *Engineering Geology*. v. 60, p. 21-20, 2001.

ANDRADE, R. C. B.; PATCHINEELAM, S. R. Especificação de metais-traço em sedimentos de florestas de manguezais com *Avicennia* e *Rhizophora*. *Química Nova*. v. 23, p. 733-736, 2000.

AVELAR, W. E. P.; MANTELATTO, F. L. M.; TOMAZELLI, A. C., SILVA, D. M. L. The marine mussel *Perna perna* (Mollusca, Bivalvia, Mytilidae) as an indicator of contamination by heavy metals in the Ubatuba Bay, São Paulo, Brazil. *Water, Air, and Soil Pollution*. v. 118, p. 65–72, 2000.

BATISTA NETO, J. A. B.; SMITH, B. J.; McALLISTER, J. J. Heavy metal concentrations in surface sediments in a near shore environment, Jurujuba Sound, Southeast Brazil. *Environmental Pollution*. v. 109, p. 1-9, 2000.

BLAKE, R. C.; CHOATE, D. M.; BRADHAN, S., REVIS, N., BARTON, L. L.; ZOCCO, T. G. Chemical Transformation of toxic metals by a *Pseudomonas* strain from a toxic waste site. *Environmental Toxicology and Chemistry*. v. 12, p. 1365-1376, 1993.

BAKER A. J. M., BROOKS R. R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements - a review of their distribution, *Ecology and Phytochemistry*. *Biorecovery*. v. 1, p. 81–126, 1989.

BAÑUELOS, G. S.; AJWA, H. A.; TERRY, N.; ZAYED, A. Phytoremediation of selenium laden soils: A new technology. *Journal of Soil and Water Conservation*. v. 52, p. 426-430, 1997.

BENAVIDES, M.; GALLEGO, S., M.; TOMARO M., L.; Cadmium toxicity in plants. Toxic Metals in Plants, Braz. J. *Plant Physiol.* v. 17: p. 21 – 34, 2005.

BROOKS, R. R. Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals. New York, *CAB International*. p. 318 , 1998.

CHECKAI R. T., COREY R. B., HELMKE P. A. Effects of ionic and complexed metal concentrations on plant uptake of cadmium and micronutriente metals from solution. *Plant Soil*. v. 99, p. 335-345, 1987.

CLARKSON D. T. e LUTTGE U. Mineral nutrition : divalent cations, transport and compartmentation. *Prog. Bot.* v. 23, p. 552-560, 1989.

CROWLEY, D. E.; WANG, Y. C.; REID, C. P. P.; SZANSISZLA, P.J. Mechanism of iron acquisition from siderophores by microorganism and plants. *Plant and Soil*. v. 130, p. 179-198, 1991.

CUNNIGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, P.; HSU, F. C. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. v. 56, p. 55-114, 1996.

DAHMANI – MULLER H.; F. VAN OORT; BALABANE, M. Metal extraction by *Arabidopsis halleri* grow on an unpollutes soil amended with various metal-bearing solids: a pot experiment. *Environmental Pollution*. v. 114, p. 77-84, 1999.

DINARDI A. L.; FORMAGI V. M.; CONEGLIAN C. M. R.; BRITO N. N.; SOBRINHO G. D.; TONSO S.; PELEGRINI R. III Fórum de Estudos Contábeis - Centro Superior de Educação Tecnológica (CESET) – UNICAMP 2003.

DUARTE, R. P. S.; PASQUAL A.; Avaliação do Cádmio (Cd), Chumbo (Pb), Níquel (Ni) e Zinco (Zn) em Solos, Plantas e Cabelos Humanos *Energia na Agricultura*. v. 15, n. 1, p. 46-58, 2000.

EMBRAPA. Manual de Análise Química de Solos, Plantas e Fertilizantes Fabio César da Silva Brasília, p. 179, 1999.

Environmental Protection Agency. Acesso em 05/07/2005 e disponível em <http://www.epa.gov/>.

EUN, S., YOUN H. S.; LEE, Y. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. *Physiologia Plantarum*. v. 110, p. 357–365, 2000.

FAN TWM, LANE N. A.; HIGASHI R., M. An electrophoretic profiling method for thiol-rich phytochelatin and metallothioneins. *Phytochemical Analysis*. v. 15, p. 175–183, 2004.

FERREIRA, A. G., MACHADO, A. L. S.; ZALMON, I. R. Temporal and spatial variation on heavy metal concentrations of the valve *Perna perna* (LINNAEUS, 1758) on the Northern coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 47, p. 319-327, 2004.

GALLI, U.; SCHEUPP, H.; BRUNOLD, C. Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiology Plantarum*. v. 92, p. 364-368, 1994.

GISBERT, C.; ROS, R.; DE HARO, A.; WALKER, D.J.; BERNAL, M.P.; SERRANO, R.; NAVARRO-AVINO, J. A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. v. 303, p. 440-445, 2003.

HART, J. J.; WELCH, R. M.; NORVELL, W. M.; SULLIVAN, L.A; KOCHIAN, L.V. Characterization of cadmium binding, uptake and translocation in intact seedlings of bread and durum wheat cultivars. *Plant Physiology*. v. 116 , p. 1413-1420, 1998.

HART J. J., WELCH R. M., NORVELL W. A., KOCHIAN L. V. Transport interactions between Cd and Zn in roots of bread and durum wheat seedlings. *Physiol. Plantarum*. v. 166, p. 73-76, 2002.

IBGE Acesso em 25/09/2005 e disponível em <http://www.ibge.gov.br/>.

JESUS, H. C.; COSTA, E. A., MENDONÇA, A. S. F.; ZANDOMADE, E.; Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da ilha de Vitória – ES. *Química Nova*. v. 27, p. 378-386, 2004.

JOYEUX, J. C.; CAMPANHA FILHO, E. A.; JESUS, H. C. Trace metal contamination in estuarine fishes from Vitória Bay, ES, Brazil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. v. 47, p. 765-774, 2004.

KIRKHAM, M. B. EDTA-facilitated phytoremediation of soil with heavy metals from sewage sludge. *International Journal of Phytoremediation*. v. 2, p. 159–172, 2000.

KRAMER, U.; PICKERING, I. J.; PRINCE, R. C.; RASKIN, I.; SALT, D. E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species. *Plant Physiology*. v. 122, p. 1343-1354, 1997.

KRÄMER, U.; SMITH, R. D.; WENZEL, W.; RASKIN, I.; SALT, D. E. The role of metal transport and tolerance in nickel hyperaccumulation by *Thlaspi goesingense* Halacsy. *Plant Physiology*. v. 115, p. 1641-1650, 1997.

LASAT, M. M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*. v. 2, p. 1-25, 2000.

LASAT, M. M., PENCE, N. S., GARVIN, D. F., EBBS, S. D., KOCHIAN, L. V. Molecular physiology of Zn transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Journal of Experimental Botan.*, v. 51, p. 71-79, 2000.

LIMA JUNIOR, R. G. S.; ARAÚJO, F. G.; MAIA, M. F.; PINTO, A. S. S. B. Evaluation of heavy metals in fish of the Sepetiba and Ilha Grande Bays, Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Research Section A*. v. 89, p. 171-179, 2002.

LOMBI E.; ZHAO F. J.; DUNHAM S. J.; MCGRATH S. P. Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. *New Phytol.* v. 145, p. 11-20, 1999.

MARSCHNER, H.; Mineral nutrition of higher plants. *Academic Press*, San Diego, 1995.

LUO Y., RIMMER D.L. Zinc-copper interaction affecting plant growth on a metal-contaminate soil. *Journal of Environmental Pollution*. v. 88, p. 79-83, 1995.

MATTINA, I. M.; LANNUCCI-BERGERA, W.; MUSANTEA C.; WHITE, J C. Concurrent plant uptake of heavy metals and persistent organic pollutants from soil. *Environmental Pollution*. v. 124, p. 375–378, 2003.

MCGRATH S. P. Phytoextraction for soil remediation. *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals* CAB International, Wallingford, p. 261 – 287, 1998.

MURPHY, A; TAIZ, L. Comparison of metallothionein gene expression and nonprotein thiols in ten *Arabidopsis* ecotypes. *Plant Physiology*. v.109, p. 945-954, 1995.

NAVARI-IZZO, F.; QUARTACCI, M., F.; COSI, E. Uptake and Translocation of cadmium in *Brassicaceae*. *Minerva Biotecnologica*. v. 13 n° 2, p 97-101, 2001.

OBATA, H.; UMEBAYASHI, M.; Production of SH Compounds in Higher Plants of Different Tolerance to Cd. *Plant and Soil*. p. 155-156, 1993.

OLIVEIRA, T. S.; COSTA, L.M. Metais pesados em solos de uma topolitossequência do triângulo mineiro. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. v. 28, p. 785-796, 2004.

PAGE, A.L.; BINGHAM, F.T.; NELSON, C. Cadmium absorption and growth of various plant species as influenced by solution cadmium concentration. *Journal of Environmental Quality*. v.1, n.3, p.288-291, 2006.

PELLET, M. D.; GRUNES, D. I., KOCHIAN, L. V. Organic acid exudation as an aluminium tolerance mechanism in maize (*Zea mays* L.). *Plant*. v.196, p. 788-795, 1995.

PERES L. E. P., Nutrição Mineral de Plantas, 2006 Acesso em 26/07/2006 e disponível em <http://www.cpa.unicamp.br/sbfv/arquivos/aulas/grad01/05nutricao mineral/NutricaoMineral.pdf>.

PICHTEL J.; KUROIWA K., SAWYERR H. T. Distribution of Pb, Cd and Ba and plants of two contaminated sites. *Environment Pollution*. v. 110, p. 171-178, 1999.

PILON-SMITS, E. A.; HWANG, S.; MEL LYTLE, C.; ZHU, Y.; TAI, J.C.; BRAVO, R.C.; CHEN, Y.; LEUSTEK, T.; TERRY, N. Overexpression of ATP sulfurylase in Indian mustard leads to increased selenate uptake, reduction, and tolerance. *Plant Physiology*. v. 119, p. 123-132, 1999.

PINTO A. P., MOTA A. M., de VARENNES A., PINTO F.C. Influence of organic matter on uptake of Cd, Zn, Cu, Fe by sorghum plants. *Science of Total Environment*. v. 326, p. 239-247, 2004.

RAMALHO, J. F. G. P., SOBRINHO, N. M. B. A; VELLOSO, A. C. X. Contaminação da microbacia de caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 35, p. 1289-1303, 2000.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. D. Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. New York, John Wiley & Sons. p. 200-240, 2000.

REITZLER, A. C.; FONSECA, A. L.; LOPES, G. P. Heavy metals in tributaries of Pampulha reservoir, Minas Gerais. *Brazilian Journal of Biology*. v. 61, p. 363-370, 2001.

ROBINSON B. H., LEBLANC M., PETIT D., BROOKS R.R., KIRKMAN J. H., GREGG P. E. H. The potential of *Thlaspi caerulescens* for phytoremediation of contaminated soil. *Plant soil*. v. 203, p. 47-56, 1998

SACRAMENTO F., SILVA B. B. Vitaminas e Minerais. In: Penildo Silva Farmacologia, 5ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p 907-924, 1998.

SAUERBECK D. R. Plant, element and soil properties governing uptake and availability of heavy metals derived from sewage sludge. *Water Air Soil Pollution*. v. 57, p. 227-237, 1991.

SAKULKOO, N.; AKARACHARANYA, A.; CHAREONPORNWATTANA, S.; LEEPIPATPIBOON, N.; NAKAMURA, T.; YAMAGUCHI, Y.; SHINMYO, A.; SANO, H. Hyper-assimilation of sulfate and tolerance to sulfide and cadmium in transgenic water spinach expressing an *Arabidopsis* adenosine phosphosulfate reductase. *Plant Biotechnology*. v. 22, p. 27-32, 2005.

SALAH S. A., BARRINGTON S. F. Effect of soil fertility and transpiration rate on young wheat plants (*Triticum aestivum*) Cd/Zn uptake and yield. *Agricultural Water Management*. v. 82, p. 177-192, 2006.

SALT, D. E.; RAUSER, W. E. MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots. *Plant Physiology*. v. 107, p. 1293-1301, 1995.

SANTA-MARIA G. E. e COGLIATTI D. H. The regulation of zinc uptake in wheat plants. *Plant Science*. v. 137, p. 1-12, 1998.

SANTA-MARIA G. E. e COGLIATTI D. H. Bidirectional Zn-fluxes and compartmentation in wheat seedling roots. *Journal of Plant Physiology*. v. 132, p. 312-315, 1988.

SCHULIN, R.; FELIX, H.; R.; FURRER G. Bioremediation of polluted soils: control of heavy metal uptake in the root zone of hyperaccumulating plants, Institut Für Terrestrische Ökologie Fachbereich Bodenschutz, 1999. Acesso em 30/06/2005 e disponível em http://www.sppe.ch/kurzfassungen/pdf/soil_p2/schulin_6_31a.pdf.

SCHNOOR J. L. Phytoremediation. GWRTAC. Ground-Water Technologies Analysis Center, Technology Evaluation Report TE-98-01. p. 43, 1998.

SHARMA, S. S.; GAUR, J. P. Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals *Ecological Engineering*. p. 37-43, 1994

SIDLE R. C., HOOK J. E., KARDOS L. T. heavy metal application and plant uptake in a land disposal system for wastewater. *Journal of Environmental Quality*. v. 5, p. 91-102, 1976.

SILVA, I. S.; ABATE, G.; LICHTING, J.; MASINI, J. C. Heavy metal distribution in recent sediments of the Tietê-Pinheiros river system in São Paulo state, Brazil. *Applied Geochemistry*, v.17, p. 105-116, 2002.

SISINNO, C. L. S.; MOREIRA, J.C. Avaliação da contaminação e poluição ambiental na área de influência do aterro controlado do Morro do Céu, Niterói, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*. v.12, p. 515–523, 1996.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. A.; MELO MARQUES, T. C. L. L. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. v. 13, p. 302-315, 2001.

SOUZA, P. S.; PILOM-SOMITS. E. A. H.; LYTLE, M.; HWANG, S.; TAI, J.; HONMA T. S. U.; YEH L.; TERRY, N. Rate-Limiting in Selenium Assimilation and Volatilization by Indian Mustard. *Plant Physiol*. v. 117, p. 1487-1494, 1998.

TERRY N., CARLSON C., RAAB TK, ZAYED A. M. (1992) Rates of selenium volatilization among crop species. *Journal of Environmental Quality*. v. 21, p. 341 – 344. 2003.

VAN DER ZAAL, B. J.; NEUTEBOOM, L. W.; PINAS, J. E.; CHARDONNENS, A. N.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J. A.; HOOYKAAS, P. J. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation. *Plant Physiology*. v. 119, p.1047-1055, 1999

VASSIL, A. D.; KAPULNIK, Y., RASKIN, I.; SALT, D. E. The role of EDTA in lead transport and accumulation by Indian mustard. *Plant Physiology*. v. 117, p. 447-453, 1998.

VESK, P. A.; NOCKOLDS, E., ALLAWAY, W., G. Metal Localization in Water Hyacinth Roots from an Urban Wetland. *Plant, Cell & Environment*. v. 22, p. 149, 1999.

VILLAR, L. S.; Otimização de Metodologia para Extração e Determinação de Metalotioneínas em Eletroforese em Gel de Poliacrilamida de Ostra *Crassostrea Rhizophorae* (GUILDING, 1828) para Aplicação em Estudos Ambientais. Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2006.

VON WIRÉN N., MARSCHNER H., RÖMHELD V. Roots of iron-efficient maize also absorb phyto siderophore-chelated zinc. *Plant Physiology*. v. 111, p. 1119-1125, 1996.

YANQUN, Z.; YUAN L.; JIANJUN C.; HAIYAN C.; LI Q.; SCHVARTZ C. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grow on lead – zinc mining area in Yunnan, China. *Environment International*. v. 31, p. 755-762, 2005.

ZHAO, F., J.; LOMBI, E.; McGRATH, S., P.; YOUNG, S., P.; SACCHI, G., A. Physiological Evidence for a High-affinity Cadmium Transporter Highly Expressed in a *Thlaspi caerulescens* Ecotype. *New Phytologist*. v. 149, p. 53-60, 2003.

ZHOU, W.; QIU B. Effects of cadmium hyperaccumulation on physiological characteristics of *Sedum alfredii* Hance (Crassulaceae). *Plant Science*. v. 169, p. 737-745, 2005.

ZHU, Y. G.; SHAW G. Soil contamination with radionuclides and potential remediation, *Chemosphere*. v. 41, p. 121-128, 2000.

WOJCIK, M.; SKÓRYŃSKA-POLIT; TULIENDORF, A.; Organic Acids Accumulation and Antioxidant Enzyme Activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd Stress, *Plant Growth Regulation*. p. 145-155, 2004.

WHITE M. C., MORRIS DECKER A., CHANEY R. L. Metal complexation of tomato and soybean stem exudate. *Plant Physiology*. v. 69, p. 292-300, 1981.

WHITEHEAD, D. C.; GOULDEN, K. M.; HARTLEY, R. D. The distribution of nutrient elements in cell wall and other fractions of herbage of some grasses and legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. v. 36, p. 311-318, 1985.

APÊNDICES

A.1. Solução de Hoagland

Preparação de solução de macronutrientes

Composição	Solução Estoque	mg/L
MgSO ₄ . 7H ₂ O	24,6 g / 100mL	1,0 mL
Ca (NO ₃) ₂ . 4 H ₂ O	23,6 g / 100mL	2,3 mL
KH ₂ PO ₄	13,6 g / 100mL	0,5 mL
KNO ₃	10,1 g / 100mL	2,5 mL
Micronutrientes	Solução de micronutrientes	0,5 mL
Fe. EDTA	Solução de Fe. EDTA	20 mL

Preparação de solução de micronutrientes

Reagentes	Solução Estoque
H ₃ BO ₃	2,86 g /L
MnCl ₂ . 4H ₂ O	1,82 g /L
ZnSO ₄	0,22 g /L
Na ₂ MoO ₄	0,09 g /L
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,09 g /L

Preparação de solução Fe. EDTA

Reagentes	Solução Estoque
FeCl ₃ . H ₂ O	0,121 g / 250 mL
EDTA	0,375 g / 250 mL

Apêndice A.2: Preparação para quantificação de proteínas

Sulfato de cobre 0,5%: dissolver 0,25g da substância em 50 mL de água deionizada estéril.

Tartarato de sódio e potássio 1%: dissolve-se 0,5g da substância em 50 mL de água deionizada estéril.

Carbonato de sódio 0,1 mol/mL: diluiu-se 5 mL da solução estoque 1 mol/L de NaOH para 50 mL com água deionizada estéril.

Apêndice A. 3: Preparação de PBS (*phosphate buffered saline*)

Substância	Massa (g)	Volume (mL)
Cloreto de sódio	0,8	100
Cloreto de potássio	0,02	
Fosfato de sódio dibásico	0,115	
Fosfato de potássio monobásico	0,02	

Apêndice A.4: Concentração de zinco nos tecidos de *Guadua angustifolia*, após 72 h de tratamento com solução de sulfato de zinco

Concentração nos tecidos (mg/kg)*	Concentração das soluções (mg/L)			
	0	50	100	150
Raízes	149 ± 83 ^c	3194 ± 17 ^b	4059 ± 339 ^{a, b}	5722 ± 1170 ^a
Colmos	318 ± 58 ^c	202 ± 22 ^c	317 ± 142 ^c	645 ± 106 ^c
Folhas	82 ± 22 ^c	125,2 ± 3,3 ^c	173,0 ± 3,0 ^c	235 ± 15 ^c

*média ± erro padrão

Apêndice A.5: Concentração de cádmio nos tecidos de *Guadua angustifolia*, após 72 h de tratamento com solução de sulfato de cádmio

Concentração nos tecidos (mg/kg)	Concentração das soluções (mg/L)			
	0	5	10	15
Raízes	51 ± 6 ^b	79 ± 14 ^b	143 ± 22 ^c	59,1 ± 0,4 ^b
Colmos	40 ± 8 ^b	53 ± 26 ^b	47 ± 12 ^b	41,0 ± 2,5 ^b
Folhas	5,4 ± 1,4 ^a	26,6 ± 2,8 ^b	18,5 ± 2,9 ^b	30 ± 5 ^b

*média ± erro padrão

Apêndice A.6: Concentração de zinco nos tecidos de *Guadua angustifolia*, após 27 dias de tratamento com solução de sulfato de zinco

Tecidos vegetais	Duração do tratamento (dias)				
	3	9	15	21	27
Raízes	5608 ± 1235 ^{a,b}	12220 ± 2543 ^a	5034 ± 805 ^{b,c}	5009 ± 1147 ^{b,c}	10965 ± 2310 ^a
Colmos	201 ± 92 ^a	846 ± 203 ^{b,c}	956 ± 201 ^{b,c}	1656 ± 34 ^{b,c}	1561 ± 291 ^{b,c}
Folhas	472 ± 28 ^c	540 ± 167 ^c	340 ± 87 ^c	394 ± 61 ^c	259 ± 64 ^c

Apêndice A.7: Concentração de cádmio nos tecidos de *Guadua angustifolia*, após 27 dias de tratamento com solução de sulfato de cádmio

Concentração nos tecidos (mg/kg)*	Concentração das soluções (mg/L)				
	03	09	15	21	27
Raízes	99 ± 18 ^b	72 ± 10 ^{a,b}	79 ± 9 ^{a,b}	85 ± 6 ^{a,b}	90 ± 3 ^{a,b}
Colmos	81 ± 11 ^c	126 ± 41 ^c	143 ± 41 ^c	108 ± 11 ^c	101 ± 2 ^c
Folhas	63 ± 10 ^c	72 ± 18 ^c	85 ± 16 ^c	85 ± 16 ^c	93 ± 12 ^c