

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**TESE**

**POTENCIAL DE ESPÉCIES VEGETAIS À FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO  
CONTAMINADO COM COBRE**

**FERNANDO KIDELMAR DANTAS DE OLIVEIRA**

**2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



POTENCIAL DE ESPÉCIES VEGETAIS À FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO  
CONTAMINADO COM COBRE

FERNANDO KIDELMAR DANTAS DE OLIVEIRA

*Sob a Orientação do Professor*

**Jacob da Silva Souto**

Tese submetida como requisito para  
obtenção do grau de **Doutor em  
Agronomia**, no Programa de Pós-  
Graduação em Agronomia.

Areia, PB

Agosto de 2018

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catálogo e Classificação**

O48p Oliveira, Fernando Kidelmar Dantas de.

Potencial de espécies vegetais à fitorremediação de solo contaminado com cobre / Fernando Kidelmar Dantas de Oliveira. - Areia, 2018.  
112 f.

Orientação: Jacob Silva Souto.  
Tese (Doutorado) - UFPB/CCA.

1. Agronomia. 2. Fitorremediação. 3. Metal pesado.  
4. Atividade enzimática. 5. Citogenética. I. Souto, Jacob Silva. II. Título.

UFPB/BC

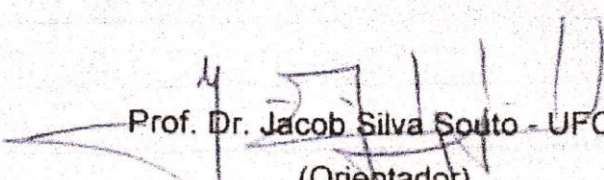
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

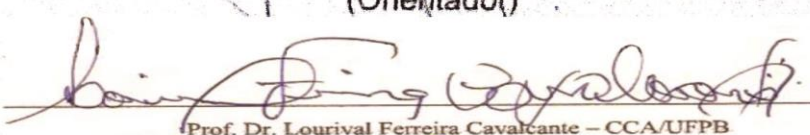
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

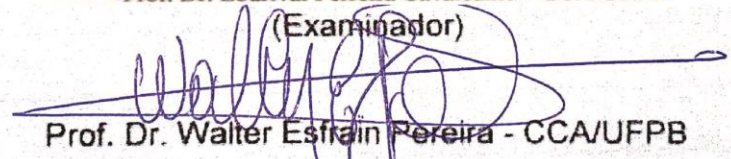
TÍTULO: POTENCIAL DE ESPÉCIES VEGETAIS À FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM COBRE

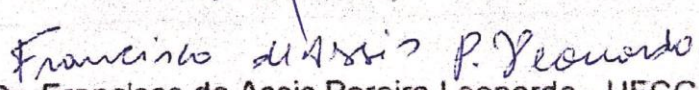
AUTOR: FERNANDO KIDELMAR DANTAS DE OLIVEIRA

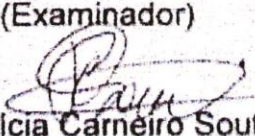
Aprovado como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR em AGRONOMIA (Ecologia e Recursos Naturais) pela comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. Jacob Silva Souto - UFCG  
(Orientador)

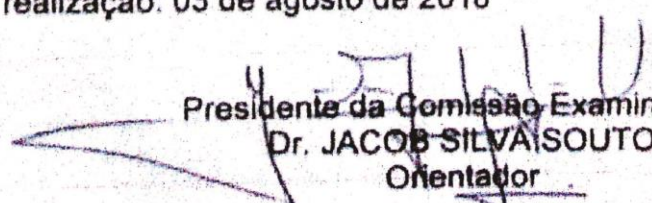
  
Prof. Dr. Lourival Ferreira Cavalcante - CCA/UFPB  
(Examinador)

  
Prof. Dr. Walter Estrelin Pereira - CCA/UFPB  
(Examinador)

  
Prof. Dr. Francisco de Assis Pereira Leonardo - UFCG  
(Examinador)

  
Prof. Dr. Patricia Carneiro Souto - UFCG  
(Examinadora)

Data da realização: 03 de agosto de 2018

  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. JACOB SILVA SOUTO  
Orientador

## DEDICO...

Ao Deus libertário.

Aos meus amados pais, Angelita Dantas de Oliveira e Manoel Batista de Oliveira e Elza Maria Alves.

Aos meus filhos, Kanauã Vieira Dantas, Kainã Vieira Dantas, Emanuel Raony Dantas de Oliveira, netos, Jaime Kideldmar Dantas, Gustavo Dantas e as minhas meninas, Liz, Laura, Mariana e Louise.

Aos irmãos, Kydelmir, Kidelman, Kilma, Kênia e Kidelci Dantas de Oliveira.

A toda a família da minha companheira nas pessoas de Francisca Expedita de Medeiros Costa e Demétrio Antão da Costa.

À minha amada esposa, Eliane Medeiros Costa por todo companheirismo, serenidade, dedicação, atenção, paz, meu oxigênio, enfim, por todo o Amor que nos envolve sempre.

## OFEREÇO...

Ao Luiz Inácio **LULA** da Silva,  
Leonardo Boff e Paulo Freire.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal da Paraíba, por ter proporcionado toda minha vida acadêmica estudantil, da graduação ao doutorado.

À Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará e a Faculdade de Engenharia de Minas e Meio Ambiente, na pessoa do professor Denilson Costa.

Aos professores e/ou pesquisadores Leonardo Félix (UFPB), Sebastião Silva, Simone Simote, Marilene Oliveira, Ulisses Albino, André Branches, Karina Fischer (UNIFESSPA), Thiago Veiga (UNIFESP), Ramiro Camacho, Cinthia Albuquerque, Fábio Oliveira, Diego Souza (UERN), Ronaldo Costa (IFPE), Jailson Alves (IFAL), Jonas Freire (IFRN), Milena Raiman (UEPA), Walmir Vasconcelos (Senai-PB), Marlon Souza, Geovan Oliveira, Lourival Tyski (Vale), Carlos Sales (DNA Idiomas-Marabá) e Nilton Costa (Embrapa-RO).

Aos colegas de fé, irmãos, companheiros, Emanuel Costa, Enoque Medeiros, Eleide Maia, Gilton Dantas, Rodrigo Ferreira, Otávio Oliveira, Joel Cordeiro e demais colegas do PPGA.

A Ramildo Costa, Almira Costa, Luciana Azevedo, Gérson Relva, (cognome filósofo) e aos discentes da UERN, Virton, Fábio, Marcos e Alliny Cavalcante.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, UFPB, Areia, PB, nas pessoas do Prof. Manoel Bandeira e da Prof<sup>a</sup> Luciana Nascimento.

À Empresa Vale S.A., pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

À Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, pela infraestrutura disponibilizada para condução do experimento.

Ao CNPq e a Capes pela concessão da bolsa.

À banca examinadora composta por, Dr<sup>a</sup> Patrícia Carneiro Souto, Dr. Francisco de Assis Pereira Leonardo, Dr. Lourival Ferreira Cavalcante, Dr. Walter Esfrain Pereira e, em especial ao orientador, Dr. Jacob Silva Souto.

Muito obrigado!

OLIVEIRA, F. K. D. **Potencial de espécies vegetais à fitorremediação de solo contaminado com cobre.** Areia, Paraíba, Brasil. 2018. 106 f. Tese (Doutorado em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Brasil.

## RESUMO GERAL

A mineração é uma atividade mundial de grande importância devido à utilização dos metais que são extraídos, a exemplo do cobre, no Brasil, com destaque para o estado do Pará. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o potencial, ou seja, habilidade, capacidade das espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* submetidas à contaminação do solo com rejeito de cobre da mineração, fitorremediar metal pesado. Para alcançar o objetivo foram realizados pesquisa bibliográfica e experimentos, organizados em três capítulos. A primeira parte é uma revisão bibliográfica sobre mineração, rejeito de mineração de cobre, fitorremediação e os vegetais a serem estudados. O primeiro capítulo avalia o potencial das espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*, submetidas ao solo contaminado com rejeito de cobre através da produção de fitomassa seca, teores e distribuição de cobre nos compartimentos radiculares, caulinares e foliares das espécies. As variáveis analisadas foram a morfométrica de crescimento, os índices e fatores de translocação e os coeficientes de extração. Os coeficientes de fitoextração foram superiores nas raízes das espécies estudadas. O segundo capítulo, teve como objetivos o de avaliar os efeitos causados em pigmentos fotossintetizantes e as atividades das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase nas espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*, cultivadas em substrato com concentração de cobre e, avaliar possíveis alterações no teor de clorofilas “a” e “b” e carotenoides. As variáveis analisadas foram atividade das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase, e a determinação dos pigmentos fotossintetizantes. Os teores de clorofila “a”, “b” e carotenoides nos compartimentos apicais, intermediários e senescentes para as três espécies não tiveram diferença entre si, mas na concentração de 400 mg dm<sup>-3</sup>, houve alteração para *A. indica*. O terceiro capítulo, objetivou-se à caracterização cromossômica através de bandas heterocromáticas nas espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* visando caracterizar citogeneticamente, e detectar o surgimento de possíveis alterações cromossômicas provenientes da contaminação pelo cobre no substrato utilizado no cultivo das espécies. Através do material vegetal foram feitas as preparações cromossômicas, coloração com fluorocromos, determinação da fórmula cariotípica e análises dos padrões de bandas heterocromáticas. Para a espécie *Schizolobium amazonicum* o número cromossômico encontrado de  $2n = 26$  surge como nova informação para literatura.

**Palavras-chave:** Fitorremediação, metal pesado, atividade enzimática, citogenética.

OLIVEIRA, F. K. D. **Potential of plant species the phytoremediation of soil contaminated with copper**. Areia, Paraíba, Brazil. 2018. 106 f. (Thesis in Agronomy). Center of Agrarian Sciences of the Universidade Federal da Paraíba, Brazil.

### GENERAL ABSTRACT

Mining is a worldwide activity of great importance due to the use of the metals that are extracted, like copper, in Brazil, with emphasis on the state of Pará. The objective of this research was to evaluate the potential, ie, ability, capacity of the species *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* and *Azadirachta indica* submitted to soil contamination with copper mining tailings, to phytoremediate heavy metal. In order to reach the objective, bibliographical research and experiments were carried out, organized in three chapters. The first part is a literature review on mining, copper mining rejects, phytoremediation and the plants to be studied. The first chapter evaluates the potential of the species *S. amazonicum*, *L. leucocephala* and *A. indica*, submitted to the soil contaminated with copper waste through the production of dry phytomass, contents and distribution of copper in the root, cauline and foliar compartments of the species. The analyzed variables were the growth morphometric, the indices and translocation factors and the extraction coefficients. The phytoextraction coefficients were higher in the roots of the species studied. The second chapter had the objective of evaluating the effects caused by photosynthetic pigments and the activities of the superoxide dismutase and guaiacol peroxidase enzymes in the species *S. amazonicum*, *L. leucocephala* and *A. indica*, cultivated in substrate with copper concentration, and to evaluate possible changes in the chlorophyll content "a" and "b" and carotenoids. The analyzed variables were enzyme activity superoxide dismutase and guaiacol peroxidase, and the determination of photosynthetic pigments. The levels of chlorophyll a, b and carotenoids in the apical, intermediate and senescent compartments for the three species did not differ, but at the concentration of 400 mg dm<sup>-3</sup>, there was a change to *A. indica*. The third chapter was aimed at the chromosomal characterization through heterochromatic bands in the species *S. amazonicum*, *L. leucocephala* and *A. indica*, aiming to characterize cytogenetically, and to detect the appearance of possible chromosomal alterations coming from the contamination by copper in the substrate used in the cultivation of species. Through the plant material were made the chromosomal preparations, staining with fluorochromes, determination of the karyotype formula and analysis of the patterns of heterochromatic bands. For the species *Schizolobium amazonicum* the chromosomal number of  $2n = 26$  appears as new information for literature.

**Keywords:** Phytoremediation, heavy metal, enzymatic activity, cytogenetics.

## LISTA DE TABELAS

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>34</b>
<b>Tabela 1.</b> Valores mensais de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação obtidos no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.....	<b>39</b>
<b>Tabela 2.</b> Atributos químicos e físicos do solo e do rejeito de cobre, usados por ocasião da instalação do experimento.....	<b>40</b>
<b>Tabela 3.</b> Massa do solo, do rejeito de cobre e massa total, usados por ocasião da instalação do experimento.....	<b>41</b>
<b>Tabela 4.</b> Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à altura, diâmetro, número de folhas e área foliar aos 30, 60, 90 e 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies <i>S. amazonicum</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>A. indica</i> .....	<b>45</b>
<b>Tabela 5.</b> Fitomassa seca média radicular, aérea e total (g) aos 120 dias das espécies <i>S. amazonicum</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>A. indica</i> em concentrações de cobre.....	<b>54</b>
<b>Tabela 6.</b> Teores de cobre ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) em folhas apicais (FA), folhas intermediárias (FI), caules (C) e raízes (R) em <i>S. amazonicum</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>A. indica</i> em concentrações de cobre e, respectivos percentuais.....	<b>56</b>
<b>Tabela 7.</b> Índice de translocação (IT) e fator de translocação (FT) em <i>S. amazonicum</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>A. indica</i> em concentrações de cobre.....	<b>57</b>
<b>Tabela 8.</b> Coeficiente de extração (CE) e quantidade extraída de cobre ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) em <i>S. amazonicum</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>A. indica</i> em concentrações de cobre.....	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>68</b>
<b>Tabela 1.</b> Valores mensais de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação obtidos no local do experimento, no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.....	<b>73</b>
<b>Tabela 2.</b> Atributos químicos e físicos do solo e do rejeito de cobre, usados por ocasião da instalação do experimento.....	<b>74</b>
<b>Tabela 3.</b> Massa do solo, do rejeito de cobre e massa total, usados por ocasião da instalação do experimento.....	<b>75</b>
<b>Tabela 4.</b> Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à superóxido dismutase em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies <i>S. amazonicum</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>A. indica</i> .....	<b>80</b>

**Tabela 5.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à guaiacol peroxidase em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.....83

**Tabela 6.** Guaiacol peroxidase na folha apical, intermediária e senescente ( $\mu\text{moles GO min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ) em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.....83

**Tabela 7.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes às clorofila “a” em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.....85

**Tabela 8.** Clorofila “a” ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}$ ) na folha apical em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.....85

**Tabela 9.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes às clorofila “b” em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.....87

**Tabela 10.** Clorofila “b” ( $\mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}$ ) na folha apical em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.....87

**Tabela 11.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à carotenoides em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.....89

### **CAPÍTULO III**.....98

**Tabela 1.** Lista com as espécies arbóreas analisadas, com seus respectivos vouchers, número cromossômico ( $2n$ ), fórmula cariotípica (FC), variação no tamanho cromossômico ( $\mu\text{m}$ ) e bandas heterocromáticas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>.....105

## LISTA DE FIGURAS

<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>34</b>
<b>Figura 1.</b> Termohigrômetro e pluviômetro para aferição de variáveis climatológicas instalados no local do experimento, no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.....	40
<b>Figura 2.</b> Incubação do substrato (A), germinação (B), crescimento (C) e irrigação dos vasos (D).....	42
<b>Figura 3.</b> Altura média de plantas de <i>S. amazonicum</i> (◊), <i>L. leucocephala</i> (◻) e <i>A. indica</i> (Δ) (A) para 30, (B) 60, (C) 90 e (D) 120 dias usando no substrato concentrações de cobre.....	47
<b>Figura 4.</b> Diâmetro médio do caule para (A) 60, (B) 90 e (C) 120 dias de <i>S. amazonicum</i> (◊), <i>L. leucocephala</i> (◻) e <i>A. indica</i> (Δ) em concentrações de cobre.....	50
<b>Figura 5.</b> Número médio de folhas aos 60 (A), 90 dias (B) e 120 dias (C) de <i>S. amazonicum</i> (◊), <i>L. leucocephala</i> (◻) e <i>A. indica</i> (Δ) em concentrações de cobre.....	52
<b>Figura 6.</b> Área foliar média em <i>S. amazonicum</i> (◊), <i>L. leucocephala</i> (◻) e <i>A. indica</i> (Δ) em concentrações de cobre, aos 120 dias .....	53
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 1.</b> Termohigrômetro e pluviômetro para aferição de variáveis climatológicas instalados no local do experimento, no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.....	74
<b>Figura 2.</b> Incubação inicial do substrato (A), germinação (B), crescimento (C) e irrigação (D) nos vasos contendo as mudas de <i>S. amazonicum</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>A. indica</i> .....	76
<b>Figura 3.</b> Superóxido dismutase (UE g <sup>-1</sup> MF) média para (A) folha apical (B) intermediária e (C) senescente em <i>S. amazonicum</i> (◊), <i>L. leucocephala</i> (◻) e <i>A. indica</i> (Δ) em concentrações de cobre, aos 120 dias.....	81
<b>Figura 4.</b> Clorofila “a” (µg g <sup>-1</sup> MF) média em folha intermediária (FI) (A) e folha senescente (FS) (B) em <i>S. amazonicum</i> (◊), <i>L. leucocephala</i> (◻) e <i>A. indica</i> (Δ) em concentrações de cobre, aos 120 dias.....	86
<b>Figura 5.</b> Clorofila “b” (µg g <sup>-1</sup> MF) média em folha intermediária (FI) (A) e senescente (FS) (B) em <i>S. amazonicum</i> (◊), <i>L. leucocephala</i> (◻) e <i>A. indica</i> (Δ) em concentrações de cobre, aos 120 dias.....	88

**Figura 6.** Carotenoides ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF) média em folha apical (FA) (A), intermediária (FI) (B) e senescente (FS) (C) em *S. amazonicum* ( $\diamond$ ), *L. leucocephala* ( $\square$ ) e *A. indica* ( $\triangle$ ) em concentrações de cobre, aos 120 dias.....90

### **CAPÍTULO III.....99**

**Figura 1.** Mina Sossego e barragem de rejeito de cobre, em Canaã dos Carajás, Pará ..... 103

**Figura 2.** Células metafásicas mitóticas mostrando a distribuição de bandas heterocromáticas de *Azadirachta indica* (A-C), *Leucaena leucocephala* (D-F) e *Schizolobium amazonicum* (G-I). Insertos em C, F e I referem-se às bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Setas em F indicando bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> distendidas, em I setas indicando dois pares de cromossomos sem bandas proximais. Barra em I = 10  $\mu\text{m}$  . 107

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 Botânica e Importância das Espécies <i>Schizolobium amazonicum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Azadirachta indica</i> .....	19
2.2 Origem do Cobre .....	20
2.3 Efeitos do Cobre nas Espécies Vegetais .....	21
2.4 Cobre como Contaminante e Seus Efeitos na Morfologia, Bioquímica, Fisiologia e Citogenética nos Vegetais .....	22
2.5 Tolerância das Espécies <i>Schizolobium amazonicum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Azadirachta indica</i> ao Cobre.....	24
2.6 Fitorremediação e Seus Mecanismos .....	25
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO I .....	34
CRESCIMENTO E POTENCIAL FITORREMEIADOR DE <i>Schizolobium amazonicum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Azadirachta indica</i> EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE .....	34
CRESCIMENTO E POTENCIAL FITORREMEIADOR DE <i>Schizolobium amazonicum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Azadirachta indica</i> EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE .....	35
1 INTRODUÇÃO.....	37
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	39
2.1 Localização, Clima e Substrato .....	39
2.2 Delineamento Experimental .....	41
2.3 Material Vegetal e Condições de Cultivo .....	41
2.4 Variáveis Analisadas.....	42
2.4.1 Avaliação Morfométrica de Crescimento .....	42
2.4.2 Índice e Fator de Translocação, Coeficiente de Extração .....	43
2.5 Avaliação Estatística.....	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
3.1 Altura de Plantas, Diâmetro de Caule, Número de Folhas, Área Foliar e Produção de Fitomassa Seca.....	45

3.2 Teores de Cobre nos Compartimentos das Plantas .....	55
3.3 Índice e Fator de Translocação, Coeficiente de Fitoextração .....	57
3 CONCLUSÕES.....	62
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
CAPÍTULO II .....	68
ESTRESSE CAUSADO PELO COBRE NAS ATIVIDADES DE ENZIMAS E PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES EM <i>Schizolobium amazonicum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> E <i>Azadirachta indica</i> .....	68
ESTRESSE CAUSADO PELO COBRE NAS ATIVIDADES DE ENZIMAS E PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES EM <i>Schizolobium amazonicum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> E <i>Azadirachta indica</i> .....	69
RESUMO .....	69
1 INTRODUÇÃO.....	71
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	73
2.1 Localização, Clima e Substrato .....	73
2.2 Delineamento Experimental.....	75
2.3 Material Vegetal e Condições de Cultivo .....	75
2.4 Variáveis Analisadas.....	77
2.4.1 Atividades de Enzimas Antioxidantes.....	77
2.4.2 Atividade da Superóxido Dismutase .....	77
2.4.3 Atividade da Guaiacol Peroxidase .....	78
2.4.4 Determinação dos Pigmentos Fotossintetizantes .....	78
2.5 Avaliação Estatística.....	79
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	80
3.1 Sistema Antioxidante .....	80
3.2 Caracterização de Teores de Clorofilas e Carotenoides .....	84
4 CONCLUSÕES.....	92
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
<b>CAPÍTULO III</b> .....	98
RESUMO .....	99

1 INTRODUÇÃO.....	101
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	103
2.1 Material Vegetal.....	103
2.2 Preparação Cromossômica.....	104
2.3 Coloração com Fluorocromos CMA <sup>+</sup> (Cromomicina A <sub>3</sub> ) e DAPI <sup>+</sup> (4' -6-diamidino-2-fenilindol) .....	104
2.4 Determinação da Fórmula Cariotípica e Análises dos Padrões de Bandas Heterocromáticas.....	104
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
3 CONCLUSÕES.....	108
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O setor mineral brasileiro produziu aproximadamente dois bilhões de toneladas em 2017, correspondente a um faturamento de US\$ 32 bilhões; a indústria da mineração contribuiu com 30% em 2016 do saldo da balança comercial do País. A estimativa para este ano é de US\$ 34 bilhões de faturamento (Instituto Brasileiro de Mineração - IBRAM, 2018).

Os principais produtos exportados foram: minério de ferro, ouro, ferronióbio, cobre, bauxita, manganês, caulim, pedras naturais e de revestimentos (IBRAM, 2017).

O cobre é o terceiro metal mais usado no mundo ficando atrás apenas do ferro e alumínio, sendo consumido em diversas fabricações, da indústria elétrico-eletrônica a máquinas industriais (London Metal Exchange - LME, 2018). No entanto, a produção de rejeitos e resíduos sólidos provenientes da mineração e sua deposição em barragens requerem cuidados com o meio ambiente.

A contaminação crescente em grandes extensões de áreas por contaminantes metálicos, compostos orgânicos, sais, e elementos radioativos em concentrações elevadas representa um perigo ambiental, com impactos na vegetação, organismos do solo, águas superficiais e subterrâneas segundo Accioly e Siqueira (2000).

O cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) são nutrientes essenciais às plantas, mas podem se tornar tóxicos em concentrações mais elevadas. Isso passa a ser outro problema relacionado ao excesso de íons minerais, pois é este acúmulo dos metais pesados no solo, que poderá causar forte toxicidade em plantas, assim como em seres humanos (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A fitorremediação é a técnica do uso de vegetação para a descontaminação *in situ* de solos e sedimentos, eliminando metais pesados e poluentes orgânicos, sendo os metais pesados por estarem depositados em camadas superiores do solo, facilmente acessíveis, as raízes das plantas cultivadas (BAIRD, 2002). Esta técnica envolve cinco processos fisiológicos: fitoestabilização, fitoestimulação, fitovolatilização, fitodegradação e fitoextração (ANDRADE et al., 2007).

Para Peuke e Rennenberg (2005) os processos ocorrem quando plantas aptas a fitoextração possuem a habilidade de translocar o contaminante para a fitomassa aérea; plantas fitoestabilizadoras devem possuir sistema radicular vigoroso e habilidade de complexar o metal ao húmus do solo ou a ácidos orgânicos rizosféricos

no solo; plantas fitodegradadoras produzem substâncias orgânicas que estimulam o crescimento da biota do solo, a qual degrada compostos orgânicos perigosos; plantas volatilizadoras absorvem metais com esta característica e os volatilizam nas folhas; plantas rizofiltradoras acumulam grande quantidade de metais no sistema radicular, precipitando-os (DINARDI et al., 2003; ANDRADE et al., 2007; PILON-SMITS, 2005; SARMA, 2011).

Nas áreas do conhecimento como a bioquímica, fisiologia vegetal e citogenética associadas à fitorremediação são necessárias pesquisas que em conjunto encontrem soluções à degradação ambiental promovida pela mineração.

Para Sharma et al. (2007); Sha Valli Khan et al. (2002) estresses abióticos como a seca, salinidade, temperatura ou metais pesados, causam a perda da homeostase celular, resultando no estresse oxidativo. Quando o agente estressor excede o limite homeostático do organismo, são ativados mecanismos de resposta aos níveis molecular, bioquímico, fisiológico e morfológico (SHA VALLI KHAN et al., 2002; ZHAO et al., 2016).

A capacidade da planta em detectar e reagir ao estresse é um fator importante para sua sobrevivência, pois dispara cascatas de sinalização que irão ativar canais iônicos, quinases, acumulação de hormônios vegetais e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHA VALLI KHAN et al., 2002; FOYER et al., 2017; NOCTOR et al., 2017).

A manutenção homeostática de EROs possui um papel importante no desenvolvimento radicular sendo que, em quantidades bem definidas, agem como sinalizadoras em diversas situações, como alongação e diferenciação das células de raízes (ZHAO et al., 2016). O acúmulo de EROs resulta na peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos, inibição enzimática, alterações na fotossíntese, inibição do crescimento e diminuição na concentração de clorofilas e, em até morte celular (MAHESHWARI, 2009), ou afetando a expressão de um conjunto específico de genes que irão formar uma resposta de defesa do organismo àquele desafio (APEL; HIRT, 2004).

A produção de EROs é uma das principais respostas bioquímicas das células a estresses bióticos e abióticos (MØLLER et al., 2007; NGUYEN et al., 2009). As EROs presentes em compartimentos celulares tem participação em processos vitais, como a fotossíntese e a fixação biológica do nitrogênio (CHANG et al., 2009; NGUYEN et al.,

2009; BECANA et al., 2010). Assim, as EROs podem atuar tanto como indicadores celulares de situações de estresse como também mensageiros secundários envolvidos na resposta ao estresse (ANTÓN et al., 2006; MØLLER et al., 2007). Para isso, a célula conta com sistemas de defesa composto de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que está presente em várias organelas e atua de forma coordenada na proteção oxidativa (ASADA, 2006; FOYER et al., 2009; MILLER et al., 2010). Tais mecanismos podem ser essenciais no processo de tolerância ao estresse.

Portanto, a citogenética tem um papel importante na detecção de substâncias potencialmente citotóxicas e genotóxicas e o impacto que estas podem trazer em relação aos metais pesados. A citotoxicidade pode ser avaliada, através de alterações no processo de divisão celular sobre o organismo-teste e pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos (SOUZA et al., 2015).

Para Oliveira et al. (2012) em estudo realizado em cultivo de cebola (*Allium cepa*) e aguapé (*Eichornia crassipes*) cultivadas com água com concentração de cromo hexavalente, poderia induzir a genotoxicidade avaliada pela frequência de micronúcleos em células meristemáticas das raízes das espécies supracitadas.

Diante do exposto objetivou-se avaliar o potencial das espécies *Schizolobium amazonicum* Huber. ex Ducke., *Leucaena leucocephala* Lam. de Wit. e *Azadirachta indica* A. Juss. submetidas à contaminação do solo com rejeito de cobre da mineração, obter a espécie mais extrativa de cobre do solo sem comprometimento do crescimento morfológico, avaliar estratégias fisiológicas e identificar quais das espécies tem comprometimento citológico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Botânica e Importância das Espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica*

O paricá (*Schizolobium amazonicum*) é uma espécie da família Caesalpinaceae, de porte elevado (20 a 30 m), que ocorre na Amazônia em mata primária e secundária de terra firme, possuindo crescimento rápido. Sua madeira é sedosa e lisa, mais ou menos lustrosa, de coloração branco-amarelo-claro, podendo conter uma tonalidade róseo-pálida, sendo muito utilizada na fabricação de forros, palitos e papel (TRINDADE et al., 1999). Segundo Carvalho e Viégas (2004), a espécie pode fornecer boa matéria-prima para a obtenção de celulose para papel, com fácil branqueamento e excelente resistência obtida com o papel branqueado, tendo sido incluída na seleção de espécies para os consórcios agroflorestais na Amazônia, pois reúne ótimas qualidades silviculturais.

Para Marques et al. (2006) a produtividade média do *S. amazonicum* varia entre 25 a 30 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup> e pode ser aumentada com técnicas de melhoramento genético aliadas a outras práticas silviculturais, o que confere a espécie grande potencial para plantios comerciais, sistemas agroflorestais e reflorestamento de áreas degradadas (TREMACOLDI et al., 2009).

O gênero *Leucaena* Benth, compreende 22 espécies, nativo das Américas, a espécie leucena (*Leucaena leucocephala*) é uma fabácea originária da América Central, México, sendo encontrada em muitas regiões tropicais do mundo (SILVA et al., 2007). Trata-se de uma espécie arbórea, perene, que apresenta raízes profundas, característica que lhe confere excelente tolerância à seca, sendo considerada uma planta bastante rústica (PRATES et al., 2000). Além da rusticidade, as possibilidades de uso desta espécie contribuíram para sua ampla dispersão. A *L. leucocephala* é utilizada na recuperação de áreas degradadas, adubação verde, produção de madeira, sombreamento e quebra vento (OLIVEIRA, 2008).

Para Drumond (1992) o destaque da espécie recai sobre sua multiplicidade de usos como madeireira, forrageira e como planta melhoradora dos solos, especialmente quando consorciada com outras culturas, destacando-se a vantagem de servir como

alternativa para preservação das espécies nativas e de recuperação de áreas degradadas.

A *L. leucocephala* é uma espécie de rápido crescimento, chegando a crescer até três metros de altura no primeiro ano, e com grande capacidade de regeneração. No entanto, para Xavier (1989) devido ao seu crescimento inicial lento, recomenda-se plantio por mudas.

Segundo Freitas et al. (1991) a *L. leucocephala* tem importância econômica que se deve ao seu valor como árvore de sombreamento e adubo verde, existindo crescente interesse na utilização da espécie nos trópicos para restauração da fertilidade dos solos e forragem.

O nim indiano (*Azadirachta indica*) pertence à família Meliaceae, que apresenta diversas espécies de árvores conhecidas pela madeira de grande utilidade, como o mogno (*Swietenia macrophylla*), o cedro (*Cedrela fissilis*), o cinamomo (*Melia azedarach*), a canjerana (*Cabralea canjerana*), a triquília (*Trichilia pallida*) etc. É originário do Sudeste da Ásia é cultivado em diversos países da Ásia, em todos os países da África, na Austrália, América do Sul e Central. É usado há séculos na Ásia, principalmente na Índia, como planta medicinal. Seu porte varia de 15 a 20 m de altura e 30 a 80 cm de diâmetro, com copas de 8 a 12 m de diâmetro e fuste apresentando coloração marrom-avermelhada (MOURÃO et al., 2004; MARTINEZ, 2008).

A espécie *A. indica* é considerada uma planta versátil em razão dos inúmeros usos que se faz da mesma, sua madeira tem grande potencial na utilização para fins energéticos e produção de carvão (ARAÚJO et al., 2000).

Neves (2004) afirma que o *A. indica* é utilizado em programas de reflorestamento no Sudeste asiático e na África, com o objetivo de recuperar áreas degradadas, acrescenta ainda, que quando jovem pode ser usado como componente arbóreo em sistemas agroflorestais.

## **2.2 Origem do Cobre**

O termo cobre é de origem latina, *cuprum*, que, por sua vez, deriva da palavra *cyprium*, usada para designar a ilha de Chipre, que foi a principal fonte do metal no mundo antigo (MAAR, 2008). Segundo Rodrigues et al. (2012) na natureza, o cobre é encontrado principalmente nos minerais calcocita, calcopirita e malaquita. Também

está presente na constituição da turquesa, um mineral não tão abundante, mas bastante conhecido e apreciado por sua rara beleza.

O cobre, segundo Rodrigues et al. (2012) é um elemento químico de símbolo Cu com número atômico  $Z = 29$ , massa molar  $M = 63,546 \text{ g mol}^{-1}$ , ponto de fusão  $T_f = 1.358 \text{ K}$  e isótopos naturais  $^{63}\text{Cu}$  (69,15%) e  $^{65}\text{Cu}$  (30,85%).

O cobre é um metal dúctil, maleável, de coloração avermelhada, cuja configuração eletrônica é  $[\text{Ar}]3d^{10}4s^1$ . Quando combinado com outros elementos, apresenta número de oxidação +1 ( $\text{CuCl}$ ), +2 ( $\text{CuCl}_2$ ) e +3 ( $\text{K}_3\text{CuF}_6$ ). Os estados de oxidação +1 e +2 podem ser encontrados em solução aquosa, embora haja uma tendência do íon cobre +1 passar para +2 (reação de desproporcionamento). O estado de oxidação +2 é o mais comum, e o +3 é bastante raro, ocorrendo em apenas alguns poucos compostos que geralmente são fortes agentes oxidantes. Em geral, sais de cobre +1 são insolúveis, diamagnéticos e de cor branca, enquanto que os de cobre +2 tendem a serem solúveis, paramagnéticos e coloridos (RODRIGUES et al., 2012).

### 2.3 Efeitos do Cobre nas Espécies Vegetais

O cobre (Cu) é um metal de transição ativo redox que está envolvido em muitos processos fisiológicos nas plantas porque pode existir em múltiplos estados de oxidação *in vivo*. Nas espécies vegetais o cobre desempenha um papel importante como um elemento estrutural de proteínas reguladoras, cofactor de muitas enzimas (como, Cu/Zn superóxido dismutase, amino oxidase, lacase, plastocianina, e polifenol oxidase), participa no transporte de elétrons na fotossíntese, respiração mitocondrial, nas respostas ao stress oxidativo, o metabolismo da parede celular, a transcrição da proteína e a translocação e sinalização hormonal (YRUELA, 2005).

Embora o cobre (Cu) seja um micronutriente essencial importante para muitas atividades metabólicas, torna-se extremamente tóxico em concentrações mais altas. Este metal está presente nos mercados industrial, doméstico, efluentes, e as fontes mais comuns de sua introdução no meio aquático são: corrosão de tubos de cobre e ligas por águas ácidas, algicidas, fungicidas utilizados na preservação de madeira e na indústria de mineração, fundição, cultivos de plantas e refino (BLAYLOCK; HUANG, 2000).

O cobre, assim como os demais metais pesados, não é biodegradável e apresenta uma dinâmica no solo bastante complexa, alterada diretamente por fatores do meio, principalmente pela quantidade de matéria orgânica, pH e CTC (SODRÉ; LENZI, 2001).

Para Larcher (2000) o cobre é um elemento com baixa mobilidade dentro da planta e, em condições de baixa oferta os sintomas são visíveis principalmente em meristemas aéreos, folhas jovens e órgãos reprodutivos. Os sintomas de deficiência incluem a produção de folhas com cor verde escuro, manchas necróticas que aparecem primeiro nas pontas das folhas jovens e se estendem em direção à base da folha ao longo das margens, as folhas também podem ficar retorcidas ou mal formadas. Sob deficiência, severa abscisão prematura pode ocorrer. Plantas apresentam crescimento atrofiado e seu desenvolvimento radicular é inibido (TAIZ; ZEIGER, 2013).

#### **2.4 Cobre como Contaminante e Seus Efeitos na Morfologia, Bioquímica, Fisiologia e Citogenética nos Vegetais**

O cobre no vegetal é um micronutriente exigido em pequenas quantidades pelas culturas, sendo um dos últimos a desenvolver sintomas visuais de deficiência, quando seu suprimento não atende à demanda das plantas. Geralmente, ocorre em teores muito baixos no solo e, na matéria seca das plantas varia de 2 a 20 mg kg<sup>-1</sup> (FERREIRA; CRUZ, 1991). Apesar do importante papel na nutrição mineral das plantas participando de diversos processos metabólicos (MARSCHNER, 2012).

O cobre (Cu) é um micronutriente que atua como componente de várias enzimas e coenzimas participa da fotossíntese, respiração e do metabolismo de nitrogênio e carboidratos (YRUELA, 2009). Entretanto, a presença em altas concentrações no solo afeta negativamente o crescimento e a produtividade das plantas (SONMEZ et al., 2006), devido aos danos às membranas celulares por meio da peroxidação de lipídios (BUENO; PIQUERAS, 2002), ao comprometimento da atividade fotossintética (LANARAS et al., 1993) e aos processos de absorção e assimilação de nutrientes (LLORENS et al., 2000; DEVRIESE et al., 2001).

O cobre em pequena concentração é um micronutriente essencial para toda forma de vida vegetal, sendo considerada uma maquinaria de tráfico de proteínas, fosforilação oxidativa e elemento estrutural na proteína reguladora (YRUELA, 2005).

Como resultado da formação de complexos de cobre-orgânico, o excesso de cobre pode ser considerado como um elemento tóxico que leva a reduzir o crescimento de brotos e raízes ao inibir o alongamento celular e o ciclo celular (OUZOUNIDOU, 1993), diminuição do teor de clorofila, expansão foliar, perturbação da cromatina com dano na conformação do DNA e o plasma causando efluxo iônico (SINGH et al., 2007). Hänsch e Mendel (2009) indicaram que o excesso de concentrações de Cu pode induzir efeito tóxico significativo alterando a função da proteína e a atividade das enzimas.

Em investigações diversas sobre os efeitos causados por contaminação por cobre em várias espécies vegetais, Lequeux et al. (2010) estudando videiras jovens afirmam que o cobre pode interferir no crescimento das raízes, incluindo diminuição do comprimento e número de ramificações, dano da cutícula da raiz (SHELDON; MENZIES, 2005), e rachaduras na raiz (MICHAUD et al., 2008), por causa dos altos níveis de Cu disponível. Além disso, a exposição das plantas a concentrações elevadas de Cu podem reduzir o nível de clorofila nas folhas e inibir a fotossíntese (YRUELA, 2009).

A genotoxicidade do cobre é devida à produção de radicais hidroxilas e espécies reativas de oxigênio através da reação de Fenton (IMLAY; LINN, 1988) que pode provocar morte celular. Raios-X também estão na origem de um aumento muito significativo na frequência de micronúcleos em fava (*Vicia faba*) (RIZZONI et al., 1987). No entanto, foi mostrado que o cobre não é um mutagênico em *V. faba* como resultado à exposição de diferentes concentrações deste metal por 2 h, mas uma concentração de 250 mM inibe a divisão celular, que está causando a diminuição da frequência de micronúcleos (STEINKELLNER et al., 1998). Do ponto de vista ambiental, a disponibilidade de cobre torna-se um problema crescente em relação a todos os organismos vivos, incluindo plantas. A necessidade de elucidar a toxicidade do cobre vem do seu uso sistêmico como fungicida, algicida ou bactericida na agricultura (SOUGUIR et al., 2008).

## 2.5 Tolerância das Espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* ao Cobre

Para Cordeiro et al. (2009) o *S. amazonicum* vem sendo cultivado em reflorestamento e sistemas agroflorestais em diferentes condições edafoclimáticas. No Estado do Pará, a espécie está sendo plantada em larga escala por apresentar rápido crescimento, pela qualidade de sua madeira e boa cotação no mercado. Porém, o processo de recuperação de áreas degradadas, mediante sistemas de produção apropriados, tendo em vista os aspectos da geração de renda, ocupação de mão-de-obra e redução dos impactos ambientais, necessitam de estudos experimentais para a geração de indicadores técnicos (SANTANA, 2005).

No entanto, são raras as informações encontradas na literatura atual sobre a nutrição com nitrogênio, fósforo e potássio no crescimento de *S. amazonicum*. De forma geral, as diferentes espécies florestais nativas apresentam exigências nutricionais distintas e, como inexiste uma recomendação específica para cada espécie, à maioria das recomendações é baseada na do Eucalipto com algumas adaptações (CAIONE et al., 2012).

Para Campello (1998) as fabáceas arbóreas possuem vasto sistema radicular e elevada produção de fitomassa, que contribui para a retenção de água e sais minerais. A *L. leucocephala*, é uma destas arbóreas mais cultivadas do mundo, pois se adapta a diversos tipos de solos, sendo tolerantes à seca e à temperatura variável (16 °C a 32 °C).

Interações ecológicas vêm sendo estudadas utilizando fabáceas arbóreas e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) no estabelecimento de plantas em ambientes áridos (DUPONNOIS et al., 2005) e em áreas degradadas por mineração (LINS et al., 2006). Para Lins et al. (2007) estudando o efeito de FMAs no crescimento de mudas de *L. leucocephala* em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre, concluíram que raízes de *L. leucocephala* não são colonizadas por FMAs quando cultivadas em substrato de rejeito de área com mineração de cobre ( $\geq 483 \text{ mg dm}^{-3}$ ).

De acordo com Silva et al. (2014) em investigação o efeito do cobre sobre o crescimento e qualidade de mudas de barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) e acácia (*Cassia multijuga* Rich.) concluíram que as doses testadas de cobre não alteram a qualidade das mudas da *C. multijuga*, enquanto o *S. polyphyllum*

mantém a qualidade de mudas até 300 mg dm<sup>-3</sup> de cobre adicionado ao solo. O *S. polyphyllum* apresenta maior crescimento e qualidade de mudas que a *C. multijuga* em solo contaminado com cobre.

Para Martins et al. (2010) o interesse por pesquisas sobre o *A. indica*, tem aumentado por suas características peculiares onde seu extrato bruto ou do seu óleo vegetal, podem ser extraídos das folhas, caules e sementes. Características, que vão desde o combate às pragas agrícolas até o uso medicinal e na indústria cosmética, o que têm atraído à atenção de pesquisadores, confirmado pelo número de trabalhos publicados sobre essa espécie (ARAÚJO et al., 2000; OKEMO et al., 2001; ROOP et al., 2005).

No entanto, Diniz et al. (2013) afirmam que ao contrário da vasta bibliografia e a respeito da biologia e das características inseticidas do *A. indica*, são raros os registros de estudos sobre o efeito da salinidade no crescimento desta espécie exótica. Para os supracitados autores o estresse salino inibiu o consumo hídrico, o crescimento biométrico e a produção de biomassa seca do *A. indica*, nos diferentes órgãos das plantas, mas com maior intensidade na parte aérea que nas raízes.

## **2.6 Fitorremediação e Seus Mecanismos**

Segundo Andrade et al. (2007) a fitorremediação apresenta grande versatilidade, podendo ser utilizada para remediação de meio aquoso, ar ou solo, com variantes que dependem dos objetivos a serem atingidos. As plantas podem remediar os solos contaminados através dos seguintes mecanismos: fitoextração, fitoestabilização, fitovolatilização, fitodegradação, fitoestimulação.

A fitoextração é a absorção do metal contaminante pelas raízes das plantas translocado para o caule e as folhas (ALI et al., 2013).

A fitoestabilização usa plantas para limitar a mobilidade e biodisponibilidade de metais nos solos (SINGH, 2012).

A fitovolatilização é a absorção de poluentes do solo por plantas, a sua conversão em forma volátil e posterior liberação para a atmosfera, sendo a mais controversa das tecnologias de fitorremediação (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007; ALI et al. 2013).

A fitodegradação é a degradação de poluentes orgânicos por plantas com a ajuda de enzimas como a dehalogenase e oxigenase, assim como não é dependente de microrganismos rizosféricos (VISHNOI; SRIVASTAVA, 2008).

A fitoestimulação ocorre a liberação de aminoácidos e polissacarídeos pela raiz, que caracteriza um estímulo para a atividade microbiana. Esses compostos produzidos ainda têm a capacidade de degradar outros componentes do solo, conferindo à planta, muitas vezes, uma aptidão rizosférica para a biorremediação, por apresentar grande concentração de microrganismos, considerada uma excelente área para a degradação de compostos orgânicos, tais como substâncias químicas aromáticas hidrofóbicas (VASCONCELOS et al., 2012).

A rizodegradação refere-se à quebra de poluentes orgânicos no solo por microrganismos habitantes da rizosfera (MUKHOPADHYAY; MAITI, 2010; ALI et al., 2013). A rizosfera estende-se aproximadamente 1,0 mm em torno da raiz e está sob a influência da planta (PILON-SMITS, 2005; ALI et al., 2013).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. **Contaminação química e biorremediação do solo**. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; SCHAEFER, C. E., Eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 299-352.

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869-81, 2013.

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. 176p.

ANDRADE, S. A. L.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; SILVEIRA, A. P. D.; SCHIAVINATO, M. A.; MAZZAFERA, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, n.68, p.198-207, 2010.

ANTÓN, M.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; SÁNCHEZ, M. L.; FEDOROVA, E.; HERRERO, M. G.; SAMA, A.; PEREIRA, L. G.; CARRETERO, C.; HERAS, N. M. L.; GUANCHE, J. P.; DABAD, J. P.; RODRÍGUEZ, A. V. Factores estructurales, bioquímicos y moleculares de la simbiosis Bradyrhizobium sp. (Lupinus)-Lupinus. **Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia**, n.72, p. 423-442, 2006.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, n.141, p. 391-396, 2006.

ARAÚJO, L. V. C.; RODRIGUEZ, L. C. E.; PAES, J. B. Características físico-químicas e energéticas da madeira de nim indiano. **Scientia Forestalis**, n. 57, p.153-159, 2000.

BECANA, M.; MATAMOROS, M. A.; UDVARDI, M.; DALTON, D. A. Recent insights into antioxidant defenses of legume root nodules. **New Phytologist**, n.188, p. 960-976, 2010.

BAIRD, C. **Química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2ª Ed., 2002. 622p.

BLAYLOCK, M. J.; HUANG, J. W. Phytoextraction of metals. In: RASKIN, I.; ENSLEY, B. D. (Ed.). **Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean-up the environment**. New York: John Wiley and Sons, p. 53-70, 2000.

BUENO, P.; PIQUERAS, A. Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. **Plant Growth Regulation**, v.36, p.161-167, 2002.

CAIONE, G.; LANGE, A.; SCHONINGER, E. L. Crescimento de mudas de *Schizolobium amazonicum* (Huber ex Ducke) em substrato fertilizado com nitrogênio, fósforo e potássio. **Sci. For.**, v. 40, n. 94, p. 213-221, 2012.

CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.). **Recuperação de Áreas Degradadas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa / Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, 1998. p.183-196.

CARVALHO, J. G.; VIEGAS, I. J. M. **Caracterização de sintomas de deficiências de nutrientes em paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex. Ducke)**. Belém: Embrapa-CPATU, 6p. (Circular Técnica, 37). 2004.

CHANG, C.; DAMIANI, I.; PUPPO, A.; FRENDON, P. Redox Changes during the Legume-Rhizobium Symbiosis. **Molecular Plant**, v. 2, n. 3, p. 370-377. 2009.

CHATTERJEE, I.; GROSS, S. R.; KINZY, T. G.; CHEN, K.Y. A rápida depleção do fator 5A de iniciação eucariótica mutante na temperatura restritiva revela conexões com o citoesqueleto de actina e com progressão do ciclo celular. **Mol Genet Genomics**, v. 275, n.3, p.264-276, 2006.

CORDEIRO, I. M. C. C.; SANTANA, A. C.; LAMEIRA, O. A.; SILVA, I. M. Análise econômica dos sistemas de cultivo com *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby (Paricá) e *Ananas comosus* var. *erectifolius* (L. B. Smith) Coppel & Leal (Curauá) no município de Aurora do Pará (PA), Brasil. **Rev. Fac. Agron.**, v. 26, p. 243-265, 2009.

DEVRIESE, M.; TSAKALOUDIS, V.; GARBAYOC, I.; LEÓN, R.; VILCHEZEC, C.; VIGARAC, J. Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, p.443-448, 2001.

DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. Fitorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis. Faculdades Integradas Claretianas-Rio Claro, 2003.

DINIZ, B. L. M. T.; CAVALCANTE, L. F.; MESQUITA, F. O.; LIMA NETO, A. J.; NUNES, J. C.; DINIZ NETO, M. A. Crescimento inicial e consumo hídrico de nim submetido ao estresse salino e biofertilizante bovino. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3, p. 470-475, 2013.

DRUMOND, M. A. **Produtividade florestal na região Semiárida do Nordeste brasileiro**. Vitória da Conquista-BA, 1992.

DUPONNOIS, R.; PAUGYA, M.; THIOULOUSE, J.; MASSE, D.; LEPAGE, M. Functional diversity of soil microbial community, rock phosphate dissolution and growth of *Acacia seyal* as influenced by grass, litter and soil-feeding termite nest structure amendments. **Geoderma**, v.124, p. 349-361, 2005.

FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. da. **Micronutrientes na Agricultura**. Piracicaba: POTAFOS/CNPq, 1991. 734 p.

FOYER, C. H.; RUBAN, A. V.; NOCTOR, G. Viewing oxidative stress through the lens of oxidative signalling rather than damage. **Biochem. J**, n. 474, p. 877-883, 2017.

FOYER, C. H.; BLOOM, A. J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. **Annual Review of Plant Physiology**, n. 60, p. 455-484, 2009.

FREITAS, A. R. D.; OLIVEIRA, A. L. P. C. D.; SILVA, B. A. da; DECICO, M. J. U. ***Leucaena leucocephala* (Lam. de Witt): cultura e melhoramento**. São Carlos: Embrapa-UEPAE/São Carlos, 1991. 93p. (Documento 12).

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.12, p. 259-266, 2009.

HUGHES, C. E. **Leucaena**: manual de recursos genéticos. Oxford: Oxford Forestry Institute. 280 p. (Tropical Papers, 37), 1998.

IMLAY, J. A.; LINN, S. DNA damage and oxygen radical toxicity. **Science**. v. 3, n. 240, p. 1302-1309, 1988.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Relatório anual**. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/>. Acesso em: 10 set. 2017.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MINERAÇÃO. **Relatório anual**. Disponível em: <http://www.ibram.org.br/>. Acesso em: 9 abr. 2018.

LANARAS, T.; MOUSTAKAS, M.; SYMEONIDIS, L.; DIAMANTOGLIOU, S.; KARATAGLIS, S. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. **Physiologia Plantarum**, v.88, p.307-314, 1993.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. São Carlos: Ed. Rima, 531p., 2000.

LEQUEUX, H.; HERMANS, C.; LUTTS, S.; VERBRUGGEN, N. Response to copper excess in *Arabidopsis thaliana*: Impact on the root system architecture, hormone distribution, lignin accumulation and mineral profile. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 8, p. 673-682, 2010.

LLORENS, N.; AROLA, L.; BLADÉ, C.; MAS, A. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v.160, p.159-163, 2000.

LONDON METAL EXCHANGE. **LME Cooper**. Disponível em: <https://www.lme.com/en-GB/Metals/Non-ferrous/Copper#tabIndex=0>. Acesso em: 13 mar. 2018.

LINS, C. E. L.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MESSIAS, A. S.; MAIA, L. C. Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, v.31, p.181-185, 2006.

LINS, C. E. L.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. S. B. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n.2, p.355-363, 2007.

MAAR, J. H. **História da química** - Primeira Parte - dos primórdios a Lavoisier. Florianópolis: Conceito, 2008.

MARQUES, L. C. T.; YARED, J. A. G.; SIVIERO, M. A. **A evolução do conhecimento sobre paricá para reflorestamento no Estado do Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 5 p. (Embrapa Amazônia Oriental, Comunicado Técnico, 158), 2006.

MARTINS, M. O.; NOGUEIRA, R. J. M.; AZEVEDO NETO, A. D.; SANTOS, M. G. Crescimento de plantas jovens de nim-indiano (*Azadirachta indica* A. Juss. - Meliaceae) sob diferentes regimes hídricos. **Revista Árvore**, Viçosa, v.34, n.5, p.771-779, 2010.

MARTINEZ, S. S. O nim (*Azadirachta indica*): um inseticida natural. Londrina, IAPAR, 2008, 124p.

MARSCHNER, P. **Mineral nutrition of higher plants**. 3. Ed. London: Elsevier, 2012. 651p.

MAHESHWARI, A. V.; BLUM, Y. C.; SHEKHAR, L.; RANAWAT, A. S.; RANAWAT, C. S. Multimodal Pain Management after Total Hip and Knee Arthroplasty at the Ranawat Orthopaedic Center. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v.467, n.6, p. 1418-1423, 2009.

MICHAUD, A. M.; CHAPPELLAZ, C.; HINSINGER, P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). **Plant and Soil**, v. 310, n. 1, p.151-165, 2008.

MILLER, G.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.; MITTLER, R. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. **Plant, Cell and Environment**, n. 33, p. 453-467, 2010.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, n. 58, p. 459-481, 2007.

MOURÃO, S. A.; ZANUNCIO, J. C.; PALLINI FILHO, A.; GUEDES, R. N. C.; CAMARGOS, A. B. Toxicidade de extratos de nim (*Azadirachta indica*) ao ácaro-vermelho-do-cafeeiro *Oligonychus ilicis*. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.39, n.8, p.827-830, 2004.

MUKHOPADHYAY, S.; MAITI, S. K. Phytoremediation of metal enriched mine waste:

a review. **Global Journal of Environmental Research**, v. 4, p. 135-150, 2010.

NEVES, E. J. M. Importância dos fatores edafo-climáticos para o uso do nim (*Azadirachta indica* A. Juss) em programas florestais e agroflorestais nas diferentes regiões do Brasil. **Boletim de Pesquisa Florestal**, v. 49, p. 99-107, 2004.

NGUYEN, G. N.; HAILSTONES, D. L.; WILKES, M.; SUTTON, B. G. Droughtinduced oxidative conditions in rice anthers leading to a programmed cell death and pollen abortion. **Journal of Agronomy e Crop Science**, n. 195, p. 157-164, 2009.

NOCTOR, G.; REICCHHELD, J. P.; FOYER, C. H. ROS-related redox regulation and signaling in plants. **Semin Cell Dev Biol.**, n.80. p.3-12, 2017.

OKEMO, P. O.; MWATHA, W. E.; CHHABRA, S. C.; FABRY, W. The kill kinetics of *Azadirachta indica* A. Juss. (Meliaceae) extracts on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. **African Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 2, p. 113-118, 2001.

OLIVEIRA, J. P. W.; SANTOS, R. N.; PIBERNAT, C. C.; BOEIRA, J. M. Genotoxicity and physical chemistry analysis of waters from sinos river (RS) using *Allium cepa* and *Eichhornia crassipes* as bioindicators. **Biochemistryand Biotechnology Reports**, v.1 n.1, p.15-22, 2012.

OLIVEIRA, A. B. Germinação de semente de Leucena (*Leucaena leucocephala*). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.8, p.166-172. 2008.

OUZOUNIDOU, G. Changes of photosynthetic activities in leaves as a result of Cu treatment: dose-response relations in *Silene* and *Thlaspi*. **Photosynthetica**, v. 29, p. 455-462, 1993.

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.184, p.105–126, 2007.

PEUKE, A. D.; RENNENBERG, H. Phytoremediation: Molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention and feasibility. **European Molecular Biology Organization**, v. 6, p.497-501, 2005.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology**, v. 56, p.15-39, 2005.

PRATES, H. T.; PAES, J. M. V.; PIRES, M. N.; PEREIRA-FILHO, I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de *L. leucocephala* na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, p. 62-68, 2000.

RIZZONI, M.; VITAGLIANO, E.; MARCONI, M. C.; A. SOTTILI, A.; GUSTAVINO, B. Micronucleus induction by low doses of X-rays in *Vicia faba* root tips. **Mutation Research**, v. 176, p. 205-209, 1987.

RODRIGUES, M. A.; SILVA, P. P.; GUERRA, W. Elemento químico: cobre. **Química nova na escola**, v. 34, n. 3, p. 161-162, 2012.

ROOP, J. K.; DHALIWAL, P. K.; GURAYA, S. S. Extracts of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* seeds inhibit folliculogenesis in albino rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 943-947, 2005.

SANTANA, A. C. Elementos para a avaliação de projetos de investimentos rurais. In: SANTANA, A. C. **Elementos de Economia agronegócio e desenvolvimento local**. Belém: GTZ; TVD; UFRA, p.63-82. (Série Acadêmica, 01), 2005.

SARMA, H. Metal hyperaccumulation in plants: a review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*, v.4, n.2, p.118-138 2011.

SHARMA, K. R.; AGRAWAL, M.; MARSHALL, F. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.66, p.258-266, 2007.

SHA VALLI KHAN, P. S.; KOZAI, T.; NGUYEN, Q.T.; KUBOTA, C.; DHAWAN, V. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.71, p.141-146, 2002.

SHELDON, A. R.; MENZIES, N. W. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. **Plant and Soil**, v. 278, n. 1, p. 341-349, 2005.

SILVA, R. F.; MISSIO, E. L.; STEFFEN, R. B.; WEIRICH, S. W.; KUSS, C. C.; SCHEID, D. L. Efeito do cobre sobre o crescimento e qualidade de mudas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Cassia multijuga* Rich. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 24, n. 3, p. 717-725, 2014.

SILVA, L. X.; FIGUEIREDO, M. V. B.; SILVA, G. A.; GOTO, B. T.; OLIVEIRA, J. P.; BURITY, H. A. Fungos micorrízicos arbusculares em áreas de plantio de leucena e sabiá no estado de Pernambuco. **Revista Árvore**, v. 31, p. 76-82, 2007.

SINGH, S. Phytoremediation: a sustainable alternative for environmental challenges. **International Journal of Green and Herbal Chemistry**, v.1, p.133-139, 2012.

SINGH, R. P.; DHANIA, G.; SHARMA, A.; JAIWAL, P. K. Biotechnological approaches to improve phytoremediation efficiency for environment contaminants. In: **Environmental bioremediation technologies**, Singh, S. N.; Tripathi, R. D. (Eds) Springer, p. 223-258, 2007.

SODRÉ, F. F.; LENZI, E. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p.324-330, 2001.

SONMEZ, H.; ALTINSOY, H.; GOKCEOGLU, C.; MEDLEY, E. W. Considerations in developing an empirical strength criterion for bimrocks. **Asian Rock Mechanics Symposium**, Singapore, 2006.

SOUGUIR, D.; FERJANI, E.; LEDOIGT, G.; GOUPIL, P. Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. **Protoplasma**, v. 233, p. 203-207, 2008.

SOUZA, G.; CROSA, O.; GUERRA, M. Karyological, morphological, and phylogenetic diversification in *Leucocoryne* Lindl (Allioideae, Amaryllidaceae). **Plant Syst Evol.**, 2015.

STEINKELLNER, H.; MUN-SIK, K.; HELMA, C.; ECKER, S.; MA, T. H.; HORAK, O.; KUNDI, M.; KNASMULLER, S. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. **Environ and Mol Mutagen**, v. 3, p. 183-191, 1998.

TAIZ, G.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TREMACOLDI, C. R.; LUNZ, A. M.; COSTA, F. R. S. Cancro em Paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum*) no Estado do Pará. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n.59, p.69-73, 2009.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; BENCHIMOL, R. L.; ALBUQUERQUE, F. C.; OLIVEIRA, N. T. Black crust (*Phyllachora schizolobiicola* subsp. *schizolobiicola*) on *Schizolobium amazonicum* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 2, p.194, 1999.

VASCONCELLOS, M. C.; PAGLIUSO, D.; SOTOMAIOR, V. S. Fitorremediação: Uma proposta de descontaminação do solo. **Estud. Biol., Ambiente Divers.**, v. 34, n. 83, p. 261-267, 2012.

VISHNOI, S. R.; SRIVASTAVA, P. N. Phytoremediation-green for environmental clean. In: **The 12th World Lake Conference**, p. 1016-1021, 2008.

XAVIER, D. F. **Leucena**: procedimentos e cuidados para um bom estabelecimento. Coronel Pacheco: Embrapa Gado de Leite. (Comunicado Técnico, 4). 3p.1989.

ZHAO, J. Z.; FAN, W.; VERSTRAETE, M. J.; ZANOLLI, Z.; FAN, J.; YANG, X. B.; TONG, S. Y. Quasi-One-Dimensional Metal-Insulator Transitions in Compound Semiconductor Surfaces. **Physical Review Letters**, v.118, n.23, 2016.

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **B. Functional Plant Biology**, v.36, n.5, p.409-430, 2009.

YRUELA, I. Copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.**, v. 17, n.1, p.145-156, 2005.

## **CAPÍTULO I**

### **CRESCIMENTO E POTENCIAL FITORREMEDIADOR DE *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE**

# **CRESCIMENTO E POTENCIAL FITORREMEIADOR DE *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* EM SOLO CONTAMINADO COM COBRE**

## **RESUMO**

A atividade minerária promove aumentos consideráveis na balança comercial de diversos países. No Brasil a extração de cobre é de muita importância, especialmente no estado do Pará, pois atinge cifras consideráveis para a economia. Objetivou-se avaliar o crescimento inicial e a capacidade, habilidade, enfim, potencial das espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica*, submetidas à contaminação do solo com rejeito de barragem de mineração de cobre através da produção de fitomassa seca, teores e distribuição de cobre nos compartimentos radiculares, caulinares e foliares das espécies. O experimento foi conduzido na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN. O período da fase experimental foi de agosto de 2016 a fevereiro de 2017. O substrato utilizado nos vasos foi composto de solo e rejeito de cobre, proveniente do Pará. Foram caracterizados os atributos químicos e físicos dos componentes do substrato. Os tratamentos foram dispostos em blocos ao acaso, em esquema fatorial 3 x 4 (espécie x concentração). Os fatores foram às espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala*, *A. indica* e as concentrações de rejeito de cobre de barragem de mineração (0, 200, 400 e 600 mg de Cu dm<sup>-3</sup> de solo), respectivamente. As avaliações morfométricas ocorreram aos 30, 60, 90 e 120 dias. As plantas foram avaliadas quanto à altura, diâmetro de caule, número de folhas e área foliar. Ao final do experimento as plantas foram divididas em compartimentos de folhas apicais, intermediárias, senescentes, caules e raízes. A fitomassa seca vegetal foi pesada em balança de precisão e serviu para determinação do índice e fator de translocação e o coeficiente de extração. Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) com comparações entre médias entre as espécies pelo teste de Tukey a 5%. Fez-se análise de regressão das variáveis morfométricas em função das doses de cobre. A *L. leucocephala* e o *A. indica* tiveram comportamento semelhante, com o aumento da concentração de cobre, com decréscimo na altura das plantas. O diâmetro médio do caule no *S. amazonicum* foi decrescente e linear. A concentração mais elevada de cobre nas raízes está relacionado ao baixo transporte do metal para o compartimento aéreo. Conclui-se que as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* obtiveram fitomassa seca radicular e aérea praticamente iguais nas concentrações crescentes de cobre. Os coeficientes de extração foram superiores nas raízes as espécies estudadas, indicando que estas têm potencial para fitoestabilizar áreas degradadas por cobre.

**Palavras-chave:** Fitoextração, contaminantes do solo, rejeito de mineração, área degradada por mineração.

# **GROWTH AND POTENTIAL PHYTOREMEDIATOR OF *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* and *Azadirachta indica* INCONTAMINATED SOIL WITH COPPER**

## **ABSTRACT**

The mining activity promotes considerable increases in the trade balance of several countries. In Brazil the extraction of copper is of great importance, especially in the state of Pará, as it reaches considerable figures for the economy. The objective of this study was to evaluate the initial growth and the capacity, ability, and finally, the potential of the species *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* and *Azadirachta indica*, submitted to soil contamination with copper mining dam rejections through the production of dry biomass, contents and distribution of copper in the root, cauline and leaf compartments of the species. The experiment was conducted at the State University of Rio Grande do Norte, Mossoró-RN. The period of the experimental phase was from august 2016 to february 2017. The substrate used in the vessels was composed of soil and copper waste from Pará. The chemical and physical attributes of the substrate components were characterized. The treatments were arranged in randomized blocks, in a factorial scheme 3 × 4 (species x concentration). The factors were the species *S. amazonicum*, *L. leucocephala*, *A. indica* and concentrations of copper mining rejections, (0, 200, 400 and 600 mg Cu dm<sup>-3</sup> of soil), respectively. Morphometric evaluations occurred at 30, 60, 90 and 120 days. The plants were evaluated for height, stem diameter, number of leaves and leaf area. At the end of the experiment the plants were divided into apical, intermediate, senescent, stems and roots compartments. The dry vegetable phytomass was weighed on a precision scale and used to determine the index and translocation factor and the extraction coefficient. Data were submitted to analysis of variance (Anova) with comparisons to the average and between species by the Tukey test at 5%. Regression analysis of morphometric variables was performed due to the function of copper doses. *L. leucocephala* and *A. indica* had similar behavior, with the increase in copper concentration, with a decrease in plant height. The average stem diameter in *S. amazonicum* was decreasing and linear. The highest concentration of copper in the roots is related to the low transport of the metal to the air compartment. It is concluded that the species *S. amazonicum*, *L. leucocephala* and *A. indica* obtained almost identical root and aerial dry biomass in increasing concentrations of copper. The extraction coefficients were higher in the studied roots, indicating that they have the potential to phytostabilize areas degraded by copper.

**Keywords:** Phytoextraction, soil contaminants, mining rejections, degraded area by mining.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil detém uma estrutura geológica favorável a ocorrências de diversos tipos de minérios, que na forma de jazidas se tornam muito competitivas internacionalmente. No entanto, a deposição de rejeitos de mineração em barragens tem provocado danos ambientais.

Para Moreira e Siqueira (2006) a contaminação do solo por metais pesados é um problema oriundo do uso de insumos químicos na agricultura e de áreas de mineração. Nesse sentido, a contaminação de áreas por cobre tem ocorrido devido às atividades de mineração desse elemento e, em regiões de cultivos agrícolas, decorrentes da aplicação de fungicidas à base de cobre (CHAIGNON; HINSINGER, 2003; NACHTIGALL et al., 2007).

O uso da revegetação de locais contaminados, com o fim de diminuir os efeitos advindos da contaminação é uma tecnologia denominada de fitorremediação de solo (LOMBI et al., 2001). De acordo com Freire de Melo et al. (2009) esta é uma tecnologia emergente e de baixo custo que pode mitigar a contaminação por metais pesados.

Para Ribeiro-Filho et al. (1999) a intensa demanda por produtos manufaturados tem contribuído para contaminação por metais potencialmente tóxicos como cobre (Cu), zinco (Zn) e chumbo (Pb). Embora o cobre seja um micronutriente essencial às plantas (SOLIOZ; STOYANOV, 2003), áreas contaminadas têm se tornado comum em consequência de atividades de mineração, culminando assim, na deposição de grandes volumes de rejeito em barragens de mineração.

Caires et al. (2011) as espécies arbóreas nativas tropicais, principalmente as de rápido crescimento, apresentam características desejáveis para a fitorremediação de solos contaminados com metais pesados (ciclo de vida mais longo, grande produção de fitomassa) quando comparadas as de ciclo curto. Tais características permitem estas espécies acumular maior quantidade de carbono e de metais pesados, o que é importante para projetos de recuperação ambiental.

Espécies arbóreas para serem utilizadas em fitorremediação devem apresentar tolerância ao contaminante, sendo já bem conhecidos os possíveis mecanismos de tolerância aos metais pesados (LARCHER, 2004).

Espécies como o *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* podem servir para experimentação no sentido de investigar quais as potencialidades destas espécies e o uso de rejeito de barragem de cobre no mecanismo de fitoextração do elemento cobre.

O *S. amazonicum* é uma espécie da família Caesalpinaceae, de porte elevado (20 a 30 m), que ocorre na Amazônia, de crescimento rápido. Sua madeira é bastante utilizada na fabricação de forros, palitos e papel (TRINDADE et al., 1999), além de ser na atualidade bastante cultivada no Estado do Pará.

A *L. leucocephala* da família Fabaceae é uma espécie de crescimento rápido, fixadora de nitrogênio, tem despontado como alternativa promissora para recuperação de áreas degradadas. Quando constatado que não está se comportando como invasora de ecossistemas naturais, a *L. leucocephala* pode enquadrar-se melhor como ruderal (DA COSTA; DURIGAN, 2010), ou seja, uma espécie vegetal que prolifera apenas em áreas degradadas ou perturbadas dificultando o estabelecimento de outras espécies, incluindo nativas (WOITKE; DIETZ, 2002).

O *A. indica* é árvore da família Meliaceae, conhecida por sua ação medicinal, nas últimas décadas seu estudo vem sendo difundido em virtude da presença de substâncias inseticidas (DEBASHRI; TAMAL, 2012; OMKAR, 2012). Apesar da bibliografia ampla da biologia e das características inseticidas da espécie, há ainda uma lacuna de investigações sobre o potencial fitorremediador desta exótica em solo contaminado por metais pesados.

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o potencial das espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* submetidas à contaminação do solo com rejeito de barragem de mineração de cobre, seu crescimento morfométrico, produção de fitomassa seca, teores e distribuição de cobre nos compartimentos radiculares, caulinares e foliares das respectivas espécies.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização, Clima e Substrato

O experimento foi conduzido em telado de náilon, na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), Mossoró-RN, na região Oeste do Estado do Rio Grande do Norte, situado nas coordenadas geográficas de 05° 12' 18,25" S, 37° 18' 53,1" W e altitude de 21 m. O clima da região, segundo Köppen, é do tipo BSw<sup>h</sup>, tropical quente semiárido, com pluviosidade média anual de 695,8 mm e temperatura média de 27,4°C, marcado por dois períodos bem definidos: seco (prolongado) e chuvoso (curto e irregular).

As variáveis climatológicas durante o período compreendido entre 15 de agosto de 2016 a 3 de fevereiro de 2017 na fase experimental apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Valores mensais de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação obtidos no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.

Meses	Temperatura °C Mín / Máx	Umidade(%) Mín / Máx	Precipitação (mm)
Agosto	22,32 / 41,85	30,6 / 77,9	0,0
Setembro	22,90 / 42,30	24,2 / 77,2	0,0
Outubro	23,50 / 41,60	25,7 / 78,5	0,0
Novembro	24,00 / 41,30	28,0 / 77,6	0,0
Dezembro	24,20 / 39,50	34,0 / 82,4	2,0
Janeiro	24,10 / 41,18	26,7 / 82,3	6,4
Fevereiro	31,30 / 32,70	32,0 / 81,5	0,0

As variáveis climatológicas foram aferidas por termohigrômetro da marca Incoterm e pluviômetro, colocados no interior do telado de náilon (Figura 1). Os registros de temperatura e umidade foram realizados diariamente. A precipitação registrada foi a que ocorreu durante a fase experimental.



**Figura 1.** Termohigrômetro e pluviômetro para aferição de variáveis climatológicas instalados no local do experimento, no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.

O substrato utilizado nos vasos para instalação do experimento foi composto de solo do local do experimento e rejeito de barragem de cobre, sendo o rejeito proveniente da empresa Vale S.A., Canaã dos Carajás, Pará. O rejeito foi transportado em tambores de 200 kg provenientes da barragem de rejeito de cobre em Canaã dos Carajás-PA. Foram coletadas previamente amostras dos componentes do substrato para caracterização dos atributos químicos e físicos do solo (camada de 0-20 cm) e rejeito (Tabela 2), conforme recomendações metodológicas da Embrapa (2009).

**Tabela 2.** Atributos químicos e físicos do solo e do rejeito de cobre, usados por ocasião da instalação do experimento.

Substrato	Solo	Rejeito de cobre
<b>Atributos químicos</b>		
pH (H <sub>2</sub> O)	6,4	-
P (mg dm <sup>-3</sup> )	3,0	3,8
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,16	0,15
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,13	-
H <sup>+</sup> +Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,5	-
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,0	-
Ca <sup>+2</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,9	16,2
Mg <sup>+2</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,7	8,7
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,9	-
CTC (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,9	-
V (%)	65,9	-
MO (g kg <sup>-1</sup> )	0,9	-
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0,27	-
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0,4	0,9
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	120,0	45,5
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	41,0	18,5
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	0,7	1,7
<b>Atributos físicos</b>		
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	856	
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	84	
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	60	
Densidade g cm <sup>-3</sup>	1,54	1,62

Classificação textural	Areia Franca
SB = Soma de bases ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^+ + \text{Na}^+$ ); CTC = Capacidade de troca catiônica [ $\text{SB} + (\text{H}^+ + \text{Al}^{3+})$ ]; V = Saturação por bases trocáveis ( $\text{SB}/\text{CTC}$ ) $\times 100$ ; MO = Matéria orgânica do solo.	

## 2.2 Delineamento Experimental

Os tratamentos foram dispostos em blocos ao acaso, usando o esquema fatorial  $3 \times 4$  (espécie  $\times$  concentração), com quatro repetições e três plantas por parcela. Os fatores foram às espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala*, *A. indica* e quatro concentrações de rejeito de cobre de barragem de mineração (0; 200; 400 e 600 mg de  $\text{Cu dm}^{-3}$  de solo), respectivamente.

A tabela 3 se refere às quantidades de solo e rejeito de cobre utilizado para compor o substrato.

**Tabela 3.** Massa do solo, do rejeito de cobre e massa total, usados por ocasião da instalação do experimento.

Cobre ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	Solo (kg)	Rejeito (kg)	Massa Total (kg)
0	8,00	0,00	8,00
200	6,24	1,76	8,00
400	4,46	3,54	8,00
600	2,68	5,32	8,00

## 2.3 Material Vegetal e Condições de Cultivo

As sementes das espécies *L. leucocephala* e *A. indica* foram provenientes de coleta em matrizes no campus da UERN - Mossoró, RN. Estas matrizes foram catalogadas e as exsicatas depositadas no Herbário Jaime Coelho de Moraes, Laboratório de Citogenética Vegetal, no CCA, UFPB. As sementes de *S. amazonicum* foram adquiridas da empresa Centerplac, Rondon do Pará e a exsicata depositada no referido herbário.

O substrato foi pesado, colocado em vasos plásticos com capacidade para 8,0 litros e, permaneceram por 15 dias incubados, sem serem irrigados. Após este período foram semeadas cinco sementes por vaso. Dez dias após a emergência, foi realizado o desbaste mantendo-se a planta mais vigorosa.

O experimento foi irrigado por gotejamento, controlado por um temporizador marca Lukma electric, com três turnos de rega (9h; 12h; 15h) por dois minutos cada turno, mantendo em aproximadamente 80% da capacidade do vaso (Figura 2).



**Figura 2.** Incubação do substrato (A), germinação (B), crescimento (C) e irrigação dos vasos (D).

## 2.4 Variáveis Analisadas

### 2.4.1 Avaliação Morfométrica de Crescimento

Após a incubação do substrato e a emergência das sementes das três espécies (10 dias), foram iniciadas as avaliações morfométricas que ocorreram aos 30, 60, 90 e 120 dias. As plantas foram avaliadas quanto à altura, diâmetro de caule, número de folhas e área foliar, porém apenas a altura foi avaliada aos 30 dias, as demais não foram aferidas. Estas medidas morfométricas foram realizadas com o uso de trena graduada para aferir altura. O diâmetro de caule foi aferido com paquímetro digital da marca Disma 0-150 mm / 0-6" PD 150. A contagem de folhas por planta foi realizada de forma direta. A área foliar apenas aos 120 dias foi realizada através de scanner marca CID Bio-Science, CI 202 Lazer Area Meter.

A avaliação final aos 120 dias foi realizada dividindo os compartimentos das espécies em folhas apicais (FA), folhas intermediárias (FI), folhas senescentes (FS),

caules (C) e raízes (R). Toda a fitomassa vegetal foi devidamente acondicionada e identificada em sacos de papel com posterior pesagem de fitomassa verde. As raízes foram lavadas com água de torneira até a retirada completa do solo.

A medição de massa fresca foi realizada com balança digital de precisão da marca Quimis modelo Q-500L 210C. Após este procedimento o material vegetal foi colocado em estufa de marca De Leo modelo Coel LW 2000 a 65 °C por 72 h até atingir peso constante e novamente pesado, compondo a fitomassa seca. Após a fitomassa seca, esta foi devidamente moída em moinho tipo Willey TE-650. A fitomassa seca foi encaminhada ao laboratório para análises de macro e micronutrientes, conforme procedimentos laboratoriais.

Para determinar os teores de cobre nas diferentes partes das plantas, amostras de 1,0 g de fitomassa seca e triturada foram submetidas à digestão nítrico-perclórica (3:1) (TEDESCO et al., 1995). As amostras foram levadas para bloco digestor controlando-se a temperatura: inicialmente de 50 °C, por aproximadamente 30 minutos; 100 °C, por mais 30 minutos e permaneceu entre 160 °C a 180 °C até completar a digestão.

#### **2.4.2 Índice e Fator de Translocação, Coeficiente de Extração**

Em função do acúmulo de cobre, nos diferentes compartimentos das espécies investigadas, estas foram classificadas quanto ao caráter de tolerância, como fitoestabilizadoras (tolerantes e acumuladoras de cobre, ferro e zinco nas raízes) e fitoextratoras (capazes de tolerar e acumular cobre, ferro e zinco na parte aérea). Para Accioly e Siqueira (2000) espécies são consideradas acumuladoras, quando as concentrações nas raízes e na parte aérea forem superiores à concentração do solo.

Em razão da quantidade de cobre acumulado, calculou-se o índice de translocação (IT) do cobre, de acordo com Abichequer e Bohnen (1998), pela equação (1):

$$IT = \frac{\text{Quant de metal acumulado parte aérea (folhas + caules)}}{\text{Quant de metal acumulado na planta}} \times 100 \quad \text{Eq.1}$$

O cálculo do fator de translocação (FT) calculado de acordo com a equação (2) e, que tem a finalidade de avaliar a habilidade da planta em translocar o metal pesado

das raízes para as partes aéreas, comportamento desejável nos estudos de fitorremediação (MARCHIOL et al., 2004):

$$FT = \frac{\text{Teor de metal na parte aérea}}{\text{Teor de metal nas raízes}} \quad \text{Eq. 2}$$

A capacidade de extração de metais pelas plantas, denominado de coeficiente de extração (CE), é avaliada através da equação (3) que corresponde ao percentual de metal retirado do solo (KUMAR et al., 1995):

$$CE = \frac{\text{Massa g do metal por g matéria seca (parte aérea e radicular)}}{\text{Massa g do metal por g matéria seca do solo}} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

## 2.5 Avaliação Estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) com comparações entre médias entre as espécies pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar 5.6 Build (86) (Ferreira, 2011). Fez-se análise de regressão das variáveis morfométricas (altura de plantas, diâmetro de caule, número de folhas e área foliar) em função das doses de cobre. Os compartimentos foliares (folha apical, folha intermediária, caule e raiz) serviram para determinar os fatores, índices e coeficientes de extração das espécies.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Altura de Plantas, Diâmetro de Caule, Número de Folhas, Área Foliar e Produção de Fitomassa Seca

A interação entre as espécies e a contaminação do substrato com cobre não apresentou resultados significativos em relação as variáveis morfológicas de crescimento aos trinta dias, porém nas demais avaliações ocorreram diferenças estatísticas significativas, especialmente aos 120 dias, observa-se na tabela 4.

**Tabela 4.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à altura, diâmetro, número de folhas e área foliar aos 30, 60, 90 e 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.

FV	GL	Altura	Diâmetro	Nº de folhas	
30 dias					
Bloco	3	2,4780 <sup>ns</sup>	0,9891 <sup>ns</sup>	0,9943 <sup>ns</sup>	
Espécies (E)	2	402,3821**	31,1786**	1,3781 <sup>ns</sup>	
Teor de cobre (C)	3	2,3281 <sup>ns</sup>	1,0640 <sup>ns</sup>	1,1287 <sup>ns</sup>	
E x C	6	5,7469 <sup>ns</sup>	0,9090 <sup>ns</sup>	0,6751 <sup>ns</sup>	
Erro	33	2,8782	1,0246	0,8791	
Total	47				
CV (%)		19,59	35,85	23,26	
60 dias					
FV	GL	Altura	Diâmetro	Nº de folhas	
Bloco	3	0,0531**	0,1666 <sup>ns</sup>	2,1859 <sup>ns</sup>	
Espécies (E)	2	695,2055**	26,9120**	10,3206**	
Teor de cobre (C)	3	13,2141**	0,3228**	4,5907**	
E x C	6	4,5181**	0,0935 <sup>ns</sup>	1,7694 <sup>ns</sup>	
Erro	33	1,5844	0,08336	0,7825	
Total	47				
CV (%)		10,77	10,03	17,29	
90 dias					
FV	GL	Altura	Diâmetro	Nº de folhas	
Bloco	3	1,7340 <sup>ns</sup>	0,1521 <sup>ns</sup>	2,3589 <sup>ns</sup>	
Espécies (E)	2	475,1936**	33,3386**	260,4769**	
Teor de cobre (C)	3	114,0351**	1,3258**	17,4804 <sup>ns</sup>	
E x C	6	17,5359**	0,5636**	13,9684 <sup>ns</sup>	
Erro	33	5,3317	0,1169	9,0467	
Total	47				
CV (%)		15,61	10,42	46,75	
120 dias					
FV	GL	Altura	Diâmetro	Nº de folhas	Área foliar
Bloco	3	3,3755 <sup>ns</sup>	0,1605 <sup>ns</sup>	3,1814 <sup>ns</sup>	0,0051 <sup>ns</sup>
Espécies (E)	2	239,9078**	27,0172**	294,2025**	0,2116**
Teor cobre (C)	3	258,0628**	4,9656**	36,0445**	1,3140**
E x C	6	61,9643**	1,3390**	36,2772**	1,5902**
Erro	33	9,9018	0,2095	4,4131	0,0479
Total	47				
CV (%)		18,26	12,94	31,04	34,97

GL = Grau de liberdade; ns = não significativo; \* significativo ao nível de 1%;

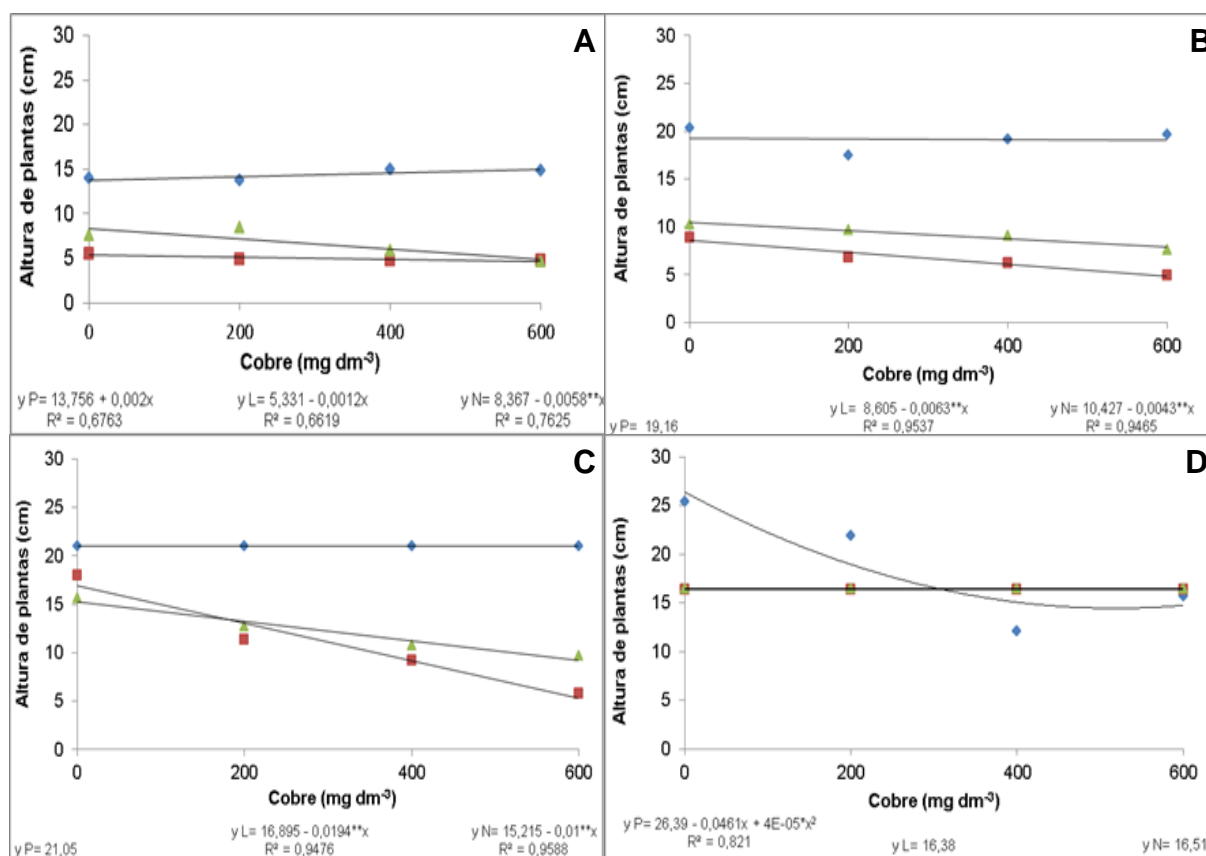
CV = Coeficiente de variação

Aos trinta dias iniciais as plantas se comportaram sem maiores alterações em relação às características morfométricas do diâmetro de caule e número de folhas, de maneira que não houve nenhum dado coletado, porém a altura de plantas das três espécies obtiveram crescimentos distintos, onde se pode observar (Figura 3 A) as diferenças em relação às doses crescentes de contaminação do cobre afetando-as. Isso demonstrando nessa fase inicial que as espécies se comportaram de maneira distinta entre elas, especialmente em razão dos tratamentos não terem recebido nenhum tipo de adubação.

Verifica-se na figura 3 (A, B) que as espécies *L. leucocephala* e *A. indica* se comportaram de maneira semelhante, com menores alturas das plantas a medida que elevou-se a concentração de cobre. No entanto, a altura das plantas foi decrescendo de forma linear, mas o *S. amazonicum* não teve sua altura comprometida tanto aos 60 dias como aos 90 dias, conforme pode-se observar na figura 3 (B, C).

As espécies em cada concentração de cobre aos 120 dias foram afetadas quanto a média de altura de maneira significativa nas três espécies (Figura 3 D), no entanto o *S. amazonicum* se comportou de maneira responsiva as doses de cobre, pois conforme a concentração do contaminante foi aumentando a altura da planta foi reduzindo. Para o *A. indica* as médias de altura se mantiveram em relação às concentrações de cobre, porém foi inferior ao *S. amazonicum*, mas também foram sendo reduzidas, em comparação ao controle que não foi usado o rejeito de cobre e, que ao final não teve diferença. No entanto, a *L. leucocephala* aumentou em altura em relação ao controle na concentração de 200 mg dm<sup>-3</sup>, mas ao final do experimento se comportou de forma semelhante estatisticamente as demais espécies.

De acordo com o que se observa na figura 3 (D) referente às médias de altura aos 120 dias, as espécies *L. leucocephala* e *A. indica* obtiveram a mesma média, já o *S. amazonicum* se comportou conforme as doses de cobre foram sendo acrescentadas a espécie foi reduzindo em altura, como constatado na equação de regressão, ou seja, altura média das três espécies foram iguais aos 120 dias na maior concentração de cobre.



**Figura 3.** Altura média de plantas de *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (□) e *A. indica* (△) (A) para 30, (B) 60, (C) 90 e (D) 120 dias usando no substrato concentrações de cobre.

Marques et al. (2004) investigando a espécie *S. amazonicum* puderam constatar que aos 30 dias a altura das plantas com omissão de macro e micronutrientes atingiram alturas que variaram de 19 a 23 cm em todos os tratamentos e, que isso comprova o quanto é importante para a boa formação de mudas de espécies silviculturais. Para espécies de crescimento inicial rápido, como o *S. amazonicum*, há uma exigência maior da quantidade de N em curto intervalo de tempo, que, se não suprido, por fertilizantes minerais, fixação biológica ou mineralização de matéria orgânica, resultará em prejuízo no crescimento inicial destas espécies (LIMA, 1994), confirmando, assim, o pequeno crescimento inicial das espécies vegetais nesta pesquisa, no entanto, o *S. amazonicum* manteve uma altura média superior a 13 cm na dosagem de 600 mg dm<sup>-3</sup>, e que mesmo sem ter ocorrido adubação esta espécie teve um bom desempenho nestas condições, o que não ocorreu com *L. leucocephala* e *A. indica*.

Para Silva et al. (2010) investigando a tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* Spreng. Taub.) inoculada com fungo em solo com excesso de cobre observaram que a altura das mudas de canafístula apresentaram certa tolerância ao efeito do cobre até a dose 150 mg dm<sup>-3</sup>, confirmando dessa maneira com esta pesquisa que apenas o *S. amazonicum* tolerou o aumento na dose de cobre até os 90 dias sem comprometer a média de altura, que esteve superior a 20 cm na dose de 600 mg dm<sup>-3</sup>.

Silva et al. (2014) investigando as espécies barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* Mart.) e cácia (*Cassia multijuga*) afirmaram que as doses testadas de cobre não alteraram a qualidade das mudas da *C. multijuga*, enquanto o *S. polyphyllum* mantém a qualidade de mudas até 300 mg dm<sup>-3</sup> de cobre adicionado ao solo.

Maryam et al. (2015) estudando plantas tropicais em solo contaminado por cobre através de lodo de esgoto constataram que o incremento de altura ocorreu de maneira diferente entre as espécies pinhão-manso (*Jatropha curcas*), acácia (*Acacia mangium*) e mama-cadela (*Hopea odorata*), mas que em concentração de 120 mg dm<sup>-3</sup> as referidas espécies obtiveram crescimento normal aos 90 dias o que indicou que mesmo com esta concentração de cobre, provavelmente parâmetros físico-químicos do lodo tenham propriedades capazes de melhorar a absorção de nutrientes essenciais existentes no próprio esgoto. No caso desta pesquisa as espécies *L. leucocephala* e *A. indica* tiveram suas alturas médias comprometidas a medida que as doses de cobre aumentavam, porém o *S. amazonicum* aos 90 dias na maior concentração (600 mg dm<sup>-3</sup>) obteve altura média próxima a recomendada para a espécie, que é de 25 a 35 cm para o plantio definitivo no campo.

Para Majid et al. (2011) em substrato contaminado por cobre a *A. mangium* teve crescimento em altura normal mesmo com a concentração crescente de cobre, porém com a menor concentração de 50 mg dm<sup>-3</sup> o desempenho foi melhor.

Silva et al. (2010) pesquisando a tolerância de canafístula (*Peltophorum dubium*) em solo com excesso de cobre, concluíram que com concentração de 450 mg dm<sup>-3</sup> as plantas atingiram uma altura de 16,75 cm, corroborando com esta pesquisa que para as três espécies a altura ficou em torno de 15 cm na mesma concentração.

Silva et al. (2012) trabalhando com concentrações crescentes de cobre com as espécies timbó (*Ateleia glazioviana*) e dedaleiro (*Lafoensia pacari*) estas atingiram

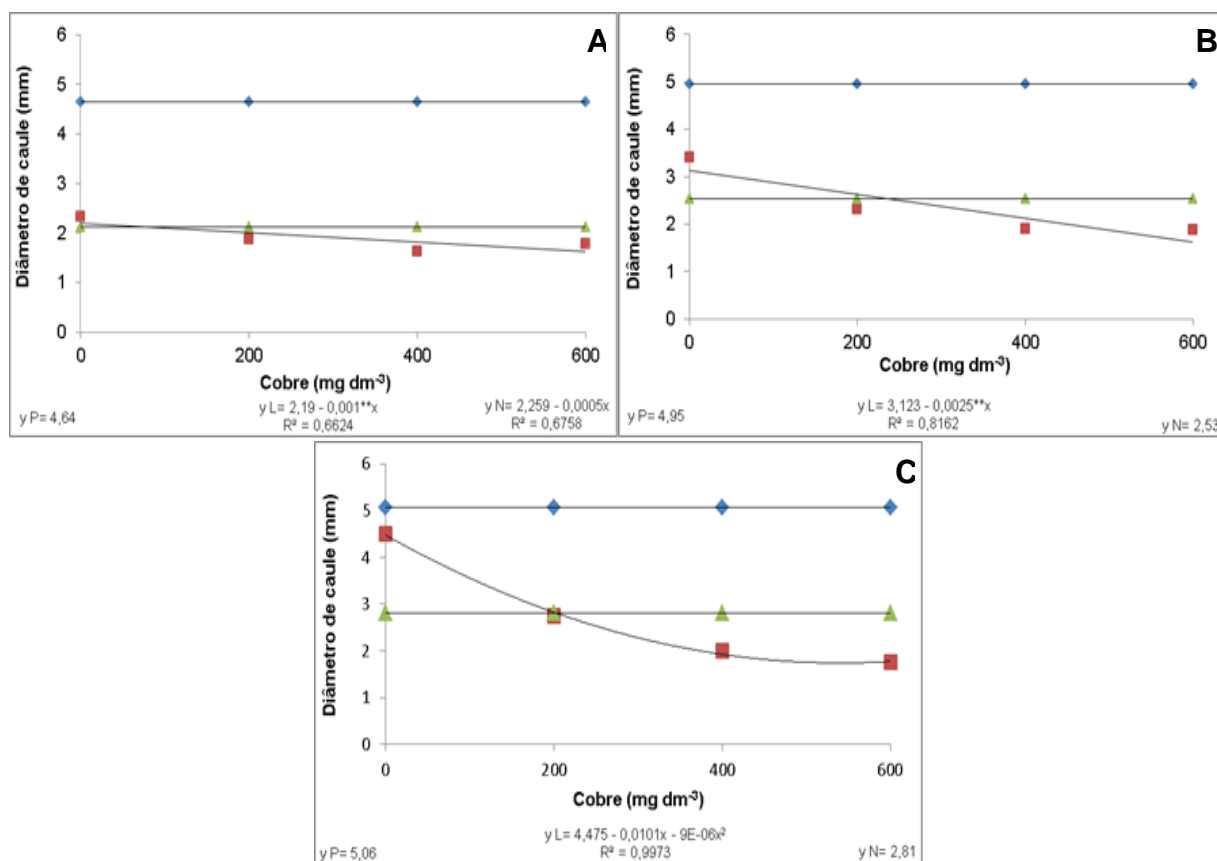
alturas de 9,08 cm e 19,68 cm, respectivamente, para uma concentração de 192 mg dm<sup>-3</sup> de cobre, diferindo com a presente pesquisa onde o *S. amazonicum* alcançou uma altura de 21,89 cm, a *L. leucocephala* 27,21 cm e o *A. indica* com 16,18 cm em concentração de 200 mg dm<sup>-3</sup>, isso comparado ao *A. glazioviana*, mas corroborando com o resultado encontrado no *L. pacari*, estando as médias do *S. amazonicum* e do *A. indica* aproximadas ao alcançado no *L. pacari*. Porém, em comparação com a *L. leucocephala*, a altura desta foi bem superior ao *L. pacari*.

Com relação ao diâmetro de caule, observa-se que as três espécies se comportaram de modo semelhante quando submetidas às concentrações de cobre, contudo à medida que se elevou a concentração de cobre de 200 a 600 mg dm<sup>-3</sup> apenas a *L. leucocephala* teve redução no diâmetro de caule (Figura 4 A, B, C).

As espécies *S. amazonicum* e *A. indica* tiveram o mesmo comportamento mesmo que com pouca variação entre 60 e 90 dias (Figura A, B). De forma geral, observou-se que os valores de diâmetro de caule nas plantas de *S. amazonicum* e *A. indica* foram menos alterados em relação às plantas de *L. leucocephala*.

O diâmetro médio de caule no *S. amazonicum* se manteve mesmo com o acréscimo do cobre ao substrato, no entanto, foi estatisticamente diferente da *L. leucocephala* e o do *A. indica* em todas as concentrações obtendo valores bem superiores, ilustrado na figura 4 (A, B, C).

O comportamento entre as espécies em relação ao diâmetro médio de caule foi o seguinte: *S. amazonicum* > *A. indica* > *L. leucocephala*.



**Figura 4.** Diâmetro médio do caule para (A) 60, (B) 90 e (C) 120 dias de *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (□) e *A. indica* (△) em concentrações de cobre.

Caione et al. (2012) investigando o crescimento de *S. amazonicum* em substrato com N, P e K obtiveram resultados satisfatórios em relação ao diâmetro de caule com valor de 4,84 mm, este parâmetro é relevante, pois segundo Souza et al. (2006) relatando alguns pesquisadores este é um parâmetro importante para estimar a sobrevivência de mudas de espécies florestais. Segundo Ribeiro et al. (2001) para eucalipto o valor ideal é de 2,0 mm aos 90 dias, o que corrobora com esta pesquisa para a espécie *A. indica* que obteve um valor um pouco superior mesmo com o aumento do contaminante, porém, para *L. leucocephala* o comportamento foi diferente pois o diâmetro desta espécie foi inferior ao valor recomendado para o eucalipto.

Segundo Silva et al. (2012) o aumento de concentração de cobre para *A. glazioviana* e *L. pacari* não aumentou o diâmetro das espécies estudadas atingindo 3,74 cm e 2,85 cm, respectivamente, na concentração de 192 mg dm<sup>-3</sup>, de maneira que na concentração bem superior (600 mg dm<sup>-3</sup>) deste trabalho o *S. amazonicum*, a

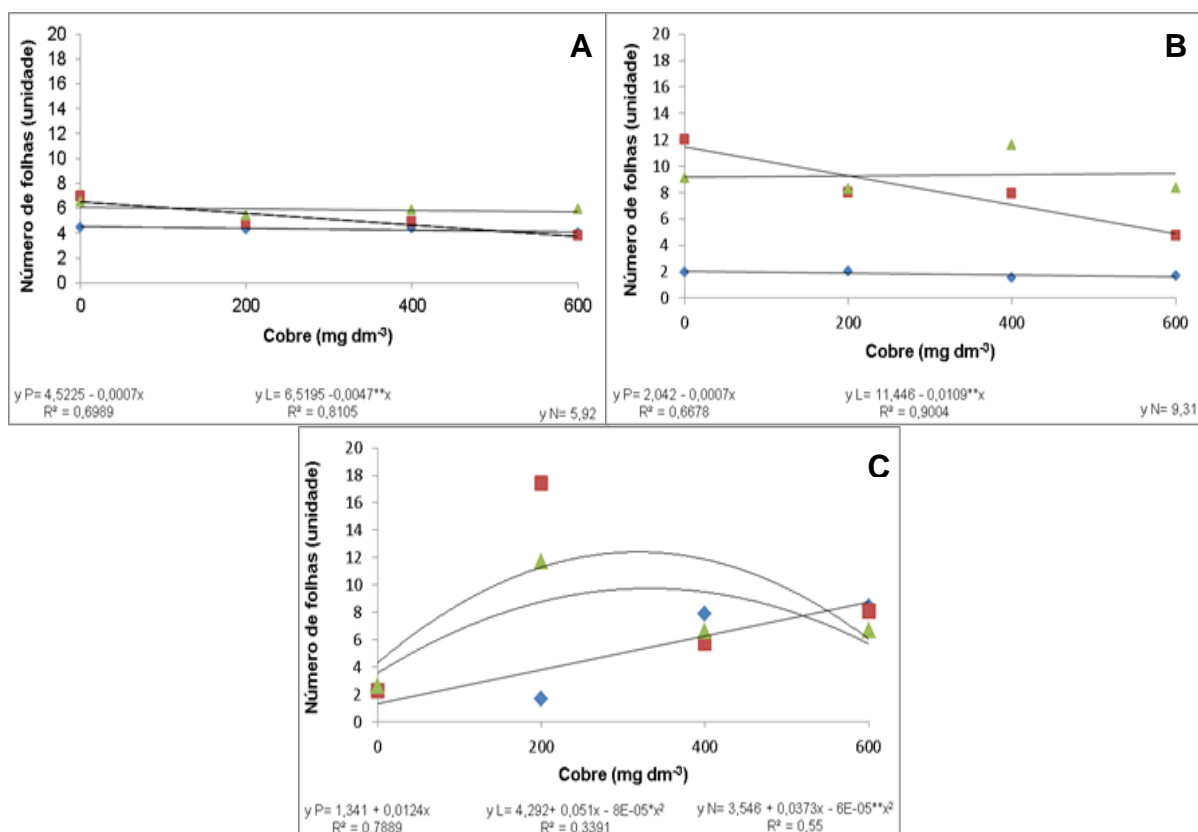
*L. leucocephala* e o *A. indica* obtiveram os seguintes diâmetros: 5,0 cm, 1,75 cm e 2,25 com diferença estatística, mas que ficou entre as médias encontradas dos autores supracitados com uma concentração bem inferior ao utilizado neste trabalho.

Na figura 5 (A) visualiza-se que prevaleceu as médias do número de folhas aos 60 dias para *S. amazonicum* e *A. indica*, sem que as concentrações tivessem interferência na redução das folhas. No entanto, a *L. leucocephala* se comportou de maneira diferente, pois, conforme elevou-se a concentração do cobre, houve diminuição de folhas, ajustando-se ao modelo linear de regressão.

Já na figura 5 (B), pode-se visualizar que aos 90 dias a espécie *S. amazonicum*, apesar de manter uma média de número de folhas constante nas concentrações, ocorreu decréscimo em comparação aos 60 dias.

A espécie *A. indica* obteve resultado bem distinto, pois aumentou praticamente o dobro do resultado anterior do número de folhas e se manteve com uma média constante sem ter sofrido a interferência das concentrações. Já *L. leucocephala* para o mesmo período de 90 dias ocorreu a mesma tendência do período anterior (60 dias), com perda de folhas com o aumento da concentração de cobre, inclusive, reduzindo a média do número folhas mais do que aos 60 dias, possivelmente aos baixos teores de nutrientes no substrato.

Aos 120 dias as espécies se comportaram ao final do experimento de maneira semelhante ao atingir um número de folhas próximas na maior concentração de cobre, no entanto, tendo pequenas diferenças de acordo com as concentrações, conforme ilustra a figura 5 (C) e as equações de regressão.



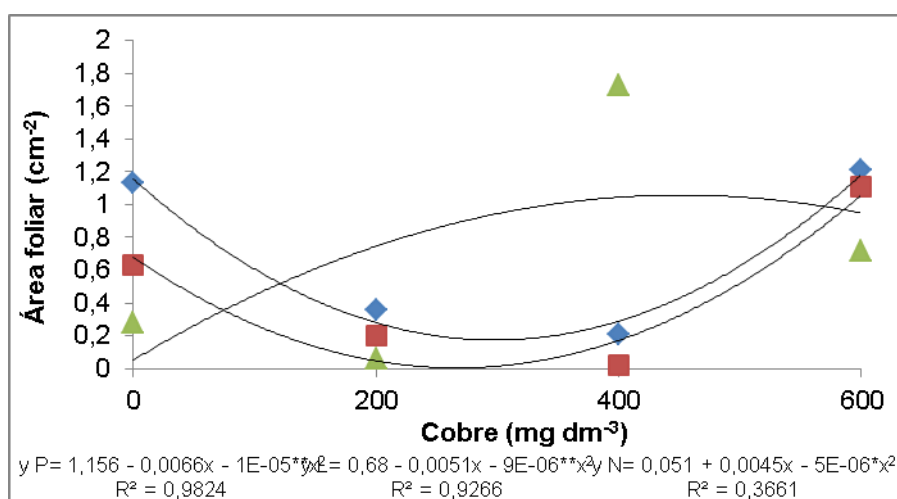
**Figura 5.** Número médio de folhas aos 60 (A), 90 dias (B) e 120 dias (C) de *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (□) e *A. indica* (△) em concentrações de cobre.

Matos et al. (2009) estudando o *S. amazonicum* com substratos orgânicos relataram número de folhas aos 60 (3 folhas) e 90 dias (8 folhas), porém foram inferiores aos encontrados na pesquisa aos 60 dias (média de 4,31 folhas), pois a mesma espécie superou em número de folhas. No entanto aos 90 dias os autores relatam uma redução atribuída, possivelmente ao contaminante. Assim, com a diminuição do número de folhas do *S. amazonicum* esta pode ser afetada tanto na altura como no diâmetro de caule, como foi constatado na presente pesquisa.

Lins et al. (2007) investigando *L. leucocephala* e fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) em substrato com rejeito de mineração de cobre comprovaram que o número de folhas alcançando (38,4) não diferiu do tratamento controle sem inoculação dos fungos FMAs (32,6), mas, em comparação com esta pesquisa o

número de folhas foi superior, porém, teve uma redução em relação a concentração de cobre.

O aumento na concentração de cobre ao atingir valores aproximados de 400 mg dm<sup>-3</sup> a área foliar média das plantas de *S. amazonicum* e *L. leucocephala* teve drástica redução, mas a partir daí estas passaram a reagir e obtiveram crescimento de área foliar. Já o *A. indica* teve acréscimo até 400 mg dm<sup>-3</sup>, mas após o aumento da concentração, esta espécie reduziu a área foliar, mas não de forma drástica, como confirmam as equações quadráticas para as espécies (Figura 6).



**Figura 6.** Área foliar média em *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (◻) e *A. indica* (△) em concentrações de cobre, aos 120 dias.

Soares et al. (2000) estudando *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre, chegaram a conclusão que a área foliar de ambas espécies tiveram decréscimo acentuado na área foliar, quando comparado com esta pesquisa.

Menegaes (2015) estudando espécies floríferas em solo contaminado com cobre constatou que a área foliar foi afetada na concentração de 700 mg dm<sup>-3</sup> atingindo um total de 624,5 cm<sup>2</sup>, o que está bem diferente para estas espécies estudadas, pois os valores de área foliar estão bem abaixo das floríferas.

A produção de fitomassa seca (Tabela 5) de *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* foi afetada pelas concentrações de cobre, causando redução tanto nos compartimentos radiculares quanto nos da parte aérea, provocando assim diminuição no crescimento. Foram observadas reduções de 52,28%, 91,9% e 66,37% para

matéria seca total para *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*, respectivamente, quando submetidas as concentrações progressivas do cobre, desde o controle (sem adição de rejeito) a 600 mg dm<sup>-3</sup>.

Em comparação entre as espécies a partir da *L. leucocephala* a qual obteve a maior fitomassa total, *S. amazonicum* e *A. indica* nas concentrações de cobre sofreram reduções na ordem os seguintes percentuais de fitomassa seca total para o controle de 21,2% e 68,58% para *S. amazonicum* e *A. indica*, respectivamente. Para 200 mg dm<sup>-3</sup> as reduções foram de 23,91% para o *S. amazonicum* e 47,52% para o *A. indica*. Já para a concentração de 400 mg dm<sup>-3</sup> as plantas de *S. amazonicum* e *A. indica* atingiram as reduções de fitomassa de 39,14% e 54,09%. No entanto, na maior concentração de 600 mg dm<sup>-3</sup> o *S. amazonicum* atingiu a maior fitomassa e assim passou a servir de parâmetro de comparação na redução de fitomassa da *L. leucocephala* e do *A. indica* com as seguintes reduções 78,47% e 71,89%, respectivamente.

Importante registrar que mesmo na maior concentração de cobre o *S. amazonicum* teve a maior produção de fitomassa seca nos compartimentos radiculares, aéreos e total em relação aos outras duas espécies, porém isso não significa que a fitotoxicidade do cobre não tenha afetado o *S. amazonicum*, já que esta teve uma redução de fitomassa em relação ao controle. No entanto outros parâmetros podem ter influenciado a produção de fitomassa nas espécies estudadas, como a fertilidade do solo, pH, matéria orgânica, entre outros.

**Tabela 5.** Fitomassa seca média radicular, aérea e total (g) aos 120 dias das espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.

Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	<i>S. amazonicum</i>			<i>L. leucocephala</i>			<i>A. indica</i>		
	PR	PA	T	PR	PA	T	PR	PA	T
<b>0</b>	1,44	3,10	<b>4,54</b>	3,16	2,63	<b>5,79</b>	0,67	1,13	<b>1,80</b>
<b>200</b>	0,71	1,03	<b>1,74</b>	1,30	0,99	<b>2,29</b>	0,45	0,78	<b>1,23</b>
<b>400</b>	0,79	0,84	<b>1,63</b>	1,28	1,41	<b>2,69</b>	0,58	0,65	<b>1,23</b>
<b>600</b>	0,97	1,19	<b>2,16</b>	0,31	0,15	<b>0,46</b>	0,21	0,37	<b>0,58</b>

\* PR: fitomassa parte radicular; PA: fitomassa parte aérea; T: fitomassa total.

A pequena quantidade de fitomassa nas espécies ora estudadas pode ser em razão de diversos fatores, entre estes, a baixa fertilidade do substrato, bem como não ter sido realizado nenhuma adubação durante o período experimental e o pH que ao final do experimento se encontrou numa faixa que variou de 7,82 (controle) a 8,82 (maior concentração de 600 mg dm<sup>-3</sup>), Malavolta et al. (1989) afirmam que elementos como Fe, Cu, Mn e Zn à medida que aumenta o pH a absorção destes elementos diminuem, acarretando dessa maneira uma menor produção de fitomassa.

Taiz e Zeiger (2013) atribuem uma baixa fitomassa à possível tolerância das espécies ao contaminante, adquirida através de adaptações bioquímicas que permitem à planta tolerar concentrações elevadas desses elementos. Essa tolerância pode ser conseguida através da redução do transporte através da membrana, exclusão, formação de peptídeos ricos em grupos tiólicos (fitoquelatinas e metalotioneínas), quelação por ácidos orgânicos e aminoácidos.

Majid et al. (2011) pesquisando a absorção de metais pesados e translocação por acácia (*Acacia mangium*) em solo contaminado com cobre, encontraram valores de fitomassa seca total da referida espécie que variaram de 121,0 g (controle) a 128,48 g (400 mg dm<sup>-3</sup>), valores bem superiores obtidos por esta pesquisa. Estes resultados sugerem que as concentrações altas de cobre no solo, efetivamente afetaram a produção de fitomassa nas três espécies. A ordem de produção de fitomassa seca nas espécies estudadas e na maior concentração de cobre foi: *S. amazonicum* > *A. indica* > *L. leucocephala*.

### 3.2 Teores de Cobre nos Compartimentos das Plantas

O aumento das concentrações de cobre influenciou os teores do elemento nos diferentes compartimentos das três espécies estudadas (Tabela 6). Em geral, a concentração de cobre nas diferentes partes das plantas para as três espécies, ocorreu no sentido acrópeto. Os maiores teores de cobre foram encontrados nas raízes das plantas *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* com valores que variaram de 39 a 527 mg dm<sup>-3</sup> para o *S. amazonicum*, de 32 a 269 mg dm<sup>-3</sup> para a *L. leucocephala* e de 74 a 147 mg dm<sup>-3</sup> para o *A. indica*.

Os teores totais seguiram a tendência em todas as concentrações comparadas entre as espécies, o aumento das concentrações de cobre promoveram acréscimo dos teores na seguinte ordem: *S. amazonicum* > *L. leucocephala* > *A. indica*.

**Tabela 6.** Teores de cobre ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) em folhas apicais (FA), folhas intermediárias (FI), caules (C) e raízes (R) em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre e, respectivos percentuais.

Cu ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	<i>S. amazonicum</i>					<i>L. leucocephala</i>					<i>A. indica</i>				
	FA	FI	C	R	T	FA	FI	C	R	T	FA	FI	C	R	T
<b>0</b>	15	7	4	13	<b>39</b>	12	7	5	8	<b>32</b>	54	8	5	7	<b>74</b>
(%)	38,46	17,95	10,26	33,33	100	37,5	21,88	15,62	25,00	100	72,98	10,82	6,75	9,45	100
<b>200</b>	13	14	10	180	<b>217</b>	7	17	8	150	<b>182</b>	10	9	5	88	<b>112</b>
(%)	5,99	6,46	4,61	82,94	100	3,85	9,35	4,39	82,41	100	8,93	8,03	4,46	78,58	100
<b>400</b>	18	17	9	195	<b>239</b>	58	15	10	155	<b>238</b>	12	7	6	122	<b>147</b>
(%)	7,53	7,11	3,77	81,59	100	24,38	6,30	4,20	65,12	100	8,16	4,76	4,09	82,99	100
<b>600</b>	18	18	11	480	<b>527</b>	61	28	15	165	<b>269</b>	38	8	57	28	<b>131</b>
(%)	3,42	3,42	2,08	91,08	100	22,67	10,42	5,58	61,33	100	29,01	6,11	43,51	21,37	100

A produção de fitomassa é importante para fitorremediação porque se as plantas produzem mais fitomassa, maiores quantidades de metais pesados serão absorvidos do solo dependendo do potencial que estas possam ter em fitorremediar.

Andreazza et al. (2015) avaliando as espécies picão-preto (*Bidens pilosa*) e língua-de-ovelha (*Plantago lanceolata*) para fitoestabilização e fitorremediação de solos contaminados com cobre que cresceram vigorosamente em Neossolos e Cambissolos de vinhedos contaminados com cobre, apresentaram baixo crescimento no resíduo de mineração de cobre contendo  $479 \text{ mg dm}^{-3}$ , tanto em altura quanto em produção de fitomassa seca nas raízes e parte aérea.

Segundo Sharmaa et al. (2007) a absorção e acumulação de metais pesados nos tecidos vegetais dependem de muitos fatores. Um acúmulo significativo de Cu, Zn e Cr no sistema radicular em comparação com as partes da parte aérea pode indicar uma eficiência na contenção da translocação e/ou baixa capacidade de controle na sua absorção, impedindo-os de alcançar metabolicamente compartimentos mais ativos da parte aérea (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; ZHANG et al., 2010). Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Sinha e Gupta (2005) que demonstraram que o acúmulo de metais pesados varia de uma parte para outro dentro dos tecidos vegetais, o que se pode confirmar com esta pesquisa.

Dias et al. (2010) afirmaram que o acúmulo e distribuição de Cu e outros metais pesados na parte radicular pode ter relação direta com mecanismos de

compartimentalização que impedem os metais de serem transportados para a parte aérea. Branzini et al. (2012) pesquisando a absorção e translocação de Cu, Zn e Cr em sesbânia (*Sesbania virgata*) chegaram a conclusão que a presença de outros metais em níveis altos promoveu a redução de fitomassa, neste caso a presença do Zn. Corroborando com esta pesquisa, pois o cobre ficou compartimentalizado tanto na parte aérea como na radicular, porém em teores bem superiores no compartimento radicular, na concentração de 600 mg dm<sup>-3</sup> para as espécies *S. amazonicum* e *L. leucocephala*, porém para o *A. indica* ocorreu o inverso.

### 3.3 Índice e Fator de Translocação, Coeficiente de Fitoextração

O índice de translocação (IT) e o fator de translocação (FT) são parâmetros usados para identificar a capacidade dos vegetais com potencial de translocar nos compartimentos aéreos e radiculares os metais pesados. Observa-se na tabela 7 que a *S. amazonicum* apresentou o IT variando de 24,80% no controle a 8,92% em concentração de 600 mg dm<sup>-3</sup>. No substrato contendo uma menor concentração a planta conseguiu retirar um maior percentual do cobre existente, no entanto, conforme se elevou o cobre no substrato o IT e o FT foram reduzidos.

**Tabela 7.** Índice de translocação (IT) e fator de translocação (FT) em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.

Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	<i>S. amazonicum</i>		<i>L. leucocephala</i>		<i>A. indica</i>	
	IT (%)	FT	IT (%)	FT	IT (%)	FT
0	24,80 (100%)	0,33	75,00 (100%)	3,00	90,54 (100%)	9,57
200	17,05 (68,95)	0,20	17,58 (23,44)	0,21	21,42 (23,66)	0,27
400	18,41 (74,23)	0,22	34,87 (46,49)	0,53	17,00 (18,77)	0,20
600	8,92 (35,96)	0,10	38,66 (51,54)	0,63	78,62 (86,83)	3,68

A *L. leucocephala* apresentou comportamento diferente, pois reduziu na concentração de 200 mg dm<sup>-3</sup>, mas, cresceu nas concentrações de 400 e 600 mg dm<sup>-3</sup> em 34,87 e 38,66%, respectivamente. O que ocorreu da mesma maneira para o FT de 0,21 e 0,63. Para a espécie *A. indica* os resultados para o IT descendentes para as concentrações de 200 e 400 mg dm<sup>-3</sup> de 21,42 e 17,00%, mas na maior concentração

(600 mg dm<sup>-3</sup>) a espécie teve um acréscimo considerável, o que ocorreu mesma tendência com o FT.

Em relação à testemunha para as três espécies o IT e FT foram 24,80% (0,33), 75,00% (3,00) e 90,54% (9,57) para *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*, respectivamente, com isso mostrando que numa pequena concentração de cobre tanto o IT como o FT são indicativos de que o cobre está sendo translocado normalmente.

Como o IT e o FT podem ser usados para estimar o potencial de espécies vegetais para fitorremediação estas são as primeiras avaliações, para posteriormente, se proceder com avaliações da capacidade das plantas de efetivamente retirar metal pesado do solo, através do coeficiente de extração (CE).

Em estudos feitos por Andreazza e Camargo (2011) em áreas contaminadas com cobre e cultivado com mamona (*Ricinus communis* L.) foram encontrados valores TF baixos quando as plantas foram cultivadas no rejeito de mineração, de TF de 0,01, 0,01 e 0,03, respectivamente. O que diferencia desta pesquisa onde os valores de TF são bem superiores, ou seja, que em relação à *R. communis* as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* se apresentam com maior capacidade de translocar o cobre em seus compartimentos aéreos e radiculares.

Chaves et al. (2010) pesquisando pinhão-manso (*Jatropha curcas*) identificaram que o IT do cobre em tratamentos contendo concentrações de 0 a 100 mg dm<sup>-3</sup> não foi influenciado de maneira significativa pelos tratamentos, porém, nas plantas submetidas às maiores concentrações (50, 75 e 100 mg dm<sup>-3</sup>), a translocação do mesmo, das raízes para a parte aérea, foi menor do que nas demais.

Segundo Kabata-Pendias (2010), o Cu não é prontamente móvel na planta devido permanecer ligado fortemente às paredes celulares das raízes, sendo os órgãos jovens os primeiros a desenvolverem sintomas de deficiência de Cu. Mas, a sua mobilidade nos tecidos vegetais pode aumentar com maior suprimento do elemento, porém nesta pesquisa o IT foi progressivamente decrescendo conforme foi aumentando a contaminação. Vale ressaltar que, a partir do tratamento correspondente a 200 mg dm<sup>-3</sup>, na medida em que aumentaram as doses de Cu aplicadas ao substrato, diminuiu o IT para o *S. amazonicum*; para a *L. leucocephala* ocorreu uma diminuição, no entanto na concentração de 600 mg dm<sup>-3</sup> o valor foi superior e para o *A. indica* ocorreu a mesma tendência na concentração maior de

cobre um maior IT, o que se justifica na variação no índice de translocação do elemento.

O coeficiente de extração (CE) é um parâmetro relevante para identificar espécies capazes de retirar metal pesado do solo e translocar para parte aérea. Caso isto não ocorra, e o metal após absorvido, fique retido na área radicular este mecanismo é denominado de fitoestabilização.

Na tabela 8 visualiza-se resultados encontrados para o *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*, se pode observar que o *S. amazonicum* no controle obteve um CE de 23,63% para a parte aérea e para a radicular 11,80%, do cobre contido no substrato que não havia sido contaminado pelo rejeito, mas que retirou do solo 0,02 mg dm<sup>-3</sup> para parte aérea e a radicular 0,01 mg dm<sup>-3</sup> deste.

Nas concentrações subsequentes de 200, 400 e 600 mg dm<sup>-3</sup>, os valores de CE foram numa ordem decrescente de 0,73, 0,59 e 0,35% (aérea) e 3,58, 2,52 e 3,59%, respectivamente, denotando assim, que quanto maior contaminação do cobre, inversamente ocorre a redução do CE para o compartimento aéreo, mas, para o radicular, apesar da redução na concentração mais elevada (600 mg dm<sup>-3</sup>) ocorreu acréscimo, com uma absorção de 0,3, podendo se inferir que o cobre ficou retido em uma maior percentagem e quantidade nas raízes do *S. amazonicum*.

A *L. leucocephala* teve comportamento inicial parecido com o *S. amazonicum* em relação ao CE, do controle (26,66%-aérea e 8,88%-radicular) e mesmas quantidades absorvidas. Para a concentração de 600 mg dm<sup>-3</sup> tanto na parte aérea (1,26%) como a radicular ocorreu tendência ao equilíbrio, no CE, porém nas quantidades absorvidas os valores forem reduzidos em aproximadamente 50% comparados ao *S. amazonicum*. Para o *A. indica* o CE no controle foi seguindo a mesma tendência das outras duas espécies estudadas (55,83%-aérea e 5,83%-radicular), mas absorvendo pequena quantidade do elemento cobre. Mas quando da maior contaminação o *A. indica* obteve 0,79% e 0,21% na parte aérea e radicular, com absorção de 0,10 e 0,03 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente.

**Tabela 8.** Coeficiente de extração (CE) e quantidade extraída de cobre ( $\text{mg dm}^{-3}$ ) em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.

Concentrações		<i>S. amazonicum</i>				<i>L. leucocephala</i>				<i>A. indica</i>			
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	PA		PR		PA		PR		PA		PR		
	(%)	(mg dm <sup>-3</sup> )	(%)	(mg dm <sup>-3</sup> )	(%)	(mg dm <sup>-3</sup> )	(%)	(mg dm <sup>-3</sup> )	(%)	(mg dm <sup>-3</sup> )	(%)	(mg dm <sup>-3</sup> )	
0	23,63	(0,02)	11,81	(0,01)	26,66	(0,02)	8,88	(0,01)	55,83	(0,07)	5,83	(0,01)	
200	0,73	(0,04)	3,58	(0,18)	0,77	(0,03)	3,61	(0,15)	0,36	(0,02)	1,33	(0,09)	
400	0,59	(0,05)	2,52	(0,19)	1,17	(0,08)	2,18	(0,15)	0,30	(0,02)	1,47	(0,12)	
600	0,35	(0,05)	3,59	(0,30)	1,26	(0,14)	1,48	(0,16)	0,79	(0,10)	0,21	(0,03)	

\* PA: fitomassa parte aérea; PR: fitomassa parte radicular.

Zancheta et al. (2011) pesquisando fitoextração de cobre por milheto (*Pennisetum glaucum* cv. BRS 1501), sorgo (*Sorghum bicolor* cv. Vassoura), crotalária (*Crotalaria juncea* cv. Juncea) e feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) cultivadas em solução nutritiva, afirmam que o Cu foi acumulado preferencialmente no sistema radicular e, portanto, translocado em baixa proporção para a parte aérea, o que embora seja considerada uma estratégia das plantas para aumentar a tolerância ao metal, será limitante para o emprego da fitoextração. O maior potencial de transporte do metal para a parte aérea foi observado em *C. ensiformis*, o que em conjunto com a alta concentração de cobre na parte aérea e acúmulo do metal, faz com que essa espécie tenha potencial para ser utilizada em programas de fitoextração deste elemento.

A concentração mais elevada de cobre nas raízes encontrados nas três espécies (*S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*) estudadas nesta pesquisa está corroborando com resultados encontrados em outros estudos (JIANG et al., 2004; XIA; SHEN, 2007), o que tem sido atribuído ao baixo transporte do metal para o compartimento aéreo.

De acordo com Lasat (2002) a retenção de cobre nas raízes é um mecanismo de tolerância ao excesso do metal, ocorrendo, por exemplo, a imobilização do metal na parede celular por carboidratos extracelulares, e conseqüentemente, a reduzida presença de íons livres para transporte à parte aérea.

Andrade et al. (2010) estudando *C. ensiformes* em solo que recebeu quantidades crescentes de cobre, também verificaram potencial fitoextrator, pois a

espécie foi capaz de translocar o metal do solo para o compartimento aéreo. Conforme os autores supracitados, a habilidade do *C. ensiformes* em acumular o cobre está relacionada à produção de fitoquelatinas no tecido foliar, que reduzem a concentração de metal livre no citosol, limitando sua solubilidade e reatividade (LASAT, 2002; OLIVA et al., 2010).

Característica desejável para vegetais fitoextratores é a capacidade de transporte do elemento absorvido pelas raízes para o compartimento aéreo, segundo Jabeen et al. (2009), uma vez que esta será a parte preferencial e mais facilmente removida da área que está sendo remediada que no caso de essências florestais o metal ficará, principalmente nos caules e, que sendo usados na confecção de móveis, estacas, enfim na indústria de móveis, este metal não entrará na cadeia trófica, no caso deste estudo esta observação serve para o *S. amazonicum* e o *A. indica*. Em estudo realizado por Soares et al. (2000) com as espécies de eucaliptos (*Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla*) em solução nutritiva encontraram baixa CE no transporte do cobre do solo para parte aérea, mantendo quantidade considerável nas raízes o que se pode inferir que, deste modo, embora a maior retenção de cobre retido nas raízes e, por sua vez, menor transporte para a parte aérea seja um importante mecanismo de tolerância das plantas a concentrações excessivas do metal, esse processo será, ao mesmo tempo, um fator limitante para o emprego da técnica da fitoextração para a remediação de áreas contaminadas com cobre.

Segundo Marques et al. (2018) trabalhando com plantas de jatobá (*Hymenaea courbaril*), canafístula (*Peltophorum dubium*) e óleo bálsamo (*Myroxylon peruiferum*) com concentração de Cu no solo ( $400 \text{ mg dm}^{-3}$ ), o crescimento das plantas não foi afetada negativamente. Ainda segundo os autores, é possível que este resultado esteja relacionado com os mecanismos que estas plantas possam ter utilizado para prevenir a translocação do Cu, acumulando os metais no sistema radicular, o que indica uma maior tolerância destas espécies para Cu.

Portanto, em termos comparativos, Kumar et al. (1995) afirmam que em solo contaminado com cobre, a mostarda-da-Índia (*Brassica juncea*) obteve um coeficiente de extração de 7, muito superior aos valores encontrados neste experimento.

### 3 CONCLUSÕES

As espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* em relação ao crescimento morfométrico alcançaram aos 120 dias e independente das doses de cobre uma altura, número de folhas e área foliar valores semelhantes, apenas ocorreu diferença no diâmetro do caule.

As espécies produziram fitomassa seca radicular e aérea na maior concentração de cobre ( $600 \text{ mg dm}^{-3}$ ), na seguinte ordem: *Schizolobium amazonicum* > *Azadirachta indica* > *Leucaena leucocephala*.

Os teores de cobre na parte radicular em relação a parte aérea para *Schizolobium amazonicum* e *Leucaena leucocephala* foram superiores em relação as concentrações de 200, 400 e  $600 \text{ mg dm}^{-3}$ .

A espécie *Azadirachta indica* em termos dos teores de cobre nas folhas, apicais, intermediárias, caule e raiz se comportou diferente na maior concentração ( $600 \text{ mg dm}^{-3}$ ).

Os coeficientes de fitoextração exceto no solo sem cobre, foram superiores nas raízes para as três espécies, podendo-se assim inferir que estas tem potencial para fitoestabilizar áreas degradadas por cobre.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICHEQUER, A.D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 22, p. 21-26, 1998.

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. **Contaminação química e biorremediação do solo**. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; SCHAEFER, C. E., eds. Tópicos em ciência do solo. Viçosa, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 299-352.

ANDRADE, S. A. L.; GRATÃO, P. L.; AZEVEDO, R. A.; SILVEIRA, A. P. D.; SCHIAVINATO, M. A.; MAZZAFERA, P. Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, n.68, p.198-207, 2010.

ANDREAZZA, R.; BORTOLON, L.; PIENIZ, S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Evaluation of two Brazilian indigenous plants for phytostabilization and phytoremediation of copper-contaminated soils. **Braz. J. Biol.**, 2015.

ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O. Fitorremediação de áreas contaminadas com cobre utilizando plantas de mamona. **Ciências Agrárias**, v. 7, 2011.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Colin Baird; trad. Maria Angeles Lobo Recio e Luiz Carlos Marques Carrera. 2ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

BRANZINI, A.; GONZÁLEZ, R. S.; ZUBILLAGA, M. Absorption and translocation of copper, zinc and chromium by *Sesbania virgate*. **Journal of Environmental Management**, v.102, p.50-54, 2012.

CAIONE, G.; LANGE, A.; SCHONINGER, E. L. Crescimento de mudas de *Schizolobium amazonicum* (Huber ex Ducke) em substrato fertilizado com nitrogênio, fósforo e potássio. **Sci. For.**, v. 40, n. 94, p. 213-221, 2012.

CAIRES, S. M.; FONTES, M. P. F.; FERNANDES, R. B. A.; NEVES, J. C. L.; FONTES, R. L. F. Desenvolvimento de mudas de cedro-rosa em solo contaminado com cobre: tolerância e potencial para fins de fitoestabilização do solo. **Revista Árvore**, v.35, n.6, p.1181-1188, 2011.

CHAIGNON, V.; HINSINGER, P. A. Biotest for Evaluating Copper Bioavailability to Plants in a Contaminated Soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 824-833, 2003.

CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F.; ARAÚJO, D. L.; FRANÇA, C. P. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, n. 2, p. 167-176, 2010.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P.; HSU, F. C. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advance in Agronomy**, v. 56, p. 55-114, 2002.

DA COSTA, J. N. M. N.; DURIGAN, G. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit (Fabacea): Invasora ou ruderal? **Revista Árvore**, v. 34, n. 5, 2010.

DEBASHRI, M.; TAMAL, M. A. Review on efficacy of *Azadirachta indica* A. Juss based biopesticides: An Indian perspective. **Research Journal of Recent Sciences**. v.1, n. 3, p. 94-99, 2012.

DIAS, L. E.; MELO, R. F.; VARGAS DE MELLO, J. W.; OLIVEIRA, J. A.; LEE DANIELS, W. Growth of seedlings of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp), wand riverhemp (*Sesbania virgata* (Cav.) Pers.), and lead tree (*Leucaena leucocephala* (Lam). de Wit.) in an arsenic-contaminated soil. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 34, p. 975-983, 2010.

DINARDI, A.L.; FORMAGI, V.M.; CONEGLIAN, C.M.R.; BRITO, N.N.; SOBRINHO, G. D.; TONSO, S.; PELEGRINI, R. **Fitorremediação**. III Fórum de Estudos Contábeis. Faculdades Integradas Claretianas – Rio Claro, 2003.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Rio de Janeiro, 3ª ed., 2009, 212p.

FREIRE DE MELO, R.; DIAS, L. E.; VARGAS DE MELLO, J. W.; ALVES DE OLIVEIRA, J. Potencial de quatro espécies herbáceas forrageiras para fitorremediação de solo contaminado por arsênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 2, p. 455-465, 2009.

JABEEN, R.; AHMAD, A.; IQBAL, M. Phytoremediation of heavy metals: physiological and molecular mechanisms. **The Botanical Review**, v.75, p.339-364, 2009.

JIANG, L.Y.; YANG, X.E.; HE, Z.L. Growth response and phytoextraction of copper at different levels in soils by *Elsholtzia splendens*. **Chemosphere**, v.55, p.1179-1187, 2004.

KUMAR, P. B. A. N.; DUSHENKOV, V.; MOTTO, H.; RASKIN, I. Phytoextraction: The use de plants to remove heavy metals from soils. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n. 5, 1995.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2004. 531p.

LASAT, M. M.; PENCE, N. S.; GARVIN, D. F.; EBBS, S. D.; KOCHIAN, L.V. Molecular physiology of zinc transport in the Zn hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **J Exp Botany**, v.51, p.71-79, 2002.

LIMA, H. N. **Crescimento inicial a campo de sete espécies arbóreas nativas em resposta a adubação com NPK**. 1994. 67 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1994.

LINS, C. E. L.; MAIA, L. C.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. S. B. Efeito de fungos micorrízicos arbusculares no crescimento de mudas de *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. em solos de caatinga sob impacto de mineração de cobre. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n.2, p.355-363, 2007.

LOMBI, E.; ZHAO, F. J.; DUNHAM, S. J.; McGRATH, S. P. Phytoremediation of heavy-metal contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p.1919-1926, 2001.

MAJID, N. M.; ISLAM, M. M.; VERONICA, J.; ARIFIN, A.; PARISA, A. Evaluation of heavy metal uptaked and translocation by *Acacia mangium* as a phytoremediator of copper contaminated soil. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p. 8373-8379, 2011.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional de plantas**. Piracicaba, POTAFOS, 1989. 201p.

MARCHIOL, L.; SACCO, P.; ASSOLARI, S.; ZERBI, G. Reclamation of polluted soil: Phytoremediation potential of crop-related Brassica species. **Water Air and Soil Pollution**. v.158, n. 1, p. 345-356, 2004.

MARQUES, D. M.; SILVA, A. B.; MANTOVANI, J. R.; PEREIRA, D. S.; SOUZA, T. C. Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. **Revista Árvore**, v.42, n.2, 2018.

MARQUES, T. C. L. L. S. M.; CARVALHO, J. G.; LACERDA, M. P. C.; MOTA, P. E. F. Crescimento Inicial do Paricá (*Schizolobium amazonicum*) sob omissão de nutrientes e de sódio em solução nutritiva. **Revista Cerne**, Lavras, v.10, n.2, p.184-195, 2004.

MARYAM, G.; MAJID, N. M.; ISLAM, M. M.; AHMED, O. H.; ABDU, A. Fitorremediação de lodo de esgoto contaminado de cobre por plantas tropicais. **Journal of Tropical Forest Science**, v. 27, n.4, p.535-547, 2015.

MATOS, G. D.; FRIGOTTO, T.; MARTINS, A. P. M.; BRUN, E. J. Desenvolvimento de mudas de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) em substrato orgânico – estudo de caso. **Synergismus scyentifica**, v. 4, n. 1, 2009.

MENEGAES, J. F. Avaliação do potencial fitorremediador de plantas floríferas em solo contaminado com cobre. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, RS, 2015.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2006. 623 p.

NACHTIGALL, G. R.; NOGUEIROL, R. C.; ALLEONI, L. R. F.; CAMBRI, M. A. Copper Concentration of Vineyard Soils as a Function of pH Variation and Addition of Poultry Litter. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 6, p.941-948, 2007.

OLIVA, S. R.; MINGORANCE, M. D.; VALDÉS, B.; LEIDI, E. O. Uptake, localization and physiological changes in *Erica andevalencis*. **Plant and Soil**, v.328, p.411-420, 2010.

OMKAR, G.M. Neem, the wonder tree, under attack: A new major pest. **Current Science**, v. 102, n.7, p.960-970, 2012.

RIBEIRO-FILHO, M. R.; CURI, N.; SIQUEIRA, J. O.; MOTTA, P. E. F. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 23, p.453-464, 1999.

RIBEIRO, G.T; PAIVA, H.N.; JACOVINE, L.A.G.; TRINDADE, C. Produção de mudas de Eucalipto. Viçosa: **Aprenda Fácil**, 2001, 112p.

SHARMAA, K. R.; AGRAWAL, M.; MARSHALL, F. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** v.66, p.258-266, 2007.

SILVA, R. F.; MISSIO, E. L.; STEFFEN, R. B.; WEIRICH, S. W.; KUSS, C. C.; SCHEID, D. L. Efeito do cobre sobre o crescimento e qualidade de mudas de *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. e *Cassia multijuga* Rich. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 3, p. 717-725, 2014.

SILVA, R. F.; SAIDELLES, F. L. F.; KEMERICH, P. D. C.; STEFFEN, R. B.; SWAROWSKY, A.; SILVA, A. S. Crescimento e qualidade de mudas de Timbó e Dedaleiro cultivadas em solo contaminado com cobre. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 16, p. 881-886, 2012.

SILVA, R. F.; ANTONIOLLI, Z. I.; LUPATINI, M.; TRINDADE, L. L.; SILVA, A. S. Tolerância de mudas de canafístula (*Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub.) inoculada com *Pisolithus microcarpus* a solo com excesso de cobre. **Ciência Florestal**, v. 20, n.1, p. 147-156, 2010.

SINHA, S.; GUPTA, A. K. Translocation of metals from fly ash amended soil in the plant of *Sesbania cannabina* L. Ritz: effect on antioxidants. **Chemosphere**, v. 61, p.1204-1214, 2005.

SOARES, C. R. F. S.; SIQUEIRA, J. O.; CARVALHO, J. G.; MOREIRA, F. M. S.; GRAZZIOTTI, P. H. Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus maculata* e

*Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 12, n. 3, p.213-225, 2000.

SOLIOZ, M.; STOYANOV, J. V. Copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 27, n. 2-3, p.183-195, 2003.

SOUZA, C. A. M.; OLIVEIRA, R. B.; MARTINS FILHO, S.; LIMA, J. S. S. Crescimento em campo de espécies florestais em diferentes condições de adubações. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 3, 2006.

TAIZ, G.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª Ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; VLKWEISS, S. J. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, Departamento de Solos, 1995, 174 p.

TRINDADE, D. R.; POLTRONIERI, L. S.; BENCHIMOL, R. L.; ALBUQUERQUE, F. C.; OLIVEIRA, N. T. Black crust (*Phyllachora schizolobiicola* subsp. *schizolobiicola*) on *Schizolobium amazonicum* in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, n. 2, p.194, 1999.

WOITKE, M.; DIETZ, H. Shifts in dominance of native and invasive plants in experimental patches of vegetations. *Perpectives in Plant Ecology, evolution and Systematics*, v. 5, n. 3, p.165-184, 2002.

XIA, Y.; SHEN, G. Comparative Studies of Copper Tolerance and Uptake by Three Plant Species of the *Genus elsholtzia*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.79, p.53-57, 2007.

ZANCHETA, A. C. F.; ABREU, C. A.; ZAMBROSI, F. C. B.; ERISMANN, N. M.; LAGÔA, A. M. A. Fitoextração de cobre por espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva. **Bragantia**, v. 70, n. 4, p.737-744, 2011.

ZHANG, H. W.; HUANG, Y.; YE, X. S.; XU, F. Analysis of the contribution of acid phosphatase to P efficiency in *Brassica napus* under low phosphorus conditions. **Sci China Life Sci**, v. 53, n. 6, 2010.

## **CAPÍTULO II**

### **ESTRESSE CAUSADO PELO COBRE NAS ATIVIDADES DE ENZIMAS E PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES EM *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* E *Azadirachta indica***

**ESTRESSE CAUSADO PELO COBRE NAS ATIVIDADES DE ENZIMAS E  
PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES EM *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena  
leucocephala* E *Azadirachta indica***

**RESUMO**

A mineração no mundo e no Brasil carrega em sua trajetória histórica um vasto campo de componentes que permitem denúncias envolvendo a degradação ambiental. Esta pesquisa teve o objetivo de avaliar os efeitos causados em pigmentos fotossintetizantes e duas enzimas nas espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica*, cultivadas em substrato com concentração de cobre e, avaliar possíveis alterações no teor de clorofilas e carotenoides. O experimento foi conduzido na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró-RN. O substrato do experimento foi composto de solo e rejeito de cobre, previamente analisados os atributos físico-químicos. Os tratamentos foram dispostos em blocos ao acaso, usando o esquema fatorial 3 x 4, com quatro repetições. Os fatores foram às espécies vegetais (*S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*) e quatro concentrações de rejeito de cobre de barragem de mineração (0, 200, 400 e 600 mg de Cu dm<sup>-3</sup> de solo). As variáveis estudadas foram as enzimas superóxido dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPOD), pigmentos fotossintetizantes (clorofilas “a”, “b” e carotenoides). A coleta dos compartimentos foliares das espécies foi realizada aos 120 dias, para determinação das atividades enzimáticas e dos pigmentos fotossintetizantes. As amostras foliares foram encaminhadas ao Laboratório de Ecologia e Sistemática Vegetal (LESV) da UERN, campus de Mossoró, RN para realização das análises das enzimas SOD e GPOD e dos pigmentos fotossintetizantes (clorofilas “a”, “b” e carotenoides). Os dados foram submetidos à análise de variância (Anova) com comparações entre médias entre as espécies pelo teste de Tukey a 5%. Fez-se análise de regressão das variáveis em função das doses de cobre. As enzimas antioxidantes SOD e GPOD tiveram suas atividades distintas entre as espécies e nos compartimentos foliares, sendo que, GPOD não obteve nenhuma significância para as espécies e nas concentrações estudadas. Para os pigmentos fotossintetizantes houve significância para a clorofila “a” para a *A. indica* e os carotenoides. Para o *S. amazonicum* e a *L. leucocephala* tanto a clorofila “a”, “b” e os carotenoides nas concentrações de 200, 400 e 600 mg dm<sup>-3</sup>, estatisticamente não houve diferença. Concluiu-se que a enzima SOD teve sua atividade diferente significativamente entre as espécies, principalmente nas folhas intermediárias e na concentração de 200 mg dm<sup>-3</sup>, onde destacou-se a *S. amazonicum* em relação a *L. leucocephala* e *A. indica*. Para a enzima GPOD as doses de cobre não promoveram nenhum efeito em sua atividade para as três espécies. Os teores de clorofila “a”, “b” e carotenoides nos compartimentos apicais, intermediários e senescentes para as três espécies não tiveram diferença entre si, mas na concentração de 400 mg dm<sup>-3</sup>, houve alteração pois a *Azadirachta indica* teve seus teores diferentes de clorofila “a” e carotenoides.

**Palavras-chave:** Superóxido dismutase, guaiacol peroxidase, clorofila, fitorremediação.

**STRESSE CAUSED BY COPPER ON ENZYMES ACTIVITIES AND  
PHOTOSINTETIZING PIGMENTS IN *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena  
leucocephala* E *Azadirachta indica***

**ABSTRACT**

Mining in the world and in Brazil carries in its historical trajectory a vast field of components that allow denunciations involving environmental degradation. The objective of this research was to evaluate the effects of photosynthetic pigments and two enzymes on the species *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* and *Azadirachta indica*, cultivated on a substrate with copper concentration and to evaluate possible changes in the content of chlorophyll and carotenoids. The experiment was conducted at the State University of Rio Grande do Norte, Mossoró-RN. The substrate of the experiment was composed of soil and copper reject, previously analyzed the physical-chemical attributes. The treatments were arranged in randomized blocks using the 3 × 4 factorial scheme, with four replications. The factors were plant species (*S. amazonicum*, *L. leucocephala* and *A. indica*) and four concentrations of copper mining tailings (0, 200, 400 and 600 mg Cu dm<sup>-3</sup> soil). The studied variables were the enzymes superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (GPOD), photosynthetic pigments (chlorophylls "a", "b" and carotenoids). The foliar compartments of the species were collected at 120 days to determine enzymatic activities and photosynthetic pigments. Leaf samples were sent to the Laboratory of Ecology and Plant Systematics (LESV) of UERN, Campus of Mossoró, RN for the analysis of the enzymes SOD and GPOD and the photosynthetic pigments (chlorophyll a, b and carotenoids). Data were submitted to analysis of variance (Anova) with comparisons between means between species by the Tukey test at 5%. Regression analysis of the variables was performed as a function of copper doses. The antioxidant enzymes SOD and GPOD had their distinct activities among the species and in the leaf compartments, being that, GPOD did not obtain any significance for the species and in the studied concentrations. For photosynthetic pigments, there was significance for chlorophyll "a" for *A. indica* and carotenoids. For *S. amazonicum* and *L. leucocephala* both chlorophyll "a", "b" and carotenoids at concentrations of 200, 400 and 600 mg dm<sup>-3</sup>, there was no statistically significant difference. It was concluded that the SOD enzyme activity was significantly different among the species, mainly in the intermediate leaves and the concentration of 200 mg dm<sup>-3</sup>, where *S. amazonicum* was distinguished in relation to *L. leucocephala* and *A. indica*. For the GPOD enzyme the copper doses did not promote any effect on their activity for the three species. The levels of chlorophyll a, b and carotenoids in the apical, intermediate and senescent compartments for the three species were not different, but at the concentration of 400 mg dm<sup>-3</sup>, there was an alteration since *Azadirachta indica* had different levels of chlorophyll a and carotenoids.

**Keywords:** Superoxide dismutase, guaiacol peroxidase, chlorophyll, phytoremediation.

## 1 INTRODUÇÃO

A atividade minerária no mundo e no Brasil carrega em sua trajetória histórica componentes que estão relacionados a degradação ambiental, por isso, são necessárias pesquisas para minimizar tais problemas.

Trabalhos de pesquisa com o intuito de mitigar problemáticas ambientais de degradação de solo e com avaliações específicas, envolvendo aspectos de bioquímica, fisiologia e anatomia vegetais, entre outros, são importantes.

O *S. amazonicum* é originária da Amazônia e tem se destacado nas plantações agroflorestais (OHASHI et al., 2010). A madeira do *S. amazonicum* é bastante usada nas indústrias de fabricação de laminados, de celulose e papel (ROSA, 2006). Vem ocorrendo uma expansão na implantação de florestas de *S. amazonicum* no Brasil, alcançando 87.519 ha em 2012, especialmente na Amazônia, segundo a Associação Brasileira de Florestas (ABRAF, 2013).

Para Campello (1998) as fabáceas arbóreas têm abundante sistema radicular e ótima produção de fitomassa, que se traduz em absorção de água e de macro e micronutrientes. A *L. leucocephala* é uma espécie muito cultivada, devido sua adaptação a diversos tipos de solos.

De acordo com Houllou et al. (2015) o *A. indica* é uma árvore com muitas utilidades podendo ser extraídos produtos inseticidas, fertilizantes, medicamentos e madeira. Em países europeus a espécie foi reconhecida como relevante para produção agrícola biológica.

Conhecer as estratégias de tolerância e seus mecanismos fisiológicos das espécies florestais capazes de suportar estresses causados por ambientes contaminados por metais pesados se faz necessário.

A capacidade de uma espécie vegetal de acumular metais depende não apenas da própria espécie, mas também do estado de desenvolvimento, o meio de cultura, a concentração de metal aplicada e as condições ambientais (HASANUZZAMAN et al., 2013).

Plantas com capacidade acumuladora desenvolvem mecanismos que permitem armazenar metais sem que estes interfiram no seu metabolismo e sem comprometer a integridade celular e, conseqüentemente, a sobrevivência da planta.

Algumas espécies têm a capacidade de acumular elevadas concentrações de metais pesados (RASCIO; NAVA-IZZO, 2011; HASSAN; AARTS, 2011).

O efeito fitotóxico dos metais pesados depende do estado de desenvolvimento das plantas, e pode ser caracterizado pela diminuição da fitomassa total das plantas, de comprimentos de parte aérea e raiz, atraso no desenvolvimento e diminuição da concentração de clorofila (PINTO, 2017).

Diferentes estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de identificar plantas com capacidade acumuladora com objetivo de utilizá-las em fitorremediação (PILON-SMITS, 2005; NEILSON; RAJAKARUNA, 2015). Apesar do desenvolvimento de trabalhos de fitorremediação, a variedade de delineamentos experimentais torna, muitas vezes, difícil a comparação entre espécies de modo a avaliar qual será a mais eficaz (MARCHIOL et al., 2004).

A exposição de plantas a contaminantes no solo por metais pesados pode provocar perturbações no seu metabolismo celular devido ao desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de compostos antioxidantes. EROs como oxigênio singleto ( $^1O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ), são capazes de promover estresse oxidativo, provocando danos as células (CAVERZAN et al., 2016). As plantas para evitarem desequilíbrios fisiológicos são capazes de ativar o sistema de defesa enzimático através de enzimas como superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutathione redutase (GR, EC 1.8.1.7), as peroxidases (GPOD, EC 1.11.1.7) e não enzimático pela regulação de compostos como glutathione (GSH), ácido ascórbico (AsA),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e carotenoides (SOFO et al., 2015; CAVERZAN et al., 2016).

Objetivou-se avaliar os efeitos de doses de cobre no solo nos pigmentos fotossintetizantes e duas enzimas nas espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Localização, Clima e Substrato

O experimento foi conduzido em telado de náilon, na Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN), Mossoró-RN, na região Oeste do Estado do Rio Grande do Norte, situado nas coordenadas geográficas de 05° 12' 18,25" S, 37° 18' 53,1" W e altitude de 21 m. O clima da região, segundo Köppen, é do tipo BSwh', tropical quente semiárido, com pluviosidade média anual de 695,8 mm e temperatura média de 27,4 °C, marcado por dois períodos bem definidos: seco (prolongado) e chuvoso (curto e irregular).

As variáveis climatológicas durante o período compreendido entre 15 de agosto de 2016 a 3 de fevereiro de 2017 na fase experimental estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1.** Valores mensais de temperatura, umidade relativa do ar e precipitação obtidos no local do experimento, no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.

Meses	Temperatura °C Mín / Máx	Umidade (%) Mín / Máx	Precipitação (mm)
Agosto	22,32 / 41,85	30,6 / 77,9	0,0
Setembro	22,90 / 42,30	24,2 / 77,2	0,0
Outubro	23,50 / 41,60	25,7 / 78,5	0,0
Novembro	24,00 / 41,30	28,0 / 77,6	0,0
Dezembro	24,20 / 39,50	34,0 / 82,4	2,0
Janeiro	24,10 / 41,18	26,7 / 82,3	6,4
Fevereiro	31,30 / 32,70	32,0 / 81,5	0,0

As variáveis climatológicas foram aferidas por termohigrômetro da marca Incoterm e pluviômetro, colocados no interior do telado de náilon, conforme figura 1. Os registros de temperatura e umidade foram realizados diariamente. A precipitação registrada foi a que ocorreu durante a fase experimental.



**Figura 1.** Termohigrômetro e pluviômetro para aferição de variáveis climatológicas instalados no local do experimento, no período de agosto/2016 a fevereiro/2017.

O substrato utilizado nos vasos para instalação do experimento foi composto de solo do local do experimento e rejeito de barragem de cobre, sendo o rejeito proveniente da empresa Vale S.A. mineradora no Estado do Pará. O rejeito foi transportado em tambores de 200 kg provenientes da barragem de rejeito de cobre em Canaã dos Carajás-PA. Foram coletadas previamente amostras dos componentes do substrato para caracterização dos atributos químicos e físicos do solo e rejeito (Tabela 2), conforme recomendações metodológicas da Embrapa (2009).

**Tabela 2.** Atributos químicos e físicos do solo e do rejeito de cobre, usados por ocasião da instalação do experimento.

Substrato	Solo	Rejeito de cobre
	<b>Atributos químicos</b>	
pH (H <sub>2</sub> O)	6,4	-
P (mg dm <sup>-3</sup> )	3,0	3,8
K <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,16	0,15
Na <sup>+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,13	-
H <sup>+</sup> +Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,5	-
Al <sup>3+</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,0	-
Ca <sup>+2</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	1,9	16,2
Mg <sup>+2</sup> (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0,7	8,7
SB (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,9	-
CTC (cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	2,9	-
V (%)	65,9	-
MO (g kg <sup>-1</sup> )	0,9	-
B (mg dm <sup>-3</sup> )	0,27	-
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	0,4	0,9
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	120,0	45,5
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	41,0	18,5
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	0,7	1,7
	<b>Atributos físicos</b>	
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	856	

<b>Silte (g kg<sup>-1</sup>)</b>	84	
<b>Argila (g kg<sup>-1</sup>)</b>	60	
<b>Densidade g cm<sup>-3</sup></b>	1,54	1,62
<b>Classificação textural</b>	Areia Franca	

SB = Soma de bases (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup> + K<sup>+</sup> + Na<sup>+</sup>); CTC = Capacidade de troca catiônica [SB + (H<sup>+</sup> + Al<sup>3+</sup>)]; V = Saturação por bases trocáveis (SB/CTC) × 100;  
MO = Matéria orgânica do solo.

## 2.2 Delineamento Experimental

Os tratamentos foram dispostos em blocos ao acaso, usando o esquema fatorial 3 × 4 (espécie x concentração), com quatro repetições e três plantas por parcela. Os fatores foram às espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala*, *A. indica* e quatro concentrações de rejeito de cobre de barragem de mineração (0, 200, 400 e 600 mg de Cu dm<sup>-3</sup>) de solo, respectivamente.

A tabela 3 se refere às quantidades de solo e rejeito de cobre utilizadas para compor o substrato.

**Tabela 3.** Massa do solo, do rejeito de cobre e massa total, usados por ocasião da instalação do experimento.

<b>Cobre (mg dm<sup>-3</sup>)</b>	<b>Solo (kg)</b>	<b>Rejeito (kg)</b>	<b>Massa Total (kg)</b>
<b>0</b>	8,00	0,00	8,00
<b>200</b>	6,24	1,76	8,00
<b>400</b>	4,46	3,54	8,00
<b>600</b>	2,68	5,32	8,00

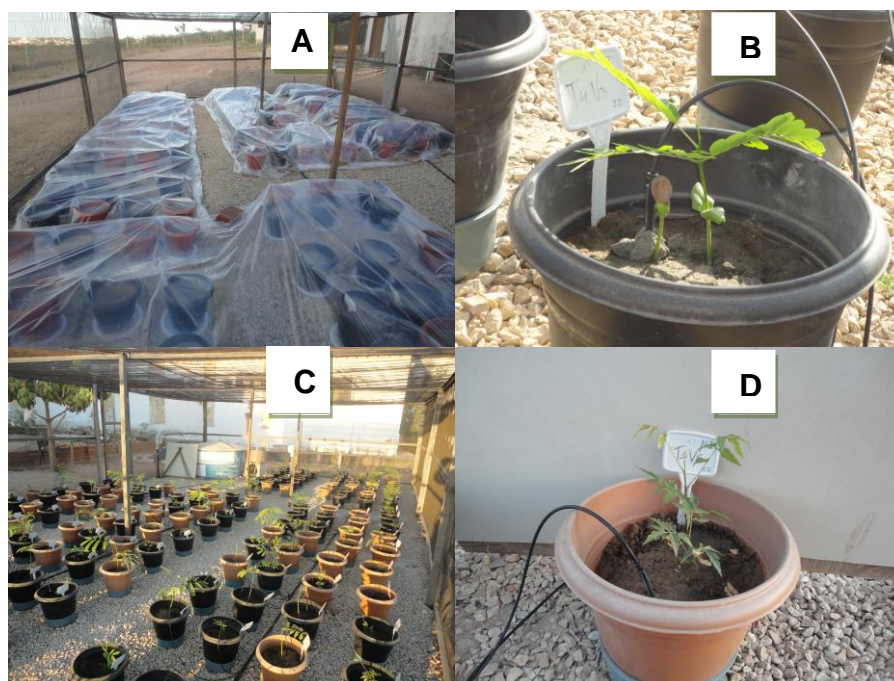
## 2.3 Material Vegetal e Condições de Cultivo

As sementes das espécies *L. leucocephala* e *A. indica* foram provenientes de coleta em matrizes no campus da UERN - Mossoró, RN. Estas matrizes foram catalogadas e as exsicatas depositadas no Herbário Jaime Coelho de Moraes, Laboratório de Citogenética Vegetal, no CCA, UFPB. As sementes de *S. amazonicum* foram adquiridas da empresa Centerplac, Rondon do Pará e a exsicata depositada no referido herbário.

O substrato foi pesado, colocado em vasos plásticos com capacidade para 8,0 litros e, permaneceram por 15 dias incubados, sem serem irrigados. Após este período

foram semeadas cinco sementes por vaso. Dez dias após a emergência, foi realizado o desbaste mantendo-se a planta mais vigorosa.

O experimento foi irrigado por gotejamento, controlado por um temporizador marca Lukma electric, com três turnos de rega (9 h; 12 h; 15 h) por dois minutos cada turno, mantendo em aproximadamente 80% da capacidade do vaso (Figura 2).



**Figura 2.** Incubação inicial do substrato (A), germinação (B), crescimento (C) e irrigação (D) nos vasos contendo as mudas de *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.

A coleta dos compartimentos (folhas apicais, intermediárias e senescentes) das espécies foi realizada aos 120 dias. Para coleta dos compartimentos foliares se observou o estágio fenológico das folhas que foram determinados pela observação da cor, tamanho e posição no ramo. Foram denominadas folhas apicais as menores e posicionadas na parte apical do ramo, de cor verde clara. Folhas intermediárias aquelas posicionadas entre as apicais e as senescentes que apresentavam tamanho normal, de cor verde-escuro. Folhas senescentes aquelas que se localizam nos ramos basais de colocação verde intenso, mas com pontuações tendendo a marrons-amareladas. Estas foram acondicionadas em caixa térmica contendo gelo.

As amostras foliares foram encaminhadas ao Laboratório de Ecologia e Sistemática Vegetal (LESV) da UERN, campus de Mossoró, RN para realização das

análises das enzimas (Superóxido dismutase-SOD e Guaiacol peroxidases-GPOD) e dos pigmentos fotossintetizantes (clorofilas “a”, “b” e carotenoides).

## **2.4 Variáveis Analisadas**

### **2.4.1 Atividades de Enzimas Antioxidantes**

Para a obtenção dos extratos proteicos e enzimáticos, no LESV, 100 mg de tecido foliar de *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala*, *Azadirachta indica* foram macerados em almorafiz contendo 4 mL de tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 7,8), EDTA a 1 mM e 1% (p /p) de polivinilpolipirrolidona (PVPP), a 4 °C durante 3 minutos. Os extratos foram centrifugados a 10.000xg durante 15 minutos, a 4 °C. As proteínas solúveis totais foram determinadas colorimetricamente pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando-se 100 µL do extrato proteico acrescidos de 3,0 mL do reagente “azul de coomassie G-250”. Os tubos de ensaio contendo a mistura reacional foram suavemente agitados em vórtex, procedendo-se em seguida, às leituras em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 595 nm. As absorbâncias das amostras correspondentes aos extratos enzimáticos foram convertidas em concentração de proteínas solúveis totais, utilizando-se padrões de albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 e 55 µg mL<sup>-1</sup>, que é procedimento laboratorial para obtenção das proteínas totais solúveis.

### **2.4.2 Atividade da Superóxido Dismutase**

Para a avaliação da atividade da SOD, no LESV, utilizou-se o método de Das et al. (2000) para cada amostra utilizou-se 1.110 µL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,8), 75 µL de L metionina 20 mM, 40 µL de triton X-100 a 1% (v/v), 75 µL de hidrocloreto de hidroxilamina 10 mM e 100 µL de EDTA 50 µM. A esta mistura adicionou-se 100 µL dos extratos proteicos e 80 µL de riboflavina 50 µM, sendo expostas, em seguida a luz fluorescente branca fria durante dez minutos para ocorrer a reação e após este período adicionou-se em cada tubo, 1 mL de reagente de Greiss (mistura de volumes iguais de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico a 5% e N-1-naftil-etilenodiamina a

0,1%) e realizada a leitura das absorvâncias em 543 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi medida como a quantidade de SOD capaz de inibir 50% de formação de nitrito nas condições de ensaio. A atividade de SOD foi expressa como unidade enzimática (UE) por grama de matéria fresca (UE g<sup>-1</sup> MF).

#### **2.4.3 Atividade da Guaiacol Peroxidase**

A atividade da GPOD foi determinada a 30 °C, através de método espectrofotométrico direto pela medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm, onde foi misturado diretamente na cubeta de leitura 800 µL de guaiacol a 1%, 800 µL de peróxido de hidrogênio 10 mM, 2000 µL de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 6,5) e 200 µL dos extratos proteicos (TEISSEIRE; GUY 2000; JIANG; ZHANG 2002). A atividade da GPOD foi determinada através do monitoramento, a 470 nm, do aumento da absorvância em função da oxidação do guaiacol, a cada 30 segundos, durante um minuto. A atividade enzimática foi quantificada pela quantidade de tetraguaiacol formado usando o coeficiente extinção de 26,6 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>, sendo os resultados expressos em micromoles de guaiacol oxidado por minuto por miligrama de massa fresca (µmoles GO min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> MF) (ZERAİK et al., 2008). Todos os procedimentos realizados no LESV.

#### **2.4.4 Determinação dos Pigmentos Fotossintetizantes**

Para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos, as amostras de tecido fresco das espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala*, *Azadirachta indica* foram coletadas, armazenadas em potes de polietileno, acondicionadas em caixa de isopor com gelo e transportadas até o LESV. Em seguida, foram pesados 200 mg de tecido foliar, sendo os mesmos macerados em almofariz com pistilo, utilizando-se 10 mL de acetona gelada a 80% (v/v), acrescida de 0,1% (m/v) de carbonato de magnésio (ARNON, 1949). Os extratos foram transferidos para tubos de ensaio e centrifugados a 2.500 rpm, durante 10 minutos.

As leituras de absorvância (A) das amostras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível, nos comprimentos de onda de 645, 663 nm para as clorofilas e 470 nm para os carotenoides. A partir dos dados de absorvâncias e fatores

de diluição (FD) realizou-se a quantificação dos teores de clorofila “a” ( $C_a$ ), “b” ( $C_b$ ) e carotenoides totais ( $C_{x+c}$ ), sendo os resultados expressos em micrograma por grama de massa fresca de tecido foliar ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF), mediante utilização das equações propostas por Lichtenthaler (1987):

$$C_a (\mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}) = [12,25A_{663 \text{ nm}} - 2,79A_{646 \text{ nm}}] \times \text{FD} \quad \text{Eq.1}$$

$$C_b (\mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}) = [21,50A_{646 \text{ nm}} - 5,10A_{663 \text{ nm}}] \times \text{FD} \quad \text{Eq.2}$$

$$C_{x+c} (\mu\text{g g}^{-1} \text{ MF}) = \frac{1000A_{470 \text{ nm}} - 1,82 C_a (\mu\text{g mL}^{-1}) - 85,02 C_b (\mu\text{g mL}^{-1})}{198} \times \text{FD} \quad \text{Eq.3}$$

## 2.5 Avaliação Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Anova) com comparações entre médias dos tratamentos experimentais pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar 5.6 Build (86) (FERREIRA, 2011). Fez-se análise de regressão em função das concentrações de cobre no solo.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Sistema Antioxidante

A interação entre as espécies e a concentração de cobre interferindo nas atividades da enzima SOD interferiu significativamente nas folhas apicais, intermediárias e senescentes das espécies investigadas (Tabela 4).

**Tabela 4.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à superóxido dismutase em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.

FV	GL	SOD apical	SOD intermediária	SOD senescente
Bloco	3	36.590,6406 <sup>ns</sup>	18.999,5514 <sup>ns</sup>	69.036,5366 <sup>ns</sup>
Espécies (E)	2	1.552.914,3596**	190.025,3901**	778.013,5145**
Teor de cobre (C)	3	364.636,7683 <sup>ns</sup>	62.756,7381 <sup>ns</sup>	229.885,2684 <sup>ns</sup>
E x C	6	569.979,8963**	287.358,9558**	663.763,4211**
Erro	33	160.838,3433	55.907,8675	134.187,2869
Total	47			
CV (%)		45,51	32,71	42,56

GL = Grau de liberdade; ns = não significativo; \* significativo ao nível de 1%;

CV = Coeficiente de variação

Para a atividade da enzima SOD nas folhas apicais, as concentrações não provocaram efeito em relação às espécies, apesar do *S. amazonicum* manter uma atividade enzimática superior a *L. leucocephala* e o *A. indica* que entre si não diferiram, ilustrado na figura 3 (A), mesmo que o *A. indica* tenha tido uma menor atividade da superóxido dismutase, comportando-se na seguinte ordem: *S. amazonicum* > *L. leucocephala* > *A. indica*, de acordo com a atividade enzimática.

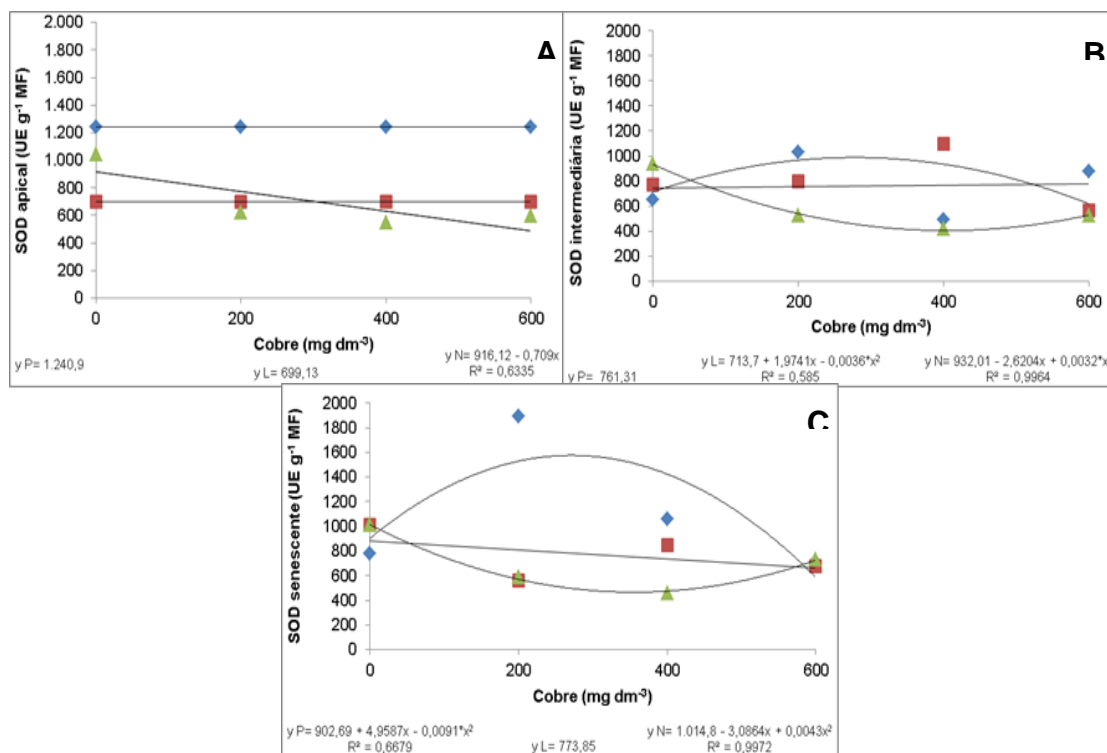
Na folha intermediária (Figura 3 B) visualiza-se que a atividade da SOD, nas doses crescentes de cobre o *S. amazonicum* se manteve com uma média inalterada em todas as doses. A *L. leucocephala* teve uma equação quadrática com aumento inicial da SOD, atingindo um valor máximo (984,33 EU g<sup>-1</sup> MF) com a concentração de 274,18 mg dm<sup>-3</sup> do cobre e, comprovando dessa maneira que a atividade da enzima foi sendo reduzida de acordo com o aumento do cobre em suas folhas intermediárias. O *A. indica* atingiu um valor médio da atividade da SOD na concentração de 400 mg dm<sup>-3</sup>, pois teve a SOD reduzida a medida que a concentração aumentava, porém a

partir da concentração 400 mg dm<sup>-3</sup> a atividade da enzima nas folhas intermediárias teve um acréscimo.

Nas folhas senescentes as espécies não tiveram comportamentos iguais estatisticamente, entre si em relação à atividade da enzima SOD (Figura 3 C). Na figura 3 (C) se percebe que o *S. amazonicum* à medida que foi aumentando a concentração de cobre a atividade enzimática foi seguindo a mesma tendência, no entanto, ao atingir uma média 1.578,19 UE g<sup>-1</sup> MF que corresponde a concentração de 272,45 mg dm<sup>-3</sup> de cobre a atividade enzimática foi reduzida progressivamente.

A *L. leucocephala* manteve uma média de atividade enzimática (SOD) constante de acordo com o cobre crescente. Já o *A. indica* quando a concentração do cobre atingiu 358,88 mg dm<sup>-3</sup> a atividade da SOD foi reduzida ao máximo com 460,97 UE g<sup>-1</sup> MF, sendo posteriormente crescente com o aumento do cobre, o que provocou uma maior atividade da enzima.

As espécies estudadas nas folhas senescentes atingiram basicamente a mesma média de atividade enzimática quando a concentração de cobre foi de 600 mg dm<sup>-3</sup>.



**Figura 3.** Superóxido dismutase (UE g<sup>-1</sup> MF) média para (A) folha apical (B) intermediária e (C) senescente em *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (□) e *A. indica* (△) em concentrações de cobre, aos 120 dias

O cobre além de ser um micronutriente essencial para as plantas, é um metal pesado que em concentrações de 200 mg dm<sup>-3</sup> no solo, é considerado valor de intervenção para áreas agrícolas (CETESB, 2005). O aumento da atividade da SOD nas espécies estudadas, na concentração de 200 mg dm<sup>-3</sup>, pode ser atribuído à acumulação de radicais superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) induzida por cobre. Para catalisar a dismutação do ânion superóxido, a qual é formada a primeira EROs, SOD participa na primeira linha de defesa contra estresse oxidativo (GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, a remoção do radical superóxido por SOD é importante para prevenir a formação de radicais hidroxila antes da sua interação com moléculas alvo (XU et al., 2013).

Possivelmente foi o que ocorreu com a *L. leucocephala* nas folhas intermdeárias e no *S. amazonicum* nas folhas senescentes, onde a atividade da SOD foi mais intensa, denotando assim a defesa das plantas para combater as espécies reativas de oxigênio (EROs). Para o *A. indica* a SOD foi diminuindo já a partir de 200 mg dm<sup>-3</sup>, possivelmente em razão da reação diferente desta espécie em comparação as demais, mas que mesmo assim, ao final na maior concentração a atividade da enzima tenha se igualado as outras duas.

Para Andrees et al. (2012) a atividade de enzimas antioxidantes pode ser aumentada até um certo nível e então diminuída devido ao aumento do estresse oxidativo, este comportamento foi observado tanto na *L. leucocephala* (folhas Intermediárias) como para o *S. amazonicum* (folhas senescentes), fato que se inverteu para o *A. indica* nos compartimentos foliares (folhas intermediárias e senescentes). Marques et al. (2018) registraram para a espécie canafístula (*Peltophorum dubium*) que com a maior concentração de cobre no solo, as atividades das enzimas SOD, CAT e APX, foram mais intensas.

As atividades da enzima GPOD (Tabela 5) entre as espécies e a concentração de cobre não teve significância estatística tanto para os compartimentos foliares quanto entre as espécies.

**Tabela 5.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à guaiacol peroxidase em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.

FV	GL	GPOD apical	GPOD intermediária	GPOD senescente
<b>Bloco</b>	3	404,2415 <sup>ns</sup>	366,2707 <sup>ns</sup>	464,3324 <sup>ns</sup>
<b>Espécies (E)</b>	2	42,6855 <sup>ns</sup>	65,3299 <sup>ns</sup>	61,3381 <sup>ns</sup>
<b>Teor de cobre (C)</b>	3	474,3351 <sup>ns</sup>	405,5054 <sup>ns</sup>	308,4661 <sup>ns</sup>
<b>E x C</b>	6	763,2955 <sup>ns</sup>	312,7075 <sup>ns</sup>	851,1518 <sup>ns</sup>
<b>Erro</b>	33	428,8871	440,4555	687,4568
<b>Total</b>	47			
<b>CV (%)</b>		75,06	107,90	85,91

GL = Grau de liberdade; ns = não significativo; \* significativo ao nível de 1%;

CV = Coeficiente de variação

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (GPOD) ( $\mu\text{moles GO min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ) nas espécies e nas folhas apicais, intermediárias e senescentes submetidas as concentrações de cobre não teve nenhuma significância estatística (Tabela 6).

**Tabela 6.** Guaiacol peroxidase na folha apical, intermediária e senescente ( $\mu\text{moles GO min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ MF}$ ) em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.

Cu ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	<i>S. amazonicum</i>	<i>L. leucocephala</i>	<i>A. indica</i>
<b>Folha apical</b>			
<b>0</b>	38,25 a	31,70 a	31,06 a
<b>200</b>	26,03 a	38,25 a	31,70 a
<b>400</b>	31,06 a	24,94 a	9,01 a
<b>600</b>	10,76 a	10,87 a	45,47 a
<b>Folha intermediária</b>			
<b>0</b>	16,78 a	13,78 a	24,74 a
<b>200</b>	16,90 a	16,78 a	13,78 a
<b>400</b>	24,74 a	16,90 a	5,11 a
<b>600</b>	17,49 a	39,18 a	27,17 a
<b>Folha senescente</b>			
<b>0</b>	35,70 a	26,50 a	32,72 a
<b>200</b>	42,58 a	35,70 a	26,50 a
<b>400</b>	32,72 a	42,58 a	21,54 a
<b>600</b>	13,39 a	8,55 a	47,71 a

\*Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A GPOD é uma peroxidase que elimina o  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de substratos fenólicos como o guaiacol:  $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Guaiacol reduzido} \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{Guaiacol oxidado}$  (GAJEWSKA et al., 2006; AHMAD et al., 2008). Este sistema antioxidativo enzimático de defesa dos vegetais é composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalases (CAT), peroxidase de fenóis (POX), peroxidases de

ascorbato (APX), redutases de glutathione (GR), redutases de monodehidroascorbato (MDHAR) e redutases de dehidroascorbato (DHAR), já o sistema não enzimático é constituído por componentes hidrofílicos, tais como o ácido ascórbico (ASA) e a glutathione (GSH) (ASADA, 2006; MUNNS; TESTER, 2008; FOYER et al., 2009). Estes componentes do sistema antioxidativo encontram-se presentes em várias organelas e atuam de forma coordenada para conferir proteção oxidativa (MØLLER et al., 2007; FOYER et al., 2009), diminuindo dessa maneira a ação de EROs.

Experimentos conduzidos *in vitro*, a GPOD catalisa a oxidação dos doadores de hidrogênio devido à ausência de substrato específico, porém, nestas condições a enzima pode usar o ascorbato como substrato para suas reações, assim a desintoxicação pode se tornar a função principal de algumas isoformas da GPOD (FIELDES; GERHARDT, 1998).

Exemplos foram relatados por Panagopoulos et al. (1990) quando constataram o aumento da atividade da GPOD na presença da radiação UV-B em plantas de hibiscos (*Hibiscus rosa-sinensis*) e beterraba (*Beta vulgaris*), no entanto, para Tekchandani (1998) o aumento na atividade desta enzima pode ser devido à síntese da mesma, assim como devido à supressão da atividade de um inibidor natural da guaiacol peroxidase.

Para alguns estudiosos as principais funções das peroxidases não foram bem esclarecidas. Supõe-se que o estudo das alterações provocadas pela indução de estresses fisiológicos poderia contribuir para a melhor compreensão da ação específica das isoformas da guaiacol peroxidase (CAMPA, 1991).

É possível que a atividade da GPOD nas espécies estudadas neste trabalho, por não ter tido respostas nos compartimentos foliares, possa ser em razão da carência de informações ainda das isoformas da guaiacol peroxidase.

### **3.2 Caracterização de Teores de Clorofilas e Carotenoides**

Na tabela 7 estão ilustrados as análises de variância que se observa que, a clorofila “a” na folha intermediária teve resultado significativo na interação entre as espécies e a concentração de cobre intervindo em seus teores.

**Tabela 7.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à clorofila “a” em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.

FV	GL	Clorofila “a” apical	Clorofila “a” intermediária	Clorofila “a” senescente
Bloco	3	197.878,3194 <sup>ns</sup>	574.807,3377 <sup>**</sup>	186.960,6832 <sup>ns</sup>
Espécies (E)	2	34.984,9054 <sup>ns</sup>	886.580,3693 <sup>**</sup>	19.579,5171 <sup>ns</sup>
Teor de cobre (C)	3	315.458,5558 <sup>ns</sup>	842.154,9114 <sup>**</sup>	1.041.437,1359 <sup>**</sup>
E x C	6	101.040,9002 <sup>ns</sup>	848.274,1591 <sup>**</sup>	235.725,1997 <sup>ns</sup>
Erro	33	139.541,2932	184.442,2856	152.283,1160
Total	47			
CV (%)		42,48	29,82	50,72

GL = Grau de liberdade; ns = não significativo; \* significativo ao nível de 1%;

CV = Coeficiente de variação

Na tabela 8 fica demonstrado que na folha apical das espécies vegetais estudadas os teores de clorofila “a” não variaram com a concentração de cobre no substrato, entre as espécies.

**Tabela 8.** Clorofila “a” ( $\mu\text{g g}^{-1}\text{MF}$ ) na folha apical em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.

Cu ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	<i>S. amazonicum</i>	<i>L. leucocephala</i>	<i>A. indica</i>
0	803,29 a	996,30 a	1.056,62 a
200	1.148,85 a	900,11 a	1.132,12 a
400	781,16 a	926,75 a	746,75 a
600	870,27 a	479,70 a	710,43 a
CV (%) = 42,48	DMS = 648,38		

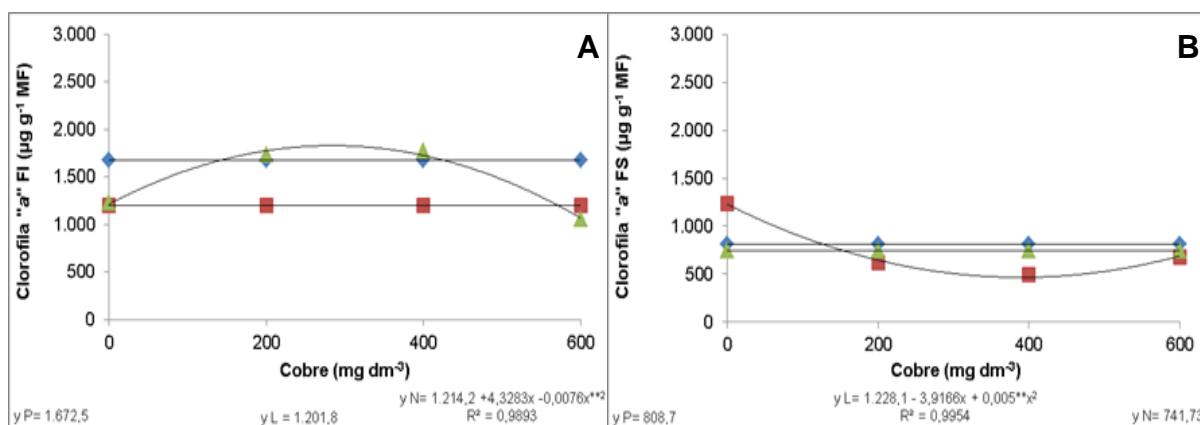
\*Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Kabata-Pendias (2010) argumentam que plantas mais sensíveis com teores que variam de 15 a 20  $\text{mg dm}^{-3}$  de cobre, devido a diversas reações metabólicas podem ter o crescimento reduzido, corroborando com esta pesquisa que os teores de cobre estiveram presentes em quantidades expressivas nas raízes e, dessa maneira uma redução no crescimento que conseqüentemente teve diminuição no número de folhas e área foliar, correspondendo assim a um menor teor de clorofila “a” para as três espécies.

A clorofila “a” nas folhas intermediárias do *S. amazonicum* e da *L. leucocephala* manteve teores numa média constante até atingir a concentração mais elevada, comparando-se com o controle, mesmo com o aumento na concentração do contaminante. Para o *A. indica* o cobre influenciou a clorofila “a” atingindo um valor

mais elevado  $1.858,95 \mu\text{g g}^{-1}$  MF, na concentração de  $284,42 \text{ mg dm}^{-3}$  e, posteriormente (clorofila “a”) sendo reduzida para a concentração de  $600 \text{ mg dm}^{-3}$  atingindo inclusive menor valor que o controle (Figura 4 A), de forma que em relação a clorofila “a” a ordem das espécies foi: *S. amazonicum* > *L. leucocephala* > *A. indica*, na maior concentração do cobre.

Com relação as folhas senescentes pode-se observar que neste compartimento a clorofila “a” atingiu o teor inferior em comparação com os compartimentos apical e intermediário, denotando que em folhas senescentes os teores decaem, possivelmente em função da senescência foliar propriamente dita, nas três espécies estudadas, mas com a *L. leucocephala* se comportando diferente, pois quanto maior a concentração do cobre menor teor de clorofila “a” de acordo com registro na equação de regressão, mas que na maior concentração as três espécies obtiveram teores aproximados da supracitada clorofila.



**Figura 4.** Clorofila “a” ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF) média em folha intermediária (FI) (A) e folha senescente (FS) (B) em *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (◻) e *A. indica* (△) em concentrações de cobre, aos 120 dias.

Observou-se que apesar de algumas diferenças entre as espécies do teor de clorofila “a” nas folhas intermediárias em comparação aos outros compartimentos (apicais e senescentes), os teores desta clorofila foram superiores, o que denota que às folhas intermediárias possam responder melhor as avaliações da clorofila “a”.

Apesar de não ter havido diferenças significativas entre as espécies estudadas para as diferentes doses de cobre aplicadas, verifica-se que os teores de clorofila “a” foram superiores no tratamento controle.

Esse comportamento também foi verificado para o feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L.) DC.), milho (*Zea mays* L.), aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.) e videira (*Vitis vinifera*) cultivados em solos com altos teores de cobre (ROSA et al., 2014; SANTANA et al., 2015; TIECHER et al., 2016a; 2016b). A diminuição destes pigmentos pode ser atribuída, segundo Cambrollé et al. (2012) e Tiecher et al. (2016a), ao efeito adverso do excesso desses metais no transporte de elétrons na fotossíntese, causando diminuição da síntese ou o incremento da degradação de clorofila, possivelmente por fotoxidação.

Nas análises de variância (Tabela 9) se observa que, tanto nos compartimentos foliares intermediários e senescentes a clorofila “b” obteve teores significativos quando submetida a concentração de cobre, assim como interação entre as espécies.

**Tabela 9.** Resumo das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes às clorofila “b” em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.

FV	GL	Clorofila “b” apical	Clorofila “b” intermediária	Clorofila “b” senescente
<b>Bloco</b>	3	62.583,3564 <sup>ns</sup>	127.891,6902 <sup>ns</sup>	6.317,9927 <sup>ns</sup>
<b>Espécies (E)</b>	2	49.624,2576 <sup>ns</sup>	182.591,2187 <sup>ns</sup>	14.559,1629 <sup>ns</sup>
<b>Teor de cobre (C)</b>	3	64.926,7681 <sup>ns</sup>	111.672,2939 <sup>ns</sup>	62.506,1393 <sup>ns</sup>
<b>E x C</b>	6	98.793,5212 <sup>ns</sup>	195.137,2800**	78.624,2938**
<b>Erro</b>	33	51.275,7056	76.487,9038	26.225,4917
<b>Total</b>	47			
<b>CV (%)</b>		57,33	47,35	47,09

GL = Grau de liberdade; ns = não significativo; \* significativo ao nível de 1%;  
CV = Coeficiente de variação

Nas espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* na folha apical a clorofila “b” teve teores reduzidos nas concentrações de cobre, assim como entre as espécies, denotando talvez que o cobre inibiu o teor da clorofila “b” (Tabela 10).

**Tabela 10.** Clorofila “b” ( $\mu\text{g g}^{-1}$  MF) na folha apical em *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* em concentrações de cobre.

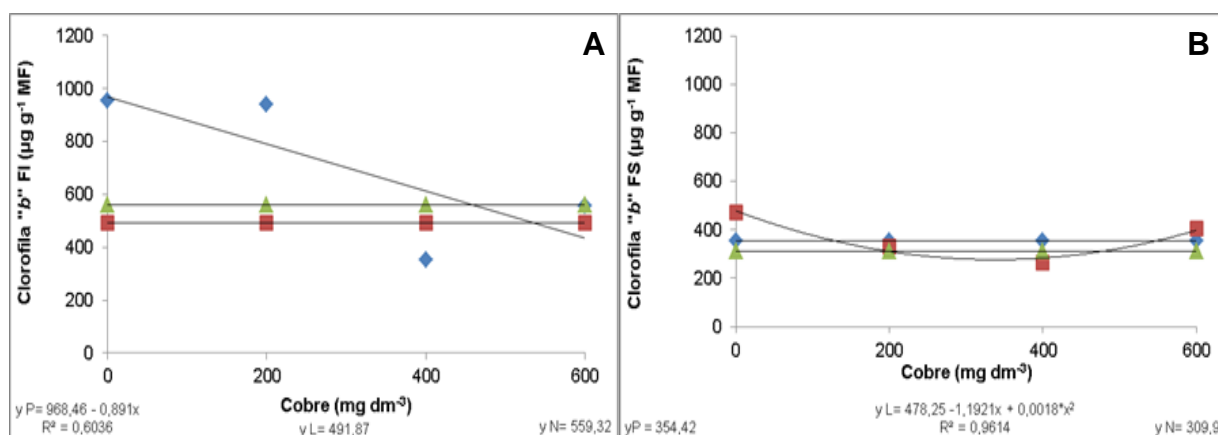
Cu ( $\text{mg dm}^{-3}$ )	<i>S. amazonicum</i>	<i>L. leucocephala</i>	<i>A. indica</i>
<b>0</b>	359,88 a	347,17 a	366,78 a
<b>200</b>	234,04 a	571,79 ab	700,84 b
<b>400</b>	304,33 a	515,31 a	323,43 a
<b>600</b>	435,85 a	202,94 a	377,38 a
<b>CV (%) = 57,33</b>	DMS = 393,03		

\*Médias seguidas de mesmas letras não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Para a clorofila “b” nas folhas intermediárias diferença estatística ocorreu no controle (sem adição do rejeito de cobre), porém nas concentrações de 400 e 600 mg dm<sup>-3</sup> as espécies tiveram o mesmo comportamento, sem significância (Figura 5 A).

Pode-se observar que ocorreu o mesmo em relação à clorofila “b” das folhas intermediárias com as folhas senescentes, dando a entender que o cobre teve interferência na atividade da clorofila “b”. Mas que a o *S. amazonicum* em comparação a clorofila “b” nas folhas intermediárias teve uma redução drástica em seu teor à medida que a contaminação aumentava.

O crescimento das espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* teve redução na produção de fitomassa, número de folhas e área foliar provocando dessa maneira redução na produção de clorofilas nos vários compartimentos das plantas, especialmente a clorofila “b”.



**Figura 5.** Clorofila “b” (µg g<sup>-1</sup> MF) média em folha intermediária (FI) (A) e senescente (FS) (B) em *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (□) e *A. indica* (△) em concentrações de cobre, aos 120 dias .

Em concentrações elevadas o elemento cobre geralmente é potencialmente tóxico para as espécies vegetais. Entretanto, nesta pesquisa pode-se perceber que ocorreu inibição do crescimento das três espécies, nas altas concentrações de Cu. Estes resultados são diferentes aos encontrados por Cambrollé et al. (2013b), quando estes autores trabalharam com videira (*Vitis vinifera* var. *sylvestris*) e os teores de clorofila “a” e “b” decresceram conforme o cobre aumentava. Vários pesquisadores (GOMES et al., 2011; YRUELA, 2013; NAIR et al., 2014; ADRESS et al., 2015) relataram o efeito do excesso de cobre sobre a clorofila resultando em degradação desse pigmento.

No entanto, vale salientar que em plantas tolerantes o conteúdo de clorofila pode aumentar ou não, sofrer alterações significativas em resposta ao tratamento com metais segundo Borghi et al. (2008). O excesso de cobre pode causar estresse oxidativo nos vegetais, devido ao aumento da produção de EROs, altamente tóxicos, que para combatê-las, os vegetais apresentam mecanismos antioxidantes que incluem as enzimas antioxidantes, como (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), catalase (CAT) e 46 peroxidase do guaiacol (GPX) que impede desse modo, danos oxidativos (ADRESS et al., 2015).

Os carotenoides foram influenciados pelas concentrações de cobre (Tabela 11) tendo interação significativa entre as espécies investigas.

**Tabela 11.** Resumos das análises de variância, pelo quadrado médio, referentes à carotenoides em folhas apical, intermediária e senescente aos 120 dias, em substrato cultivado com doses de cobre e as espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica*.

FV	GL	Carotenoides apical	Carotenoides intermediária	Carotenoides senescente
<b>Bloco</b>	3	11.397,7042 <sup>ns</sup>	25.164,1294 <sup>ns</sup>	781,9627 <sup>ns</sup>
<b>Espécies (E)</b>	2	11.990,3485 <sup>ns</sup>	48.114,2609 <sup>ns</sup>	9.556,3662 <sup>ns</sup>
<b>Teor de cobre (C)</b>	3	62.687,5195**	33.860,4569**	3.703,9432 <sup>ns</sup>
<b>E x C</b>	6	37.754,0127**	71.384,6565**	41.651,7887**
<b>Erro</b>	33	13.394,8764	18.205,7905	15.549,9321
<b>Total</b>	47			
<b>CV (%)</b>		36,61	28,82	35,51

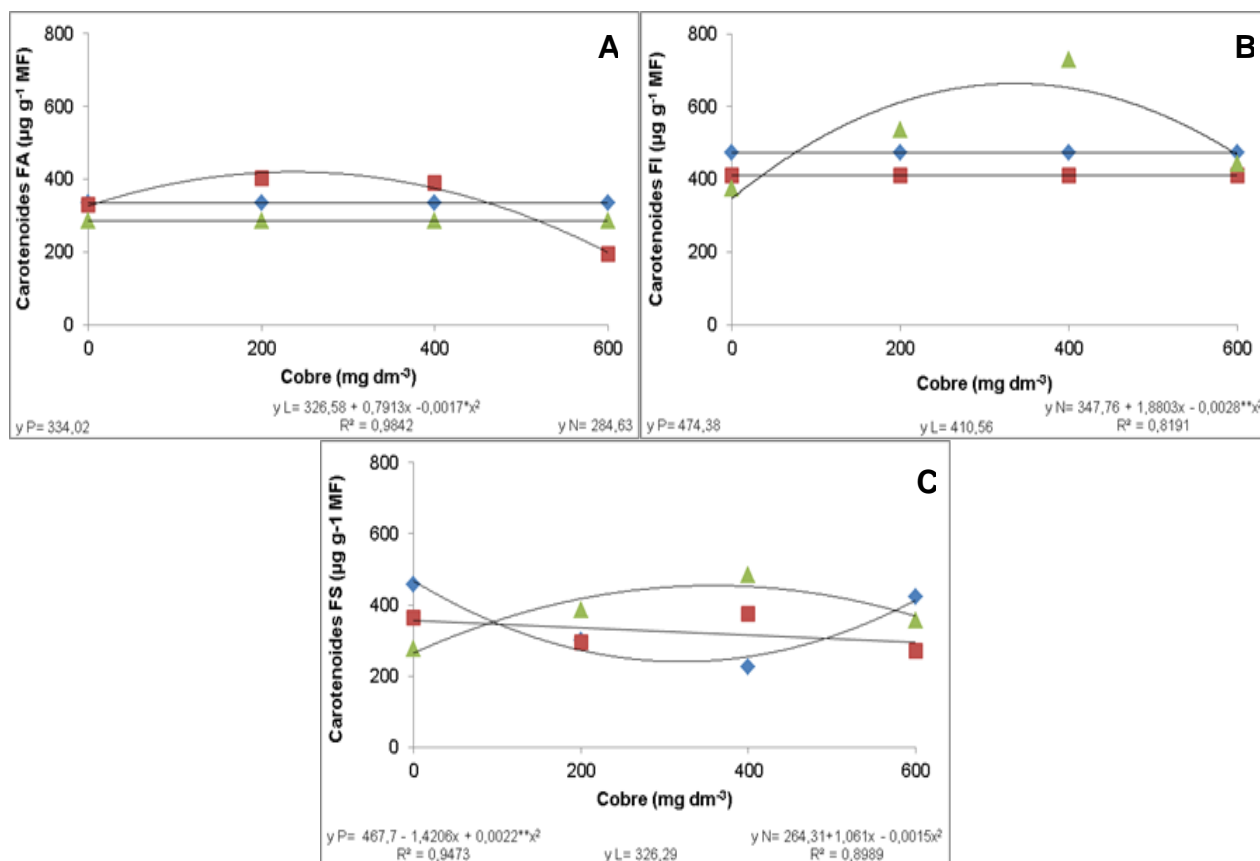
GL = Grau de liberdade; ns = não significativo; \* significativo ao nível de 1%;  
CV = Coeficiente de variação

Os carotenoides considerados pigmentos acessórios exercem função importante na proteção dos processos fotoquímicos quando a extinção fotoquímica de energia luminosa não é eficiente, de maneira que nas folhas apicais das espécies investigadas apenas a *L. leucocephala* se comportou diferente, pois teve um pico de atividade e, posteriormente decaiu com o aumento de concentração de cobre, ao passo que as outras plantas obtiveram uma média constante nas diferentes concentrações do cobre (Figura 6 A).

Para as folhas intermediárias na figura 6 B, os carotenoides permaneceram sem expressar diferenças entre as espécies, no entanto, o *A. indica* se comportou à medida que crescia o cobre no substrato os carotenoides cresciam, porém quando a

concentração foi de 600 mg dm<sup>-3</sup> as atividades dos carotenoides se tornaram sem significância estatística, atingindo valores médios entre as três espécies.

Em relação às folhas senescentes e os carotenoides o *S. amazonicum* teve sua atividade em declínio à medida que ocorria uma maior concentração de cobre, mas quando a concentração atingiu 322,86 mg dm<sup>-3</sup>, passou a ocorrer um aumento dos carotenoides de 238,37 µg g<sup>-1</sup> MF. Inverso ao *A. indica* que foi aumentando a atividade dos carotenoides e posteriormente reduziu para concentração de 353,66 mg dm<sup>-3</sup> correspondendo a 451,93 µg g<sup>-1</sup> MF de carotenoides (Figura 6 C).



**Figura 6.** Carotenoides (µg g<sup>-1</sup> MF) média em folha apical (FA) (A), intermediária (FI) (B) e senescente (FS) (C) em *S. amazonicum* (◇), *L. leucocephala* (□) e *A. indica* (△) em concentrações de cobre, aos 120 dias.

Segundo Taiz e Zeiger (2013) além de pigmentos acessórios, os carotenoides desempenham papel essencial na fotoproteção, protegendo o aparelho fotossintético contra o oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), extremamente reativo, que danifica muitos componentes celulares e, situam-se nas lamelas dos cloroplastos, em íntima associação com as clorofilas, o que permite a transferência de energia para as

clorofilas. Portanto, esses pigmentos são importantes na prevenção da indução de danos oxidativos causados pelo estresse (WAHID, 2007). Evidenciando neste estudo que os carotenoides se mantiveram em quantidades entre 200 e 500  $\mu\text{g g}^{-1}$  MF em todas as concentrações de cobre divergindo em relação aos compartimentos foliares das três espécies.

Silva et al. (2013) afirmam que omissões de nitrogênio, enxofre e ferro são os que mais prejudicaram o teor do pigmento. Enquanto que os maiores teores foram observados nas plantas cultivadas sob omissão de K, Mg, Mo, B, Mn e Cu indicando a manutenção desse pigmento nessas condições. Dessa maneira, mesmo sob deficiência K, Mg, Mo, B, Mn e Cu as plantas conseguem produzir carotenoides que podem atuar como antioxidantes nas plantas, inibindo os malefícios de radicais livres gerados em condições ambientais estressantes (SANCHEZ et al., 1999).

Enfim, os carotenoides fazem também parte integrante dos mecanismos de defesa, funcionando como inibidores de EROs, dado que atuam como poderosos antioxidantes neste processo através do sistema conjugado de duplas ligações que possuem (MOURATO et al., 2009).

## 4 CONCLUSÕES

A atividade da enzima superóxido dismutase teve sua atividade com diferença significativa entre as espécies investigadas, principalmente nas folhas intermediárias e na concentração de  $200 \text{ mg dm}^{-3}$ , onde destacou-se a *Schizolobium amazonicum* em relação a *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica*.

O cobre não promoveu nenhum efeito na atividade da enzima guaiacol peroxidase, nas condições estudadas para as três espécies.

Os teores de clorofila “a” e “b”, e carotenoides nos compartimentos apicais, intermediários e senescentes para as três espécies não tiveram diferença entre si, mas na concentração de  $400 \text{ mg dm}^{-3}$ , houve alteração onde a espécie *Azadirachta indica* registram teores diferentes de clorofila “a” e carotenoides.

As folhas intermediárias das espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica*, apresentaram os maiores teores de clorofila “a” e “b” e carotenoides, indicando como prováveis folhas de serem utilizadas para estas avaliações.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADREES, M. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 11, p. 8148-8162. 2015.

AHMAD, A.; ROBINSON, A. R.; DUENSING, A.; VAN DRUNEN, E.; BEVERLOO, H. B.; WEISBERG, D. B.; HASTY, P.; HOEIJMAKERS, J. H.; NIEDERNHOFER, L. J. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair. **Mol Cell Biol.**, v. 28, n. 16, p. 5082-92, 2008.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol**, v.24, n. 1, p. 1-15.1949.

ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, v.141: 391-396, 2006.

ABRAF - Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário estatístico da ABRAF**. Ano base 2012. Brasília: ABRAF: 148 p. 2013.

BATES, L.S., WALDERN, R.P.; TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207. 1973.

BORGHI, M.; TOGNETTI, R.; MONTEFORTI. G.; SEBASTIANI, L. Responses of two poplar species (*Populus alba* and *Populus canadensis*) to high copper concentrations. **Environmental and Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 290-9. 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, v. 86, n. 9, p. 867-874, 2012.

CAMBROLLÉ, J.; GARCIA, J. L.; OCETE, R.; FIGUEROA, M. E.; CANTOS, M. Growth and photosynthetic responses to copper in wild grapevine. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 294-301, 2013b.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, J.; EVERSE, K.E.; GRISHAM, M.B. (Eds.). **Peroxidases in Chemistry and Biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 25–50.

CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.). **Recuperação de Áreas Degradadas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa / Sociedade Brasileira de Recuperação de Áreas Degradadas, p.183-196. 1998.

CAVERZAN, A.; CASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. **Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes enzimas envolvidas na tolerância das plantas ao estresse. Abióticos e bióticos Stress em Plantas** - Avanços e Perspectivas Futuras. Capítulo 20. 2016.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. **Valores orientados para solos e águas subterrâneas para o estado de São Paulo** - 2005. Nº 195-2005-E, de 23 de nov. 2005.

DAS, K.; SAMANTA, L.; CHAINY, G. B. N. A modified spectrophotometric assay of superoxide dismutase using nitrite formation by superoxide radicals. **Ind. J. Biochem. Biophys**, v. 37, p. 201-204. 2000.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Rio de Janeiro, 3ª Ed., 2009, 212p.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042. 2011.

FIELDES, M. A.; GERHARDT, K. E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, v.132, p.89-99, 1998.

FOYER, C. H.; BLOOM, A. J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G. Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 60, p. 455-484. 2009.

GAJEWSKA, E.; SKŁODOWSKA, M.; SLABA, M.; MAZUR, J. Effect of Nickel on Antioxidative Enzyme Activities, Proline and Chlorophyll Content in Wheat Shoots. **Biol Plant.**, v. 50, p. 653-659, 2006.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.48, n.12, p.909-30. 2010.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. D.; MELO, S.; NOGUEIRA, M. D. O. G.; CASTRO, E. M. D.; SOARES, A. M. Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**. v. 68, n. 5, p.566-73. 2011.

HASANUZZAMAN, M.; NAHAR, K.; ALAM, M. M.; FUJITA, M. Adverse Effects of Cadmium on Plants and Possible Mitigation of Cadmium-Induced Phytotoxicity – Cap. one in Cadmium: Characteristics, Sources of Exposure, Health and Environmental Effects. Ed. Mirza Hasanuzzaman & Masayuki Fujita. **Nova Science** Publishers, Inc. Nova Iorque. EUA. 2013.

HASSAN, Z.; AARTS, M. Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants. **Environmental and Experimental Botany**. v. 72, p. 53-63. 2011.

HOULLOU, L. M.; SOUZA, R. A.; SANTOS, E. C. P.; SILVA, J. J. P.; BARBOSA, M. R.; SAUVÉ, J. P. G.; HARAND, W. Clonal propagation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) via direct and indirect in vitro regeneration. **Revista Árvore**, v.39, n.3, p. 439-445. 2015.

JIANG, M. Y.; ZHANG, J. H. Water stress-induced abscisic accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. **J. Exp. Bot.**, v. 379, p. 2401-2410. 2002.

KABATA-PENDIAS, A. Trace elements in soils and plants. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. 505p.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: PACKER, L., DOUCE, R. (Eds.). **Methods in enzymology**. London: Academic Press. p. 350-38. 1987.

MARCHIOL, L.; SACCO, P.; ASSOLARI, S.; ZERBI, G. Reclamation of polluted soil: Phytoremediation potential of crop-related Brassica species. **Water Air and Soil Pollution**. v.158, n. 1, p. 345-356. 2004.

MARQUES, D. M.; SILVA, A. B.; MANTOVANI, J. R.; PEREIRA, D. S.; SOUZA, T. C. Growth and physiological responses of tree species (*Hymenaea courbaril* L., *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. and *Myroxylon peruiferum* L. F.) exposed to different copper concentrations in the soil. **Revista Árvore**, v.42, n.2, 2018.

MOURATO, M. P.; MARTINS, L. L.; ANDRADA, M. P. C. Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. **Biologia Plantarum**, v.53, n.1, p. 105-111. 2009.

MØLLER, I.M.; JENSEN, P.E.; HANSSON, A.. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v.58, p.459-481, 2007

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v.59, p. 651-681. 2008.

NAIR, P. M. G.; KIM, S.; CHUNG, I. M. Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre em feijão mung (*Vigna radiata* EU.) mudas: respostas nível fisiológico e moleculares das plantas cultivadas *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 36, n.11, p. 2947-58. 2014.

NEILSON, S.; RAJAKARUNA, N. Phytoremediation of Agricultural Soils: Using Plants to Clean Metal-Contaminated Arable Land in Phytoremediation, Ed. Ansari, A. A.; Gill, S. S.; Gill, R.; Lanza, G. R.; Newman, I., **Springer International Publishing**. 2015.

OHASHI, S. T.; JAG, Y.; FARIAS NETO, J. T. Variability among *Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby provenances planted in the municipality of Colares - PA. **Acta Amazonia**, v. 40, p.81-88. 2010.

PANAGOPOULOS, I.; BORNMAN, J. F.; BJORN, L. O. Effects of ultraviolet radiation and visible light on growth, fluorescence induction, ultraweak luminescence and peroxidase activity in sugar beet plants. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.8, p. 73–87. 1990.

PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review Plant Biology**, v. 56, n. 1, p. 15-39. 2005.

PINTO, F. R. **Caracterização da acumulação e da tolerância ao stress induzido por Cd em plantas de espinafre (*Spinacea oleracea* L.)**. 2017. 257 f. Tese (Doutorado em Engenharia do Ambiente). Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa, Portugal, 2017.

RASCIO, N.; NAVORI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?. **Plant Science**, v.180, p. 169-181. 2011.

ROSA, D. J.; AMBROSINI, V. G.; BASSO, A.; BORGHEZAN, M.; BRUNETO, G. *Vitis labrusca* L.) cultivated in soil with high levels of copper and liming. In: **BIO Web of Conferences**, Mendonza, Argentina: EDP Sciences, 2014.

ROSA, L. S. Botanical, anatomical and technological characteristics of parica (*Schizolobium amazonicum* Huber ex. Ducke). **Revista Ciências Agrárias**, v. 46, p.63-79. 2006.

SÁNCHEZ, A.; FLORES-COTERA, L.B.; LANGLEY, E.; MARTIN, R.; MALDONADO, G.; SÁNCHEZ, S. Carotenoides: Estructura, Función, Biosíntesis, Regulación y Aplicaciones. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, 41, p.175-191. 1999.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. **Journal of Plant Research**, v.127, p.119-29. 2014.

SANTANA, N. A.; FERREIRA, P. A. A.; SORIANI, H. H.; BRUNETTO, G.; NICOLOSO, F. T.; ANTONIOLLI, Z. I.; JACQUES, R. J. S. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. **Applied Soil Ecology**, v. 96, p. 172-182. 2015.

SILVA, S. T.; ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; BOLDRIN, P. F.; PINTO, J. E. B. P. **Efeito da nutrição mineral na produção de pigmentos fotossintéticos de *Achillea millefolium* L. (ASTERACEAE)**. 64º Congresso Nacional de Botânica Belo Horizonte, 2013.

SOFO, A.; SCOPA, A.; NUZZACI, M.; VITTI, A. Ascorbato peroxidase e catalase actividades e da sua regulação genética em plantas submetidas à Seca e salienta Salinidade. **Int. J. Mol. Sei.**, v. 16, p.13561-13578. 2015.

TAIZ, G.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes' activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Science**, v.153, p. 65-72. 2000.

TEKCHANDANI, S.; GURUPRASAD, K.N. Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. **Plant Science**, v.136, p.131-137. 1998.

TIECHER, T. L.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; LOURENZI, C. R.; TIECHER, T.; GIROTTI, E.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; DE CONTI, L.; MIMMO, T.; CESCO, S.; BRUNETTO, G. The potential of *Zea mays* L. in remediating copper and zinc contaminated soils for grapevine production. **Geoderma**, v. 262, p.52-61. 2016a.

TIECHER, T. L.; TIECHER, T.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A.; NICOLOSO, F. T.; SORIANI, H. H.; TASSINARI, A.; PARANHOS, J. T.; DE CONTI, L.; BRUNETTO, G. Physiological and nutritional status of black oat (*Avena strigosa* Schreb.) grown in soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 106, p. 253-263, 2016b.

WAHID, A. Physiological implications of metabolite biosynthesis for net assimilation and heat-stress tolerance of sugarcane (*Saccharum officinarum*) sprouts. **J Plant Res.**, v. 120, p. 219-228, 2007.

XU, J.; DUAN, X.; YANG, J.; BEECHING JR, Z. P. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots. **Plant Physiology**. v.161, n.3, p.1517-1528. 2013.

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1090-1109. 2013.

ZERAIK, A. E.; SOUZA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; LEITE, O. D. Desenvolvimento de um *spot test* para o monitoramento da atividade da peroxidase em um procedimento de purificação. **Quim. Nova**, v. 31, p. 731-734. 2008.

### **CAPÍTULO III**

#### **CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DAS ESPÉCIES *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* EM SOLO CONTAMINADO POR COBRE**

# CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DAS ESPÉCIES *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* EM SOLO CONTAMINADO POR COBRE

## RESUMO

A mineração realiza deposição de rejeito em barragem que pode provocar degradação ambiental, podendo provocar alterações genéticas em espécies vegetais. Os metais pesados depositados em barragens necessitam serem investigados no âmbito da fitorremediação. O objetivo da pesquisa foi à caracterização cromossômica através do bandejamento CMA<sup>+</sup> (Cromomicina A<sub>3</sub>) e DAPI<sup>-</sup> (4'-6-diamidino-2-fenilindol) nas espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica*, e detectar o surgimento de possíveis alterações cromossômicas provenientes da contaminação pelo cobre no substrato utilizado no cultivo. O experimento foi desenvolvido no jardim experimental do Laboratório de Citogenética Vegetal do CCA, UFPB. As sementes foram colocadas em substratos com concentrações de cobre (0, 200, 400 e 600 mg Cu dm<sup>-3</sup> solo). A preparação cromossômica foi realizada utilizando pontas de raízes jovens pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 0,002 M, por 24 horas a 4 °C, e fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por 2-24 horas. As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada por cinco minutos e digeridas a 37 °C por 1 hora em solução contendo 2% de celulase. Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com 10 µL de CMA<sup>+</sup> (0,1 mg ml<sup>-1</sup>) por uma hora, depois coradas com 10 µL de DAPI<sup>-</sup> (1 µg ml<sup>-1</sup>) por meia hora, lavadas com água destilada, secas ao ar e montadas com meio contendo glicerol/tampão McIlvaine pH 7,0 (1:1). A determinação da fórmula cariotípica e análises dos padrões de bandas heterocromáticas foram realizadas, as quais foram medidas de três metáfases com morfologia cromossômica clara utilizando o software Image tool® versão 3.0. Das espécies analisadas, *Schizolobium amazonicum* apresentou 2n=26, *Azadirachta indica* 2n=28 e *Leucaena leucocephala* 2n=112, estas apresentaram predomínio de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Os dados da presente análise foram insuficientes para detectar distúrbio genotóxico nas espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* cultivadas em rejeito de cobre. Os dados cariológicos podem ser utilizados em estudos citotaxômicos e evolutivos para os representantes da Superordem Rosanae, bem como, servir de contribuição científica no apoio a conservação dessas espécies. Para a espécie *Schizolobium amazonicum* o número cromossômico encontrado foi de 2n=26.

**Palavras-chave:** *Schizolobium amazonicum*, cromossomos, rejeito de mineração, fitorremediação.

# CITOGENETIC CHARACTERIZATION OF SPECIES *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* AND *Azadirachta indica* IN SOIL CONTAMINATED BY COPPER

## ABSTRACT

The mining makes deposit of waste in a dam that can cause environmental degradation, and may cause genetic alterations in plant species. Heavy metals deposited in dams need to be investigated under phytoremediation. The objective of the research was to characterize the chromosomal characterization through CMA<sup>+</sup> banding + (Cromomycin A<sub>3</sub>) and DAPI<sup>-</sup> (4'-6-diamidino-2-phenylindole) in the species *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* and *Azadirachta indica*, and to detect the occurrence of possible chromosomal alterations from copper contamination on the substrate used in the crop. The experiment was carried out in the experimental garden of the CCA Plant Cytogenetics Laboratory, UFPB. The seeds were placed on substrates with copper concentrations (0, 200, 400 and 600 mg Cu dm<sup>-3</sup> soil). The chromosome preparation was performed using young root tips pretreated with 0.002 M 8-hydroxyquinoline (8-HQ) for 24 hours at 4 °C and fixed in Carnoy 3:1 (ethanol: glacial acetic acid) by 2-24 hours. The roots were washed twice in distilled water for five minutes and digested at 37 °C for 1 hour in a solution containing 2% cellulase. After aging, the slides were stained with 10 µl CMA<sup>+</sup> (0.1 mg ml<sup>-1</sup>) for one hour, then stained with 10 µl DAPI<sup>-</sup> (1 µg ml<sup>-1</sup>) for half an hour, washed with distilled water, air dried and mounted in a place containing glycerol / McIlvaine buffer pH 7.0 (1:1). The determination of the karyotype formula and analyzes of the heterochromatic bands patterns were performed, which were measured from three metaphases with clear chromosome morphology using Image tool® software version 3.0. Concerning the species analyzed, *Schizolobium amazonicum* presented 2n=26, *Azadirachta indica* 2n=28 and *Leucaena leucocephala* 2n=112, which presented predominance of metacentric and submetacentric chromosomes. The data of the present analysis were insufficient to detect genotoxic disorder in *S. amazonicum*, *L. leucocephala* and *A. indica* species grown in copper waste. The karyological data can be used in cytotaxonomic and evolutionary studies for the representatives of the Rosanae Superordination, as well as to serve as a scientific contribution to the conservation of these species. For *Schizolobium amazonicum*, the chromosome number was 2n=26.

**Keywords:** *Schizolobium amazonicum*, chromosomes, mining tailings, phytoremediation.

## 1 INTRODUÇÃO

Os despejos de efluentes domésticos e industriais têm acelerado a degradação ambiental e aumentado o risco de contaminação para espécies da flora brasileira. Os principais contaminantes existentes são os metais, que mesmo sendo provenientes de fontes naturais são lançados na água e solo em decorrência de atividades antrópicas (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Quando biodisponíveis, os metais podem ser incorporados pelos organismos e, serem inseridos nos diferentes níveis das cadeias tróficas (BAIRD; CANN, 2004). Esse desbalanço de metais e outros contaminantes, podem causar sérios danos ao DNA de espécies vegetais (GICHNER et al., 2006; LIU et al., 2009), levando a formação de aberrações cromossômicas que podem ser detectados pela citogenética clássica (EGITO et al., 2007; MAZZEO; MARTIN-MORALES, 2015).

Para Kumar e Bhardwaj (2017) investigando a genotoxicidade de metais pesados em meristemas de cominho (*Cuminum cyminum*) concluíram que estes induzem vários efeitos genotóxicos. Já Franzaring et al. (2017) investigando fitotoxicidade de rejeitos de estanho de mineração e acumulação de metais pesados em trigo mourisco (*Fagopyrum esculentum* Moench), milho (*Zea mays* L.), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) concluíram que as relações de dose-resposta indicaram diferentes sensibilidades nas espécies.

Estudos citogenéticos têm sido utilizados na sistemática vegetal e na fundamentação de hipóteses de filogenia em diversos grupos de plantas (MORAES et al., 2012; SHE et al., 2014; MORAES; LEITCH; LEITCH, 2015; SOUSA; SUSANNA, 2015; ACOSTA; MOSCONE; COCUCCHI, 2016; BALTISBERGER; HORANDL, 2016).

Dados cromossômicos podem auxiliar também na preservação ambiental, na recuperação de áreas degradadas e fitorremediação e na detecção de alterações cromossômicas em ambientes contaminados. Diversos autores têm abordado a ocorrência de genotoxicidade em plantas ocasionada por metais pesados, com intuito de avaliar o impacto que esses contaminantes podem causar ao DNA vegetal, comprovando assim seu potencial genotóxico (GICHNER et al., 2006; EGITO et al., 2007; LIU et al., 2009; MAZZEO; MARTIN-MORALES, 2015).

Para Mediouni et al. (2006) o excesso de cobre nos compartimentos vegetais promove a formação de espécies reativas de oxigênio e o seu efeito tóxico para os

vegetais foi superior do que os outros metais não essenciais. A influência de modificações epigenéticas na estrutura da cromatina para a expressão de genes é controlada por mecanismos básicos como, a metilação do DNA, modificações nas histonas, e RNA (RODENHISER; MANN, 2006). A interação dos supracitados mecanismos conduz a diferenças herdáveis na expressão do gene, de maneira que um erro ocorrendo nos mecanismos conduz a desordens epigenéticas, segundo Dawson; Kouzarides (2012).

A empresa que beneficia o cobre na microrregião de Carajás-PA dispõe de capacidade instalada de produção de 540 mil t ano<sup>-1</sup> de concentrado, com 30% de cobre e 8 g t<sup>-1</sup> de ouro, com capacidade para processar 41 mil t de minério por dia (BERGERMAN; DELBONI; NANKRAN, 2009). Especificamente a mina Sossego, possui uma lagoa de rejeitos com resíduos metálicos de cobre, que é uma preocupação com possíveis impactos ambientais.

Para Souza (2016) estudando tiririca (*Cyperus rotundus*) avaliando seu potencial na absorção de metais, concluiu que o acúmulo de metais em seus diferentes compartimentos sofreu variação no seu perfil químico referente ao metabolismo secundário.

Das espécies que ocorrem em ambientes degradados pelo rejeito de cobre no estado do Pará, encontram-se no entorno da barragem algumas espécies de várias famílias como Poaceae, Cyperaceae, Fabaceae, Euphorbiaceae, Thyphaceae, Cucurbitaceae, entre outras.

O objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização cromossômica através do bandejamento CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> em três espécies arbóreas *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke, *Leucaena leucocephala* Lam. de Wit. e *Azadirachta indica* A. Juss., assim como detectar o surgimento de possíveis alterações cromossômicas provenientes da contaminação pelo cobre no substrato utilizado no cultivo das mesmas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

O experimento foi conduzido em jardim experimental em vasos plásticos a céu aberto anexo ao Laboratório de Citogenética Vegetal, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, no período de março a outubro de 2017. Foram analisadas três espécies *S. amazonicum*, *L. leucocephala* e *A. indica* com possível potencial de fitorremediar cobre proveniente de rejeito de barragem de mineração ocorrente em Canaã dos Carajás, Estado do Pará (Figura 1).



**Figura 1.** Mina Sossego e barragem de rejeito de cobre, em Canaã dos Carajás, PA.

Todas as espécies foram semeadas em substratos com diferentes concentrações de cobre: 0; 200; 400 e 600 mg Cu dm<sup>-3</sup> solo. As avaliações ocorreram após 120 dias. Exsicatas de todas as espécies analisadas encontram-se depositadas no Herbário Jaime Coelho de Moraes do CCA, com as seguintes identificações para *S. amazonicum* (n. 23.691); *L. leucocephala* (n. 23.635) e *A. indica* (n. de coleta 1.342).

## **2.2 Preparação Cromossômica**

Foram utilizadas pontas de raízes jovens pré-tratadas com 8-hidroxiquinoleína (8-HQ) 0,002 M, por 24 horas a 4 °C, e posteriormente fixadas em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético glacial) por 2-24 horas a temperatura ambiente. As raízes foram lavadas duas vezes em água destilada por cinco minutos e digeridas a 37 °C por 1 hora em solução contendo 2% de celulase (Onozuka®) e 20% de pectinase (Sigma®, Saint Louis, MO) (w/v).

O meristema de cada raiz foi esmagado sobre uma lâmina em uma gota de ácido acético 45%, coberta com uma lamínula, a qual foi posteriormente removida após congelamento em nitrogênio líquido. Em seguida as lâminas foram secas ao ar e envelhecidas por três dias a temperatura ambiente.

## **2.3 Coloração com Fluorocromos CMA<sup>+</sup> (Cromomicina A<sub>3</sub>) e DAPI<sup>-</sup> (4' -6-diamidino-2-fenilindol)**

Após o envelhecimento, as lâminas foram coradas com 10 µL de CMA<sup>+</sup> (0,1 mg ml<sup>-1</sup>) por uma hora, em seguida coradas com 10 µL de DAPI<sup>-</sup> (1 µg ml<sup>-1</sup>) por meia hora, lavadas com água destilada, secas ao ar e montadas com meio contendo glicerol/tampão McIlvaine pH 7,0 (1:1). Em seguida, as lâminas foram estocadas por três dias em uma câmara escura para estabilização dos fluorocromos. As melhores metáfases foram analisadas em fotomicroscópio Zeiss® com câmera de vídeo Axio Cam MRC5 usando o software Axiovision® 4.8.

## **2.4 Determinação da Fórmula Cariotípica e Análises dos Padrões de Bandas Heterocromáticas**

Para cada espécie, foram medidas três metáfases com morfologia cromossômica clara utilizando o software Image tool® versão 3.0. A razão entre os braços ( $r$  = comprimento do braço longo/comprimento do braço curto) foi utilizada para classificar os cromossomos em metacêntricos ( $r = 1-1,49$ ), submetacêntricos ( $r = 1,5-2,9$ ), ou acrocêntricos ( $r \geq 3,0$ ), de acordo com Guerra (1986). As bandas heterocromáticas foram identificadas de acordo com Schweizer (1981), como segue: CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (proximais ou terminais/teloméricas).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os detalhes do cariótipo das espécies analisadas, seus respectivos números cromossômicos ( $2n$ ), fórmulas cariotípicas (FC), variações nos tamanhos dos cromossomos ( $\mu\text{m}$ ) e bandas heterocromáticas estão apresentados na tabela 1. Das espécies analisadas, *Schizolobium amazonicum* apresentou  $2n=26$ , *Leucaena leucocephala*,  $2n=112$  e *Azadirachta indica*  $2n=28$ . Nas três espécies houve o predomínio de cromossomos metacêntricos e submetacêntricos. Contudo, nas três espécies foram identificados alguns cromossomos acrocêntricos, especialmente entre os menores cromossomos do complemento.

**Tabela 1.** Lista com as espécies arbóreas analisadas, com seus respectivos vouchers, número cromossômico ( $2n$ ), fórmula cariotípica (FC), variação no tamanho cromossômico ( $\mu\text{m}$ ) e bandas heterocromáticas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>+</sup>.

Espécie	Voucher	$2n$	FC	Tamanho Cromossômico ( $\mu\text{m}$ )	Bandas Heterocromáticas CMA <sup>+</sup> /DAPI <sup>+</sup>
<i>Schizolobium amazonicum</i>	Tyski, L 1	26	10M + 14S + 2A	1,41 – 2,72	4t + 22p
<i>Leucaena leucocephala</i>	Oliveira, AKD, Oliveira, FKD 1	112	46M + 60S + 6A	1,00 – 4,91	6t
<i>Azadirachta indica</i>	Cordeiro, JMP 1	28	18M + 10S	1,89 – 4,44	2p + 2t

\*p= banda proximal; t= banda terminal/telomérica.

\*\*M= Metacêntrico; S= Submetacêntrico; A= Acrocêntrico.

*Azadirachta indica* apresentou  $2n=28$  (Figura 2. A-C), corroborando com contagens prévias (SINGHAL; GILL, 1984). Nessa espécie observou-se fórmula cariotípica contendo 18M + 10S e cromossomos variando de 1,89  $\mu\text{m}$  a 4,44  $\mu\text{m}$  (Tabela 1). A família Meliaceae apresenta alta variação no número cromossômico que vai de  $2n=16$  (*Sandoricum koetjape* (Burm.f.) Merr.) a  $2n=\text{ca.}360$  (*Trichilia dregeana* Sond.), subsequentemente apresentando uma alta heterogeneidade em seu número básico,  $x=6, 7, 8, 12, 13, 14, 23, 25$  com diferentes níveis de ploidia (STYLES; VOSSA, 1971; GROSSI et al., 2011).

Quanto à tribo Melieae, onde o gênero *Azadirachta* está inserido, o número  $2n=28$  é recorrente, indicando número básico  $x=14$  como o mais provável e estável

para a tribo. Na presente análise foram visualizadas 2 bandas pericentroméricas e 2 bandas terminais/teloméricas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> heterocromáticas, essas indicando as regiões organizadoras do nucléolo (RON's) (Figura 2. Insertos em C). Não existe qualquer registro de dados de distribuição da heterocromatina para os representantes da família Meliaceae, dificultando assim discussões acerca desse parâmetro para *A. indica*.

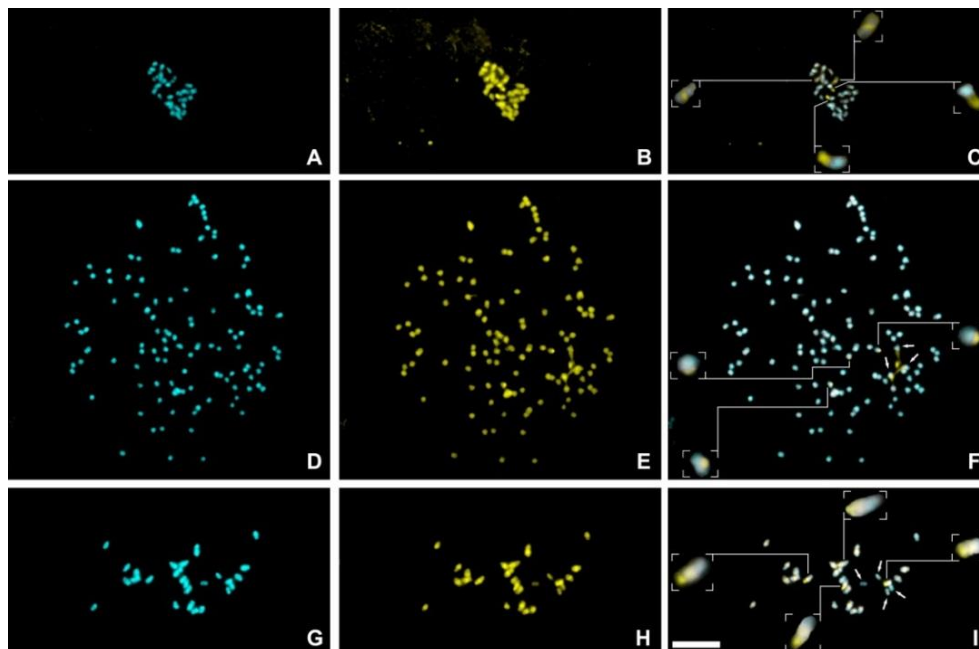
*Leucaena leucocephala* apresentou  $2n=112$  (Figura 2. D-F), fórmula cariotípica contendo 46M + 60S + 6A, e cromossomos variando de 1 µm até 4,91 µm (Tabela 1). A variação no número cromossômico do gênero *Leucaena* vai de  $2n=52$ , como em *L. cuspidata* Standley até  $2n=112$  em *L. involucrata* Zárate (Cardoso et al., 2000). A origem das espécies poliploides de *Leucaena* ainda não está bem resolvida, mas supõe-se que tenham surgido por aloploidização depois de hibridização entre duas espécies diploides (HUGHES, 1998; CARDOSO et al., 2000).

Dentre os representantes da família Fabaceae existe alta variação cromossômica numérica, onde é sugerido para o grupo números cromossômicos básicos que vão de  $x=4$  a  $x=64$  (BAIRIGANJAN; PATNAIK, 1989), onde pode-se hipotetizar que os números básicos que melhor explicam a evolução dos cariótipos poliploides de *Leucaena* seriam  $x=26$ , 27 e 28. O bandeamento com CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> em *Leucaena leucocephala* mostrou blocos heterocromáticos ricos principalmente em GC (CMA<sup>+</sup>) e nenhuma banda rica em AT (DAPI<sup>+</sup>), no total de 6 bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (Figura 2. F). Dentre essas, 3 bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> conspícuas distendidas (Figura 2. Indicadas pelas setas em F), possivelmente indicando as RON's ativas, e 3 bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> menos conspícuas não distendidas (Figura 2. Indicadas por insertos em F). Estudos dos padrões da heterocromatina em representantes da família Fabaceae (SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004; SOUSA et al., 2012; CORDEIRO; FELIX, 2018) têm demonstrado que apenas blocos heterocromáticos ricos em GC são visualizados sejam terminais/teloméricos ou proximais, como no gênero *Senna* (CORDEIRO; FELIX, 2017) ou em *Dioclea virgata* (L.C. Rich.) Amshoff (SOUZA; BENKO-ISEPPON, 2004), corroborando os dados da presente análise.

*Schizolobium amazonicum* apresentou  $2n=26$  (Figura 2. G-I), contagem inédita, com fórmula cariotípica de 10M + 14S + 2A e cromossomos variando de 1,41 µm até 2,72 µm. O *S. amazonicum* é uma Caesalpinioideae (Fabaceae), e como discutido anteriormente, o número básico para essa família varia de  $x=4$  a  $x=64$  (BAIRIGANJAN;

PATNAIK, 1989). Outra espécie do gênero é o *S. parahyba* (Vell.) Blake que apresenta  $2n=24$  (BIONDO et al., 2005). Essas duas espécies são as únicas aceitas em termos taxonômicos, o que leva a crer que o número cromossômico básico para esse gênero pode ser  $x=12$  ou  $x=13$ , onde por eventos de disploidia ambas as hipóteses podem ter sido possíveis à evolução cariotípica do grupo. Quanto aos padrões da heterocromatina, *S. amazonicum* apresentou 4 bandas terminais/teloméricas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> (Figura 2. Insertos em I), possivelmente indicando as RON's. Além disso, todos os cromossomos de *S. amazonicum* apresentaram bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> proximais, exceto por dois pares de cromossomos menores (Figura 2. Indicados por setas em I), e ainda algumas regiões mais coradas com DAPI<sup>-</sup> para alguns cromossomos.

Segundo a literatura e a presente análise, o número de bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> terminais/teloméricas para as Fabaceae apresenta uma variação de 2 a 6 bandas heterocromáticas. Bandas CMA<sup>+</sup> proximais são mais variáveis e sua existência ou ausência possivelmente se deve a alguma família de DNA satélite que tenha evoluído junto às regiões proximais dos cromossomos de espécies mais derivadas dentro da família Fabaceae (BRUNEAU et al., 2001; MILLER et al., 2003).



**Figura 2.** Células metafásicas mitóticas mostrando a distribuição de bandas heterocromáticas de *Azadirachta indica* (A-C), *Leucaena leucocephala* (D-F) e *Schizolobium amazonicum* (G-I). Insertos em C, F e I referem-se às bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup>. Setas em F indicando bandas CMA<sup>+</sup>/DAPI<sup>-</sup> distendidas, em I setas indicando dois pares de cromossomos sem bandas proximais. Barra em I = 10  $\mu$ m.

### 3 CONCLUSÕES

Não foi detectado qualquer distúrbio genotóxico nas espécies *Schizolobium amazonicum*, *Leucaena leucocephala* e *Azadirachta indica* cultivadas em rejeito de barragem de cobre.

Os dados cariológicos obtidos devem ser testados em estudos citotaxômicos e evolutivos para os representantes da Superordem Rosanae, bem como, servir de contribuição à conservação dessas espécies.

Para espécie *Schizolobium amazonicum* o número cromossômico encontrado de  $2n = 26$ , não estava disponível anteriormente na literatura.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA, M. C.; MOSCONE, E. A.; COCUCCHI, A. A. Using chromosomal data in the phylogenetic and molecular dating framework: karyotype evolution and diversification in *Nierembergia* (Solanaceae) influenced by historical changes in sea level M. C. **Plant Biology**, v.18, n.3, p. 514-526, 2016.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Environmental Chemistry**. New York: W.H. Freeman, 2004.
- BAIRIGANJAN, G. C.; PATNAIK, S. N. Chromosomal Evolution in Fabaceae. **Cytologia**, v. 54, p. 51-64, 1989.
- BALTISBERGER, M.; HORANDL, E. Perspectives in Plant Ecology, **Evolution and Systematics**, v. 18, p. 1-14, 2016.
- BERGERMAN, M.; DELBONI, H.; NANKRAN, M. Estudo de variabilidade e otimização do circuito de moagem SAG da Usina do Sossego. **Revista Escola de Minas**, v. 62, n.1, p. 93-97, 2009.
- BIONDO, E.; MIOTTO, S. T.S.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae-Leguminosae do Sul do Brasil. **Ciência Florestal**, vol. 15, n. 3, p. 241-248, 2005.
- BRUNEAU, A.; FOREST, F.; HERENDEEN, P. S.; KLIGAARD; LEWIS, G. P. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. **Systematic Botany**, v. 26, n. 3, p. 487-514. 2001.
- CARDOSO, M. B.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; BODANESE-ZANETINI, M. H. Taxonomic and evolution ary implications of intraspecific variability in chromosomes numbers of species of *Leucaena* Benth. (Leguminosae). **Bot.J. Linn. Soc.** 134, p. 549-556. 2000.
- CORDEIRO, J. M. P.; FELIX, L.P. Intra- and interspecific karyotypic variations of the genus *Senna* Mill. (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 32, n. 1, p. 128-134, 2018.
- DAWSON, M. A.; KOUZARIDES, T. Cancer epigenética: a partir de mecanismo para terapia. **Celular**, v. 150, n.1, p.12-27, 2012.
- EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. das G.; MEDEIROS, S. R. B.; LIMA, L. F. Cytoxi and genotoxic potencial of surface water fronj the Pitibu river northerastern/RN Brasil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, n. 2, p. 435-441, 2007.
- FRANZARING, J. C.; DAMSOHN, W.; ANDREAS FANGMEIER, A.; SCHLOSSER, S.; KURZ, H.; BÜTTNER, P. Phytotoxicity of tin mine waste and accumulation of involved heavy metals in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* MOENCH). **International Journal of Phytoremediation**. University of Florida. v. 21, p.49. 2017.

GICHNER, T.; PATKOVA, Z.; SZÁCOVA, J.; DEMNEROVÁ, K. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 65, p. 420-426, 2006.

GROSSI, J. A.; GODOY, S. M.; MACEDO, C. R.; PAULA, G. B. N.; ROMAGNOLO, M. B.; RISSO-PASCOTO, C. Comportamento meiótico durante microsporogênese em espécies da família meliaceae. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** UNIPAR, Umuarama, v.14, n. 1, p. 51-56, 2011.

GUERRA, M. Citogenética de angiospermas coletadas em Pernambuco. **Revista Brasileira de Genética**, v. 9, p. 21-40, 1986.

HUGHES, C. E. **Leucaena. A genetic resources handbook**. Tropical Forestry Paper 37. Oxford: Oxford Forestry Institute, 1998.

KUMAR, G.; BHARDWAJ, M. Genotoxicidade comparativa de metais pesados em meristemas de raízes de *cuminum cyminum* EU. **Cromossoma Botânica**, v.13, n.3, p.56 -62, 2017.

LIU, W.; YANG, Y. S.; LI, P. J.; ZHOU, Q. X.; XIE, L. J.; HAN, Y. P. Risk assessment of cadmium contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. **Journal of Hazardous Materials**, v.161, p. 878-883, 2009.

MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity evaluation of environmental pollutants using analysis of nucleolar alterations. **Environ Sci Pollut Res**, 2015.

MEDIOUNI, C.; BENZARTI, O.; BANDEJA, B.; GHORBEL, M. H. Cádmio e cobre toxicidade para plântulas de tomateiro Jemal F. **Agron Sustainable Dev.** v. 26, p. 227-232, 2006.

MILLER, J. T.; GRIMES, J. W.; MURPHY, D. J.; BAYER, R. J.; LADIJES, P. Y. A. Phylogenetic analysis of the acacieae and Ingeae (Mimosoideae: Fabaceae) based on trnk, matk, psb A – trnh, and trnl/trn F sequence data. **Systematic Botany**, v. 28, n. 3, p. 558-566, 2003.

MORAES, A. P.; SOUZA-CHIES, T. T.; STIELHL-ALVES; REGGERS, L.; SILTAN-YARONVLEV, S.; BROWN, C.; CHAUVEAU, O.; NADOT, S.; BOURGER, VICCINI, L. F.; ALTCHCHUK-SANTOS. Evolutionary trends in iridaceae e: new cytogenetic findings from the new world. **Botanical Journal of the Linnean Soc**, v.177, p. 27-49, 2015.

MORAES, A. P.; LEITCH, I. J.; LEITCH, A. R. Chromosome studies in Orchidaceae: karyotype divergence in Neotropical genera in subtribe Maxillariinae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n.170, p. 29–39. 2012

RODENHISER, D.; MANN, M. **Epigenética e doença humana**: traduzir biologia básica para aplicações clínicas. CMAJ, v. 174 n.3, p. 341-348, 2006.

SCHWEIZER, B.; WOLFF, E. F. On Nonparametric Measures of Dependence for Random Variables. **The Annals of Statistics**, v. 9, n. 4, p. 879-885. 1981.

SHE, C. W.; JIANG, X. H.; OU, L. J.; LONG, K. L.; ZHANG, L. H.; DUAN, W. T.; ZHAO, W.; HU, J. C. Molecular cytogenetic characterization and phylogenetic analysis of the seven cultivated vigna species (Fabaceae). **Plant Biology**, p.1-13, 2014.

SINGHAL, V. K.; GILL, B. S. Socgi plant chromosome number reports - II. J. **Cytol. Genet**, v.19, p.115 -117, 1984.

SOUZA, P. P. Estudo do perfil químico de *Cyperus rotundus* e avaliação do seu potencial de absorção de metais. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, 2016. 150 p.

SOUSA, A.; SUSANNE, S. R Interstitial telomere-like repeats in the monocot family Araceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, n. 177, p. 15–26, 2015.

SOUZA, M. G. C.; BENKO-ISEPPON. Cytogenetics and chomosome banding paterns in caesalpinioidea and papilionioideae species of Pará, Amazonas, Brasil. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.144, p.181-191, 2004.

STYLES, B. T.; VOSSA, C. G. Chromosome numbers in the meliaceae. **TAXON**, v. 20 n. 4, p. 485-499, 1971.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática-Princípios e Aplicações. 1ª. Ed. São Carlos: RiMa, 2006. 478p.