

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA-UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS-CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
AGRÁRIAS
MESTRADO EM MANEJO DO SOLO**

EDUARDO DA SILVA DANIEL

**FRACIONAMENTO DE CÁDMIO NO SOLO E
FITORREMEDIAÇÃO COM VIME**

**LAGES, SC
2013**

EDUARDO DA SILVA DANIEL

**FRACIONAMENTO DE CÁDMIO NO SOLO E
FITORREMEDIAÇÃO COM VIME**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Manejo do Solo.

Orientador: Prof. Dr. David José Miquelluti. Co-orientador: Profª. Dra. Mari Lucia Campos.

**LAGES, SC
2013**

EDUARDO DA SILVA DANIEL

**FRACIONAMENTO DE CÁDMIO NO SOLO E
FITORREMEDIAÇÃO COM VIME**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Manejo do Solo do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. David José Miquelluti
CAV/UDESC

Co-orientador:

Prof^a. Dra. Mari Lucia Campos
CAV/UDESC

Membro:

Prof. Dr. Tássio Dresch Rech
EPAGRI/Estação Experimental de Lages

Lages, 18 de julho de 2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, que propiciou este momento.

Aos meus pais, Mário e Janete, e meus irmãos, Tiago e Gabriel, pelo apoio incondicional, incentivo e compreensão.

Ao orientador e mentor David José Miquelluti, por compartilhar seus princípios profissionais, éticos e humanos, pela confiança, disposição e auxílio na realização dos trabalhos e principalmente pela amizade e preocupação.

À prof.^a Mari Lucia Campos, pelos valiosos conselhos, empatia e estima, pessoa de caráter excepcional, a quem devo grande parte dos conhecimentos obtidos nesse período.

Ao Dr. Tássio Dresch Rech, e aos prof. Cassandro Vidal Talamini do Amarante, Henrique Pessoa dos Santos, e Clóvis Arruda de Souza, pela colaboração e contribuição nos trabalhos.

Ao funcionário e amigo José Ferraz Neto, pela presteza e atenção e aos amigos do Laboratório de Levantamentos e Análises Ambientais que incentivando, colaborando ou trocando experiências, contribuíram em muito para o andamento dos trabalhos. Um agradecimento especial à Marta e Dreyce.

Ao Márcio e Vítor, amigos de longa data que possibilitaram a oportunidade, e pela camaradagem de sempre.

Aos amigos Marco e Jonas, pelo companheirismo e amizade.

À Mariuccia, pela amizade, compreensão, carinho, colaboração e amor incondicional. Ter você ao meu lado faz tudo parecer mais fácil, sou grato de todas as maneiras possíveis.

À EPAGRI/Estação Experimental de Lages, pela seção de uso do IRGA LC-PRO-SD e doação das estacas de vime.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, pela oportunidade de realização do curso, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de pesquisa e apoio financeiro ao projeto.

A todos os professores e colegas da pós-graduação do CAV, por oportunizar conhecimento amplo e de qualidade.

"É preciso sentir a necessidade da experiência, da observação, ou seja, a necessidade de sair de nós próprios para aceder à escola das coisas, se as queremos conhecer e compreender."

Émile Durkheim

RESUMO

DANIEL, Eduardo da Silva. **Fracionamento de cádmio no solo e fitorremediação com vime**. 2013. 72 p. Mestrado (Dissertação em Manejo do Solo – Área: Caracterização, conservação e uso dos recursos naturais) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Lages, 2013.

Um dos fatores que podem causar riscos à segurança alimentar e limitar o uso dos solos é a presença de metais pesados. Dentre eles, o cádmio (Cd) é considerado o principal contaminante devido à elevada mobilidade, toxidez às plantas, aos animais e ao homem. A fitorremediação apresenta-se como alternativa aos métodos físicos e químicos na recuperação de solos contaminados pelo metal, proporcionando menor custo e impacto ambiental em locais em que ocorre superficialmente e/ou em baixas concentrações. Considerando-se que as características do solo e a habilidade de absorção das plantas são os principais fatores que governam a fitoavaliabilidade dos elementos, o objetivo deste trabalho foi estudar a afinidade do Cd às diferentes frações químicas do solo e avaliar o potencial de *Salix viminalis* como fitorremediador de um Cambissolo de baixada do planalto catarinense contaminado pelo metal. Plantas de vime foram desenvolvidas em Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico após ser contaminado pelo metal, arranjado de acordo com um delineamento inteiramente casualizado, em doses crescentes, sob condições controladas. O efeito do aumento das concentrações de Cd no solo foi analisado segundo sua afinidade às frações químicas do solo, influência em parâmetros morfológicos e fisiológicos do desenvolvimento, bem como na capacidade de absorção e translocação do metal pelas plantas. À medida que se aumenta a dose de Cd aplicada, eleva-se a sua concentração na fração disponível, na matéria orgânica, nos óxidos de ferro, na fração residual e na concentração total no solo, além do aumento da proporção do contaminante ligada às frações mais disponíveis. Plantas de *Salix viminalis* se mostraram altamente responsivas à concentração de Cd no solo para clorofila total nas folhas, taxa fotossintética e massa seca produzida. O aumento dos níveis do metal no solo provocou a elevação da sua concentração nas diferentes estruturas das plantas da espécie

estudada, demonstrando um alto potencial quando utilizada na fitorremediação de solos contaminados com Cd, através da fitoestabilização e fitoextração, mesmo com a necessidade de maiores períodos de remediação em contaminações mais severas.

Palavras-chave: Metais pesados. Cádmio nos solos. Fitorremediação.
Salix viminalis.

ABSTRACT

DANIEL, Eduardo da Silva. **Fractionation of cadmium in soil and phytoremediation with osier**. 2013. 72 p. Mestrado (Dissertação em Manejo do Solo – Área: Caracterização, conservação e uso dos recursos naturais) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Lages, 2013.

One of the factors that can cause food safety hazards and limit the use of soils is the presence of heavy metals. Among them, Cd is considered the main contaminant due to the high mobility and its toxicity to plants, animals and man. Phytoremediation is an alternative to physical and chemical methods in the recovery of soils contaminated by metal, providing lower cost and environmental impact in locations where contamination occurs on the surface and / or at low concentrations. Considering that soil characteristics and the ability to plant uptake are the main factors that govern the viability of the elements in plants, the aim of this study was understanding the affinity of Cd by different fractions of soil structure and to evaluate the potential of *Salix viminalis* in remediation from a lowland Cambisol in the highlands of Santa Catarina contaminated by the metal. Osier plants were developed in gleysolic aluminic fluvic cambisol after being contaminated by metal, arranged according to a completely randomized design, in increasing doses, under controlled conditions. The effect of increasing concentrations of Cd in the soil was analyzed according to their affinity fractions soil chemical, influence on morphological and physiological development, as well as the absorption and translocation of metal by the plants. As increasing the dose of Cd applied, rises to its concentration in the fraction of available organic matter, in iron oxides, in the residual fraction and total concentration in the soil, and increased the proportion of contaminant linked to fractions more available. *Salix viminalis* plants were highly responsive to the concentration of Cd in the soil to total chlorophyll in leaves, photosynthetic rate and dry matter produced. Increased levels of the metal in the soil caused the increase of its concentration in the different structures of plant species under study, demonstrating a high potential when used in phytoremediation of soils contaminated with Cd by phytoextraction and phytostabilization, even

with the need for longer periods remediation of contamination in harsher.

Key-words: Heavy metals. Cadmium in soils. Phytoremediation. *Salix viminalis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1 - Localização do Cd no solo.	20
Ilustração 2 - Esquema de extração fracionada para o Cd no solo.	25
Ilustração 3 - Concentração de Cd total no solo extraído de acordo com a metodologia de Ure (1990) em um Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico contaminado com doses crescentes do metal.	26
Ilustração 4 - Cd associado às diferentes frações constituintes do solo em um Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico contaminado com doses crescentes do metal.	28
Ilustração 5 - Índice SPAD em folhas de vime (<i>Salix viminalis</i>) em função da concentração de Cd no solo em 36, 52, 63 e 78 dias de desenvolvimento das plantas.	43
Ilustração 6 - Taxa fotossintética (A) de plantas de <i>Salix viminalis</i> em solo contaminado por Cd com 0, 10, 50, 100 e 200 mg kg ⁻¹ em função da densidade do feixe do fluxo de fótons (DFFFA).	45
Ilustração 7 - Produção de massa seca total em plantas de <i>Salix viminalis</i> em função da concentração de Cd no solo.	46
Ilustração 8 - Produção de massa seca dos caules, raízes, ramos e folhas em plantas de <i>Salix viminalis</i> em função da concentração de Cd no solo.	48
Ilustração 9 - Acumulação de Cd nas raízes, caules, ramos e folhas de plantas de vime (<i>Salix viminalis</i>) em função da concentração de Cd no solo.	50
Ilustração 10 - Fator de Bioconcentração (a) e Fator de Translocação (b) para o Cd em plantas de <i>Salix viminalis</i> cultivadas em solo contaminado.	51

Ilustração 11 - Quantidade acumulada (a) e taxa de fixação (b) de Cd nas plantas de *Salix viminalis* cultivadas em solo contaminado em período de três meses..... 53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Características químicas e argila do Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico, solo utilizado no experimento. 22
- Tabela 2 - Concentração de Cd extraído nas frações do solo, somatório nas frações e total extraído por água-régia em um Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico contaminado. 27
- Tabela 3 - Coeficientes das equações de regressão ajustadas entre os teores de Cd extraídos em cada fração e as doses do metal adicionadas ao solo, em que $Y = a + bx$ 29
- Tabela 4 - Características químicas e argila do Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico, solo utilizado no experimento. 38
- Tabela 5 - Produção de Massa Seca (MS) Total e nas diferentes estruturas de plantas de *Salix viminalis* desenvolvidas em solo com doses crescentes de Cd. 47

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	CAPÍTULO I: AFINIDADE DO CÁDMIO ÀS FRAÇÕES DA ESTRUTURA QUÍMICA DE UM CAMBISSOLO FLÚVICO ALUMÍNICO GLEISSÓLICO CONTAMINADO.....	17
2.1	RESUMO	17
2.2	ABSTRACT	18
2.3	INTRODUÇÃO.....	19
2.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
2.4.1	Procedimentos experimentais	22
2.4.2	Controle da qualidade analítica	24
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.5.1	Cádmio total no solo.....	26
2.4.2	Fracionamento de cádmio no solo	28
2.4.3	Cádmio total na digestão e no fracionamento.....	31
2.6	INTRODUÇÃO.....	31
3.	CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO ESTRESSE INDUZIDO POR CÁDMIO EM PLANTAS DE VIME CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO	32
3.1	RESUMO	32
3.2	ABSTRACT	33
3.3	INTRODUÇÃO.....	34
3.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.5.1	Clorofila total nas folhas.....	42
3.5.2	Taxa fotossintética das plantas	43
3.5.3	Produção de massa seca.....	46

3.5.4	Índice de Tolerância.....	49
3.5.5	Concentração de cádmio nos diferentes tecidos das plantas	49
3.5.6	Fator de Translocação.....	50
3.5.7	Fator de Bioconcentração	51
3.5.8	Potencial de utilização do <i>Salix viminalis</i> na Fitorremediação	53
3.6	CONCLUSÕES	55
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1. INTRODUÇÃO

A qualidade da vida humana depende da composição química dos alimentos e do ambiente. O solo é um componente específico da biosfera, pois não é apenas um dissipador geoquímico de contaminantes, mas também age como tampão natural e controla o transporte de elementos químicos e substâncias para a atmosfera, hidrosfera e biota. No entanto, a função mais importante do solo é ser um aliado da produção agrícola, que é fundamental para a sobrevivência dos seres humanos. Assim, a manutenção das funções ecológicas e agrícolas dos solos é de responsabilidade da humanidade (KABATA-PENDIAS, 2010). Um dos fatores que podem causar riscos à segurança alimentar e limitar o uso dos solos é a presença de metais pesados.

O termo “metal pesado” é aplicado a um grupo heterogêneo de elementos, incluindo metais, semi-metais e não metais, que possuem número atômico maior que 20 ou massa específica maior que 5 g cm^{-3} (MALAVOLTA, 2006). Essa definição tem sido considerada inadequada, pois inclui elementos não metálicos, como por exemplo, o arsênio ou o flúor (DUFFUS, 2002). Entretanto, ainda está sendo muito utilizada em trabalhos acadêmicos. Já os termos “elemento-traço” ou “metal-traço” são usados como sinônimos embora à luz da Química Analítica Quantitativa também são inadequados, uma vez que o qualitativo “traço” designa concentrações não detectáveis de qualquer elemento pela mais avançada técnica instrumental disponível (SOARES, 2004). Nessa dissertação, optou-se por utilizar o termo “metal pesado”. Dentre esses elementos, o Cd é considerado o principal contaminante, devido à elevada toxicidade às plantas, aos animais e ao homem. O metal possui relativa mobilidade no solo e nas plantas, e pode migrar para as águas superficiais, via erosão, e para as águas subsuperficiais, pelo movimento vertical e descendente no perfil do substrato (LOGAN; CHANEY, 1983; LEVINE et al, 1989).

As plantas que crescem em solos contaminados podem absorvê-lo e acumulá-lo em tecidos comestíveis, em grandes quantidades, sem apresentar sintomas de toxicidade, assim, introduzindo o metal na dieta humana (McBRIDE, 2003). O elevado potencial para bioacumulação é devido, sobretudo, à sua semelhança com elementos como o zinco, cálcio, magnésio e potássio. O consumo de vegetais produzidos localmente em meios urbanos apresenta os maiores riscos de ingestão de Cd, veiculados a partir do solo ou da água de irrigação contaminada e da deposição atmosférica (MCLAUGHLIN et al., 2011).

As intoxicações crônicas traduzem-se em problemas gastrointestinais, doença renal crônica tubular, distúrbios esqueléticos e nervosos, e também em problemas de hipertensão arterial, além da redução do crescimento, carcinomas e dermatoses, hipertensão e acidentes vasculares (MENDES; OLIVEIRA, 2004). Por esta razão, existem considerações especiais nos manuais de agências de proteção ambiental a respeito do Cd, dentre elas a necessidade da remediação de locais contaminados quando ultrapassam valores máximos permitidos de concentração nos solos (CETESB, 2005; CONAMA, 2009).

A tecnologia atual de saneamento da poluição do solo por metais pesados utiliza-se da escavação e aterramento do local contaminado (GARBISU et al., 2002), evitando a perda do solo por erosão e lixiviação, mas não remediando a área nem reduzindo a toxidez ou o volume da contaminação (SMITH et al., 1995). Outras medidas também utilizadas na remediação de solos contaminados são a precipitação, a troca de íons e a fixação dos metais com produtos químicos, que diminuem a solubilidade dos metais contaminantes através da formação de hidróxidos insolúveis; e a lixiviação, que se utiliza de soluções ácidas ou agentes quelantes para dessorver e lixiviar metais (GARBISU et al., 2002), mas que acaba gerando resíduos que requerem tratamento, tornando o processo dispendioso, apesar de eficaz (KHAN et al., 2000).

Os métodos físicos e/ou químicos utilizados para a remoção de metais pesados do solo o tornam inaproveitável como meio de crescimento de plantas, por eliminarem toda a sua atividade biológica (KHAN et al., 2000), além de promoverem outros efeitos negativos, tais como a produção de resíduos indesejáveis, descaracterização da área, possível aumento da mobilização dos contaminantes e altos custos (NEDELKOSKA; DORAN, 2000). Para tanto, uma alternativa aos métodos tradicionais para o tratamento da contaminação por metais pesados é a fitorremediação, que consiste na utilização de plantas para remover, conter, transferir, estabilizar ou tornar inofensivos os metais tóxicos.

A fitorremediação é considerada uma opção viável e pode satisfazer regulamentos ambientais e, simultaneamente, ser uma das tecnologias mais eficientes em relação ao custo/benefício, tanto sozinha quanto combinada com outra tecnologia de remediação (ROBINSON et al., 2003). Além do fato da técnica ser fundamentada em processos naturais, ela proporciona outras vantagens, tais como a mínima destruição e desestabilização da área, baixo impacto ambiental e estética

favorável (NEDELKOSKA; DORAN, 2000). É uma alternativa limpa que fornece contenção dos lixiviados, manutenção e melhora da estrutura, fertilidade e biodiversidade do solo (KHAN et al., 2000), possibilita a reciclagem dos metais e produção de madeira, é uma solução permanente, aplicado *in situ*, utiliza energia solar, é aplicável a uma grande variedade de contaminantes, possui grande aceitação pública e reduz a erosão (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000).

Considerando-se que as características do solo e a habilidade de absorção das plantas são os principais fatores que governam a fitodisponibilidade dos elementos (KABATA-PENDIAS, 2004), o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do vime (*Salix viminalis*) como uma planta melhoradora da qualidade de solos contaminados com Cd através da técnica da fitorremediação, analisando-se a afinidade do metal às diferentes frações químicas do solo e a sua disponibilidade às plantas, e a capacidade do vime em tolerar, absorver e translocar o Cd do solo contaminado, em condições controladas.

2. CAPÍTULO I: AFINIDADE DO CÁDMIO ÀS FRAÇÕES DA ESTRUTURA QUÍMICA DE UM CAMBISSOLO FLÚVICO ALUMÍNICO GLEISSÓLICO CONTAMINADO

2.1 RESUMO

A contaminação do solo pelo Cd ocorre principalmente através da exposição da superfície a grandes concentrações do metal, originária das atividades industriais, agrícolas e destinação indevida de resíduos urbanos. Quando não há uma interação estável com o solo pode ocorrer migração, e assim, a poluição da biota e da água. No entanto, o impacto da contaminação pelo Cd não deve ser avaliado somente pelo seu teor total, mas também pela sua disponibilidade, que é uma propriedade relacionada com a sua mobilidade no solo. A compreensão da afinidade do metal pelas diferentes frações químicas do solo torna-se imprescindível no diagnóstico da contaminação e definição de estratégias de remediação. Com a finalidade de se observar os efeitos da aplicação de diferentes doses de Cd nas frações do solo, um experimento foi conduzido utilizando-se como matriz o Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico. Após o período de contaminação e incubação do metal, amostras de solo foram coletadas e analisadas sob distintos protocolos de extração: para a abertura das amostras, o de Ure (1990); para o fracionamento sequencial, o de Gomes et al. (1997). A determinação da concentração de Cd no solo foi realizada por espectrometria de absorção atômica com atomização em chama ar-acetileno. A análise dos resultados foi efetuada através de análise de variância e ajuste de equações de regressão. À medida que se aumenta a dose de Cd aplicada, eleva-se a sua concentração na fração disponível, na matéria orgânica, nos óxidos de ferro, na fração residual e na concentração total no solo. Proporcionalmente, sob baixas concentrações no solo, o elemento tem maior tendência de ligar-se à matéria orgânica, minerais silicatados e aos óxidos de ferro, que às frações solúvel e trocável, as quais são mais representativas que aquelas em altas concentrações de Cd no solo.

Palavras-chave: Poluição de solos. Extração fracionada do cádmio.

2.2 ABSTRACT

The contamination of soil by Cd occurs mainly by surface exposure to high concentrations of the metal, originating from industrial, agricultural and improper disposal of municipal waste. When no stable interaction with the soil migration can occur, and thus, pollution of biota and water. However, the impact of contamination by Cd should be evaluated not only by their total content but also by its availability, which is a property related to their mobility in soil. Therefore, understanding the affinity of the metal by different fractions of soil structure becomes essential in the diagnosis of contamination and definition of remediation strategies. In order to observe the effects of different doses of Cd in the soil fractions, an experiment was carried using as the matrix a gleysolic aluminic fluvic cambisol. After a period of contamination and incubation of the metal, soil samples were collected and analyzed under different extraction protocols: for opening of samples, Ure (1990); for sequential fractionation, Gomes et al. (1997). The determination of the concentration of Cd in soil was performed by atomic absorption spectrometry with atomization air-acetylene flame. The analysis was performed using analysis of variance and regression adjustment equations. As increasing the dose of Cd applied, rises to its concentration in the fraction of available organic matter, in iron oxides, in the residual fraction and total concentration in the soil. Proportionally, at low concentrations in the soil, the element has a greater tendency to bind to organic matter, silicate minerals and iron oxides, which the soluble and exchangeable fractions, which are more representative than those in high concentrations of Cd in soil.

Key words: Soil pollution. Fractional extraction of cadmium.

2.3 INTRODUÇÃO

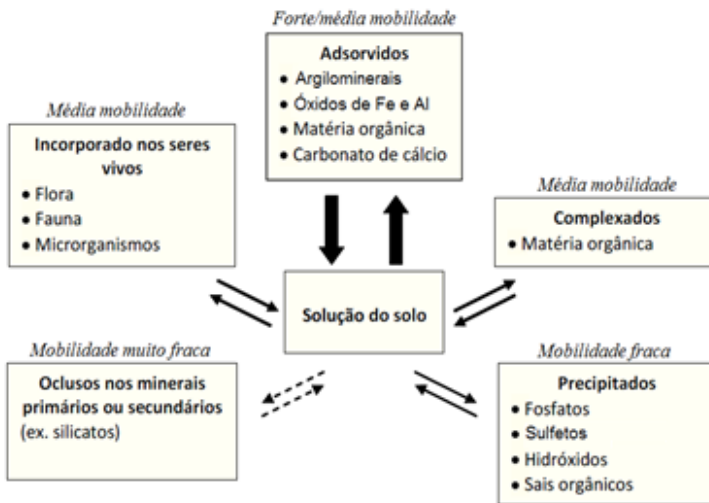
O principal fator determinante do conteúdo de Cd no solo é a composição química da rocha de origem e o seu grau de intemperismo. A concentração média de Cd no solo está entre 0,2 e 1,1 mg kg⁻¹. Aparentemente, níveis acima das concentrações de *background* refletem o impacto antropogênico no status de Cd nos horizontes superficiais. Tal impacto é proveniente da exploração e beneficiamento de outros metais como zinco e chumbo (BOON; SOLTANPOUR, 1992); na produção de tintas, pilhas e baterias (POSTCH, 1967); nos combustíveis e lubrificantes (OLSEN, 1972); nos corretivos e nos fertilizantes, principalmente os fosfatados (MULLA; PAGE; GANJE, 1980; LANGENBACH; SERPA, 1985); nos corretivos; nos fungicidas (LAGERWEFF, 1970) e nos resíduos industriais e urbanos (VALADARES et al., 1983). Quando não ocorre uma interação estável, pode haver migração, o que culmina na contaminação da água, subsuperfície do solo e dos lençóis freáticos (LINHARES et al., 2009). A ingestão de tecidos comestíveis de plantas que crescem em meios contaminados é a principal fonte de intoxicação pelo Cd, além da ingestão e aspiração de partículas do solo.

A influência dos fatores de solo, formas químicas e a habilidade de absorção pela planta são os fatores que governam a fitodisponibilidade dos elementos (KABATA-PENDIAS, 2004). A principal via de absorção dos metais pelas plantas é a solução do solo, e a forma química Cd⁺² tem preferência sobre as demais. No entanto, essa forma só ocorre após a solubilização do metal que está adsorvido aos argilominerais, óxidos e matéria orgânica, complexados à M.O., precipitados na forma de sais e hidróxidos, incorporados nos seres vivos e oclusos nos minerais, sendo tal processo ocorrendo com maior ou menor mobilidade, dependendo do tipo de ligação que o metal faz com essas frações (ver Ilustração 1).

A literatura relata que o pH, o potencial de oxirredução, a força iônica, a textura, a presença de cátions competindo pelos mesmos sítios de adsorção e os teores de matéria orgânica e de óxidos de Fe e Al são os principais fatores que influem na adsorção-dessorção de Cd nos solos.

Por sua vez, a concentração do elemento adsorvida aos colóides é altamente influenciada pela quantidade total desse elemento no solo. Os teores totais variam muito entre os solos, mesmo entre solos não impactados.

Ilustração 1 - Localização do Cd no solo.



Fonte: adaptado de ADEME, 2005.

Quando surgem suspeitas de contaminação, a certificação ocorre por meio da comparação dos valores encontrados na amostragem dessas áreas com valores de referência estabelecidos por um órgão de controle ambiental. Entre os critérios utilizados para a definição dos valores de referência, o grau de fitotoxicidade e o uso do solo são os mais empregados (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000). No Brasil, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da resolução nº420 de 2009, estabeleceu critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas. Nesta resolução, o limite de concentração de Cd para o Valor de Prevenção foi fixado em $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$, abaixo do qual o solo ainda é capaz de sustentar suas funcionalidades. Para o limite de investigação, acima do qual existem riscos potenciais à saúde humana, os valores foram fixados em 3 mg kg^{-1} de solo (TFSA) para uso agrícola, 8 mg kg^{-1} para uso residencial e 20 mg kg^{-1} para uso industrial (CONAMA, 2009), devendo ser adotada a análise de risco e se necessário técnicas de intervenção e descontaminação.

Na legislação ambiental existente em vários países, em especial naqueles que seguem os padrões estipulados pela European

Environment Agency (EEA), a avaliação dos valores guia ou valores máximos permissíveis no solo, ou relativos à valorização agrícola de certos resíduos, é determinada pelo emprego de extratores fortes, como a água-régia. Os teores dos elementos extraídos por este extrator são designados vulgarmente de teores “totais” ou semitotais, embora ainda seja relativamente frequente serem designados apenas de totais.

Um dos métodos mais utilizados na análise do solo tem sido o isolamento de um dado elemento, associado a uma fração específica. Este tipo de análise baseia-se, geralmente, no uso de uma única solução extratora (que se procura que esteja bem correlacionada com a fração à qual é associada), sendo então designada de extração única. Por outro lado, em estudos de poluição ambiental, interessa, muitas vezes, conseguir avaliar simultaneamente a disponibilidade ambiental de um dado poluente no solo a curto e a longo prazo. Para isso, é necessário quantificar a proporção desse elemento que está associada às várias frações do solo e, logo, mais ou menos energeticamente retido. Com base nesse conhecimento é que se poderá avaliar o risco do elemento vir a ser mobilizado pela alteração de condições no solo ou por alterações do seu uso, fornecendo, assim, informação útil na avaliação do destino destes poluentes (DAVIDSON et al., 1998; RAO; SAHUQUILLO; SANCHEZ, 2008). Os métodos de extração única não permitem efetuar tal avaliação, sendo necessária a combinação de várias soluções extratoras, sucessivamente mais fortes ou específicas para diferentes frações. Os métodos de extração sequencial foram desenvolvidos nesse sentido: uma mesma amostra de solo é sujeita a várias extrações, sendo o resíduo da primeira usado como material para a segunda extração e assim por seguinte. A fração do solo atacada por cada extrator é restringida pela extração precedente e tornada, assim, mais específica (RAO; SAHUQUILLO; SANCHEZ, 2008).

Metodologias de análise baseadas no fracionamento com ordem de extração mais adequada e com mínimas chances do extrator retirar elementos de outra fração têm sido buscadas ao longo do tempo. Dentre elas, o método desenvolvido por Mann e Ritchie. (1993) foi proposto para estudar metais pesados em solos ácidos. Neste esquema, são contempladas as frações trocável, ligada à matéria orgânica e a óxidos de alumínio e ferro (cristalinos e amorfos) e residual. Este esquema de fracionamento se tornou o mais adequado para solos de regiões tropicais, pois, entre outras vantagens, elimina a fração ligada a carbonato e inclui os óxidos de alumínio juntamente com os de ferro e manganês. Em solos de regiões tropicais, a fração ligada a carbonato

não possui representatividade, em relação à fração ligada a óxidos de ferro e alumínio, devido a esses solos possuírem alta intemperização (SILVA; VITTI, 2008).

Baseado nesses preceitos, este trabalho teve como objetivo observar a partição do Cd entre as diferentes frações químicas do solo e avaliar a efetividade da estimativa de Cd total no solo através da digestão em água régia (URE, 1990), num Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Procedimentos experimentais

As unidades experimentais foram constituídas de vasos plásticos contendo 4,5 kg de solo da camada superficial (perfil de 0 a 20 cm) de um Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico, coletado em ambiente natural na Comunidade de Pessegueiros, no município de Bocaina do Sul. As características químicas desse solo são disponibilizadas na tabela 1.

Tabela 1 - Características químicas e argila do Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico, solo utilizado no experimento.

pH	CTC_{pH 7,0}	V	Al⁺³	Ca	Mg	K	P	Argila	CO*
	cmol _c dm ⁻³	%	cmol _c dm ⁻³	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	mg dm ⁻³	g kg ⁻¹	
5,0	15,96	45	2,2	5,9	1,2	49	4,2	280	11,6

*Carbono orgânico

Fonte: produção do próprio autor.

O solo foi contaminado com doses crescentes de Cd, com a finalidade de se observarem os efeitos da aplicação de diferentes quantidades do metal nas diferentes frações do solo. Tais doses constituíram os tratamentos, nos valores de 0, 10, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹ de Cd no solo, arranjados de acordo com um delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. A contaminação do solo ocorreu após a secagem e tamisagem do solo em peneira de 2 mm, utilizando solução de nitrato de cádmio (Cd(NO₃)₂). O solo, depois de contaminado, foi mantido incubado por 45 dias com umidade acima da capacidade de campo, em casa de vegetação, para a estabilização das condições químicas.

Inicialmente, foi procedida a abertura das amostras, com o objetivo de quantificar o Cd total no solo. Considerando que a Resolução do CONAMA nº 420 de 2009 reconhece a legalidade do uso de métodos recomendados pela International Standardization Organization (ISO) e pela Deutsches Institut für Normung (DIN) o método utilizado foi o descrito por Ure (1990), também conhecido como água régia (ISO 11466, 1995; ISO 11047, 1998). A fração terra fina seca ao ar (TFSA) das amostras foi submetida a trituração e homogeneizada em almofariz de ágata até pó fino com dimensões inferiores a 145 µm. Uma mistura de ácido clorídrico e nítrico, na proporção de 3:1 (HCl:HNO₃), em volume de 10 mL, foi adicionada a uma massa de 1g de solo, ambos inseridos em um tubo de digestão. Estes tubos foram alocados em bloco digestor (Dist DI 40/40PM) e aquecidos à temperatura de 90 ± 5°C durante 2 horas. Após o resfriamento das amostras, adicionou-se 15 mL de água destilada, realizando-se em seguida a filtração das alíquotas em papel filtro quantitativo para cinzas de 0,00014 g (Vetec). Por último, o conteúdo filtrado foi acondicionado em frascos do tipo *snap-cap*.

A seguir foi determinada a concentração do metal nas frações solúvel, trocável, ligado à matéria orgânica, aos óxidos de ferro, aos óxidos de alumínio e residual. Este procedimento, também conhecido como método do fracionamento, foi realizado conforme proposição de Mann e Ritchie (1993) e adaptado por Gomes et al. (1997) com base em Kämpf e Schwertmann (1982), para também quantificar o Cd ligado aos óxidos de alumínio. Além das sugestões de Gomes et al. (1997), outras modificações também se fizeram necessárias: (a) quantificação com base na massa em vez de volume, para facilitar a comparação dos resultados; (b) diluição dos extratos com 5 mL de solução de conservação; (c) separação dos extratos da amostra através de pipetagem do sobrenadante, em vez da utilização de papel filtro; (d) separação dos extratos da fração ligada à matéria orgânica em tubos tipo *Falcon* de 15 mL, em vez de balões volumétricos de 10 mL; (e) transferência do resíduo da extração da fração ligada aos óxidos de ferro para tubos de digestão, em vez de cadinhos de teflon, seguido de secagem do conteúdo em estufa, para posterior digestão da fração residual; (f) utilização do método de Ure (1990) para a digestão da fração residual, em vez da combinação dos ácido nítrico, perclórico e fluorídrico, indicada por Gomes et al. (1997).

Para cada fração, a centrifugação das amostras ocorreu a 3.500 rpm por 20 min. Após cada extração, adicionou-se 5 mL de água

deionizada ao resíduo de solo, sendo a amostra novamente centrifugada, e o sobrenadante gerado descartado, para que toda a solução extratora da fração anterior fosse eliminada. Para a solução de NaClO a 0,7 M, o pH foi ajustado imediatamente antes do uso para 8,5 (SHUMAN, 1985). Todos os extratos foram armazenados a 4°C, para restringir a alteração das amostras, em frascos plásticos, com o propósito de evitar a adsorção dos metais. Para a análise de concentração de cada fração, as curvas-padrão foram construídas utilizando-se as soluções extradoras como solventes, a fim de minimizar o efeito-matriz.

O esquema detalhado da extração fracionada dos metais é apresentado na Ilustração 2.

A quantificação do metal, para todas as análises, foi realizada por espectrofotômetro de absorção atômica de alta resolução com atomização em chama ar-acetileno ContrAA-700 (Analytyc Jena, Jena, Alemanha).

Ao final, foram ajustadas equações de regressão entre os teores de Cd extraídos em cada análise (Cd total e fracionado) e as doses do metal adicionadas ao solo, considerando-se 5% de significância.

2.4.2 Controle da qualidade analítica

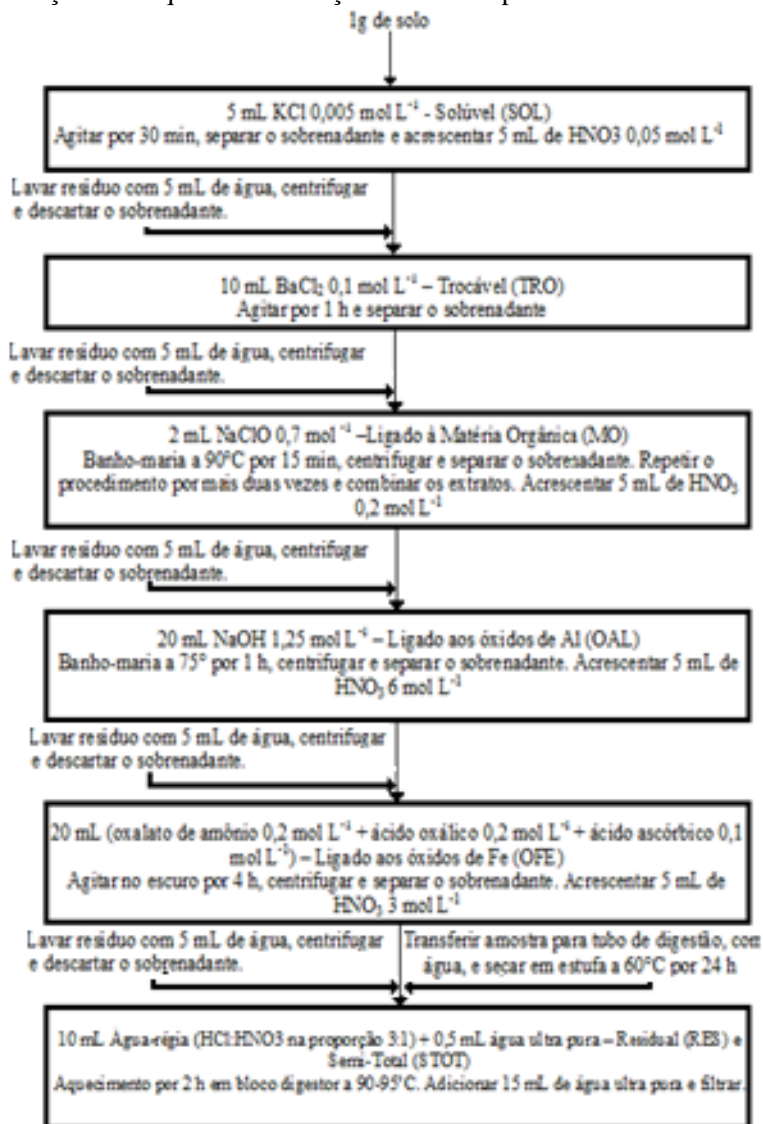
Anteriormente aos procedimentos analíticos de preparo das amostras, realizou-se a descontaminação de toda a vidraria: béqueres, balões volumétricos, frascos de vidro e polietileno para coleta de amostras, dentre outros, foram lavados com água corrente, e em seguida, colocados por 12 h em solução de limpeza (HCl 3%). Após isso, o material foi enxaguado com água destilada e seco em estufa à temperatura de $\pm 65^{\circ}\text{C}$, evitando-se exposição à poeira.

O peso da massa de solo das amostras foi obtida com o auxílio de uma balança analítica com sensibilidade de quatro casas decimais. Todas as soluções de extração e curvas-padrão foram preparadas utilizando-se água ultra pura (Milli-Q, Milipore®).

As análises foram realizadas em duplicata, com quatro provas em branco utilizadas com o propósito de corrigir possíveis erros devido à contaminação dos extratores utilizados.

A confiabilidade dos métodos analíticos empregados foi avaliada utilizando-se a amostra de solo de referência certificada pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST), SRM 2709a (San Joaquin).

Ilustração 2 - Esquema de extração fracionada para o Cd no solo.



*Teor Semi-Total (STOT) = amostras de solo sem prévias extrações

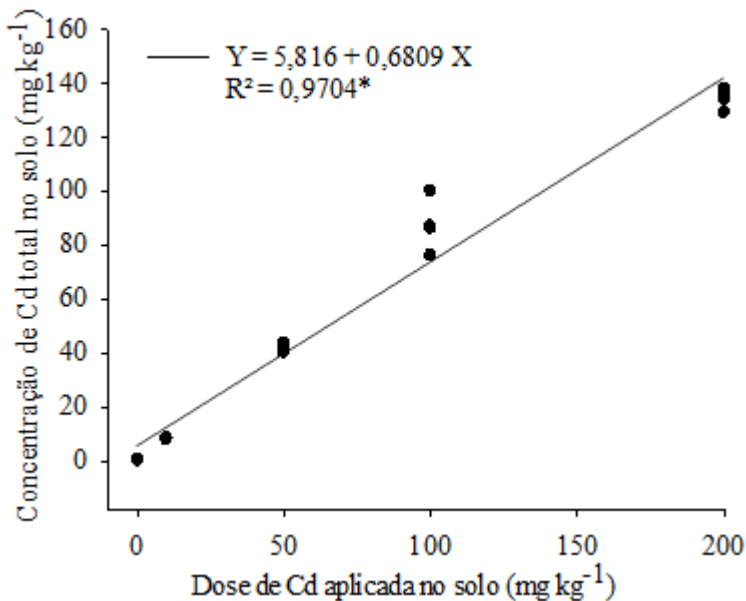
Fonte: adaptado de Gomes, 1997.

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Cd total no solo

A concentração de Cd total aumentou linearmente à medida que se elevou o teor de Cd aplicado no solo. Porém, as proporções recuperadas foram menores em comparação às doses aplicadas de 10, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹ de Cd, perfazendo 85, 85, 88, e 67% dessas doses, respectivamente (ver Ilustração 3 e Tabela 2).

Ilustração 3 - Concentração de Cd total no solo extraído de acordo com a metodologia de Ure (1990) em um Cambissolo Flúvico Aluminíco gleissólico contaminado com doses crescentes do metal.



Fonte: produção do próprio autor.

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

Estes resultados estão de acordo com aqueles verificados por Andrade et al. (2009) que, estudando a disponibilidade de metais pesados em solos de mineração de chumbo, constatou que o método de extração de Ure (1990) não solubiliza totalmente a amostra do solo, porém, extrai o teor máximo potencialmente biodisponível dos metais pesados, uma vez que os elementos químicos na estrutura de minerais silicatados e óxidos refratários não são considerados móveis no meio ambiente e, portanto, excluídos de muitos mecanismos de transporte e poluição (USEPA, 2007).

De acordo com Keller e Védý (1994), a água-régia extrai todos os metais presentes na fração residual do solo, exceto aqueles que ocorrem nos silicatos, com uma porcentagem de extração variando de 60-100%, dependendo do metal considerado (e por isso conhecido também como método de extração semi-total ou pseudo-total). Os valores de Cd total obtidos no presente trabalho estão dentro desta faixa.

Tabela 2 - Concentração de Cd extraído nas frações do solo, somatório nas frações e total extraído por água-régia em um Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico contaminado.

Dose	SOL	TRO	MO	OAL	OFE	RES	TOT FRA	TOT AR
..... mg kg ⁻¹								
0	<LD*	<LD	<LD	<LD	0,62	1,83	2,45	0,83 ^{ns}
10	0,62	3,68	1,26	<LD	0,91	2,18	8,65	8,53 ^{ns}
50	3,19	16,80	6,38	<LD	1,78	6,26	33,98	42,45 ^{ns}
100	6,93	40,10	12,37	<LD	2,96	10,50	72,86	87,73 ^{ns}
200	12,58	73,25	20,71	<LD	6,11	17,90	130,58	134,63 ^{ns}

Fonte: produção do próprio autor.

*LD: Limite de detecção de Cd para a fração. ^{ns}: diferença não significativa a 5 %.

Frações: SOL-Solúvel, TRO-Trocável, MO-Matéria Orgânica, OAL-Óxidos de alumínio, OFE-Óxidos de ferro, TOT FRA-Total fracionado e TOT AR: Total água-régia.

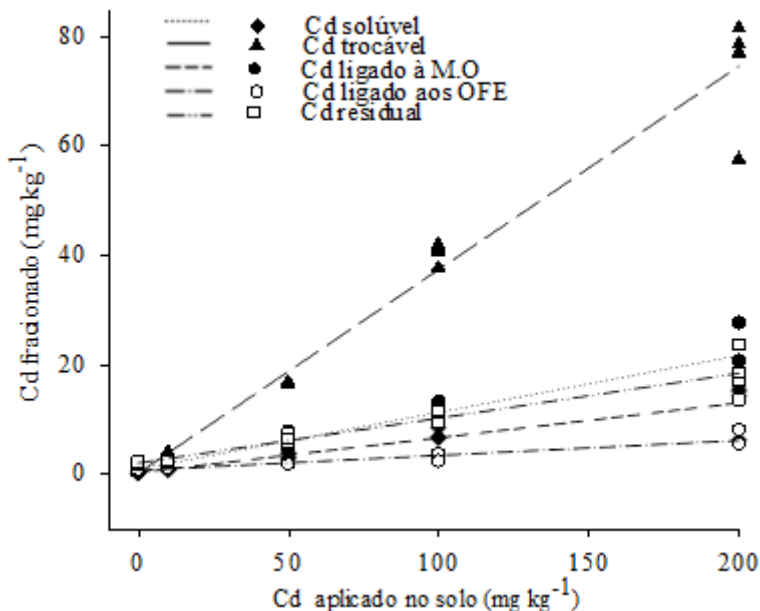
As doses de Cd aplicadas no solo resultaram em valores totais do metal superiores à concentração máxima permitida (10 mg kg⁻¹) para solos agrícolas de acordo com a legislação de vários países (KABATA-

PENDIAS et al., 2000), com exceção da dose de 10 mg kg⁻¹, em que a concentração do metal ficou abaixo desse limite. Quanto à legislação brasileira, os valores encontrados estão acima do valor de prevenção (1,3 mg kg⁻¹), e ultrapassam o valor de investigação para solos agrícolas (3 mg kg⁻¹) e para solos de uso residencial (8 mg kg⁻¹), em todas as doses aplicadas, e para uso industrial (20 mg kg⁻¹), exceto na dose de 10 mg kg⁻¹ de solo, de acordo com a Resolução n°420 do CONAMA (2009).

2.4.2 Fracionamento de Cd no solo

Observou-se aumento linear da concentração de Cd extraída em todas as frações de acordo com o acréscimo da dose do metal adicionado ao solo (ver Ilustração 4 e Tabela 3).

Ilustração 4 - Cd associado às diferentes frações constituintes do solo em um Cambissolo Flúvico Aluminico gleissólico contaminado com doses crescentes do metal.



Fonte: produção do próprio autor.

Este aumento foi mais pronunciado nas frações solúvel e trocável. Na fração solúvel, as concentrações extraídas representaram 7,27%, 7,50%, 8,04% e 9,37% e, na fração trocável corresponderam a 36,85%, 32,72%, 40,10% e 36,63%, das doses de Cd aplicadas ao solo, respectivamente (ver Tabela 2).

Tabela 3 - Coeficientes das equações de regressão ajustadas entre os teores de Cd extraídos em cada fração e as doses do metal adicionadas ao solo, em que $Y = a + bx$.

Fração química	a	bx	P(a)	R²
Solúvel	0,1035	0,0634	<0,0001	0,8726
Trocável	-0,0347	0,3713	<0,0001	0,9718
M.O	0,7028	0,1038	<0,0001	0,9322
Óxidos de Fe	0,5202	0,0272	<0,0001	0,9282
Residual	1,8460	0,0818	<0,0001	0,9240
Total	5,8110	0,6809	<0,0001	0,9704

Fonte: produção do próprio autor.

Os resultados obtidos concordam com aqueles de Gomes et al. (1997) que, trabalhando com extração fracionada de metais pesados em latossolo vermelho-amarelo contaminado, tendo sido aplicadas doses de Cd de até 7,2 mg kg⁻¹ para o horizonte A, e 3,6 mg kg⁻¹ para o horizonte B, constataram maior distribuição do metal nas frações solúvel e trocável do solo (62%) em relação à concentração total. Costa et al. (2007) também obtiveram altos teores de Cd solúvel e trocável em uma extração sequencial do metal em diferentes solos contaminados, utilizando concentrações do metal de até 5 mg kg⁻¹, sendo os valores das frações conjuntas variando de 27,2 a 44,6% do Cd adicionado ao solo. Ambos os autores corroboram os resultados obtidos no presente experimento, no que se refere ao Cd solúvel e trocável, indicando uma alta proporção do metal ligado a essas frações, possibilitando a sua maior mobilidade no solo.

Na fração ligada à matéria orgânica, na qual o Cd sofreu aumento linear com o acréscimo das doses do metal no solo, as concentrações extraídas corresponderam a 12,60%, 12,77%, 12,38% e 10,36% em relação a essas doses (ver Tabela 2). Estes resultados

discordam dos obtidos por Costa et al. (2007), os quais encontraram índices variando de 19 e 56,8% em uma extração sequencial em diferentes solos contaminados, porém, utilizando-se da combinação de dois diferentes extratores (DTPA $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e NaOH $0,5 \text{ mol L}^{-1}$).

Gomes et al. (1997) também observaram valores de Cd ligados a matéria orgânica menores que na fração trocável do solo (6,6% em horizonte A). De maneira semelhante, Silveira (2002), estudando latossolos tratados com bio-sólido, com concentrações totais de Cd de até $0,22 \text{ mg kg}^{-1}$, encontrou valores do metal associado à matéria orgânica na ordem de 11 a 22%, após o procedimento de uma extração sequencial, faixa que compreende a concentração de Cd obtida neste trabalho.

As concentrações de Cd associado aos óxidos de ferro (ver Tabela 2) corresponderam a 9,12%, 3,56%, 2,96% e 3,06% em média, das doses de Cd aplicadas no solo, respectivamente. Esses valores são relativamente baixos, se levarmos em consideração relatos da alta afinidade de Cd por óxidos de ferro cristalinos ou de baixa cristalinidade (BENJAMIN; LECKIE, 1981). No entanto, estão em consonância com os resultados de Silveira (2002), cuja faixa se manteve entre 4 a 6% e de Gomes et al. (1997), os quais não ultrapassaram a proporção de 6% do Cd total no solo.

Na fração residual as proporções de recuperação das doses de Cd adicionadas foram de 21,80%, 12,52%, 10,48% e 8,96%, respectivamente (ver Tabela 2). Essas taxas são condizentes com aquelas encontradas por Silveira (2002), as quais variaram de 6 a 16%, e por Gomes et al (1997), que variaram de 9,6 a 19,3%, do Cd total do solo.

Os teores de Cd ligado aos óxidos de alumínio ficaram abaixo do limite de detecção do aparelho de leitura. Também ficaram abaixo desse limite os teores das frações solúvel, trocável, e associado à matéria orgânica quando não se aplicou Cd ao solo (ver Tabela 2).

As taxas de recuperação do Cd aplicado permaneceram estáveis para as diferentes doses, nas frações solúvel e trocável e diminuíram da menor para a maior dose nas frações ligadas à matéria orgânica, óxidos de ferro e residual. Considerando-se os valores absolutos, as maiores diferenças entre as doses ocorreram nas duas primeiras frações. Conclui-se que em condições de baixa concentração no solo, o Cd tem a tendência de estar ligado a formas menos disponíveis, permanecendo adsorvido à matéria orgânica, minerais silicatados e a óxidos de ferro. A medida que os valores de concentração de Cd aumentam no solo,

frações mais disponíveis, como a solúvel e a trocável, são as mais acionadas.

2.4.3 Cd total na digestão e no fracionamento

Quando se contabiliza o Cd total através da soma das concentrações em cada fração em relação aqueles obtidos com uma extração única com água-régia (ver Tabela 2), percebem-se pequenas diferenças que são devidas, provavelmente, às perdas de material durante o procedimento de extração sequencial e/ou ao nível de precisão do equipamento de leitura. No entanto, essas diferenças não são significativas quando os resultados são analisados através do teste t (amostras pareadas), a 5% de significância, para todas as doses aplicadas no solo. Conforme recomendação de McLaren e Crawford (1973), a adequação da metodologia de extração deve ser testada por análise de regressão entre o teor total determinado pela digestão e a soma dos teores obtidos nas frações. Os valores totais obtidos na extração sequencial apresentaram uma correlação com aqueles obtidos via digestão em água-régia com coeficiente R^2 equivalente a 0,99, revelando uma alta proximidade entre ambos. A regressão e o coeficiente de determinação, bem como a ausência de diferença significativa entre as metodologias, sugerem que para o Cd, os extratores utilizados na extração sequencial são adequados.

2.6 CONCLUSÕES

O método de digestão em água régia extrai o teor máximo potencialmente biodisponível e pode ser utilizado com segurança na estimativa da concentração total de Cd no solo.

À medida que se aumenta a dose de Cd aplicada, eleva-se a sua concentração na fração disponível, na matéria orgânica, nos óxidos de ferro, na fração residual e na concentração total do solo.

Em condições de baixa concentração no solo, o Cd tem a tendência de se associar às frações menos disponíveis, como a M.O, óxidos de ferro e minerais silicatados. Quando grandes quantidades são adicionadas, as frações mais disponíveis, como a solúvel e a trocável, são acionadas em maiores taxas.

3. CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DA RESPOSTA AO ESTRESSE INDUZIDO POR CÁDMIO EM PLANTAS DE VIME CULTIVADAS EM SOLO CONTAMINADO

3.1 RESUMO

A fitorremediação apresenta-se como alternativa aos métodos físicos e químicos para a recuperação de solos em que os contaminantes ocorrem superficialmente e/ou em baixas concentrações, proporcionando menor custo e impacto ambiental. Apesar de tolerarem altos níveis de Cd no solo, plantas hiperacumuladoras estão sujeitas à fitotoxicidade relacionadas ao metal, resultando na inibição do desenvolvimento. Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar o comportamento de plantas de *Salix viminalis* quando utilizadas para a fitorremediação de Cd em solos contaminados, quanto ao crescimento, capacidade de acumulação, translocação e tolerância ao metal. Plantas desta espécie foram propagadas a partir de estacas e cultivadas em casa de vegetação, em vasos contendo solos com concentrações de Cd equivalentes a 0, 10, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹, sob condições naturais de fotoperíodo, e controladas de temperatura e umidade. Em intervalos de 15 dias, foram tomadas leituras da intensidade de verde das folhas, as quais, juntamente com a calibração do equipamento ajustada preliminarmente, subsidiaram a estimativa de clorofila nas folhas. Aos 78 dias, obteve-se as taxas de fotossíntese sob diferentes intensidades luminosas, e aos 85 dias, a massa seca produzida pelas plantas e a concentração de Cd em suas estruturas. A análise dos dados foi procedida com o suporte de equações de regressão ajustadas entre as variáveis analisadas e as diferentes concentrações de cádmio no solo. Plantas de *Salix viminalis* se mostraram altamente responsivas à concentração do Cd no solo para clorofila total nas folhas, taxa fotossintética e massa seca produzida. A elevação dos níveis do metal no solo provocou a variação da sua concentração nas diferentes estruturas das plantas, reduzindo os Fatores de Bioconcentração nas raízes e parte aérea, bem como o Fator de Translocação, determinando maiores períodos de remediação nas contaminações mais severas. Apesar disso, a espécie estudada apresenta potencial para utilização em programas de remediação de solos contaminados com Cd através da fitoestabilização e fitoextração.

Palavras-chave: Cádmio no solo; Fitorremediação; Vime.

3.2 ABSTRACT

Phytoremediation is an alternative to physical and chemical methods in the recovery of soils contaminated, providing lower cost and environmental impact in locations where contamination occurs on the surface and / or at low concentrations. Although tolerate high levels of Cd in soil, hyperaccumulator plants are subject to phytotoxicity related to the metal, resulting in growth inhibition. Thus, this study aimed evaluate the behavior of *Salix viminalis* plants when used for phytoremediation of cadmium in contaminated soil regarding growth, ability of accumulation, translocation and tolerance to metal. Plants were propagated from cuttings and grown in a greenhouse in pots containing soil with Cd concentrations of 0, 10, 50, 100 and 200 mg kg⁻¹, under natural conditions of photoperiod and controlled temperature and humidity. At intervals of 15 days, readings were taken of the intensity of the green color of leaves, which, coupled with the calibration of the equipment set preliminarily provided an estimate of chlorophyll in leaves. At 78 days, were obtained photosynthesis rates under different light intensities, and at 85 days, the dry mass produced by plants and the concentration of Cd in their structures. Data analysis was performed with the support of adjusted regression equations between variables and the different concentrations of Cd in the soil. *Salix viminalis* plants were highly responsive to the concentration of Cd in the soil to total chlorophyll in leaves, photosynthetic rate and dry matter produced. Increased levels of metal in soil caused the variation of its concentration in the different structures of plants, reducing the Bioconcentration Factors in roots and shoots, and the translocation factor, determining longer periods of remediation in the most severe contamination. Despite this, the species studied has potential for use in programs of remediation of soils contaminated with Cd by phytostabilization and phytoextraction.

Key words: Cadmium in the soil; Phytoremediation; Osier.

3.3 INTRODUÇÃO

Diversas técnicas têm sido desenvolvidas para remediar solos contaminados por metais pesados. No entanto, muitas áreas permanecem contaminadas em razão dos elevados custos, ambiental e econômico, dos métodos disponíveis. Nesse contexto, a fitorremediação apresenta-se como uma alternativa de custo razoável, ambientalmente mais segura e de maior aceitação pelo público que métodos mais agressivos ao ambiente, principalmente em locais contaminados na superfície ou em baixos níveis de concentração. Dentre várias técnicas dessa alternativa, duas tem se mostrado mais promissoras e despertado maior atenção dos pesquisadores: a fitoextração e a fitoestabilização.

A fitoextração baseia-se na utilização de plantas para extrair poluentes do solo e acumulá-los em seus tecidos, seguido da colheita do material, que poderá ser incinerado, compactado, compostado, descartado em local apropriado ou até mesmo reciclado através da biomineração. Já a fitoestabilização visa reduzir o potencial de dano ao meio ambiente pela redução da mobilidade e disponibilidade do contaminante no solo usando processos de precipitação, complexação, humificação e lignificação, prevenindo a entrada do contaminante nas águas subterrâneas ou na cadeia alimentar. As pesquisas sobre esta técnica estão direcionadas para o desenvolvimento de plantas que produzem grande quantidade de massa de raízes, capazes de imobilizar contaminantes sem transportá-los para a parte aérea. Ambas as tecnologias apresentam baixo custo, e têm alto potencial para remediação *in situ* de grandes áreas contaminadas (CHANEY et al., 2000; ROBINSON et al., 2003; TANDY et al., 2004), com baixo ou médio nível de contaminação (SCHMIDT, 2003).

Algumas espécies de plantas, conhecidas como hiperacumuladoras, são muito promissoras para cumprir este papel, uma vez que podem acumular nos tecidos das plantas concentrações de metais 50 a 500 vezes superiores em relação às encontradas em plantas de espécies não hiperacumuladoras (LASAT, 2000). A capacidade de concentrar alta quantidade de um dado metal nos tecidos e a disponibilidade de um sistema eficiente de translocação do contaminante das raízes para a parte aérea são fatores que garantem às espécies hiperacumuladoras de metais alta capacidade de detoxificação (McGRATH; ZHAO, 2003). No entanto, muitas das espécies hiperacumuladoras possuem crescimento lento e baixa produção de

biomassa, requerendo, desta forma, vários anos para descontaminar áreas poluídas.

Obviamente, a otimização do potencial de fitorremediação de Cd do solo depende da escolha de um genótipo apropriado que combine características como a alta acumulação na parte aérea e a alta produtividade de biomassa. A tolerância ao metal, e a conseqüentemente proteção da integridade e funcionalidade dos processos fisiológicos e metabólicos primários também são pré-requisitos essenciais no uso de plantas para esse objetivo (PIETRINI et al. 2003). Essas características ocorrem de maneira simultânea na família *Salicaceae*, as quais a torna muito atrativa para ser utilizada em projetos de fitorremediação de solos contaminados pelo metal (ANDRADE; TAVARES; MAHLER, 2007). Além disso, esta família é composta por espécies vegetais que sobrevivem em ambientes temporariamente saturados em água, em que frequentemente o nível do lençol freático atinge as camadas mais superficiais do solo.

Apesar de tolerarem o Cd, existe um limite de concentração no meio a partir do qual as *Salicaceae* ficam sujeitas à toxicidade provocada pelo metal. Hakmaoui et al. (2007) observaram a redução do peso da massa fresca, comprimento de folhas, comprimento e número de raízes, além da diminuição do índice de tolerância em plantas de *Salix purpurea*, cultivadas em meio hidropônico contaminado com Cd, a partir da concentração de 44 μM . Em geral, a clorose, o encarquilhamento de folhas e o nanismo são descritos como os principais sintomas de fitotoxicidade. A abertura estomática, a transpiração e a fotossíntese são relatados como mecanismos afetados pelo Cd em plantas conduzidas em soluções contaminadas (SANITÀ DI TOPPI e GABBRIELLI, 1999). O elemento interfere na absorção, transporte e utilização de vários nutrientes (Ca, Mg, P e K) e de água pelas plantas (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997), além de reduzir a absorção e transporte de nitrato das raízes para a parte aérea (HERNÁNDEZ; CÁRPENA-RUIZ; GARATE, 1996) e afetar a permeabilidade da membrana plasmática, provocando uma redução no teor de água das células (BARCELO; POSCHENRIEDER, 1990). Ainda pode causar nas plantas a redução da atividade de ATPase na membrana plasmática e alterações na funcionalidade das membranas por indução da peroxidação lipídica (FODOR; SZABÓ-NAGY; ERDEI, 1995). Vários estudos têm sugerido que estresses oxidativos podem estar envolvidos com a toxidez ao Cd, tanto pela indução da produção de radicais livres de oxigênio, quanto pela redução da produção de

antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SOMASHEKARAI AH; PADMAJA; PRASAD, 1992; STOHS; BAGCHI, 1995; SHAW, 1995; GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996; SANDALIO et al., 2001; BALESTRASSE et al., 2001; FORNAZIER et al., 2002; CHO; SEO, 2004).

Um dos sintomas típicos visíveis da toxicidade ao Cd é a clorose foliar (JIANG et al., 2005; KÜPPER et al., 2007), que ocorre devido à ausência de clorofilas nessas estruturas. Esses pigmentos são responsáveis pela captura de luz usada na fotossíntese, sendo essenciais na conversão da radiação luminosa em energia química, na forma de ATP e NADPH. Assim, as clorofilas estão relacionadas com a eficiência fotossintética das plantas e, conseqüentemente, com seu crescimento e adaptabilidade aos diferentes ambientes (JESUS; MARENCO, 2008).

A redução da clorofila provocada pelas doses de Cd *in solo* tem origem em processos distintos. De acordo com Van Assche e Clijsters (1990), o Cd altera a biossíntese de clorofila pela inibição da protoclórfila redutase, provavelmente através da interação do metal com grupos SH. Também pode afetar a integração das moléculas de clorofila em pigmentos proteicos complexos dos fotossistemas (HORVATH et al., 1996). A substituição dos íons de magnésio por íons de Cd em moléculas de clorofila é um possível mecanismo que resulta na destruição de clorofila (KÜPPER; KÜPPER; SPILLER, 1998). Porém, a clorose das folhas pode não ser devida a um efeito direto do cádmio na biossíntese ou destruição desse pigmento. Barylá et al. (2001) verificou que, em plantas de colza, o cádmio altera a divisão celular e a replicação dos cloroplastos, resultando em uma diminuição drástica do número de cloroplastos e, conseqüentemente, da quantidade de clorofila. Vale salientar que em baixos níveis de contaminação por Cd, bem como durante curtos períodos de exposição, os sintomas visuais de fitotoxicidade podem ser menos pronunciados ou estar ausentes, mesmo assim outros bioindicadores são identificados: o aumento da atividade de enzimas envolvidas na defesa da planta contra o estresse oxidativo (LANDBERG; GREGER, 2002), a complexação intracelular (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002), compartimentalização (MA et al., 2005; KÜPPER et al., 2007), complexação à proteínas ligantes (MA et al., 2005) e a imobilização externa ou na raiz do metal (LOMBI; ZHAO; McGRATH, 2001). Ao serem ativados, estes mecanismos inibem os efeitos do Cd relacionados à clorofila, evitando os processos que provocam a sua redução nas folhas.

Além da ação nas clorofilas, outros processos, de maneira direta ou indireta, estão relacionados à alteração da fotossíntese pelo Cd: a inibição da atividade da ribulose-bisfosfato carboxilase oxigenase (Rubisco), enzima responsável pela captação do CO₂ (MUTHUCHELIAN; BERTAMINI; NEDUNCHEZHIAN, 2001), a substituição de Ca²⁺ por Cd²⁺ no processo de hidrólise da água, no centro de reação do fotossistema II (ANDRESEN; KÜPPER, 2013), e o distúrbio na relação água-planta, ocasionando o fechamento dos estômatos em muitas plantas, levando a uma menor taxa de transpiração (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002).

Em decorrência de todas as alterações morfológicas e fisiológicas provocadas pela fitotoxicidade do Cd, a taxa de absorção líquida de CO₂ é inibida, e por fim, há a redução da atividade fotossintética das plantas que culmina numa menor produção de biomassa. Segundo Gichner et al. (2006), altos teores de Cd no solo podem inibir o desenvolvimento das plantas, efeito que pode ser comprovado pela menor produção de matéria seca em comparação com aquelas conduzidas em solo não contaminado. Tal efeito é descrito em estudos de diversas culturas arbóreas: *Eucalyptus camaldulensis* (MARQUES et al., 2011), *Arabidopsis halleri* (VASSILEV; VANGRONSVELD; YORDANOV, 2002), *Albizia lebbek* (L.) Benth. (FAROOQI, 2009) e *Populus Deltoids x Populus nigra* (WU et al., 2009) e *Salix* (VASSILEV, 2005). Essa redução, no entanto, pode não ser significativa quanto à alteração do potencial remediador das plantas. Para Greger e Landberg (1999) o uso do *Salix viminalis* é adequado para a fitoextração de metais em solos com baixa a moderada contaminação, dado ao seu elevado potencial de acumulação e às altas taxas de absorção e translocação para a parte aérea, em especial para o Cd, Zn e Cu. Um estudo de Zacchini et al. (2011) conclui que plantas de *Salix alba* L. podem tolerar o Cd e transportá-lo para as folhas em grandes quantidades. Sendo assim, outros parâmetros devem ser considerados a fim de se atestar a viabilidade da espécie como fitorremediadora de locais contaminados pelo metal. Dentre eles, alguns devem ser destacados: o Índice de Tolerância (*It*), que mede a habilidade do crescimento de plantas em ambientes com a presença de altas concentrações de metais (WILKINS, 1978); o Fator de Translocação (*Ft*), que avalia a capacidade de acumulação do metal nas partes aéreas em relação ao absorvido pelas raízes e o Fator de Bioconcentração (*FBC*), que mede a capacidade das plantas de extrair e acumular metais em seus tecidos (ZAYED; GOWTHAMAN; TERRY, 1998).

Considerando que cada genótipo distinto entre plantas hiperacumuladoras de Cd responde de maneira diversa quanto ao desenvolvimento em solo contaminado pelo metal, e que esse desenvolvimento é influenciado por fatores ambientais e pelo manejo de condução das plantas, o estudo objetivou avaliar o potencial de plantas de *Salix viminalis* na remediação de um Cambissolo de baixada do Planalto Catarinense contaminado com Cd, através da técnica da fitorremediação, subsidiando-se em informações específicas sobre níveis de tolerância quanto à concentração do metal no solo, capacidade de absorção e local de concentração do metal nas plantas, bem como analisar o comportamento de alguns parâmetros morfológicos e fisiológicos das plantas envolvidos nesta avaliação, sob condições homogêneas do ambiente de crescimento e do manejo de condução dessas plantas.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em janeiro de 2013 e conduzido por um período de 85 dias em casa de vegetação, localizada no CAV- UDESC em Lages, SC. As unidades experimentais foram constituídas de quatro plantas de vime (*Salix viminalis*) desenvolvidas em vasos plásticos contendo 4,5 kg de solo da camada superficial (perfil de 0 a 20 cm) de um Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico, coletado em ambiente natural na comunidade de Pessegueiros, no município de Bocaina do Sul, SC, e corrigido e adubado de acordo com os níveis de fertilidade recomendados para a cultura do vime no Planalto Sul Catarinense por Rech et al. (2012). As características químicas desse solo são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Características químicas e argila do Cambissolo Flúvico Alumínico gleissólico, solo utilizado no experimento.

pH	CTC 7,0	pH	V	Al ⁺³	Ca	Mg	K	P	Argila	CO*
	cmol _c dm ⁻³		%	cmol _c dm ⁻³			mg dm ⁻³		g kg ⁻¹	
5,0	14,99	7,0	70	0,4	7,4	2,8	141	12,8	280	12,8

Fonte: produção do próprio autor.

*Carbono orgânico

O solo foi contaminado de acordo com o procedimento experimental descrito no item 1.3.1, antes do plantio das estacas. Após o período de incubação do metal no solo, cada vaso recebeu quatro estacas de vinte centímetros de comprimento, de diferentes diâmetros, variando entre 5 e 10 mm, coletadas de forma aleatória de ramos de plantas de *Salix viminalis* da estação experimental da EPAGRI de Lages, SC, seis meses após a poda drástica dos ramos das plantas adultas das quais foram extraídos os clones/estacas. Para o pleno desenvolvimento das plantas, a umidade do solo foi mantida na capacidade de campo e a luminosidade em condições naturais de intensidade e fotoperíodo. A temperatura e umidade do ar foram controladas através de sistema automatizado, variando entre 15 e 25°C e 70 e 95%, respectivamente.

Aos 36, 52, 63 e 78 dias, foram tomados os valores de intensidade do verde das folhas (índice Soil Plant Analysis Development – SPAD) das plantas de vime, os quais subsidiaram os cálculos que determinaram a conteúdo de clorofila total. Este índice foi obtido através do medidor portátil de clorofila SPAD 502 (Konica Minolta®, Tóquio, Japão), que utiliza-se de princípios ópticos não destrutivos, baseados na absorvância e/ou refletância da luz pelas folhas. Para tanto, foram amostradas folhas totalmente expandidas, do terço médio das plantas, no período entre 8-10 h da manhã (com temperatura de 15-18°C e umidade relativa de 75-85%). O valor de intensidade de verde considerado foi a média de leituras efetuadas em nove folhas amostradas aleatoriamente nas quatro plantas de cada unidade experimental, ausentes de danos físicos ou sintomas do ataque de pragas e doenças. Apesar da praticidade, rapidez e precisão, os modelos que descrevem a relação entre as leituras dos equipamentos portáteis não destrutivos, como o índice de intensidade do verde das folhas, variam para cada cultura, de acordo com as características intrínsecas a cada espécie, exigindo calibração independente com os teores de clorofila determinados destrutivamente (LEE, 1988; MARKWELL; OSTERMAN; MITCHELL, 1995; UDDLING et al., 2007). Sendo assim, para a obtenção dos valores de clorofila nas folhas de plantas de *Salix viminalis*, para os diferentes tratamentos, os mesmos podem ser estimados através de uma equação de regressão ajustada empiricamente, baseada no método de Arnon (1949), que correlaciona o índice SPAD com a quantidade de clorofila total nas folhas de plantas de *Salix viminalis*. Tal equação é dada por: $Y = -2,95 + 0,629X$, em que Y é a quantidade de Clorofilas totais nas folhas, em $\mu\text{g cm}^{-2}$ e X, o índice SPAD obtido (Daniel et al., dados não publicados).

Foram tomadas medidas da taxa fotossintética das plantas a 71 dias do plantio das estacas. A leitura foi realizada em apenas uma folha/unidade experimental, pertencente ao terço médio da planta, cujo índice SPAD, fosse exatamente igual a média dos índices de pelo menos 15 folhas do terço médio de todas as plantas daquela unidade experimental. O horário estabelecido para as leituras foi delimitado entre as 09h e 15h, evitando-se os períodos de oscilações bruscas da assimilação do CO₂ pelas plantas, e utilizando sempre folhas expostas à radiação solar (não sombreada pelo dossel). O equipamento utilizado para esta determinação foi o analisador de gases por infravermelho (Infra-Red Gas Analyser - IRGA) portátil LC-PRO SD (ADC Bioscientific, Hertfordshire, R.U.). O cálculo da área das folhas foi realizado através de um integrador de área foliar LI-3050A (LI-COR, Lincoln, E.U.A.). Previamente às avaliações, o analisador de gases foi calibrado retirando-se o CO₂ e o vapor de água do ar circulante no aparelho com óxido de cálcio e drierite, respectivamente e o nível de entrada de CO₂ foi estabilizado com o auxílio de um recipiente com capacidade para 20 litros. A taxa fotossintética de cada folha amostrada foi medida em dez diferentes intensidades luminosas: 0, 8, 43, 86, 173, 347, 522, 782, 1044, 1304 $\mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, emitidas através de um dispositivo emissor acoplado à câmara foliar do equipamento. O intervalo entre leituras de taxa fotossintética nas diferentes intensidades luminosas obedeceu ao tempo de dois minutos, possibilitando a estabilização das trocas gasosas na câmara foliar. A temperatura da câmara foi mantida abaixo dos 25°C e a umidade do ar com pressão de vapor entre 9,1 e 20,4 mb.

A função ajustada que define as curvas características para os valores de taxa fotossintética (A), em relação ao fluxo do feixe de fótons ($DFFFA$) foi um modelo hiperbólico, sendo $A = a + [(A_{max} \times DFFFA)/(b + DFFFA)]$, em que A_{max} é a taxa máxima de fotossíntese e a e b são coeficientes de ajuste da equação. A partir dele pode-se estimar a respiração no escuro (coeficiente a da equação), o ponto de compensação de luz (I_c , valor de $DFFFA$ em que A é igual a zero) e estimar a eficiência quântica aparente (ϕ , $\mu\text{mol CO}_2$ por $\mu\text{mol de f\u00f3tons}$). A variável ϕ foi estimada pelo ajuste de uma equação linear, na faixa em que a variação de A em função da $DFFFA$ era linear, isto é, $A = c + (\phi \times DFFFA)$, em que c e ϕ são coeficientes de ajuste. Na função hiperbólica, A_{max} e b correspondem aos valores de V_{max} e K_m da equação de Michaelis-Menten (AMARANTE; STEFFENS; MOTA, 2007).

Ao final de 85 dias de ciclo vegetativo, as plantas foram colhidas, em condições de umidade do solo em capacidade de campo, tomando-se o cuidado de retirar dos vasos a totalidade das raízes. Estas foram lavadas por três vezes com água destilada, até eliminar todas as partículas de solo associadas, e logo após, uma vez com água deionizada. Cada unidade experimental foi dividida em raízes, caules, ramos e folhas, as quais foram secas em estufa de circulação forçada a 65°C durante 48 horas. Os valores de massa seca, para as diferentes estruturas de cada unidade experimental, foram obtidos em balança analítica de precisão, com quatro casas decimais.

O Índice de Tolerância (*IT*) foi obtido de acordo com o cálculo:

$$IT = \frac{\text{Peso seco das plantas em solo contaminada} \times 100}{\text{Peso seco das plantas em solo controle}}$$

Para a determinação da concentração de Cd nos tecidos vegetais, o material foi processado em moinho e tamisado em peneira de malha de 20 mesh. Com o auxílio da balança de precisão, pesou-se 0,25 g de tecido vegetal para compor cada amostra. Seguidamente, o material foi inserido em frascos de digestão de perfluoroalcoxi (PFA) de 50 ml, ao qual foram adicionados 6 mL de HNO₃ 65%. Logo após, os tubos foram inseridos em invólucros de pressão de poliéter-éter-cetona (PEEK). A abertura das amostras foi procedida em forno microondas *Multiwave 3000* (Anton Paar, Graz, Áustria) por 30 minutos, à temperatura de 190°C com compensação da pressão até 20 Bar. Após a digestão, o material foi filtrado em papel filtro quantitativo de 0,00014 g, com posterior adição de 10 mL de água ultrapura e acondicionamento em tubos do tipo *Snap cap*. A determinação da concentração do Cd nos tecidos foi realizada por espectrofotômetro de absorção atômica com fonte contínua, atomização em chama, ar acetileno, ContrAA 700 (Analytyc Jena, Jena, Alemanha).

Para a obtenção do Fator de Translocação (*FT*) e do Fator de Bioconcentração (*FBC*), os seguintes cálculos foram procedidos:

$$FT = \frac{\text{Concentração de metal na parte aérea} \times 100}{\text{Concentração do metal nas raízes}}$$

$$FBC = \frac{\text{Concentração do metal no material colhido}}{\text{Concentração do metal na solução}}$$

As quantidades de Cd acumuladas nas plantas foram estimadas de acordo com o seguinte cálculo:

$$\text{Peso do Cd fixado nas plantas} = [(\text{concentração de Cd nas raízes}) \times (\text{peso das raízes})] + [(\text{concentração de Cd no caule}) \times (\text{peso dos caules})] + [(\text{concentração de Cd nos ramos}) \times (\text{peso das ramos})] + [(\text{concentração de Cd nas folhas}) \times (\text{peso das folhas})]$$

A taxa de Cd fixado foi obtido através do seguinte cálculo:

$$\text{Cd fixado nas plantas (\%)} = \frac{\text{peso do Cd nas plantas} \times 100}{\text{peso do Cd no solo}}$$

O controle da qualidade analítica foi procedido de maneira idêntica ao item 2.4.2 para a limpeza de vidrarias, preparo de soluções de extração e curvas-padrão e utilização de provas em branco. A análise do comportamento das variáveis consideradas em relação às concentrações de Cd no solo foi efetuada através do ajuste de equações de regressão, testadas em nível de significância de 5%.

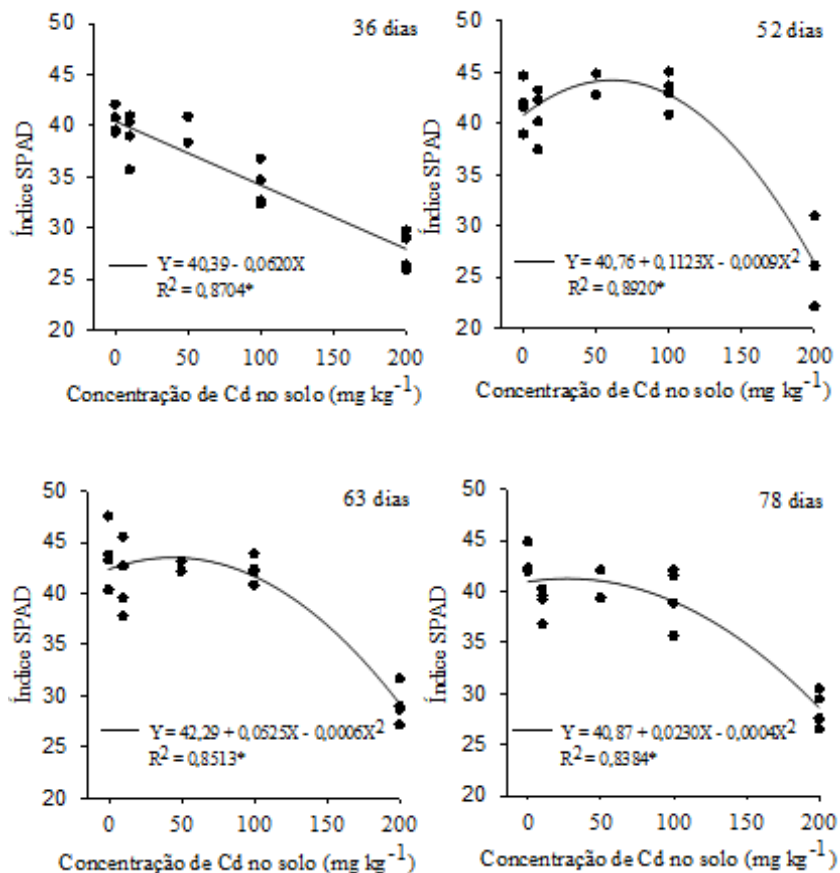
3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Clorofila total nas folhas

A resposta do índice SPAD das folhas das plantas de *Salix viminalis* apresentou alto grau de associação com a concentração de Cd no solo (ver Ilustração 5). Observou-se uma tendência de queda do índice ocorrendo sempre além dos 30 mg kg⁻¹ de Cd no solo, a partir dos 52 dias de ciclo vegetativo. O valor máximo estimado reduziu, e foi atingido em contaminações cada vez menores, à medida que transcorreu o ciclo vegetativo.

Nikolic et al. (2008), avaliando a resposta de um híbrido de álamo ao estresse por Cd, observou um decréscimo na concentração de clorofila total das folhas com o aumento da concentração de Cd em um meio hidropônico. Marques et al., (2011), analisando respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao Cd em solução nutritiva, também identificou esse decréscimo. Em contraste, Lunackova et al. (2003) não encontrou nenhuma redução significativa do teor de pigmentos dos cloroplastos em plantas de *Salix alba* L. e *Populus x euroamericana* cv. expostas ao Cd cultivadas em hidroponia.

Ilustração 5 - Índice SPAD em folhas de vime (*Salix viminalis*) em função da concentração de Cd no solo.



Fonte: produção do próprio autor.

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

3.5.2 Taxa fotossintética das plantas

O acréscimo da concentração de Cd no solo provocou o aumento da eficiência quântica (ϕ) em baixos valores de densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (*DFFFA*), até a dose de 50

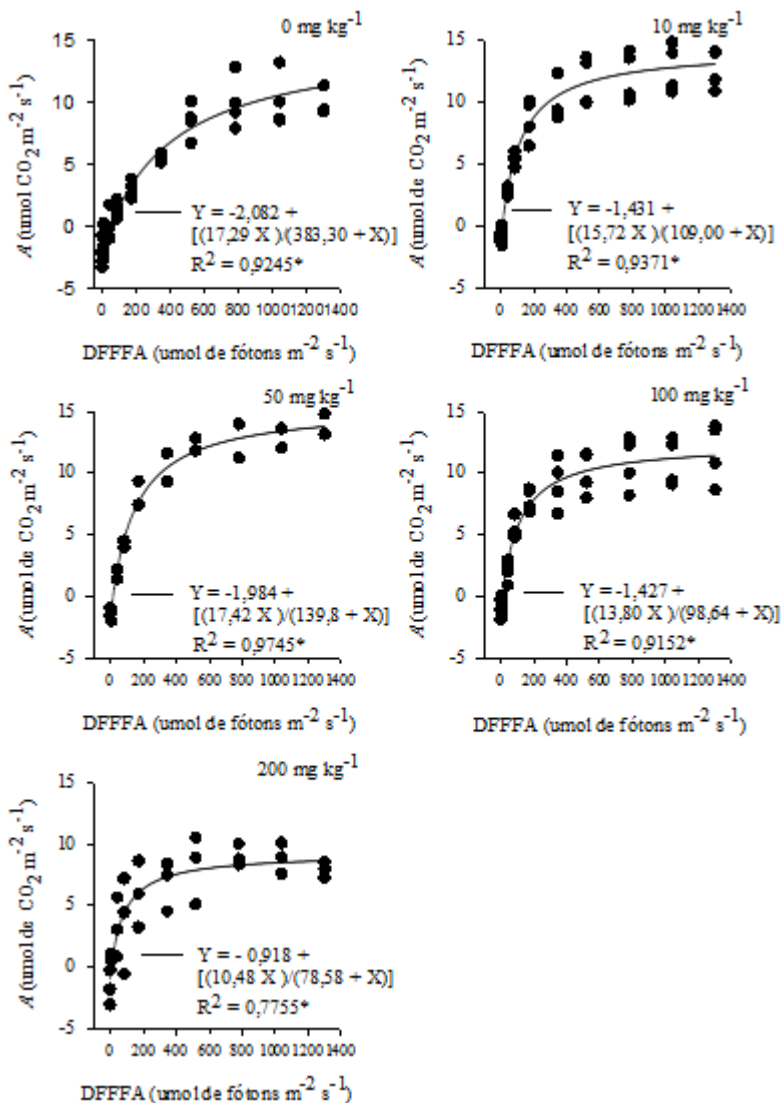
mg kg⁻¹. Isto pode ter ocorrido pela diminuição dos valores de respiração no escuro (Re), ponto de compensação de luz (Γ) e coeficiente b (valor de $DFFFA$ correspondente à metade da A_{max}) das equações hiperbólicas ajustadas (ver Ilustração 6). A partir da dose de 50 mg kg⁻¹, começa a haver redução da Φ , no entanto, as plantas conduzidas na dose de 200 mg kg⁻¹ tiveram valores superiores para esta variável que aquelas conduzidas em meio não contaminado.

A 173 μmol de fóton m⁻² s⁻¹, os valores de fotossíntese líquida (A) das plantas conduzidas em solo contaminado são superiores aos valores daquelas plantas conduzidas em solo não contaminado, à exceção da dose de 200 mg kg⁻¹, a 5% de significância, pelo teste de Tukey (ver Ilustração 6). Essa diferença atinge o seu máximo a aproximadamente 196 μmol de fóton m⁻² s⁻¹ quando as estimativas dadas pelas curvas ajustadas indicam, para a dose de 50 mg kg⁻¹, uma taxa fotossintética 116% maior que nas plantas cultivadas em solo não contaminado.

A medida em que a intensidade luminosa é elevada, a Φ se reduz para todos os tratamentos, porém, de maneira menos acentuada para as plantas não contaminadas, e a diferença de A entre plantas contaminadas e não contaminadas torna-se cada vez menor (ver Ilustração 6).

Para o valor máximo de $DFFFA$ considerado (1304 μmol de fóton m⁻² s⁻¹), e na dose de 50 mg kg⁻¹, na qual se obteve a maior A_{max} do experimento, a A_{max} ultrapassou em 21% a A_{max} das plantas não contaminadas, e em 60% a daquelas contaminadas com 200 mg kg⁻¹. No entanto, nesse valor de intensidade luminosa, não houve diferença da A_{max} das plantas cultivadas com diferentes contaminações de Cd no solo, quando testadas estatisticamente pelo teste F, a 5% de significância, revelando que sob altas intensidades luminosas, plantas de vime que foram conduzidas em solo contaminado com Cd até concentrações de 200 mg kg⁻¹, mesmo com menor teor de clorofila em suas folhas, não apresentaram diferença quanto a taxa máxima fotossintética em relação àquelas plantas que se desenvolveram em solo não contaminado. Nessas plantas, a menor concentração de clorofila é compensada pela diminuição de Re e consequentemente de Γ , aumentando assim a eficiência na captação da luz, configurando-se a influência de um mecanismo de defesa das plantas ao estresse causado pelo Cd.

Ilustração 6 -Taxa fotossintética (A) de plantas de *Salix viminalis* em solo contaminado por Cd com 0, 10, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹ em função da densidade do feixe do fluxo de fótons (DFFFA).



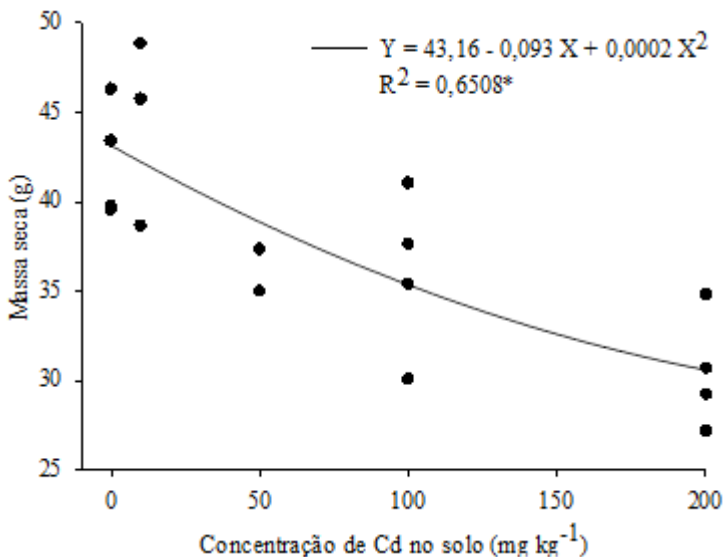
*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.
Fonte: produção do próprio autor.

Nikolic et al. (2008) encontrou valores de taxa fotossintética mais elevados para a dose zero do que naquelas conduzidas em solução contaminada com o metal. No entanto, obteve maiores valores de taxa fotossintéticas em concentrações mais altas (10^{-4} M) que nas mais baixas (10^{-5} M). Os dados obtidos são divergentes daqueles observados por Vassilev et al. (2002), para plantas de *Salix alba* e *Salix viminalis* conduzidas em solução nutritiva contaminada com Cd até 15 μ M, que obteve redução nos valores de taxa fotossintética nas primeiras doses aplicadas. Essas diferenças podem ser devidas aos meios utilizados para a condução das plantas, que nos dois casos, disponibilizam o Cd para as mesmas em taxa maiores que quando conduzidas em solo.

3.5.3 Produção de massa seca

A tendência da estimativa da produção de massa seca das plantas de vime que melhor se ajustou aos dados obtidos foi a polinomial quadrática (ver Ilustração 7).

Ilustração 7 - Produção de massa seca total em plantas de *Salix viminalis* em função da concentração de Cd no solo.



*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F. Fonte: produção do próprio autor.

Apesar de haver queda dessa produção da menor até a maior dose de Cd no solo, de 42,26 a 30,51 g, apenas se observa diferença significativa entre a dose de 200 mg kg⁻¹ e as doses 0 e 10 mg kg⁻¹, a 5%, pelo teste de Tukey (ver Tabela 5).

Tabela 5 - Produção de Massa Seca (MS) Total e nas diferentes estruturas de plantas de *Salix viminalis* desenvolvidas em solo com doses crescentes de Cd.

Dose de Cd (mg kg ⁻¹)	MS Total	Raízes	Caules	Ramos	Folhas
0	42,26 a	13,64 a	17,10 a	5,37 a	6,15 ab
10	44,43 a	14,31 a	18,77 a	5,40 a	5,94 ab
50	36,19 ab	7,29 a	16,72 a	6,10 a	6,08 ab
100	36,06 ab	8,14 a	15,86 a	5,53 a	6,53 a
200	30,51 b	7,96 a	15,14 a	3,34 a	4,07 b

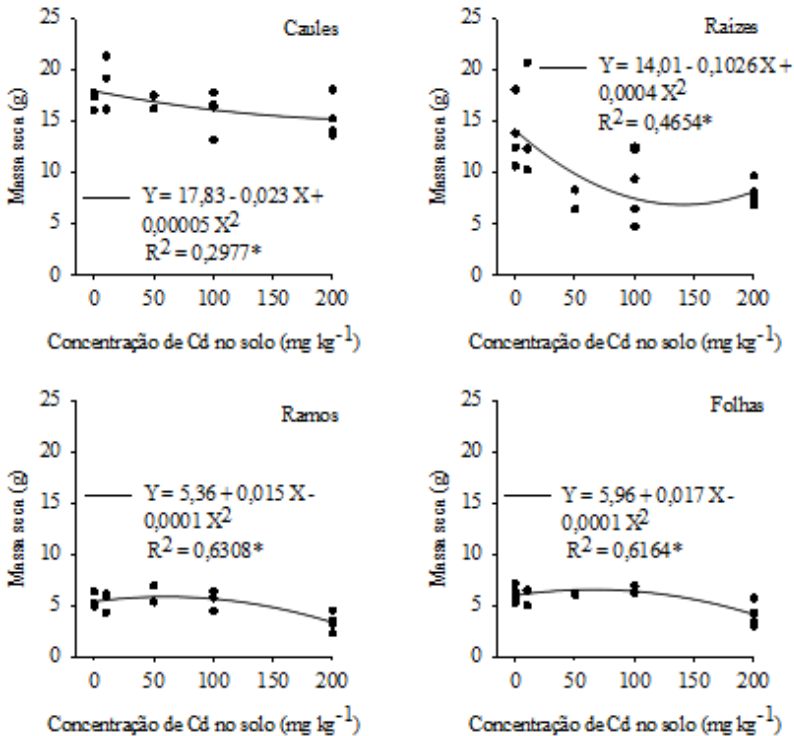
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Fonte: produção do próprio autor.

O comportamento de queda de produção foi observado também para as raízes, caules, ramos e folhas (ver Ilustração 8). No entanto, para as três primeiras estruturas, não houve diferença pelo teste F, a 5% de significância, entre os tratamentos (ver Tabela 5). A única diferença apontada por este teste foi entre as doses de 100 e 200 mg kg⁻¹ para a produção de massa seca nas folhas, em que a primeira se mostrou superior (6,53 g) à segunda (4,07 g). Entre as plantas contaminadas e não contaminadas não houve diferença significativa para esta estrutura (ver Tabela 5).

Em híbridos de álamo conduzidos em solo contaminado por Cd, Wu et al. (2009) encontraram um acréscimo de massa seca total entre as primeiras doses, ocorrendo o contrário nas maiores concentrações do metal. O decréscimo de massa seca também foi observado no trabalho de Vassilev, Vangronsveld e Yordanov (2002), para dois genótipos de *Salix viminalis* distintos, conduzidos em solução hidropônica.

Ilustração 8 - Produção de massa seca dos caules, raízes, ramos e folhas em plantas de *Salix viminalis* em função da concentração de Cd no solo.



*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

Fonte: produção do próprio autor.

Considerando apenas as novas estruturas emitidas, as raízes foram as que mais contribuíram para a produção de massa seca pelas plantas de vime, seguidas das folhas e ramos. Os caules apresentaram a maior contribuição em termos de massa seca, porém, eram compostos em grande parte pelas estacas plantadas no início do estudo, havendo pouca alteração nestas estruturas com o desenvolvimento das plantas. Devido ao limitado período de condução, não houve um maior desenvolvimento das outras partes das plantas. Schmitt (2010), trabalhando com *Salix x rubens* sob condições muito semelhantes,

verificou uma produção de massa seca de raízes superior à produção de ramos, e a de ramos inferior à de folhas. No entanto, a autora obteve produção de massa seca de raízes superior a de folhas somente a partir de 50 mg kg⁻¹ do metal no solo.

Apesar da estimativa de produção de massa seca total indicar queda de acordo com o aumento concentrações de Cd no solo, os efeitos do metal nas diferentes estruturas do Cd, principalmente para raiz, ramos e folhas influenciaram essa variável de maneira que o aumento de massa seca para ramos e folhas nas doses iniciais compensou, em partes, a perda de massa das raízes nesse intervalo. Entre a concentração de 100 e 200 mg kg⁻¹, a estimativa de produção de massa seca decaiu em todas as estruturas, resultando na menor produção de massa seca total das plantas para a última dose, em relação às menores doses.

3.5.4 Índice de Tolerância

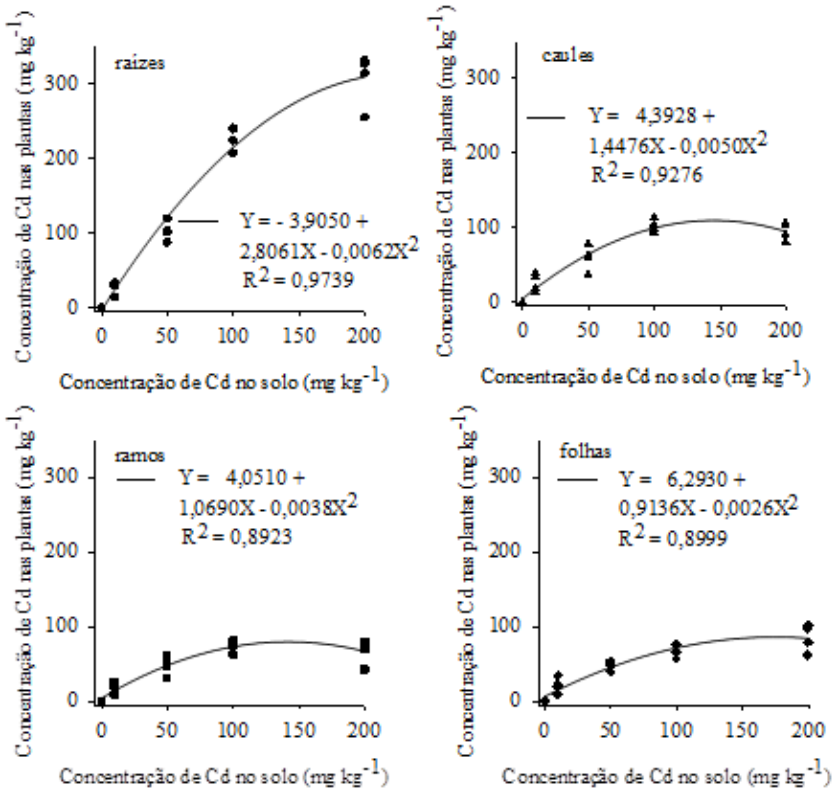
A redução da produção de massa seca nas plantas contaminadas foi inferior a 28%, em relação à produção daquelas não contaminadas. Dessa maneira, o Índice de Tolerância (*IT*) da espécie nas condições estudadas foi superior a 60% em todo o intervalo de contaminação considerado, e de acordo com o esquema proposto por Lux et al. (2004), se classifica como altamente tolerante ao Cd. Comparativamente, Zacchini et al. (2009) obteve resultados muitos semelhantes em estudo de plantas do mesmo gênero (*Salix alba* L. e *Salix sp.*) conduzidas em solução hidropônica contaminada, comprovando a alta tolerância do vime em meios sob demasiada concentração de Cd.

3.5.5 Concentração de Cd nos diferentes tecidos das plantas

A variação da concentração de Cd no solo alterou as concentrações do metal nos diferentes tecidos das plantas (ver Ilustração 9). Tanto o comportamento quanto a magnitude do efeito observado ocorreram de maneira semelhante para caule, ramos e folhas. Entre esses três tecidos da parte aérea das plantas, as maiores acumulações foram verificadas nos caules, seguidos dos ramos e folhas. Para caules e ramos, nota-se que a concentração do elemento atinge o ápice, 110 mg kg⁻¹ e 85 mg kg⁻¹ no tecido, respectivamente, a 145 mg kg⁻¹ de Cd no solo; nas folhas, o máximo valor de concentração do metal, 80 mg kg⁻¹, foi obtido próximo de 200 mg kg⁻¹ de Cd no solo. Nas raízes, a determinação do ápice da acumulação do metal extrapola o intervalo de

concentração considerado no solo em estudo, já que a tendência de aumento da concentração do elemento ainda é observada na maior dose.

Ilustração 9 - Acumulação de Cd nas raízes, caules, ramos e folhas de plantas de vime (*Salix viminalis*) em função da concentração de Cd no solo.



*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

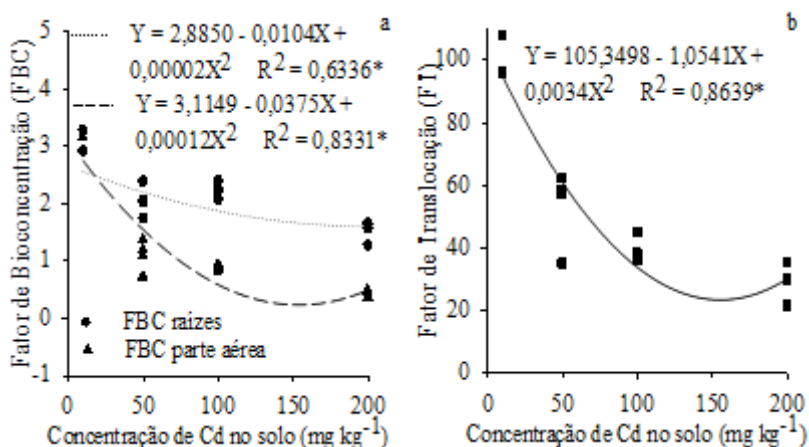
Fonte: produção do próprio autor.

3.5.6 Fator de Translocação

A variação desse fator revela tendência polinomial quadrática, com o aumento da concentração do metal no solo (ver Ilustração 10-b). O valor máximo foi obtido em 10 mg kg⁻¹: 102,04%. Entre as

contaminações de 10 a 150 mg kg⁻¹ há uma intensa diminuição da translocação do metal para a parte aérea, em que o *FT* (Fator de Translocação) chegou ao mínimo de 23,65%. Após esse intervalo há uma ligeira elevação, até 200 mg kg⁻¹. Os resultados apresentaram valores superiores aos obtidos por Zacchini et al. (2009) em contaminações de baixas a intermediárias, o que pode ser explicado pelas diferenças entre as matrizes de condução das plantas e espécies estudadas. Para maiores concentrações, os valores observados são coerentes com os atingidos pelo autor, o qual obteve *FT* entre 19 a 26%, para genótipos de *Salix alba* L. e *Salix sp.*

Ilustração 10 - Fator de Bioconcentração (a) e Fator de Translocação (b) para o Cd em plantas de *Salix viminalis* cultivadas em solo contaminado.



*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F.

Fonte: produção do próprio autor.

3.5.7 Fator de Bioconcentração

O aumento da concentração de Cd no solo provocou a queda do Fator de Bioconcentração (*FBC*) nas raízes e parte aérea da espécie, cujas equações de regressão descrevem funções polinomiais quadráticas (ver Ilustração 10-a). O *FBC* parte de 2,78 quando a concentração de Cd no solo equivale a 10 mg kg⁻¹ diminuindo até 1,55 quando essa concentração fica próxima de 200 mg kg⁻¹, para a qual a queda do fator

praticamente cessa, nas raízes dessas plantas. Na parte aérea, o fator, de 2,75 na concentração de 10 mg kg⁻¹ diminui até 0,23 quando a concentração no solo é de 150 mg kg⁻¹, onde passa a ter um leve aumento até a concentração de 200 mg kg⁻¹. Tais resultados demonstram taxas inferiores àquelas obtidas por Zacchini et al. (2009), o qual obteve valores em torno de 80 para o *FBC* das raízes, e de 10 a 15 para o *FBC* das partes aéreas de clones de vime, em experimento cujas plantas foram conduzidas em solução de hidroponia. No entanto, diferenças quanto ao substrato e à concentração do metal usado podem prejudicar as comparações entre resultados de estudos que avaliam o *FBC* de plantas acumuladoras de metais. Em condução sob hidroponia, a quantidade de Cd total está totalmente disponível para as plantas. Sob a mesma matriz, contaminada com Cd, e espécie do mesmo gênero (*Salix x rubens*), Schmitt (2010) encontrou valores de *FBC* semelhantes aos obtidos no presente estudo, tanto para as raízes quanto para a parte aérea das plantas, constatando-se que o meio de condução acaba influenciando em muito esse fator de avaliação.

O *FBC* das raízes é dependente da concentração e capacidade das mesmas em absorver o Cd do solo, e o *FBC* da parte aérea é influenciado pelo *FBC* das raízes e do *FT*. Quando a concentração de Cd no solo foi elevada, o *FBC* das raízes reduziu, em menor intensidade que a diminuição do *FBC* das partes aéreas, restringindo mais intensamente a concentração do metal na parte aérea, revelando que nas plantas conduzidas sob altas doses do metal no solo a translocação não aconteceu de maneira tão eficiente quanto nas plantas contaminadas com baixas concentrações do metal. O *FBC* da parte aérea foi reduzido a valores inferiores a 1, em concentrações pouco maiores que 75 mg kg⁻¹ de Cd no solo e, nesse ponto, equivaleu a aproximadamente metade do *FBC* das raízes, chegando a representar um valor oito vezes menor que este índice, quando a concentração no solo correspondeu a 150 mg kg⁻¹.

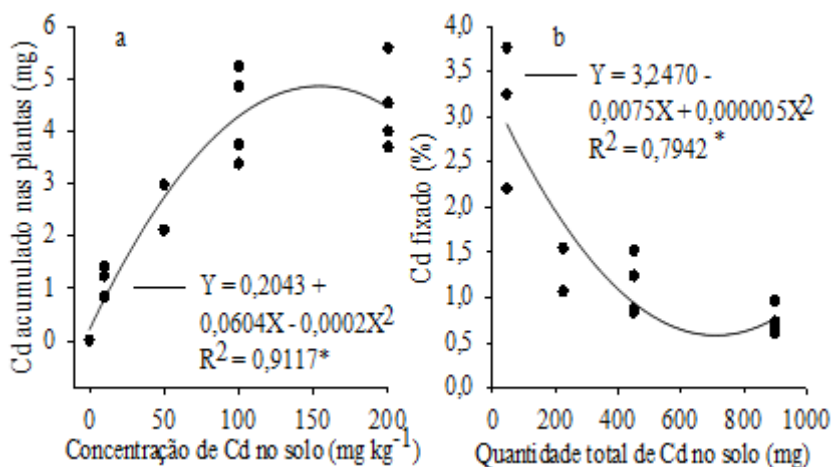
O principal local de acumulação do Cd nas plantas foram as raízes. O armazenamento nessa estrutura é favorecido pela associação das fitoquelatinas (COBETT; GOLDSBROUGH, 2002), e metalotioninas (MA et al., 2005) com o metal, formando complexos que são enviados para dentro dos vacúolos, e pela adsorção do Cd nos sítios de ligação presentes na parede celular dessa estrutura (MILNER; KOCHIAN, 2008) aliado ao processo de lignificação dessas paredes (FINGER-TEIXEIRA et al., 2010) que impede passagem do metal para o meio intracelular e para os vasos de condução, permanecendo aderido ao meio extracelular das células das raízes. Tal restrição do fluxo do

metal para o caule, ramos e folhas, pode ser visto como um mecanismo de proteção dessas estruturas a concentrações tóxicas que podem inibir processos fisiológicos nas mesmas, tais como a atividade enzimática, síntese de clorofilas e taxa fotossintética, absorção, transporte e uso de macroelementos e água.

3.5.8 Potencial de utilização do *Salix viminalis* na Fitorremediação

Apesar do aumento da quantidade de Cd fixada nas plantas com a elevação dos níveis do metal no solo (ver Ilustração 11-a), as taxas de fixação diminuíram, caindo de 2,92%, em 10 mg kg^{-1} para 0,58%, a $152,50 \text{ mg kg}^{-1}$ (ver Ilustração 11-b). Estes valores, principalmente para os níveis mais baixos de Cd no solo, são superiores aos encontrados por Schmitt (2010), diferença que pode ser explicada pela distinção de genótipos e do tempo de condução dos experimentos.

Ilustração 11 - Quantidade acumulada (a) e taxa de fixação (b) de Cd nas plantas de *Salix viminalis* cultivadas em solo contaminado em período de três meses.



*Significativo ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste F. Fonte: produção do próprio autor.

Considerando-se os Valores de Investigação (VI) definidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) na Resolução nº 420 de 2009, que define a concentração de Cd no solo acima da qual existem riscos potenciais, diretos ou indiretos, à saúde humana, e o potencial de fitorremediação de Cd no solo pelas plantas de *Salix viminalis*, a descontaminação irá ocorrer em intervalo de tempo que será dependente da concentração do metal no solo e do objetivo de uso futuro da área contaminada. Quando o propósito da descontaminação for a utilização do solo para o desenvolvimento de culturas agrícolas, contaminações de 10, 50, 100 e 200 mg kg⁻¹ podem ser revertidas a valores abaixo do VI para o Cd (3 mg kg⁻¹) em aproximadamente 6, 13, 26,6 e 32 anos, respectivamente. Quando o objetivo for o uso residencial (VI de 8 mg kg⁻¹), para as mesmas concentrações seriam necessários 1,71, 11,47, 24,47 e 31,17 anos, respectivamente. Para o uso industrial (VI de 20 mg kg⁻¹), concentrações de 50, 100 e 200 mg kg⁻¹ do metal levariam cerca de 8,20, 21,28 e 29,22 anos, respectivamente, para serem revertidas. Essas estimativas foram calculadas considerando-se que o corte e a remoção progressiva do material, bem como o aumento da produção, não afetam os potenciais de fitoestabilização e fitoextração do metal para a espécie.

Dado à alta tolerância das plantas de *Salix viminalis* ao Cd no solo e considerando a acumulação e distribuição do metal na planta, podem ser utilizadas para diferentes fins na fitorremediação. Quando para a fitoextração, a utilização deve ser feita em locais que apresentam baixas concentrações do metal no solo, já que a espécie é potencialmente promissora na translocação e acumulação em tecidos da parte aérea nessas condições. A translocação do metal para caules, ramos e folhas é um processo bioquímico fundamental em uma utilização eficaz de plantas para remediar locais poluídos. De fato, uma mobilização eficiente dos metais da raiz para a parte aérea pode reduzir os efeitos prejudiciais exercidos por este poluente na fisiologia e bioquímica dessa estrutura. Isso auxilia na eficácia da captação do metal pela planta, permitindo a sua remoção do substrato contaminado ao longo do tempo. A espécie também apresenta expressiva acumulação e imobilização do metal nas raízes das plantas, e conseqüentemente, alta capacidade de fitoestabilização, podendo ser utilizada para este fim em locais que apresentam até 200 mg kg⁻¹ de Cd no solo.

3.6 CONCLUSÕES

Plantas de *Salix viminalis*, cultivadas em solo contaminado por Cd, sofrem variação da quantidade de clorofila total das folhas, com uma tendência de diminuição da concentração desse pigmento à medida que as concentrações do metal se elevam no solo.

Plantas de vime que se desenvolvem em solo contaminado com Cd, com concentrações de 10 a 100 mg kg⁻¹, tem maiores eficiências fotossintéticas que aquelas conduzidas em meio não contaminado, sob baixos valores de luminosidade. À medida que a luminosidade aumenta, essa eficiência diminui, de tal maneira que não há diferença significativa entre plantas conduzidas em solo não contaminado e contaminado, até a dose de 200 mg kg⁻¹, para a fotossíntese líquida.

Ao se desenvolverem em solos com concentração de Cd equivalente a 200 mg kg⁻¹, as plantas de *Salix viminalis* obtêm menor produção de massa seca em relação àquelas produzidas em solos com baixas concentrações de Cd no solo. No entanto, ainda mantêm índices dentro da faixa de alta tolerância ao metal.

Considerando a acumulação e a distribuição do metal na planta, ela pode ser utilizada na fitorremediação para dois propósitos distintos: fitoextração, em locais que apresentam baixas contaminações, e fitoestabilização, em solos altamente contaminados pelo metal.

Plantas de *Salix viminalis* utilizadas com o propósito da fitorremediação de solos contaminados pelo Cd tem uma redução da taxa de fixação do metal em seus tecidos à medida que a contaminação no solo aumenta, recuperando locais poluídos com baixas concentrações do metal mais rapidamente que naqueles altamente contaminados.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação Química e Biorremediação do Solo. In: **Tópicos em Ciência do Solo**. v. 1. 1.ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 299-352.

AGENCE DE L'ENVIRONNEMENT ET DE LA MAÎTRISE DE L'ÉNERGIE - ADEME. Dérogations relatives à la réglementation sur l'épandage des boues de stations d'épuration. Comment formuler une demande pour les sols à teneurs naturelles élevées en éléments traces métalliques? Paris, 2005. 142 p. Disponível em: <<http://www.compensation-co2.fr/servlet/getBin?name=8954EE2974CE419520408D162DAFE3A51275308522733.pdf>> Acesso em: 13 de julho de 2012.

ALLEONI, L. R. F. et al. Atributos do solo relacionados à adsorção de cádmio e cobre em solos tropicais. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 27, p. 729-737, 2005.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. 2.ed. London: Blackie Academic & Professional, 1995. 368 p.

AMARANTE, C. V. T.; STEFFENS, C. A.; MOTA, C. S. Radiação, fotossíntese, rendimento e qualidade de frutos em macieiras 'Royal Gala' cobertas com telas antigranizo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 42, n. 7, p. 925-931, 2007.

ANDRADE, J. C. M.; TAVARES, S. R. L.; MAHLER, C. F. **Fitorremediação: o uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo: Oficina de textos, 2007. 176 p.

ANDRADE, M. G. et al. Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo. I – Fitoextração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1879-1888, 2009.

ANDRESEN, E.; KÜPPER, H. Cadmium toxicity in plants. In: SIGEL, A.; SIGEL, H. SIGEL, R. K. O. **Cadmium: From Toxicology to Essentiality. Metal Ions in Life Sciences**. Chichester: Springer, p. 395–413, 2013.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Maryland, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

BALESTRASSE, K. B. et al. Response of antioxidant defense system in soybean nodules and root subjected to cadmium stress. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 28, p. 497-504, 2001.

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

BARYLA, A. et al. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. **Planta**, Berlin, v. 212, p. 696–709, 2001.

BENJAMIN, M. M.; LECKIE, J. O. Multiple-site adsorption of Cd, Cu, Zn, and Pb on amorphous iron oxyhydroxide. **Journal of Colloid and interface Science**, London, v. 79, n. 1, p. 209-221, 1981.

BOON, D. Y.; SOLTANPOUR, P. N. Lead, cadmium, and zinc contamination of aspen garden soils and vegetation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 21, p. 82-86, 1992.

BRITT, C. et al. **Bioenergy Crops and Bioremediation – a review**. London: Department for Food, Environment and Rural Affairs, 2002. 120 p.

CHANEY, R.L. et al. Progress in risk assessment for soil metals, and in-situ remediation and phytoextraction of metals from hazardous contaminated soils. In: US-EPA's Conference: Phytoremediation: state of science conference, 2000, Boston. **Anais...** Boston: USEPA, 2000. p. 1-33.

CHO, U. H.; SEO, N. H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, Beijing, v. 168, p. 113–120, 2004.

CHRISTENSEN, T. H. Cadmium soil sorption at low concentrations. **Water, Air & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 44, p. 71-82, 1989.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Reviews Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 159-82, 2002.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo: CETESB, 2005. 4 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução N° 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**. n. 249. Brasília, 2009. p. 81-84.

COSTA, C. N. et al. Fracionamento sequencial de cádmio e chumbo em solos. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1323-1328, 2007.

DAI, H. et al. Influence of photosynthesis and chlorophyll synthesis on Cd accumulation in *Populus x canescens*. **Journal of Food Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 10, p. 1020-1023, 2012.

DANIEL, E. S. et al. Determinação não destrutiva de clorofilas em folhas de vimeiro através do índice SPAD. **Revista Ciência Florestal**, Santa Maria, no prelo.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental pollution**, Barking, v. 98, p. 29-36, 1997.

DAVIDSON, C. M. et al. A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially-contaminated land. **Analytica Chimica Acta**, London, v. 363, p. 45-55, 1998.

DE FILIPPIS L. F.; ZIEGLER, H. Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction

cycle of *Euglena*. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 142, p. 167-172, 1993.

FAROOQI, Z.R. et al. Toxic effects of lead and cadmium on germination and seedling growth of *Albizia lebbek* (L.) benth. **Pakistan Journal of Botany**, v. 41, n. 1, p. 27-33, 2009.

FINGER-TEIXEIRA, A. et al. Cadmium-induced lignification restricts soybean root growth. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1959-64, 2010.

FODOR, A.; SZABÓ-NAGY, A.; ERDEI, L. The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 14, p. 787-792, 1995.

FORNAZIER, R. F. et al. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 45, p. 91-97, 2002.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Beijing, v. 121, p. 151-159, 1996.

GARBISU, C. et al. Phytoremediation: A technology using green plants to remove contaminants from polluted areas. **Review in Environmental Health**, Berlin, v. 17, p. 75-90, 2002.

GICHNER, T. et al. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 65, p. 420–426, 2006.

GOMES, P.C. et al. Extração fracionada de metais pesados em latossolo vermelho-amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 543-551, 1997.

GÖTHBERG, A. et al. Influence of Nutrient Levels on Uptake and Effects of Mercury, Cadmium, and Lead in Water Spinach. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, n. 4, p. 1247-1255, 2004.

GREGER, M.; LANDBERG, T. Use of willow in phytoextraction. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 1, p. 115–123, 1999.

HAKMAOUI, A. et al. Copper and Cadmium Tolerance, Uptake and Effect on Chloroplast Ultrastructure. Studies on *Salix purpurea* and *Phragmites australis*. **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**, v. 62, p. 417-26, 2007.

HERNÁNDEZ, L. E.; CÁRPENA-RUIZ, R.; GARATE, A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 19, p. 1581–1598, 1996.

HORVATH, G. et al. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium poisoned barley leaves. **Planta**, Berlin, v. 199, p. 238–243, 1996.

JESUS, S. V.; MARENCO, R. A. O SPAD-502 como alternativa para a determinação dos teores de clorofila em espécies frutíferas. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 4, p. 815-818, 2008.

JIANG, R. F. et al. Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). **New Phytologist**, London, v. 167, p. 805-814, 2005.

KABATA-PENDIAS, A. Soil-plant transfer of trace elements – an environmental issue. **Geoderma**. London, v. 122, p 143-149, 2004.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC Press, 2010. 548 p.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A.B. **Trace elements from soil to human**. Berlin: Springer-Verlag, 2007. 550 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC Press. 1992. 365 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3.ed. London: CRC Press, 2000. p. 123–167.

KÄMPF, N.; SCHWERTMANN, U. The 5M-NaOH concentration treatment for iron oxides in soil. **Clays and Clay Minerals**, Lawrence, v. 30, n. 6, p. 401-408, 1982.

KELLER, C.; VÉDY, J. C. Distribution of copper and cadmium fractions in two forest soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 23, n. 5, p. 987-999, 1994.

KHAN, A. G. et al. Role plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, Oxford, v. 41, p. 197-207, 2000.

KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. In situ detection of heavy metals substituted chlorophylls in water plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 58, p. 123–133, 1998.

KÜPPER, H. et al. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, London, v. 175, p. 655–674, 2007.

KURDZIEL, B. M.; PRASAD, M. N. V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V. **Heavy metal stress in plants: From biomolecules to ecosystems**. 2.ed. New Delhi: Springer, p. 146-181, 2004.

LAGERWEFF, J. V. Lead, mercury, and cadmium as environmental contaminants. In: MORVEDT, J. J.; GIORDANO, P. M.; LINDSAY, W. L. (Eds.). **Micronutrients in agriculture**. Madison: Society of America, 1972. p. 593-636.

LANDBERG, T.; M. GREGER, M. Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 159, n. 1, p. 69–75, 2002.

LANGENBACH, T.; SERPA, M. Teor de cádmio nos fertilizantes fosfatados brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 9, p. 179-181, 1985.

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

LEE, D. W. Simulating forest shade to study the development ecology of tropical plants: Juvenile growth in three vines in India. **Journal of Tropical Ecology**, Cambridge, v. 4, n. 3, p. 281-292, 1988.

LEVINE, M. B. et al. Heavy metal concentrations during ten years of sludge treatment to an old-field community. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 18, n. 4, p. 411-418, 1989.

LING, T.; JUN, R.; FANGKE, Y. Effect of cadmium supply levels to cadmium accumulation by *Salix*. **International Journal of Environmental Science and Technology**, Tehran, v. 8, p. 493-500, 2011.

LINHARES, L. A. et al. Adsorção de cádmio e chumbo em solos tropicais altamente intemperizados. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, 2009.

LOGAN, T. J.; CHANEY, R. L. Metals. In: Workshop on Utilization of Municipal Wastewater and Sludge on Land, 1983, Riverside. **Anais...** Riverside: University of California, 1983, p. 235-323.

LOMBI, E. et al. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. **New Phytologist**, London, v. 149, p. 53-60, 2001.

LUNACKOVA, L. et al. Comparison of cadmium effect on willow and poplar in response to different cultivation conditions. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 47, n. 3, p. 403-411, 2003.

LUX, A. et al. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 120, p. 537-545, 2000.

MA, J. F. et al. Subcellular localization of Cd and Zn in the leaves of a cadmium-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. **Planta**, Springer-Verlag, v. 220, p. 731-736, 2005.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 2006. 638 p.

MANN, S. S.; RITCHIE, G. S. P. The influence of pH on the forms of cadmium in four west Australian soils. **Australian Journal of Soil Research**, Melbourne, v. 31, p. 255-270, 1993.

MARKWELL, J.; OSTERMAN, J. C.; MITCHELL, J. L. Calibration of the Minolta SPAD-502 leaf chlorophyll meter. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 467-472, 1995.

MARQUES, T. C. L. L. S. M. M. et al. Respostas fisiológicas e anatômicas de plantas jovens de eucalipto expostas ao cádmio. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 35, n. 5, p. 997-1006, 2011.

McBRIDE, M. B. Cadmium concentration limits in agricultural soil: weakness in USEPA's risk assessment and the 503 rule. **Human and Ecological Risk Assessment**, Philadelphia, v. 9, p. 661-674, 2003.

McGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current Opinion of Biotechnology**, London, v. 14, n. 13, p. 277-282, 2003.

McLAREN, R. G.; CRAWFORD, D. V. Studies on soil copper. I. The fractionation of copper in soils. **Journal of Soil Science**, New York, v. 24, n. 2, p. 172-181, 1973.

McLAUGHLIN, M. J. et al. Uptake of metals from soil into vegetables. In: SWARTJES, F. A. (Ed). **Dealing with contaminated sites: from theory towards practical application**. New York: Springer, p. 325-367, 2011.

MENDES, B.; OLIVEIRA, J. F. **Qualidade da água para consumo humano**. Lousã: Lidel, 2004. 640 p.

MILNER, M. J.; KOCHIAN, L. V. Investigating Heavy-metal Hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a Model System. **Annals of Botany**, Oxford, v. 102, p. 3-13, 2008.

MONTEIRO, C. C. Análise bioquímica do mutante hormonal *Never Ripe* (Nr) submetido aos estresses por cádmio e salinidade. 2010.

Dissertação (Mestrado em Ciências). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2010. 119 p.

MUTHUCHELIAN, K.; BERTAMINI, M.; NEDUNCHEZHIAN, N. Triaccontanol can protect *Erythrina variegata* from cadmium toxicity. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 158, p. 1487–1490, 2001.

MULLA, D. J.; PAGE, A. L.; GANJE, J. J. Cadmium accumulations and bioavailability in soils from long-term phosphorus fertilization. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 9, p. 408-412, 1980.

NAIDU, R. et al. Ionic-strength and pH effects on the sorption of cadmium and the surface charge of soils. **European Journal of Soil Science**, Oxford, v. 45, p. 419-429, 1994.

NEDELKOSKA, T. V.; DORAN, P. M. Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. **Minerals Engineering**, Sidney, v. 13, n. 5, p. 549-561, 2000.

NIKOLIC, N. et al. Responses of hybrid poplar to cadmium stress: Photosynthetic characteristics, cadmium and proline accumulation, and antioxidant enzyme activity. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, Cracóvia, v. 50, n. 2, p. 95-103, 2008.

OLSEN, S. R. Micronutrients interaction. In: MORTVEDT, J. J.; GIORDANO, P. M.; LINDSAY, W. L. (Eds). **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America, 1972. p. 243-264.

PERFUS-BARBEOCH, L. et al. Heavy Metal Toxicity: Cadmium Permeates through Calcium Channels and Disturbs the Plant Water Status. **Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 539-548, 2002.

PIETRINI, F. et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 133, p. 829-837, 2003.

POMBO, L. C. A. Sorção de cádmio em solos do estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 19, p. 19-24, 1995.

POSTCH, C. **Mineralogia**. Rio de Janeiro: Livraria São José, 1967. 337 p.

RAO, C. R. M.; SAHUQUILLO, A.; SANCHEZ, J. F. L. A review of the different methods applied in environmental geochemistry for single and sequential extraction of trace elements in soils and related materials. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 189, p 291-333, 2008.

RECH, T. D. et al. Recommendation of soil fertility levels for willow in the Southern Highlands of Santa Catarina. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 877-884, 2012.

ROBINSON, B. et al. Phytoextraction: an assessment of biogeochemical and economic viability. **Plant and Soil**, Crawley, v. 249, p. 117-125, 2003.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 2115-2126, 2001.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 105–130, 1999.

SCHMIDT, U. Enhancing phytoextraction: the effect of chemical soil manipulation on mobility, plant accumulation, and leaching of heavy metals. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, p. 1939-1954, 2003.

SCHIMITT, C. Nutrição mineral do vime em ambientes naturais e potencial de fitorremediação em ambiente contaminado com cádmio e chumbo. 2011. Dissertação (Mestrado em Manejo do Solo). Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, 2011. 80 p.

SHAW, B. P. Effect of mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 37, p. 587-596, 1995.

SHUMAN, L. M. Fractionation method for soil microelements. **Soil Science**, Baltimore, v. 140, p. 11-22, 1985.

SILVA, M. L. S.; VITTI, G. C. Fracionamento de metais pesados em solo contaminado antes e após cultivo de arroz. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1385-1391, 2008.

SILVEIRA, M. L. A. Extração sequencial e especiação iônica de zinco, cobre e cádmio em latossolos tratados com biossólido. 2002. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Botucatu, 2002. 165 p.

SMITH, L.A. et al. **Remedial options for metals-contaminated sites**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 240 p.

SOARES, R. M. Coeficientes de distribuição de metais pesados em solos de São Paulo. 2010. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2004. 214 p.

SOMASHEKARAI AH, B. V.; PADMAJA, K.; PRASAD, A. R. K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 85, p. 85–89, 1992.

SPOSITO, G. The chemistry of soils. 2.ed. Oxford: Oxford University Press, 2008. 330 p.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 18, p. 321-336, 1995.

TANDY, S. et al. Extraction of heavy metals from soils using biodegradable chelating agents. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 38, p. 937-944, 2004.

TEDESCO, M. J. et al. Análise de plantas, solos e outros materiais. Boletim Técnico n.5. Ed. rev. aum. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 170 p.

UDDLING, J. et al. Evaluating the relationship between leaf chlorophyll concentration and SPAD-502 chlorophyll meter readings. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 91, n. 1, p. 37-46, 2007.

URE, A. M. Methods of analysis for heavy metals in soils. In: ALLOWAY, B.J. (Ed.) **Heavy metals in soils**. New York: John Wiley, p. 40-80, 1990.

URE, A. M. Single extraction schemes for soil analysis and related applications. **Science of The Total Environment**, London, v. 178, p. 3-10, 1996.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USEPA. Method 3051A – Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Washington, DC, 2007. 30 p. Disponível em: <<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>> Acesso em: 09 de abril de 2013.

VALADARES, J. M. A. S. et al. Some heavy metals in soils treated with sewage sludge, their effects on yield, and their uptake by plants. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 2, p. 49-57, 1983.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant Cell Environment**, Oxford, v. 13, p. 195–206, 1990.

VASSILEV, A. Cadmium Accumulation and Tolerance of Two *Salix* Genotypes Hydroponically Grown in Presence of Cadmium. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 28, p. 1–19, 2005.

VASSILEV, A.; VANGRONSVELD, J; YORDANOV, I. Cadmium phytoextraction: Present state, biological backgrounds and research needs. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 28, p. 68–95, 2002.

WILKINS, D. A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root grown. **The New Phytologist**, London, v. 80, p. 623-633, 1978.

WU, F. et al. Cadmium accumulation and growth responses of a poplar (*Populus deltoids* × *Populus nigra*) in cadmium contaminated purple soil and alluvial soil. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 177, p. 268–273, 2010.

ZACCHINI, M. et al. Metal Tolerance, accumulation and translocation in poplar and willow clones treated with cadmium in hydroponics. **Water, air and soil pollution**, Dordrecht, v. 197, p. 23-34, 2009.

ZACCHINI, M. et al. An example of cadmium accumulation and tolerance abilities involving different metal binding and defence compounds in the *Populus nigra* L. clone Poli and *Salix alba* L. clone SS5. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 55, p. 383-386, 2011.

ZAYED, A.; GOWTHAMAN, S.; TERRY, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetlands plants. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 27, p. 715-721, 1998.