

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-graduação em Botânica

Dissertação de Mestrado

Potencial de uso de *Schinus lentiscifolius* March. e
Schinus terebinthifolius Raddi na recuperação de
áreas degradadas pela mineração e respostas
fisiológicas ao cobre

Ana Paula Moreira da Silva

Porto Alegre
Março de 2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Biociências
Programa de Pós-graduação em Botânica

Potencial de uso de *Schinus lentiscifolius* March. e
Schinus terebinthifolius Raddi na recuperação de
áreas degradadas pela mineração e respostas
fisiológicas ao cobre

Autora: Ana Paula Moreira da Silva

Orientador: Luís Mauro Gonçalves Rosa

Co-orientação: Maria Luiza Porto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Porto Alegre
Março de 2008

*O homem, bicho da Terra tão pequeno
chateia-se na Terra
lugar de muita miséria e pouca diversão,
faz um foguete, uma cápsula, um módulo
toca para a Lua
desce cauteloso na Lua
pisa na Lua
planta bandeirola na Lua
experimenta a Lua
coloniza a Lua
civiliza a Lua
humaniza a Lua.*

*Lua humanizada: tão igual à Terra.
O homem chateia-se na Lua.
Vamos para Marte — ordena a suas máquinas.
Elas obedecem, o homem desce em Marte
pisa em Marte
experimenta
coloniza
civiliza
humaniza Marte com engenho e arte.*

*Marte humanizado, que lugar quadrado.
Vamos a outra parte?
Claro — diz o engenho
sofisticado e dócil.
Vamos a Vênus.
O homem põe o pé em Vênus,
vê o visto — é isto?
idem
idem
idem.*

*O homem funde a cuca se não for a Júpiter
proclamar justiça junto com injustiça
repetir a fossa
repetir o inquieto
repetitório.*

*Outros planetas restam para outras colônias.
O espaço todo vira Terra-a-terra.
O homem chega ao Sol ou dá uma volta
só para tiver?
Não-vê que ele inventa
roupa insiderável de viver no Sol.
Põe o pé e:
mas que chato é o Sol, falso touro
espanhol domado.*

*Restam outros sistemas fora
do solar a col-
onizar.
Ao acabarem todos
só resta ao homem
(estará equipado?)
a difícilíssima dangerousíssima viagem
de si a si mesmo:
pôr o pé no chão
do seu coração
experimentar
colonizar
civilizar
humanizar
o homem
descobrimo em suas próprias inexploradas entranhas
a perene, insuspeitada alegria
de con-viver*

Carlos Drummond de Andrade

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar desculpem-me caso não consiga simplesmente agradecer e me estenda um pouco além, mas poucas são as “horas da estrela” das “Macabéias¹” e “Macabeus” que fazem pesquisa, então é preciso aproveitá-las quando existentes. Além disso, acredito que o privilégio de ter estudado em uma Universidade Pública é algo que sempre me vem à cabeça, uma vez que ainda são poucos os estudantes brasileiros que gozam desse privilégio, ainda mais quando provenientes de escolas públicas.

É, para ser mais clara, a UFRGS é uma Universidade a qual tenho muito a agradecer porque teve vários conhecimentos formais e informais que aprendi aqui dentro, além das amizades que este ambiente me proporcionou desde meu ingresso, em 1997, para realização de meu ensino médio vinculado ao técnico. Desde lá até agora são 11 anos consecutivos nos quais tive uma formação de qualidade a qual sou muito grata. Além de grata, acredito que a formação proporcionada pela universidade vai auxiliar na construção de um País recheado de profissionais qualificados e preocupados na resolução dos problemas ambientais, científicos e sociais. Isto porque, mesmo que nossos estudos dentro da universidade representem apenas “a ponta de um *iceberg*” da grande massa de conhecimento científico que possivelmente exista sobre determinado assunto, eles devem ser capazes de nos despertar idéias sobre as mais diversas áreas do conhecimento, desde seu contexto filosófico até a aplicação de idéias científicas para resolver os problemas ambientais e sociais brasileiros. Não tenho certeza se a maioria das pessoas presentes na Universidade compartilha de interesse semelhante; no entanto, foi esse sentimento que eu construí após esse tempo de UFRGS e espero continuar compartilhando dele no futuro.

Parando de filosofar e indo mais diretamente aos agradecimentos. Para mim seria impossível não agradecer a todo conjunto de periódicos *on-line* assinados pela Capes e disponibilizados na internet, é claro que toda essa tecnologia facilitou as pesquisas de todas as áreas, inclusive a minha, e a possibilidade de acessá-los em casa é ainda mais confortável. Outro agradecimento muito especial vai para o CNPq que me disponibilizou uma bolsa de mestrado desde o princípio da pós-graduação, sem a qual seria impossível a dedicação total ao curso, além de já ter disponibilizado bolsas de iniciação científica durante a graduação. Além disso, ao CNPq novamente por ter financiado o projeto de início a fim através do edital do CT-Mineral I, ganho a partir de 2004/2005, e que permitiu a montagem do laboratório que até então não existia em estrutura física e aparelhos.

Aos meus Pais, em que ao invés de se ausentarem da minha vida, como costume ouvir queixas de colegas, se tornaram mais presentes, me dando, inclusive, inúmeras sugestões sobre a resolução de problemas técnicos e estruturais dos meus experimentos. À minha irmã e meu cunhado que me

¹ Personagem do livro “A Hora da Estrela” de Clarice Lispector.

auxiliaram na impressão da dissertação e estão sempre dispostos a me auxiliar a resolver meus problemas.

A minha amiga Marisa Azzolini que sempre me dedicou palavras de apoio, atenção e sugestões inúmeras, também por ter me ouvido tantas vezes por entre choros, desistências e dúvidas. Confesso que não sei como ela agüentou ouvir tantas das minhas queixas!

Ao meu orientador Luís Mauro Rosa que me acompanha desde a graduação, por ter me acolhido no laboratório, pela amizade, pela confiança, e por saber organizar muito bem congressos.

À professora Maria Luiza Porto por me co-orientar e disponibilizar o espaço do laboratório de Fitorremediação para a realização dos experimentos.

Aos meus colegas de laboratório que me auxiliaram durante o mestrado na realização dos experimentos: Daniel Vilasboas Slomp, Bárbara Getz, Jéssica dos Reis Antunes, Cíntia Beauvalet, Bianca Espíndola de Abrão, Liliane de Araújo Coelho, Pâmela Bergonci. E aos demais colegas de laboratório que dispõe de sua amizade: Greice Mattei, Rogério Both, Ana Luiza, Tanise Sausen.

À Maria Lúcia Vidal de Souza, proprietária da área onde foi feita a coleta de sementes de *Schinus lentiscifolius*, pela permissão da coleta. À CGTEE e ao CRM por disponibilizarem cinzas e rejeitos para a realização dos experimentos. Ao professor Marcos Antônio Bacarin pelo empréstimo do fluorômetro. À professora Lucia Rebello Dillenburg pelo empréstimo de nitrato de amônio, quando necessário. Ao laboratório de Ecotox pelo cedência de água deionizada nos momentos de tensão laboratorais e empréstimo do pHâmetro, durante o período que o do laboratório estava quebrado. E a todos que me auxiliaram a carregar equipamentos e materiais pesados, que geralmente carregava com frequência.

Aos meus amigos Iuri Marques de Oliveira pela amizade e pelos conselhos na estrutura da dissertação através das longas conversas pelo MSN, Cláudia Clebsh pela amizade e Shana de Souto Weber pela amizade e pelo heróico ato de recuperação do meu arquivo da dissertação, corrompido pelo Word, às vésperas da impressão e da entrega da dissertação no PPG. E demais colegas e amigos da graduação e pós.

Ao meu fiel amigo Flamboyant que, embora um felino ao invés de um canídeo, sempre ficava sentado à porta de meu quarto bem como em cima dos artigos. Auxiliando-me com charme, nas discussões dos meus trabalhos, ao mesmo tempo em que reclamava atenção entre um copo de café e outro e me fazia rir de suas caretas sonolentas.

A outras amigas e amigos, que aqui permanecerão anônimos, que me fizeram lembrar que “o dever de todo revolucionário é fazer revolução²”. Nessa perspectiva o grande desafio que temos na pesquisa, que é a revolução que devemos defender, é o de divulgar em todos em todos os locais do Brasil e do Mundo os nossos resultados. Defendendo o “internacionalismo científico”, a fim de fazer da pesquisa uma ferramenta para transformação social e solidariedade entre os povos.

² Ernesto Guevara de la Serna – “Che Guevara”

RESUMO

A busca por espécies capazes de recuperar áreas de mineração é necessária, uma vez que a mineração do carvão mineral causa severos impactos no ambiente. No entanto, a recuperação é limitada pelas características físicas e químicas dos seus resíduos que tem metais pesados em sua composição entre outros fatores de estresse, dificultando o estabelecimento das plantas. Algumas espécies colonizam naturalmente ambientes com metais pesados, este é o caso da aroeira-do-campo (*Schinus lentiscifolius* March.) que habita uma mina de cobre abandonada, em Lavras do Sul (RS) e ainda não foi testada em trabalhos de recuperação de áreas degradadas. Diferentemente da aroeira vermelha (*S. terebinthifolius* Raddi) que é uma espécie rústica e vem sendo utilizada nestes trabalhos. Desta forma, este trabalho foi dividido em duas etapas: uma primeira em que o objetivo foi testar o potencial de utilização de *Schinus lentiscifolius* em rejeitos e cinzas de mineração de carvão mineral; e uma segunda que teve por objetivo verificar as respostas fisiológicas e a acumulação de cobre em *S. lentiscifolius* e em *S. terebinthifolius*. Na primeira foram realizados experimentos de germinação e crescimento em solo, cinzas e rejeitos de mineração, utilizando duas populações de *S. lentiscifolius*, uma de dentro e outra de fora da mina de cobre. Os resultados da primeira etapa mostram que as plantas germinam com facilidade em cinzas e rejeitos de mineração, mas nenhuma das populações sobreviveu em rejeitos. Possivelmente, para a utilização de *Schinus* em resíduos de mineração são necessárias melhorias nas condições nutricionais das cinzas e rejeitos de mineração. Na segunda etapa foram cultivadas *S. lentiscifolius* (População mina) e uma de *S. terebinthifolius*, proveniente do campus do Vale/UFRGS (RS) em diferentes concentrações de cobre durante 100 dias de experimento. Os resultados mostraram diversos sintomas visuais de danos causados pelo cobre, além de redução na fotossíntese, clorofila e biomassa. Os valores de acumulação de metal mostraram que existe uma restrição no transporte de cobre para parte aérea da planta, ocorrendo elevada inibição do crescimento aéreo e de raízes mesmo em baixas concentrações de cobre. Desta forma, os resultados desta etapa mostram que ambas as espécies de *Schinus* sofrem os efeitos negativos do cobre, sugerindo que possam existir outros mecanismos que não a tolerância que permitam *S. lentiscifolius* habitar a mina de cobre.

ABSTRACT

Coal mining causes severe impacts to the environment, therefore it is imperative that we search for species which can help restore the impacted areas. This recuperation is limited by the physical and chemical traits of the mining byproducts which carry heavy metals in their composition, which can limit plant establishment. Some species naturally colonize contaminated soils with heavy metals. This is the case of a wild species called “aroeira-do-campo” (*Schinus lentiscifolius* March.) that grows in an abandoned open-cast copper mine, in Lavras do Sul (RS); however it has not yet been tested in restoration areas, unlike Brazilian pepper (*S. terebinthifolius* Raddi), a rustic species that has been used for restoration work. Therefore, this study was divided in two phases: in the first, the objective was to test the potential use of *Schinus lentiscifolius* for restoration of ash and mine waste, by testing their germination and growth on this medium; in the second phase, the objective was to verify the physiological responses to copper by *S. lentiscifolius* and *S. terebinthifolius*. For the first phase, germination tests were carried out and the seedlings were cultivated in either soil, ash and mine wastes, using two populations of *S. lentiscifolius*, one inside and other from outside of a copper mine. The results of first phase show that the seeds germinated easily on ash and mine waste, but no species/populations survived in wastes. One possible limitation to plant growth and development in ash and wastes is the nutritional status of the medium. In the second phase, *S. lentiscifolius* (Mine population) and, and one population of *S. terebinthifolius* from UFRGS/Campus do Vale (RS), were cultivated in different concentrations of copper for approximately 100 days. The plants cultivated in copper solution exhibited visible symptoms of phytotoxicity, decreases of photosynthetic rates, reductions on chlorophyll content and biomass. The values of metal accumulation indicated that there is a restriction in the transport of copper to the shoot. These results in an inhibition of shoot and root growth even at lower copper concentrations. These results show that both species of *Schinus* sp. suffer the negative effects of copper, suggesting that other mechanisms may exist, instead of tolerance, that allow *S. lentiscifolius* plants to live in the copper mine.

ÍNDICE

PARTE INICIAL

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Revisão da literatura.....	2
1.1.1. Carvão Mineral.....	2
1.1.2. A recuperação de áreas degradadas pela mineração e a fitorremediação.....	5
1.1.3. A escolha das espécies.....	7
1.1.4. Mas, afinal, o que significa tolerar metais pesados?.....	10
1.1.5. Efeito do cobre nas plantas.....	12
2. PERGUNTAS E OBJETIVOS.....	15

PARTE 1

EFEITO DAS CINZAS E DOS REJEITOS DE CARVÃO MINERAL NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO INICIAL DE *Schinus lentiscifolius* March

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1. Experimentação.....	17
2.2. Experimento 1.....	18
2.2.1. Substratos utilizados.....	18
2.2.2. Coleta das sementes.....	18
2.3. Germinação de <i>Schinus lentiscifolius</i> em solo, cinzas e rejeitos.....	19
2.2.4. Análise estatística.....	20
2.3. Experimento 2.....	20
2.3.1. Substratos utilizados.....	20
2.3.2. Coleta das sementes.....	20
2.3.3. Obtenção das plantas.....	20
2.3.4. Preparo do vaso.....	20
2.3.5. Delineamento experimental.....	22

2.3.6. Cultivo das plantas.....	22
2.3.7. Casa de vegetação.....	22
2.3.8. Análises de crescimento e sobrevivência.....	24
2.3.9. Análises de biomassa.....	24
2.3.10. Análises estatística.....	24
2.4. Experimento 3.....	25
2.4.1. Substratos utilizados.....	25
2.4.2. Coleta das sementes.....	25
2.4.3. Germinação de <i>Schinus lentiscifolius</i> em misturas de cinzas e solo.....	25
2.4.3. Análise da germinação.....	25
2.4.3. Análise estatística.....	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Características dos substratos de mineração.....	27
3.2.1 Análises químicas dos substratos.....	27
3.2. Influência das cinzas e rejeitos de mineração na germinação de duas populações de <i>S. lentiscifolius</i>	29
3.2.1 Análises químicas dos substratos.....	26
3.3. Efeitos das cinzas e rejeitos de mineração na mortalidade das plantas.....	31
3.4. Efeitos dos substratos de mineração no crescimento das plantas.....	31
3.5. Germinação em diferentes proporções de cinzas: solo.....	34
4. DISCUSSÃO.....	36
5. CONCLUSÕES.....	39

PARTE 2

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Schinus lentiscifolius* E *S. terebinthifolius* SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR EXCESSO DE COBRE

1. INTRODUÇÃO.....	40
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
2.1. A escolha das espécies.....	41
2.2. Coleta de sementes.....	41
2.3. Cultivo das plantas.....	42

2.4. Tratamentos com adição de cobre.....	43
2.5. Análises de fotossíntese.....	44
2.5.1. Fluorescência da clorofila a.....	44
2.5.2. Taxas de fotossíntese.....	44
2.5.3. Análise de pigmentos.....	44
2.6. Análises de crescimento.....	45
2.7. Quantificação do metal.....	46
2.8. Análises estatísticas.....	47
3. RESULTADOS.....	48
3.1. Sintomas visíveis de dano.....	48
3.1.1. Folhas.....	48
3.1.2. Raízes.....	48
3.2. Crescimento em altura e biomassa.....	53
3.3. Fotossíntese.....	58
3.3.1. Fluorescência da clorofila a.....	58
3.3.2. Taxas de fotossíntese.....	58
3.3.3. Conteúdo de clorofilas.....	59
3.4. Concentração e acumulação de cobre.....	59
4. DISCUSSÃO.....	64
 PARTE FINAL	
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Altura das plantas (cm)
Cl_a/b/a+b	Clorofila a/b/a+b
EL	Expansão lateral
ETR	Taxa de transporte de elétrons
FBA	Fator de bioacumulação
F_m	Fluorescência máxima
F_o	Fluorescência Basal
FSII	Fotossistema II
F_v	Fluorescência Variável
F_v/F_m	Eficiência quântica potencial do fotossistema II
F_v/F_m'	Eficiência quântica efetiva do fotossistema II
IT	Índice de transporte
IVG	Índice de velocidade de germinação/emergência
NPQ	Coefficiente de extinção não-fotoquímico
PFD	Densidade de fótons
qP	Coefficiente de extinção fotoquímico
t	Tempo em dias
TAC	Total de acumulação
TCR	Taxa de crescimento relativo
Φ_{FSII}	Produtividade quântica do fotossistema II

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	(A) Localização das jazidas de carvão mineral no RS. (B) Perfil de uma mineração a céu aberto, Minas do Leão (RS). (C) Separador de carvão dos Rejeitos. (D) Campo de resíduos de mineração no Pátio da Termelétrica de São Jerônimo (RS). Fonte do Mapa: Retirado do Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul	Pág. 3
Figura 2	Plantas de <i>Schinus lentiscifolius</i> (A) sobre filão de pedras de cobre; (B) Detalhe de ferimento no caule causado por larva de inseto, mostrando coloração azul da seiva; (C) Detalhe de porções da casca da planta mostrando seiva azul misturada à seiva âmbar. (D) Detalhe do filão de cobre mostrando rochas contendo cobre e apresentam coloração azul. Fotos de 9/06/2007, em Lavras do Sul, RS – Brasil.	Pág. 9
Figura 3	Superfície foliar de <i>Schinus lentiscifolius</i> (A) Estômato, (B) Detalhe de tricoma e (C) Detalhe de superfície cerosa.	Pág. 9
Figura 4	(A) Material usado para confecção das divisões dos vasos. (B) Placa de Garrafa PET sendo modelada na estufa 50°C. (C) Vaso de PVC sem divisória. (D) Vaso de PVC com divisória. (E) Modelo e dimensões de vaso utilizado para o cultivo das plantas, (F) Detalhe frontal do vaso. A - População de <i>Schinus lentiscifolius</i> da mina, B - População de <i>S. lentiscifolius</i> da área externa da mina.	Pág. 21
Figura 5	(A) Temperatura (°C) máxima (—●—) e mínima (····) e (B) umidade relativa máxima (—●—) e mínima (····) durante o período do experimento. As linhas dos gráficos não mostram tendências nas temperaturas/umidade da casa de vegetação, sendo ligados os registros de temperatura/umidade por linhas apenas para facilitar a visualização.	Pág. 23
Figura 6	Percentual germinação de <i>S. lentiscifolius</i> nos substratos: (A) solo, (B) cinzas e (C) rejeitos. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na germinação das populações de <i>S. lentiscifolius</i> . Não ocorreram diferenças significativas entre tratamentos na mesma população (n=25 sementes/ tratamento). P< 0,05	Pág. 30
Figura 7	Sobrevivência em rejeitos de mineração de <i>Schinus lentiscifolius</i> - População Fora da mina (FM), de <i>Schinus lentiscifolius</i> - População da mina (DM). (n=10)	Pág. 31
Figura 8	Relação entre substrato e crescimento da planta: Em <i>S. lentiscifolius</i> (A) População de Fora da mina e (B) População da mina e em (C) <i>S. terebinthifolius</i> . (n=13). Médias ± erro padrão.	Pág. 32
Figura 9	Curva de germinação cumulativa (%) de sementes de duas populações de <i>S. lentiscifolius</i> . (A) População da mina e (B) População Fora da Mina. Médias de 4 potes com 12 sementes cada	Pág. 35
Figura 10	A) Visão geral das plantas recém colocadas em floreiras coletivas, (B) Plantas sob sombrite (C) Visão geral do experimento e (D) detalhe de folha de <i>S. terebinthifolius</i> não aclimatada e recém exposta ao Sol.	Pág. 43
Figura 11	<i>Schinus lentiscifolius</i> mostrando os sintomas de exposição ao cobre: (acima) após 60 dias - visão geral de algumas folhas sintomáticas - e (abaixo) 100 dias – corresponde a folha mais jovem e completamente expandida de uma planta de cada tratamento.	Pág. 49
Figura 12	<i>Schinus terebinthifolius</i> mostrando os sintomas de exposição ao cobre: (acima) após 60 dias - visão geral de algumas folhas sintomáticas - e (abaixo) 100 dias – corresponde a folha mais jovem e completamente expandida de uma planta de cada tratamento.	Pág. 49

Figura 13	Respostas de <i>S. lentiscifolius</i> a diferentes doses de cobre, sintomas foliares apresentados em cada tratamento. As folhas correspondem aos padrões de coloração apresentados além do controle nos seguintes tratamentos: controle, 16 μ M, 32 μ M, 64 μ M e 128 μ M. Seta superior indica, da esquerda para direita, a folha mais velha sentido mais jovem, respectivamente.	Pág. 50
Figura 14	Respostas de <i>S. terebinthifolius</i> a diferentes doses de cobre, sintomas foliares apresentados em cada tratamento. As folhas correspondem aos padrões de coloração apresentados além do controle nos seguintes tratamentos: controle, 16 μ M, 32 μ M, 64 μ M e 128 μ M. Seta superior indica, da esquerda para direita, a folha mais velha sentido mais jovem, respectivamente.	Pág. 51
Figura 15	(Foto Acima) Raízes de <i>Schinus lentiscifolius</i> (Acima) e <i>S. terebinthifolius</i> (Abaixo) após 100 dias de exposição aos tratamentos com cobre. (Fotos Abaixo) Detalhe de plantas submetidas a 32 μ M de cobre (A) <i>S. lentiscifolius</i> , seta indica a presença de nódulos nesta porção da raiz. (B) <i>S. terebinthifolius</i> , seta indica rachaduras ao longo do eixo radicular. — (30cm).	Pág. 52
Figura 16	Crescimento médio da parte aérea de (A) <i>Schinus lentiscifolius</i> e de (B) <i>S. terebinthifolius</i> submetidas a diferentes concentrações de cobre, durante 100 dias de experimento. (n=10).	Pág. 54
Figura 17	Curva de dose-resposta (regressão não-linear), a resposta corresponde aos valores de biomassa de raiz para cada tratamento de cobre. Raízes (A) <i>S. lentiscifolius</i> (B) <i>S. terebinthifolius</i> . Pontos correspondentes a todos os valores de biomassa de cada tratamento (n=10). P<0,0001.	Pág. 56
Figura 18	Curva de dose-resposta (regressão não-linear), a resposta corresponde aos valores de biomassa de parte aérea para cada tratamento de cobre. Parte aérea: (A) <i>S. lentiscifolius</i> (B) <i>S. terebinthifolius</i> . Pontos correspondentes a todos os valores de biomassa de cada tratamento (n=10). P<0,0001.	Pág. 57
Figura 19	Respostas dos parâmetros de fluorescência da clorofila a de plantas de <i>Schinus lentiscifolius</i> e <i>S. terebinthifolius</i> submetidas a tratamentos com cobre após 30 dias de exposição ao metal. (A) Fo – Fluorescência Basal; (B) Fm - Fluorescência máxima; (C) Fv/Fm – Eficiência quântica máxima do FSII; (D) Fv'/Fm' – Eficiência quântica efetiva do FSII. (E) Φ FSII – Produtividade Quântica do FSII; (F) qP – Coeficiente de extinção fotoquímico; (G) NPQ – Coeficiente de extinção não-fotoquímico; (H) ETR – Taxa de transporte de elétrons. Letras diferentes correspondem a resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos da mesma espécie. n=5 plantas por tratamento. (p<0,05)	Pág. 60
Figura 20	Taxas de fotossíntese líquida das plantas de <i>Schinus lentiscifolius</i> e <i>S. terebinthifolius</i> tratadas com cobre. Após (A) 10 dias, (B) 30 dias, (C) 40 dias, (D) 65 dias e (E) 100 dias de exposição. Letras diferentes correspondem a resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos da mesma espécie.	Pág. 61
Figura 21	Concentração de clorofilas, após 100 dias de experimento, das plantas de <i>Schinus lentiscifolius</i> e <i>S. terebinthifolius</i> tratadas com cobre. (A) concentração de clorofila a; (B) concentração de clorofila b; (C) concentração de clorofila a+b e (D) Razão de clorofilas a:b. Letras diferentes correspondem a resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos da mesma espécie. n=5. (p<0,05)	Pág. 62

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Análise química dos componentes do solo, dos rejeitos e das cinzas de mineração utilizados para o cultivo das plantas (Fonte: Análise feita no Laboratório de solos da faculdade de Agronomia da UFRGS, método EPA 3050). 1- McBride, 1993. 2- CETESB, 2001. ^A - Valores de referência de qualidade, estabelecidos com base em análises de amostras ambientais, de forma preventiva, para efetuar a proteção da qualidade dos solos.	Pág. 28
Tabela 2	Valores de P associados a probabilidade da análise de variância do percentual de germinação de duas populações de <i>S. lentiscifolius</i> . (P<0,05)	Pág. 29
Tabela 3	Valores de P associados a probabilidade da análise de variância dos parâmetros de crescimento das duas populações de <i>S. lentiscifolius</i> .. P<0,05.	Pág. 33
Tabela 4	Dados de crescimento de <i>Schinus lentiscifolius</i> Fora da mina (FM), <i>Schinus lentiscifolius</i> da Mina (DM). Média± Erro Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na germinação das populações de <i>S. lentiscifolius</i> . Não ocorreram diferenças significativas entre tratamentos na mesma população. 1(n=13); 2(n=5). (P<0,05). TCR – Taxa de crescimento relativo	Pág. 33
Tabela 5	Valores de P associados a probabilidade da análise de variância do percentual e IVG de germinação de duas populações de <i>S. lentiscifolius</i> .	Pág. 34
Tabela 6	Média da percentagem de germinação aos 30 dias de experimento e Índice de Velocidade de emergência (IVG) das sementes das populações de <i>S. lentiscifolius</i> , em solo (S) e em cinzas (C). Letras iguais resultados estatisticamente iguais e letras diferentes, resultados estatisticamente diferentes. Médias de 4 potes com 12 sementes cada. Valores médios ± Erro Padrão. P<0,05.	Pág. 34
Tabela 7	Parâmetros de crescimento das plantas de <i>Schinus</i> tratadas com diferentes concentrações de cobre. Média ± Erro Padrão das amostras. Letras diferentes, resultados estatisticamente significativos entre os tratamentos da mesma espécie. (n= 10) e (p<0,05).	Pág. 55
Tabela 8	Doses críticas de toxidez do cobre nas plantas de <i>S. lentiscifolius</i> e <i>S. terebinthifolius</i> expostas ao cobre. As doses foram calculadas com o auxílio da equação ajustada (P<0,0001) às curvas de dose-resposta. EC ₁₀ - Concentração que resulta em 10% da perda de resposta e EC ₅₀ - Concentração que resulta em 50% de perda da resposta. Kabata-Pendias (2001). (n=10).	Pág. 58
Tabela 9	Concentrações de cobre das plantas de <i>Schinus lentiscifolius</i> e <i>S. terebinthifolius</i> tratadas com cobre após 100 dias de experimento. Média ± Erro Padrão das amostras. Letras iguais na linha resultados estatisticamente não significativos, letras diferentes resultados estatisticamente significativos. **Média de duas amostras. p<0,05	Pág. 63

1. INTRODUÇÃO

O processo de mineração do carvão mineral causa inúmeros impactos ambientais, especialmente através da disposição inadequada de seus subprodutos. As áreas de depósito são extensas e podem contaminar o solo através da lixiviação de elementos tóxicos dos resíduos descartados, os quais contêm metais pesados em sua composição (Ugurlu, 2004). O trabalho de recuperação de uma área degradada por subprodutos da mineração inclui, entre suas etapas, a revegetação da área, a qual é dificultada pelas características tóxicas e físicas dos substratos (Tordoff *et al.*, 2000). Outra etapa da recuperação é a remediação ou isolamento dos poluentes, para que o ambiente não se contamine pela lixiviação dos elementos tóxicos contidos nos resíduos (Tordoff *et al.*, 2000). Logo, a busca constante de espécies capazes de revegetar áreas degradadas pelos subprodutos da mineração, visando também o potencial fitorremediador das mesmas, é fundamental para que se desenvolva um bom trabalho de recuperação ambiental das áreas contaminadas.

Ao mesmo tempo, sabe-se que são escassas espécies capazes de sobreviver em ambientes que contenham metais pesados. Estes ambientes estão frequentemente sujeitos a diversos fatores de estresse como a seca e a baixa disponibilidade de nutrientes. Por isso, é possível que as espécies que conseguem sobreviver em locais contendo metais pesados possuam eficientes mecanismos de tolerância aos metais e a outros estresses. No Rio Grande do Sul, *Schinus lentiscifolius* March. é uma espécie capaz de colonizar naturalmente rejeitos de cobre na mina de Volta Grande, em Lavras do Sul – RS (Porto, 1990), sendo abundante na área. O local em que a espécie habita possui cobre e, possivelmente, esteja sujeito a outros estresses que não parecem influenciar a distribuição de *S. lentiscifolius* na área.

Em função de conseguirem sobreviver a condições adversas, acredita-se que as espécies que crescem em ambientes com metais poderiam ter maior habilidade em recuperar áreas degradadas (Whiting *et al.*, 2004). Neste sentido, uma das idéias deste trabalho é verificar o potencial de *S. lentiscifolius* em recuperar áreas degradadas pelos resíduos da extração e da queima do carvão mineral. Embora estes resíduos não contenham elevadas quantidades de cobre, plantas que habitam ambientes contendo metais pesados poderiam ser mais promissoras na recuperação de áreas degradadas do que aquelas que não os habitam. Além disso, será investigado se a espécie é realmente tolerante ao cobre. Para isso, será comparado seu potencial de tolerância ao metal com o de *S. terebinthifolius* que não habita a mineração

de cobre abandonada e está amplamente sendo utilizada em trabalhos de recuperação de áreas degradadas.

1.1. Revisão da literatura

Nessa secção será realizada uma breve revisão da literatura sobre mineração, tolerância aos metais pesados e efeitos do cobre sobre as plantas. A fim de esclarecer dúvidas sobre o assunto.

1.1.1. Carvão Mineral

A exploração do carvão mineral é um processo utilizado no Rio Grande do Sul (RS), uma vez que o Estado possui em torno de 5,4 bilhões toneladas de carvão mineral lavrável que totalizam 6,6 bilhões no Brasil (DNPM, 2006). As principais jazidas do Estado encontram-se na Região Carbonífera do Baixo Jacuí que abrange os municípios de Arroio dos Ratos, Barão do Triunfo, Butiá, Charqueadas, Eldorado do Sul, General Câmara, Minas do Leão, São Jerônimo e Triunfo (Figura 1A). Ao todo, os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina possuem juntos 99,4% de toda a produção brasileira, a qual representa atualmente 11 milhões de toneladas brutas do minério por ano (DNPM, 2006). A maior parte da produção do carvão mineral é consumida pelo setor energético. Em 2004, este setor absorveu 92,81% de toda a produção de carvão (DNPM, 2006), o que corresponde a 1% da matriz energética brasileira. O restante do carvão é usado para o beneficiamento de minerais e para outros setores industriais, tendo destaque na indústria de cerâmica (DNPM, 2006).

O carvão mineral, no Brasil, ocorre em coberturas da bacia do Paraná e é de idade Permiana, pertencendo à formação Rio Bonito (Gomes *et al.*, 2003), recoberta por sedimentação marinha durante a transgressão do Permiano (Koppe & Costa, 2002). Devido ao seu processo de formação, o carvão brasileiro adquiriu características próprias, como altos teores de cinzas (50%) e enxofre (2,5%), isto faz o mineral ter baixo índice de aproveitamento energético e gerar mais cinzas (Gomes *et al.*, 2003).

A escolha dos processos de extração do carvão se dá de acordo com a geomorfologia da área e a distância do minério da superfície. No RS, a maior parte da extração é feita em mineração a céu aberto (Fig. 1B), pelo método de lavras em tiras. Neste método ocorre a abertura da lavra onde é feita a retirada do minério bruto. Posteriormente, ocorre o beneficiamento do material mineral extraído da lavra, que consiste na separação do carvão das impurezas associadas à rocha. A separação é feita por flotação e, neste processo, a rocha minerada é levada até um decantador que separa o material pela densidade do sólido em água

(Fig. 1C). Assim, o material mais leve é o carvão, que é enviado para as termelétricas e, o mais pesado são os rejeitos, que constituem cerca de 30-60% do material minerado (Stewart & Daniels, 1992).



Figura 1. (A) Localização das jazidas de carvão mineral no RS. (B) Perfil de uma mineração a céu aberto, Minas do Leão (RS). (C) Separador de carvão dos Rejeitos. (D) Campo de resíduos de mineração no Pátio da Termelétrica de São Jerônimo (RS).

Fonte do Mapa: Retirado do Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul (Acessado em 12/01/2008, http://www.scp.rs.gov.br/atlas/indice_mapas.asp?menu=331).

Os rejeitos se caracterizam por serem uma rocha fragmentada de tamanho variado e com baixa capacidade de retenção de água, o que permite elevada percolação de água nestes resíduos, tornando sua superfície mais sujeita à seca (Tordoff *et al.*, 2000). Em sua composição, os rejeitos possuem carvão de baixa qualidade e impurezas, entre as estas estão

piritas e marcassitas, carbonatos, argilas e metais pesados como Ni, Cu, Cr e Pb (Sampaio, 2002).

Após a separação, os rejeitos costumam ser enviados para uma área próxima de onde foram extraídos e são descartados em pilhas, que ficam sujeitas a condições ambientais variadas como luz, chuvas e ventos. E assim, expostos ao ambiente, ocorre a oxidação da pirita presente nos rejeitos. As piritas consistem em sulfetos de ferro (FeS_2) que em contato com a água e o ar, oxidam formando ácido sulfúrico, responsável pelo baixo pH da solução, e óxidos ferrosos, que dão uma coloração avermelhada à solução (Silva *et. al.*, 2006A). A acidificação possibilita a solubilização de metais pesados e a lixiviação para o ambiente (Tiwary, 2001), tendo como consequência a formação de drenagem ácida das áreas mineradas (Scheibe, 2002).

Além dos rejeitos, outro subproduto do carvão mineral são as cinzas, que são produzidas durante a queima do carvão nas termelétricas (Fig. 1C). A quantidade e a composição das mesmas são dependentes da origem do mineral, do processo de queima e do tempo de permanência do carvão na fornalha (Adriano *et al.*, 1980). Entre as características químicas das cinzas podem-se destacar as seguintes: elevado pH, elevada quantidade de micronutrientes, baixos teores de ferro e a presença de metais pesados como níquel, cromo, chumbo e cobre (Adriano *et al.*, 1980; Gupta *et al.*, 2002). Após sua retirada da fornalha, as cinzas costumam ser dispostas em pilhas nos arredores das termelétricas ou em áreas de depósitos, geralmente próximas à termelétrica.

No Brasil, algumas pesquisas têm verificado o potencial de se usar as cinzas do carvão mineral como matéria-prima para cerâmicas, cimentos e tijolos. Além destes usos, outros visam o reaproveitamento das cinzas na agricultura, a fim de diminuir a acidez do solo (Pathan *et al.*, 2003). No entanto, a presença de metais pesados limita seu uso para este fim, uma vez que os metais pesados não são degradáveis e podem ser acumulados ao longo de cadeias alimentares (Gupta *et al.*, 2002). Em outros casos, os subprodutos são retornados à lavra de origem e a camada de solo é reconstituída.

A recuperação destes locais é necessária e é prevista por lei, através do artigo 2º da Política Nacional do Meio Ambiente (Lei 6.938, 30/08/1981), que dispõe no Inciso VIII da necessidade de se recuperar áreas degradadas. No caso de áreas mineradas, a recuperação deverá retornar uma nova forma de utilização para o local (Art. 3º, Decreto N°97.632, 10/04/1989). A recuperação de áreas de mineração deve ter entre seus objetivos: cobrir a

superfície e diminuir a erosão e transporte de partículas da área, a fim de evitar a contaminação do solo e de corpos d'água do entorno; a redução do impacto visual gerado tanto pela abertura da lavra (no caso de minas de superfície), bem como pela disposição dos resíduos do carvão; extrair ou estabilizar os compostos tóxicos dos resíduos (Tordoff *et al.*, 2000).

1.1.2. A recuperação de áreas degradadas pela mineração e a fitorremediação

A recuperação de áreas degradadas pelos subprodutos da extração, beneficiamento e queima do carvão mineral tem uma série de dificuldades de realização em função das características físicas e químicas dos resíduos. Estes resíduos apresentam compostos tóxicos e poluentes, pHs extremos e ausência ou quantidades insignificantes de macronutrientes disponíveis (Tordoff *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2002). Estes fatores dificultam o estabelecimento vegetal e a recuperação da área onde estão os resíduos, fazendo com que a regeneração espontânea muitas vezes não seja satisfatória, sendo inferior aos métodos que incluem a intervenção humana (Parrotta & Knowles, 1999).

As técnicas utilizadas para recuperação de áreas degradadas por resíduos de mineração são variadas. Um exemplo destas técnicas, que costuma ser utilizada na atividade de mineração de carvão no RS, consiste na reconstrução da camada superior do solo (*topsoil*). Primeiramente é realizada a reposição dos resíduos na lavra, seguida pela adição das camadas de solo retiradas durante a abertura da lavra e o plantio de espécies vegetais após a construção do *topsoil*. Na seleção das plantas, comumente são usadas aquelas cujas sementes e mudas estão comercialmente disponíveis, as quais geralmente são espécies agrônômicas de crescimento rápido, como o trevo-branco (*Trifolium repens*), *Brachiaria* sp e *Eucalyptus* sp. Em outros casos é feito um plantio de espécies nativas da área, as quais são selecionadas de acordo com sua facilidade em obter mudas em viveiros e a presença em áreas vizinhas. Nestes procedimentos, o principal objetivo é conter a erosão e isolar os contaminantes, para que não poluam o ambiente.

Porém, em se tratando de uma degradação química, a recuperação da área precisa ir além da revegetação, devendo também ser considerados processos que se encarreguem da remediação dos poluentes presentes nos solos. Por isso, atualmente, diversas pesquisas têm se direcionado à seleção de plantas tolerantes aos poluentes e na sua aplicação na recuperação de áreas degradadas por compostos tóxicos. Por esse motivo, a fitorremediação emergiu como

uma alternativa viável para “limpar” solos e ambientes aquáticos contaminados por metais pesados e por outros elementos tóxicos (Gratão *et al.*, 2005).

A técnica de fitorremediação se baseia nas diferentes estratégias utilizadas pelas plantas para sobreviver em ambientes que contenham metais pesados, uma vez que as plantas absorvem metais em quantidades variáveis em respostas a fatores internos e externos (Baker & Walker, 1989). A técnica foi proposta na década de 80 por Chaney (1983) e consiste em cultivar, em áreas com contaminação ambiental, plantas que acumulam elementos tóxicos em seus tecidos, na tentativa de reduzir os contaminantes e torná-los menos disponíveis para o ambiente, diminuindo a toxidez dos mesmos (Chaney *et al.*, 1997; Accioly & Siqueira, 2000; Clemens *et al.*, 2002). Os elementos tóxicos podem ser de vários tipos, desde poluentes orgânicos até metais pesados. A extração dos metais no solo, através da fitorremediação, pode ser feita através dos diferentes processos pelos quais as plantas absorvem os poluentes: (1) fitoextração; (2) fitovolatilização; (3) rizofiltração e (4) fitoestabilização (Chaney *et al.*, 1997).

Na fitoextração, a planta acumula grandes quantidades de metais na sua parte aérea, sendo que a acumulação aérea será dependente da quantidade de metal acumulado e da biomassa que a planta produz (Accioly & Siqueira, 2000). Em alguns casos, mesmo que a planta concentre eficientemente metal em sua parte aérea, a planta produz pouca biomassa, o que compromete a eficiência de extração do metal no substrato. Por exemplo, *Brassica juncea* acumula 1/3 de níquel a menos do que *Thlaspi caerulescens* acumula; no entanto, *B. juncea* produz mais biomassa do que *T. caerulescens*, o que faz *B. juncea* remover mais níquel do substrato do que *T. caerulescens*, como consequência do total de biomassa produzido pela planta (Prasad & Freitas, 2003).

Na rizofiltração se faz uso de plantas colocadas em ambientes aquáticos contaminados e que conseguem tolerar e acumular grandes quantidades de metal em pouca biomassa, ou seja, deixando o mínimo de resíduo (Accioly & Siqueira, 2000). Várias espécies têm sido utilizadas para este fim, incluindo aquáticas como o aguapé (*Eichhornia crassipes*) e terrestres como o girassol (*Helianthus annuus*).

A fitovolatilização usa a propriedade que alguns metais têm de ocorrerem na forma gasosa, como acontece com o As, o Hg e o Se; ou seja, ocorre a conversão dos mesmos, quando presentes no solo, para um gás quando absorvida pela planta (Singh *et. al.*, 2003).

Além destes processos, a retirada do metal do ambiente pode ocorrer pela fitoestabilização que consiste na imobilização do metal no sistema solo-planta, através da sua fixação por humificação ou por lignificação nos tecidos vegetais radiculares (Accioly & Siqueira, 2000). A escolha das plantas, neste caso, ocorre pela capacidade das mesmas em tolerar as condições do solo, controlar a erosão, conter a lixiviação e evitar a translocação dos contaminantes para a parte aérea (Accioly & Siqueira, 2000). Assim, as plantas diminuem a toxidez do metal no solo, por isso devem apresentar crescimento rápido, estabelecerem-se rapidamente e possuir um denso dossel e sistema de raízes (Prasad & Freitas, 2003).

Para utilização em áreas de mineração, as técnicas mais adequadas consistem na fitoextração e fitoestabilização (Soares & Casagrande, 2007). Uma limitação da técnica de fitorremediação reside na profundidade das raízes das plantas que estão sendo utilizadas. Nesta técnica, há o predomínio do uso de espécies com raízes pouco profundas; contudo, isto limita a profundidade de extração dos metais à camada superficial do solo, em geral, nos primeiros 30-50cm. Este problema pode ser contornado com o uso de espécies arbóreas, as quais poderiam ampliar a absorção dos metais até camadas mais profundas do solo (Pilon-Smits, 2005).

1.1.3. A escolha das espécies

A escolha das espécies a serem utilizadas em trabalhos de recuperação de áreas degradadas é uma etapa importante, que deve atender aos objetivos individuais de cada projeto de recuperação. Desta forma, no caso de áreas com contaminações químicas, sobreviver a condições adversas da área já é um diferencial importante que deve ser considerado na escolha do conjunto das espécies que serão utilizadas. Juntamente disto, outros aspectos relevantes também auxiliam na escolha, tais como a rusticidade da espécie, o crescimento rápido, ou mesmo a sua disponibilidade em viveiros e facilidade de germinação.

Atualmente, *Schinus terebinthifolius* é uma espécie que vem sendo amplamente utilizada em trabalhos de recuperação de áreas degradadas. Esta espécie é a segunda espécie vegetal mais utilizada (70,4% de uso) em projetos com esta finalidade no Estado de São Paulo (Barbosa *et al.*, 2003). Sua utilização é variada, incluindo desde projetos que visam recuperação de matas ciliares até trabalhos em ambientes contaminados por compostos químicos.

Além disso, a espécie já foi observada em áreas degradadas por caulim e recolonizadas que foram recolonizadas naturalmente (Araújo *et al.*, 2005). Entre os motivos da utilização de

Schinus terebinthifolius estão os seguintes: a facilidade de cultivo em viveiros, sendo encontrada em, aproximadamente, 80% dos viveiros no Estado de São Paulo (Barbosa *et al.*, 2003); a facilidade de armazenar as sementes, as quais podem ser estocadas por 6 meses em temperatura ambiente sem perda de sua viabilidade (Medeiros & Zanon, 1998A); a facilidade de germinação, que se situa em torno de 80% em areia (Medeiros & Zanon, 1998B); e, por último, pela elevada rusticidade e crescimento rápido da espécie.

A espécie *Schinus lentiscifolius*, embora ainda não se conheçam trabalhos de recuperação ambiental que a utilizam, coloniza naturalmente a Mina de Volta Grande, uma mina de cobre abandonada que está situada em Lavras do Sul (RS). A vegetação da área é denominada “vegetação metalófito” (Porto, 1981), onde *S. lentiscifolius* é a espécie arbóreo-arbustiva dominante. Nesta mina, ouro e cobre foram minerados: a exploração do ouro ocorreu de 1885 até 1940 e, de 1976 até 1989, a exploração do ouro ocorreu em conjunto com a do cobre (Sippel, 2003). Além de ouro e cobre ocorrem na área o chumbo, a prata e o molibdênio. Os minerais ficam associados a rochas formando filões tipo *stockworks* (IBGE, 1986).

Na área da mina, *Schinus lentiscifolius* tem coloração azulada em suas folhas, destacando-se na paisagem, e, em alguns locais da mina, crescendo diretamente sobre os rejeitos de cobre (Figura 2A e detalhe das pedras dos filões em 2D). Alguns trabalhos sugerem que *S. lentiscifolius* forma ecótipos tolerantes ao cobre, em especial, nas plantas que crescem sobre os filões de cobre (Porto, 1981).

Além disso, em soluções nutritivas sem o metal observou-se que populações provenientes da mina possuem menor percentual de germinação do que populações de fora; não ocorrendo o mesmo em soluções com cobre, em que a população da mina é menos inibida (Slomp D., comunicação pessoal). Observações pessoais mostraram que, em algumas plantas presentes na mina, a seiva apresenta coloração azulada (Figura, 2B e 2C), diferentemente da coloração âmbar que costuma ocorrer na planta durante a cicatrização de ferimentos. Por apresentar todas estas características a espécie foi escolhida, a fim de verificar sua habilidade em descontaminar áreas que contenham metais pesados.



Figura 2. Plantas de *Schinus lentiscifolius* (A) sobre filão de pedras de cobre; (B) Detalhe de ferimento no caule causado por larva de inseto, mostrando coloração azul da seiva; (C) Detalhe de porções da casca da planta mostrando seiva azul misturada à seiva âmbar. (D) Detalhe do filão de cobre mostrando rochas contendo cobre que apresentam coloração azul. Fotos de 9/06/2007, em Lavras do Sul, RS – Brasil.

Ambas as espécies pertencem à família Anacardiaceae e são nativas no Rio Grande do Sul *Schinus terebinthifolius* está distribuída em praticamente todo o Estado. Já *Schinus lentiscifolius* tem distribuição mais restrita, sendo abundante na região de Lavras do Sul e arredores. Fisionomicamente esta espécie é reconhecida pela aparência azulada que tem a folha, provavelmente devido à presença de ceras epicuticulares que são abundantemente observadas em microscopia eletrônica (Fig. 3C). A superfície foliar de *S. lentiscifolius* ainda se destaca pela presença de tricomas foliares (Fig. 3B) e estômatos policíclicos-actinocíticos (Fig 3A.) (Millán & Ferriz, 2005).

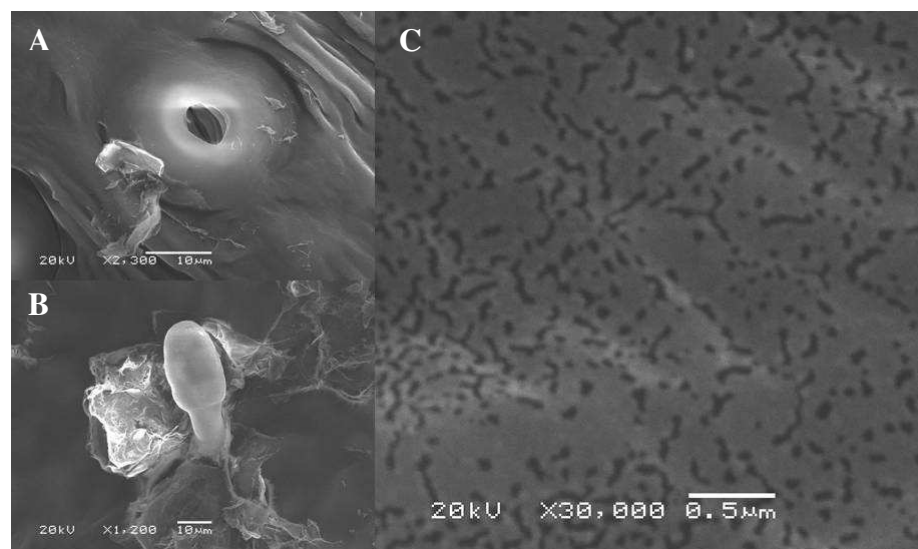


Figura 3. Superfície foliar de *Schinus lentiscifolius* (A) Estômato, (B) Detalhe de tricoma e (C) Detalhe de superfície cerosa.

1.1.4. Mas, afinal, o que significa tolerar metais pesados?

A sensibilidade das espécies aos metais pesados é diferenciada em função da tolerância individual de cada espécie ao metal. Macnair (1997) define tolerância como a habilidade de sobreviver em um solo que é tóxico para outras plantas, e esta habilidade é manifestada pela interação entre o genótipo e o ambiente. Logo, o limite da tolerância de cada planta seria a concentração de metal mais elevada que a mesma pode ser exposta sem que lhe ocorram sintomas de toxicidade.

Obviamente, o mecanismo que cada espécie ou população utiliza para tolerar as concentrações de metal acima da essencialidade é diferente. Da mesma forma, as formas de acumulação de metal pelas espécies também são diferentes. Baker (1981) sugeriu existir uma relação entre a absorção e os mecanismos de tolerância, sugerindo 3 modelos de absorção de metal utilizados pelas plantas: exclusoras, indicadoras e acumuladoras. Estes modelos foram descritos baseados na absorção do metal pela parte aérea da planta, em resposta ao aumento da concentração do metal no substrato.

As exclusoras são as plantas que restringem a entrada do metal na parte aérea, mesmo que ocorra o aumento da concentração de metal no solo. A exclusão parece ser a estratégia mais comum de tolerância entre as plantas (Boojar & Goodarzi, 2007). Esta é a estratégia adotada por *Agrostis tenuis* que concentra metais nas raízes evitando o transporte do metal para a parte aérea (Dahmani-Muller *et al.*, 2000). Entre as possíveis explicações para o fato está a presença de mecanismos de fixação do metal na parede celular das células das raízes da planta (Dahmani-Muller *et al.*, 2000).

Plantas indicadoras são aquelas que a concentração de metal encontrada na parte aérea aumenta linearmente com o aumento das concentrações externas. Plantas indicadoras de metais têm sido usadas para a prospecção de depósitos minerais. Tal como ocorre com algumas espécies de *Astragalus* que são indicadoras de Urânio no Colorado (Harborne, 1993).

Por fim, chamou-se de acumuladoras as plantas que absorvem ativamente metais do substrato, mantendo as concentrações na parte aérea elevadas, mesmo quando estão expostas a baixas concentrações de metal no substrato. Em *Thlaspi caerulescens*, a absorção de grandes quantidades de Zn está associada à elevada quantidade de transportadores de alta afinidade do metal em suas raízes (Lasat *et al.*, 1996). Nesta espécie, transportadores de alta afinidade para cádmio parecem ser responsáveis pelo fenótipo de hiperacumulação de cádmio em alguns ecótipos tolerantes (Lombi *et al.*, 2001). A hiperacumulação corresponde a um pequeno grupo

de plantas ($\approx 1\%$ de todas as das acumuladoras), que acumulam 1% (Zn ou Mn), 0,1% (Ni, Co, Cu e Pb) e 0,01% (Cd) de metal quando crescidas no ambiente natural (Pollard *et al.*, 2002).

Grande parte das plantas acumuladoras e hiperacumuladoras encontradas no mundo estão em regiões de solos serpentinos e ultramáficos. Nestes locais, o substrato é enriquecido com metais e pobre em nutrientes, denominando-se a vegetação formada de “vegetação metalófitas”, em virtude das características diferenciadas das plantas. Em geral, estas são regiões com elevadas quantidades de endemismos e muitas espécies ameaçadas (Whiting *et al.*, 2004). No mundo, as principais áreas de vegetação metalófitas se encontram na Nova Caledônia, no Zaire e em Cuba. No Brasil existem áreas deste tipo em Goiás, na região da Niquelândia.

Dentro da célula, o significado das plantas tolerantes sobreviverem aos danos gerados pelos metais pesados se justifica através de diferentes mecanismos tais como a liberação de ácidos orgânicos pela raiz, micorrizas, a produção pelas plantas de moléculas quelantes de metais, alterações na permeabilidade de membrana, entre outros (Clemens, 2006). De modo geral os mecanismos poderiam ser classificados como mecanismos externos de tolerância e mecanismos internos, que se situam nos limites da membrana plasmática, que é a primeira estrutura viva das células vegetais (Hall, 2002).

Dentro dos mecanismos externos existentes, um deles é a liberação de ácidos orgânicos pela raiz que é conhecido um mecanismo externo de tolerância ao alumínio. Nele as plantas estimulam a liberação dos ácidos, na rizosfera, pelas raízes, como resultado há a formação de complexos não tóxicos dos metais com os ácidos orgânicos (Ryan *et al.*, 2001). Este mecanismo pode ser visto em diversas variedades de plantas agrônomicas tolerantes ao alumínio.

Após a entrada do metal na célula, outros mecanismos podem ser encontrados, como a ligação no citosol do metal com vários quelantes. Entre os quelantes mais comuns estão novamente os ácidos orgânicos, proteínas e peptídeos de baixo peso molecular ricos em cisteína: as metatotioneínas e as fitoquelatinas.

Trabalhos anteriores (Brooks, 1998) indicam que *Homalium guillainii*, uma planta hiperacumuladora de níquel, apresenta maiores quantidades de citrato em sua seiva. Em *Alyssum lesbiacum*, a tolerância e a hiperacumulação de Ni parecem estar relacionadas com as elevadas quantidades de histidina livre no citosol, já que o mesmo fenômeno não ocorre em *A. montanum*, que é uma espécie não-hiperacumuladora (Callahan *et al.*, 2006). Em *Brassica*

juncea a tolerância e acúmulo de Cd parecem se relacionar com a presença de fitoquelatinas na planta, pois ocorre uma rápida indução da biossíntese destes peptídeos durante a exposição ao Cd (Haag-Kerwer *et al.*, 1999). Outras moléculas têm sido propostas como quelantes de metal; entre elas estão os flavonóides e proteínas “heat shock”, cuja expressão foi verificada nas raízes da espécie tolerante *Armeria marítima*, quando crescida em solos com cobre (Hall, 2002).

1.1.5. Efeito do cobre nas plantas

Embora os mecanismos de tolerância aos metais sejam inúmeros, grande parte das espécies sofre os efeitos tóxicos dos metais pesados. De modo geral, os metais livres na célula exercem efeitos negativos pela sua facilidade em interagir com os grupos sulfidril das proteínas (Hall, 2002); pela produção de radicais livres de oxigênio por auto-oxidação ou reação de Fenton; pelo deslocamento de íons metálicos essenciais de biomoléculas (Küpper *et al.*, 1996); pela redução do alongamento de raiz por redução da absorção de água pela raiz (Lamberts *et al.*, 1998); entre outros efeitos.

Os efeitos tóxicos dos metais são variados de acordo com o metal ao qual a planta está sendo exposta. O potencial de oxidação e afinidade com as biomoléculas de cada metal é diferenciado, bem como a sua entrada na célula, que pode ocorrer pelo uso de diferentes transportadores. Entre os metais pesados, um dos mais significativos em termos de poluição ambiental é o cobre presente em minerações, resíduos de carvão mineral, além de ser utilizado na agricultura na composição de fungicidas (como a calda bordalesa utilizada para evitar a proliferação de ferrugens na cultura de videiras), contaminando o solo e o ambiente.

O cobre é um micronutriente essencial e como nutriente é um cofator de algumas proteínas, entre elas a plastocianina, a superóxido dismutase e a citocromo c oxidase (Marschner, 1995). A concentração média de cobre presente nos tecidos vegetais secos varia de 5-20µg/g (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Na célula é encontrado no citoplasma, no retículo endoplasmático, no estroma do cloroplasto, no lúmen do tilacóide e no apoplasto (Marschner, 1995). No entanto, dificilmente encontra-se livre, porque tem fortes propriedades oxidantes; portanto, é muito reativo.

Em nível macroscópico, a toxicidade do cobre pode ser observada pela existência de cloroses, necroses, redução da biomassa da planta e redução do crescimento, em especial, do crescimento da raiz (Clijsters & Van Assche, 1985; Maksymiec, 1997). Em nível celular, o efeito tóxico do cobre é devido a interações com aminoácidos das proteínas (em

concentrações < 25ppm nos tecidos), a substituição de outros elementos como Mg (em concentrações >100ppm nos tecidos), a indução da deficiência de outros íons e ao dano oxidativo das membranas celulares (Clisters & Van Assche, 1985; Yruela, 2005).

A toxidez por cobre pode também causar a deficiência de outros íons, como consequência da competição dos íons pela absorção da raiz, ocorrendo um desbalanço nutricional na planta. Em plantas de alfafa (*Medicago sativa*), por exemplo, quando submetidas a 500ppm de cobre por 4 dias, ocorreu um aumento na absorção de cálcio e uma diminuição na absorção de boro e mobilidênio (Peralta-Videa *et al.*, 2004).

Alguns autores descrevem que, entre as consequências da deficiência nutricional causada pelo cobre, poderia estar a fotoinibição. Päsikkä *et al.* (2002) observaram que plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) submetidas ao excesso de cobre eram mais sensíveis à fotoinibição. Esses efeitos eram diminuídos quando as plantas eram cultivadas em excesso de ferro. Isto sugere que ambos os elementos teriam rotas similares de absorção na raiz e que o excesso de cobre induziria a deficiência de ferro em folhas, porque o aumento da sensibilidade à fotoinibição foi relacionado como uma consequência da deficiência de ferro. O ferro é necessário para a biossíntese de clorofila, em folhas deficientes, haveria uma diminuição da síntese, tornando as folhas mais sensíveis aos efeitos da fotoinibição (Päsikkä *et al.*, 2002).

Na fotossíntese, o cobre pode gerar diversos danos, entre eles a substituição do Mg^{2+} da clorofila *in vivo*, processo que pode ser um dos fatores relacionados à queda da fotossíntese no estresse por cobre (Küpper *et al.*, 1996). Este fenômeno possui algumas particularidades, uma vez que as Cu-porfirinas (clorofilas substituídas) liberam energia na forma de calor (Maksymiec, 1997). Como resultado ocorre interferência da transferência de energia das antenas para o centro de reação, funcionando como um obstáculo para a energia de dissipação (Küpper, 2001). Além disso, o cobre causa mudanças na composição de lipídeos dos tilacóides, ocasionando alterações na fluidez de membrana no FSII, a destruição do complexo de liberação do O_2 através da interação com íons Mg, Ca e Cl e catalisando a formação de radical hidroxil OH^- (Yruela, 2005).

O cobre também é um importante inibidor do fotossistema II. Alguns estudos indicam que o fotossistema II (FSII) é mais sensível ao cobre do que o fotossistema I (FSI). Em *Spinacea oleracea* se observou que, em tilacóides expostos a 20 μ M de cobre, a atividade do FSII foi reduzida em 50%, enquanto no FSI o mesmo ocorreu em apenas 80 μ M de cobre (Clisters & Van Assche, 1985). No FSII, o cobre se associa com as histidinas dos peptídeos D₁ e D₂ (Maksymiec, 1997). O Aceptor o e doador de elétrons do FSII são os principais alvos

de ação do cobre (Yruela, 2005). No lado de redução do PSII, Q_B e Feo-Fe- Q_A são as regiões mais sensíveis para toxicidade, sendo bloqueado o fluxo de elétrons da TyrZ para o $F680^+$ em altas concentrações de cobre, uma vez que o cobre interage com a TyrD na proteína D2 (Yruela, 2005).

Maksymiec *et al.* (2007) sugerem que os efeitos do cobre na fotossíntese da plantas poderiam ocorrer em 3 etapas distintas. Na primeira ocorreriam danos na fase bioquímica da fotossíntese, além do aumento nos processos dissipativos de energia. Essa fase seria sucedida por uma segunda etapa, em que ocorreria a diminuição da reoxidação de Q_A e se iniciaria a inativação do centro de reação do PSII. Por fim, na última etapa, todos estes danos culminariam em mudanças estruturais nos cloroplastos, causando um dano em todo sistema fotossintético.

2. PERGUNTAS E OBJETIVOS

A idéia básica deste trabalho consiste em verificar se é possível utilizar uma planta que recupera naturalmente uma área de mineração de cobre para recuperar outros tipos de áreas degradadas. Neste caso, a recuperação engloba os subprodutos (ou resíduos) resultantes dos processos de extração e de queima do carvão mineral. Embora os resíduos de mineração não costumem possuir quantidades elevadas de cobre, os resíduos de mineração são de difícil revegetação, conforme já exposto anteriormente. Além disso, acredita-se que espécies que habitem ambientes com fatores de estresse, como locais contendo metais pesados, possam ter maior habilidade em se desenvolver em outras áreas também degradadas. Isto pois, em áreas degradadas, de um modo geral, as espécies vegetais costumam estar sujeitas a mais de um fator de estresse, podendo possibilitar as espécies maior rusticidade frente aos diversos estresses ambientes presentes em áreas degradadas. Logo, considerando os aspectos já apresentados acerca das espécies e abordagens que serão utilizadas neste trabalho, as seguintes questões são levantadas:

- 1) Uma vez que *S. lentiscifolius* habita ambientes com condições severas, caracterizando a vegetação metalófito de uma mina de cobre, poderia esta espécie ser utilizada para recuperação de áreas com disposição dos resíduos de mineração do carvão?
- 2) *Schinus lentiscifolius* apresenta tolerância ao cobre? Se não apresenta, como ela pode habitar áreas que contém cobre consideradas tóxicas para outras plantas?
- 3) Dado que *S. terebinthifolius* é uma espécie rústica e pertencente ao mesmo gênero *S. lentiscifolius*, ela poderia apresentar tolerância ao cobre, ou ser utilizada para recuperar áreas de mineração do carvão?

Para responder estas questões, este trabalho foi dividido em duas partes:

- i. Na primeira foram estudadas as respostas de germinação e crescimento das espécies *S. lentiscifolius* às cinzas e aos rejeitos de carvão mineral.
- ii. Na segunda parte foram verificados os efeitos de diferentes concentrações de cobre sobre o desenvolvimento e fisiologia das duas espécies de *Schinus*. O cobre foi o metal escolhido em função de *S. lentiscifolius* possuir populações que crescem naturalmente sobre uma área de mineração de cobre, sendo que este metal, em concentrações elevadas é tóxico para a maioria das espécies.

EFEITO DAS CINZAS E DOS REJEITOS DE CARVÃO MINERAL NA GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DE *Schinus lentiscifolius* March.

1. INTRODUÇÃO

Embora se fale em tecnologias limpas de geração de energia elétrica, uma parcela considerável da energia ainda é proveniente da queima do carvão mineral. Os impactos gerados pelo uso do carvão mineral se estendem desde a produção de gases do efeito estufa, a abertura da lavra, em que há a produção de rejeitos, até a produção de cinzas, resultantes após a queima do carvão mineral na fornalha. Ambos os resíduos, quando descartados diretamente no ambiente, podem causar contaminações da água e do solo, devido à lixiviação de componentes tóxicos como os metais pesados (Cu, Zn, Mn, Pb, Hg, Cd, Ni, entre outros) presentes em sua composição (Ugurlu, 2004). A revegetação destas áreas pode controlar os processos de erosão e conter a lixiação dos metais tóxicos para o ambiente (Sinha *et. al.*, 2005). No entanto, a revegetação costuma ser um processo difícil e demorado (Gupta *et. al.*, 2002), como resultado dos pHs extremos dos substratos, da falta de macronutrientes (especialmente nitrogênio), de elevadas quantidades de micronutrientes e da presença de metais tóxicos (Adriano *et. al.*, 1980).

A seleção de espécies capazes de revegetar estas áreas é necessária, sendo uma alternativa para reduzir os impactos gerados pelos resíduos da mineração. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar a germinação e crescimento de duas populações de aroeira do campo (*Schinus lentiscifolius* March), quando crescidas em resíduos (cinzas e rejeitos) de mineração.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Experimentação

A fim de verificar o potencial da espécie em germinar e crescer nos resíduos de mineração este trabalho foi dividido em três etapas:

- i. **Experimento 1:** *Germinação em solo, cinzas e rejeitos* - consistiu em verificar o potencial de germinação da espécie nestes substratos. Este experimento foi realizado com duas populações de *Schinus lentiscifolius* e teve duração de 30 dias. Os resultados deste experimento nos conduziram à segunda etapa;
- ii. **Experimento 2:** *Crescimento em solo, cinzas e rejeitos* - consistiu em verificar o potencial de crescimento e sobrevivência de duas populações de *S. lentiscifolius* nos substratos testados. Nesta etapa, as plantas foram cultivadas por período de 5 meses, sendo utilizados 2 meses para aclimação e 3 para o acompanhamento dos experimentos. Os resultados deste experimento nos conduziram a um terceiro e último experimento;
- iii. **Experimentos 3:** *Germinação em misturas de solo e cinzas* - consistiu em adições de solo às cinzas, a fim de melhorar as qualidades nutricionais das cinzas. Este experimento foi realizado com duas populações de *Schinus lentiscifolius* e teve duração de 30 dias.

2.2. Experimento 1

2.2.1. Substratos utilizados

Utilizaram-se três substratos:

A) Solo orgânico comercial;

B) Cinzas finas de carvão mineral que foram coletadas diretamente na Usina Termelétrica de São Jerônimo;

C) Rejeitos de carvão mineral que foram coletados na área de depósito dos rejeitos, em Arroio dos Ratos (RS). Os rejeitos utilizados eram resultantes do processo de beneficiamento do carvão na CRM e foram coletados logo após terem sido colocados na área, não tendo sofrido a exposição aos fatores ambientais.

Uma amostra de 100g de cada substrato, seca em estufa (60°C), foi enviada para análise no Laboratório de análises de solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS. O método utilizado para a análise do substrato foi da EPA 3050, que corresponde a uma análise do que está ambientalmente disponível dos elementos do substrato.

2.2.2. Coleta das sementes

A coleta de todas as sementes foi realizada em abril de 2006 na cidade de Lavras, RS. Lavras do Sul se situa entre as coordenadas UTM 228500 a 230500 E e 6588000 a 6584000 N, neste local o clima é subtropical com as 4 estações bem definidas, tendo temperaturas de 6-12°C no inverno e podendo chegar a 40°C no verão. As precipitações entre 1.300 e 1.600mm, bem distribuídas ao longo do ano (Frizzo & Porto, 2004).

Para a realização das coletas foram escolhidas duas áreas para a coleta uma que corresponde ao interior da Mina de Volta Grande, que é uma mina de cobre abandonada situada na cidade; a outra corresponde a uma área localizada à beira da estrada, distante aproximadamente 5Km da mina. Em ambos os locais procedeu-se a coleta de sementes em 10-12 árvores por localidade, as quais foram escolhidas pela disponibilidade de sementes no dia da coleta. Devido às condições do interior da mina e do lado externo da mina serem diferentes cada local de coleta foi considerado uma população. Desta forma, foram trabalhadas com duas populações: uma do interior da mina (DM) e outra externa à mina de cobre (FM).

No laboratório, as sementes foram selecionadas manualmente, conforme a aparência saudável e a presença ou ausência de perfurações causadas por larvas de insetos. Após serem selecionadas, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas prateleiras sob

temperatura ambiente, conforme indicado por Medeiros & Zanon (1998), para conservação das sementes. Antes de serem utilizadas nos experimentos, as sementes foram imersas em água por 15 minutos e posteriormente foram excluídas aquelas que flutuavam na água neste período. Foram usadas para os experimentos apenas as sementes que não flutuaram na água durante a seleção.

2.2.3. Germinação de *Schinus lentiscifolius* em solo, cinzas e rejeitos

O experimento foi conduzido em câmaras de germinação (tipo BOD – Tecnal TE-401) sem que houvesse nenhum tratamento de escarificação nas sementes. As sementes foram desinfestadas em uma solução de 2:1 (água deionizada: hipoclorito de sódio comercial 2%) por 10 minutos e, posteriormente, foram lavadas com água deionizada até a completa retirada do hipoclorito. As sementes foram colocadas para germinar em três substratos diferentes: cinzas, rejeitos e solo orgânico comercial misturado com areia (1:1). Todos os substratos foram previamente esterilizados por duas horas em estufa a 200°C.

Foram utilizados recipientes plásticos com 110mL de volume, que foram preenchidos com o substrato, resultando nas seguintes quantidades de cada substrato: cinzas, 50g; rejeitos, 70g; solo, 85g. Calculou-se a capacidade de vaso dos substratos, utilizando a metodologia sugerida pelo RAS (Brasil, 1989). Nesta recomenda-se a adição de 100mL de água em 100g de substrato, com verificação da capacidade de retenção de água do substrato em 15 minutos.

Para a experimentação, a umidade foi mantida entre 70 - 72,5% da capacidade de vaso (Brasil, 1989): cinzas, 50g; rejeitos, 30g e solo 28g. A correção da umidade foi feita adicionando-se água deionizada, duas vezes por semana se necessário. O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado com 4 sementes por recipiente, em 25 repetições por tratamento (100 sementes por tratamento), tendo um total de 6 tratamentos com 150 repetições ao todo, sendo ao todo 3 substratos vs 2 populações.

Os recipientes foram colocados em BOD com 25°C de temperatura e 12 horas de fotoperíodo. Posteriormente, foi colocado um filme plástico sobre os recipientes para garantir que não ocorresse uma evaporação excessiva de água. As sementes consideradas germinadas consistiram nas plântulas emergidas para fora do substrato. O número total de sementes germinadas foi avaliado aos 14, 21 e 30 dias, sendo calculado o percentual de germinação de cada tratamento.

2.2.4. Análise estatística

Os dados de percentual de germinação foram transformados em arcoseno $\sqrt{x/100}$, e as médias dos tratamentos foram comparadas, com o auxílio do programa SigmaStat 2.03, por análise de variância (ANOVA) fatorial. O seguinte modelo foi usado, o efeito da população, o efeito do substrato e a interação entre população \times substrato. Posteriormente foi aplicado o teste de Tukey para comparação das médias significativas ($P < 0,05$).

2.3. Experimento 2

2.3.1. Substratos utilizados

Foram utilizados os mesmos substratos já descritos no item 2.2.1 da página 18.

2.3.2. Coleta das sementes

As sementes foram coletadas conforme já descrito no item 2.2.2 da página 18.

2.3.3. Obtenção das plantas

Sementes de duas populações de *S. lentiscifolius* e de *S. terebinthifolius* foram desinfestadas em 15 minutos em uma solução 1:1 (hipoclorito comercial 2%: água deionizada), sendo então lavadas até a retirada completa do hipoclorito. Imediatamente após a desinfestação, as sementes foram selecionadas e colocadas para germinar diretamente no substrato em que seriam cultivadas quando adultas. Após 3 meses, as plântulas obtidas foram transplantadas para vasos de PVC divididos em 3 compartimentos iguais.

2.3.4. Preparo do vaso

No experimento utilizou-se um vaso dividido em 3 partes iguais (Fig 4). As divisões dos foram feitas com material plástico proveniente de garrafas PET (Fig 4A). As garrafas foram cortadas a fim de se obter placas plásticas e as placas foram modeladas em estufa 50°C (Fig. 4B), sendo dobradas nas pontas e unidas no centro por grampos e cola de PVC flexível. As divisões montadas foram coladas nos vasos de PVC, sendo separadas por ângulo igual (120°), para garantir que todas as três cavidades formadas tivessem aproximadamente o mesmo volume de substrato (Fig. 4 C-D). Os vasos apresentavam diâmetro de 24,5 cm e altura de 30 cm, sendo que as divisões não permitiam contato entre as plantas (Fig. 4 E). O volume de substrato em cada divisão era de, aproximadamente, 4,7 litros. Foi utilizado o mesmo substrato para cada cavidade do vaso, variando a população de *Schinus* utilizada.

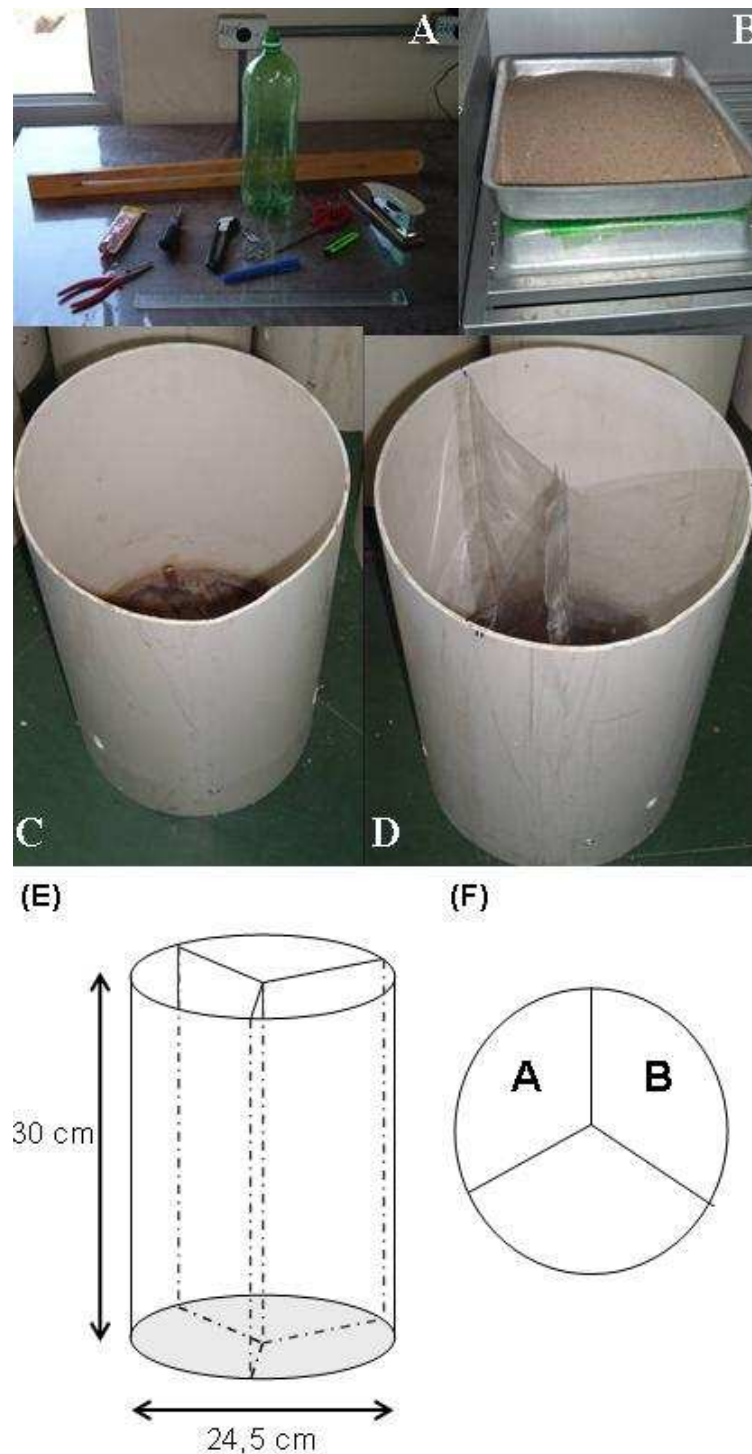


Figura 4. (A) Material usado para confecção das divisões dos vasos. (B) Placa de Garrafa PET sendo modelada na estufa 50°C. (C) Vaso de PVC sem divisória. (D) Vaso de PVC com divisória. (E) Modelo e dimensões de vaso utilizado para o cultivo das plantas, (F) Detalhe frontal do vaso. A - População de *Schinus lentiscifolius* da mina, B - População de *S. lentiscifolius* da área externa da mina.

2.3.5. Delineamento experimental

Para cada vaso foi utilizado um substrato diferente e uma planta de cada população amostrada. Para impedir a compactação do substrato no fundo do vaso, o que iria dificultar a aeração das raízes, colocou-se uma camada de aproximadamente 5 cm de areia previamente limpa e seca no fundo do vaso. Ao todo, foram utilizados 3 substratos e duas populações de *S. lentiscifolius*, uma de dentro da mina (DM) e outra de fora da mina (FM). Utilizou-se delineamento experimental completamente casualizado.

Foram utilizadas 13 plantas de cada população para o tratamento de cinzas e solo. No tratamento de rejeitos foram utilizadas 10 plantas de cada população, divididas em duas populações vs três substratos. Ao todo foram utilizadas 72 plantas divididas em 6 tratamentos:

A) *Schinus lentiscifolius* - população da mina (DM):

1. em solo,
2. em cinzas e
3. em rejeitos;

B) *S. lentiscifolius* - população de fora da mina (FM):

4. em solo,
5. em cinzas e
6. em rejeitos;

2.3.6. Cultivo das plantas

O experimento foi mantido em condições naturais na casa de vegetação, no período de 26 de setembro de 2006 até 12 de fevereiro de 2007, sendo que os dados do experimento foram coletados posteriormente a 4 de dezembro, o qual se definiu como período de aclimação das mudas. As plantas foram regadas com 250mL de água deionizada, em dias alternados durante o verão e de duas vezes por semana, na primavera.

2.3.7. Casa de vegetação

As variações de temperatura e umidade ocorridas na casa de vegetação foram registradas com uso de um termômetro digital de máxima e mínima (Termo-Higrômetro- Incoterm - 7429) (Fig.5). Os registros ocorreram no período de dezembro a fevereiro que corresponde ao período de acompanhamento do experimento. A casa de vegetação tinha cobertura plástica, sendo pouco arejada, o que causou temperaturas mais elevadas em alguns períodos do verão.

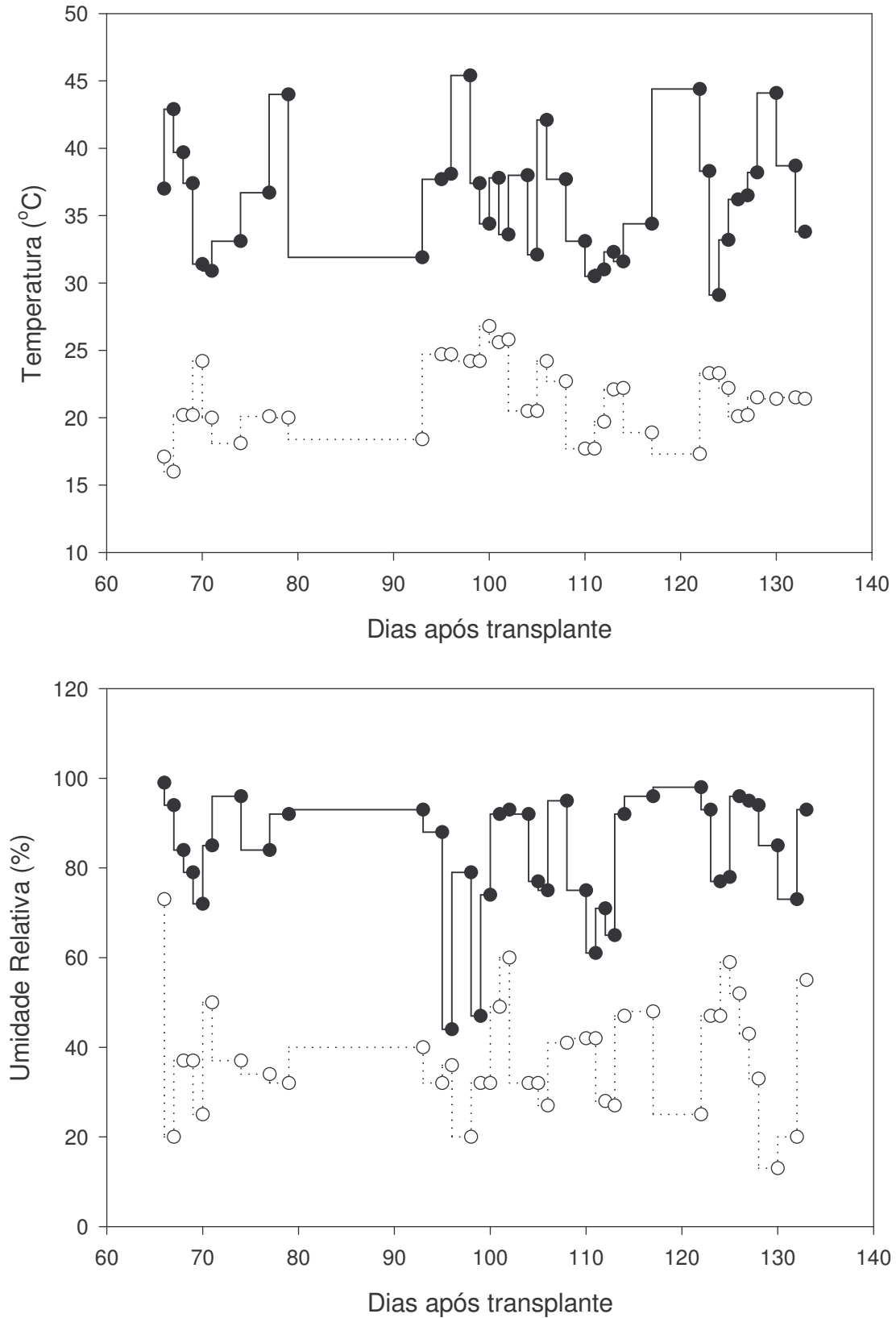


Figura 5. (A) Temperatura (°C) máxima (—●—) e mínima (···○···) e (B) umidade relativa máxima (—●—) e mínima (···○···) durante o período do experimento. As linhas dos gráficos não mostram tendências nas temperaturas/umidade da casa de vegetação, sendo ligados os registros de temperatura/umidade por linhas apenas para facilitar a visualização.

2.3.8. Análises de crescimento e sobrevivência

A partir do dia 4 de dezembro de 2007, iniciaram-se semanalmente as medidas de sobrevivência e de crescimento. A sobrevivência foi avaliada em função do percentual de plantas vivas por tratamento no tempo decorrido. Para a medida de altura fez-se uso de régua e estabeleceu-se o primeiro nó (das folhas cotiledonares) como ponto de altura zero.

A taxa de crescimento relativo ao tempo total de experimento (140 dias) foi calculada segundo a equação de Blackmann (Beadle, 1985), modificada com uso da medida de altura das plantas ao invés da matéria seca:

$$(1) \quad \text{TCR} = \left(\frac{\ln A_2 - \ln A_1}{t_2 - t_1} \right)$$

Sendo A_1 e A_2 as alturas medidas no primeiro dia avaliado (t_1), que foi em 4 de dezembro de 2007, e no último (t_2) dia em que foi medida a altura, que foi em 6 de fevereiro de 2007. A partir dos dados semanais de altura e sobrevivência construiu-se uma curva de crescimento bruto das plantas em altura e de percentual de sobrevivência.

2.3.9. Análises de biomassa

No dia 12 de fevereiro de 2007, o experimento foi desmontado. As plantas foram separadas, manualmente, em parte aérea e raiz. Todo o material coletado foi colocado em sacolas de papel e levado à estufa por 5 dias a 60°C. As amostras foram pesadas em balança analítica com 4 casas de precisão (Sartorius).

2.3.10. Análises estatística

A análise estatística dos dados foi feita, com o auxílio do programa SigmaStat 2.03, sendo realizada análise de variância (ANOVA) fatorial. O seguinte modelo foi usado, o efeito da população, o efeito do substrato e a interação entre população \times substrato. Posteriormente foi realizado o teste de Tukey para comparação das médias significativas ($p < 0,05$).

2.4. Experimento 3

2.4.1. Substratos utilizados

Utilizaram-se o solo e as cinzas já descritos no item 2.2.1 da página 18. No entanto, foram realizadas misturas do solo nas cinzas, a fim de melhorar as condições nutricionais das cinzas. Os substratos utilizados na germinação consistiam em misturas de diferentes proporções de cinzas e de solo, medidas em volume, totalizando 5 misturas:

- A) 100% Cinzas;
- B) 66% Cinzas;
- C) 33% Cinzas;
- D) 20% Cinzas
- E) 0% Cinzas (=100% Solo).

2.4.2. Coleta das sementes

As sementes foram coletadas conforme já descrito no item 2.2.2 da página 18.

2.4.3. Germinação de *Schinus lentiscifolius* em misturas de cinzas e solo

Neste experimento foram utilizados recipientes de polietileno com capacidade de 500mL fechados com filme plástico de PVC. A troca do recipiente usado para germinação ocorreu porque nestes cabiam mais sementes do que os recipientes utilizados anteriormente e a perda de umidade era insignificante, não necessitando repor água durante o andamento do experimento.

Os substratos utilizados correspondiam às misturas referidas no item 2.4.1. desta página, as quais foram previamente secas e esterilizadas em estufa a 200°C, durante duas horas. A capacidade de retenção de água de cada mistura foi medida segundo a metodologia de RAS (Brasil, 1989), já descrita em 2.2.3 da página 19. A umidade foi mantida em 75%, através da adição de água no início do experimento. O experimento foi conduzido em câmaras de germinação (tipo BOD – Tecnal TE-401), com fotoperíodo (12 horas) e temperatura constante (25°C).

Foram utilizadas sementes das duas populações de *Schinus lentiscifolius*, uma de dentro da mina (DM) e outra de fora da mina (FM). As sementes não sofreram nenhum tratamento de escarificação e foram desinfestadas por 15 minutos em uma solução 1:1 (hipoclorito comercial 2%: água deionizada), sendo posteriormente lavadas até a retirada completa do hipoclorito, selecionadas e colocadas para germinar imediatamente.

O delineamento experimental foi completamente casualizado, sendo colocadas 10 sementes por recipiente e sendo feitas 4 réplicas para cada tratamento. Ao todo foram utilizados 5 substratos e duas populações de *S. lentiscifolius*, uma de dentro da mina (DM) e outra de fora (FM), totalizando 10 tratamentos com 4 réplicas cada.

2.4.3. Análise da germinação

A germinação foi avaliada através da emergência da plântula para fora do substrato, a qual foi verificada diariamente no período de 30 dias. O índice de velocidade de emergência (IVG) foi calculado segundo a equação descrita por Maguirre (1962), no qual é feito o somatório das plântulas germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos:

$$(1) \quad \text{IVG} = \left(\frac{G1}{D1} + \frac{G2}{D2} + \frac{Gn}{Dn} \right)$$

Desta forma, G1 representa o número de sementes germinadas no primeiro dia, D1 o primeiro dia de medição, D2 o segundo dia, e assim posteriormente. A porcentagem de germinação foi calculada através do total de sementes germinadas em cada mistura, pelo total de sementes colocadas para germinar.

2.4.3. Análise estatística

Para proceder-se as análises estatísticas, os dados de percentual de germinação foram transformados em arcoseno $\sqrt{x/100}$, e os do IVG não sofreram nenhuma transformação. Realizou-se análise de variância (ANOVA) fatorial para comparação dos tratamentos. O seguinte modelo foi usado, o efeito da população, o efeito do substrato e a interação entre população \times substrato. Posteriormente foi realizado o teste de Tukey para comparação das médias significativas ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.2. Características dos substratos de mineração

3.2.1 Análises químicas dos substratos

As propriedades físico-químicas das cinzas, do solo e dos rejeitos são apresentadas na tabela 1. As amostras de solo revelam um solo moderadamente ácido, apresentando valores de nitrogênio, manganês, zinco e alumínio, mais elevados que os demais substratos. As cinzas apresentaram pH elevado e elevada condutividade elétrica, com reduzidos valores de nitrogênio e valores elevados de magnésio. Os rejeitos apresentaram pH ácido, baixa condutividade elétrica, elevadas quantidades de potássio e magnésio. Embora as concentrações de macronutrientes de um modo geral não tenham sido baixas, os resultados correspondem aos valores de macronutrientes totais e não aos valores de macronutrientes disponíveis. Nenhum dos substratos apresentou valores de metais pesados acima das concentrações consideradas tóxicas para solo.

Tabela 1. Análise química dos componentes do solo, dos rejeitos e das cinzas de mineração utilizados para o cultivo das plantas (Fonte: Análise feita no Laboratório de solos da faculdade de Agronomia da UFRGS, método EPA 3050). 1- McBride, 1993. 2- CETESB, 2001. ^A- Valores de referência de qualidade, estabelecidos com base em análises de amostras ambientais, de forma preventiva, para efetuar a proteção da qualidade dos solos.

Parâmetros avaliados	Concentrações		Análises químicas dos substratos utilizados			
	“normais” em solos		Solo	Cinzas	Rejeitos	Medologia utilizada
	1 (ppm)	2 ^A (ppm)				
pH			4,1	10,5	2,7	1 Am:5 H ₂ O - potenciometria
Condutividade elétrica - µS/cm			345	902	3,45	Extração H ₂ O 5:1 - condutometria
Nitrogênio (TKN) - % (m/m)			0,32	0,06	0,26	Kjeldahl – 0,01%
Fósforo Total - % (m/m)			0,06	0,01	<0,01	Digestão úida nítrico-perclórica – ICP-OES/ 0,01%
Potássio Total - % (m/m)			0,10	0,16	707	EPA 3050/ ICP-OES/ 0,01%
Magnésio Total - % (m/m)			0,19	574	508	EPA 3050/ ICP-OES/ 0,01%
Enxofre total - % (m/m)			0,05	0,24	3,4	Digestão úmida nítrica perclórica/ turbidimetria/0,01%
Manganês Total mg.kg ⁻¹ – mg/kg	80-1300		172	86	86	EPA 3050/ ICP-OES/ 3mg/kg
Alumínio Total - % (m/m)			7,4	1,2	0,87	EPA 3050/ ICP-OES/ 0,01%
Ferro Total - % (m/m)			4,0	0,74	4,7	EPA 3050/ ICP-OES/ 0,01%
Cobre total mg.kg ⁻¹ – mg/kg	6 - 80	35	33	20	23	EPA 3050/ ICP-OES/ 0,4 mg/kg
Zinco total mg.kg ⁻¹ – mg/kg	17-125	60	54	46	9	EPA 3050/ ICP-OES/ 2 mg/kg
Molibidênio total – mg/kg	1-3	<25	<0,2	2	<0,2	EPA 3050/ ICP-OES/ 0,2 mg/kg
Cobalto total – mg/kg	1,6 - 21,5	13	8	7	16	EPA 3050/ ICP-OES/ 0,4 mg/kg

3.2. Influência das cinzas e rejeitos de mineração na germinação de duas populações de *S. lentiscifolius*

No experimento de germinação observou-se que o efeito do substrato sobre a germinação das populações de *S. lentiscifolius* avaliadas não foi significativo (Tabela 2). No entanto, ocorreram diferentes respostas das populações de *S. lentiscifolius* a germinação ($P < 0,05$). Na população de *S. lentiscifolius* proveniente de fora da mineração de cobre ocorreu maior percentual de germinação do que na população do interior da mineração de cobre (Figura 6).

Tabela 2. Valores de P associados a probabilidade da análise de variância do percentual de germinação de duas populações de *S. lentiscifolius*. ($P < 0,05$) * resultados estatisticamente significativos. ^{NS} resultados não-significativos

Fonte de variação (df)	GERMINAÇÃO – VALORES DE P		
	14 dias	21 dias	28 dias
Substratos (3)	0,154 ^{NS}	0,178 ^{NS}	0,114 ^{NS}
Populações (2)	0,020*	0,029*	0,037*
Substrato x População (6)	0,925 ^{NS}	0,883 ^{NS}	0,917 ^{NS}

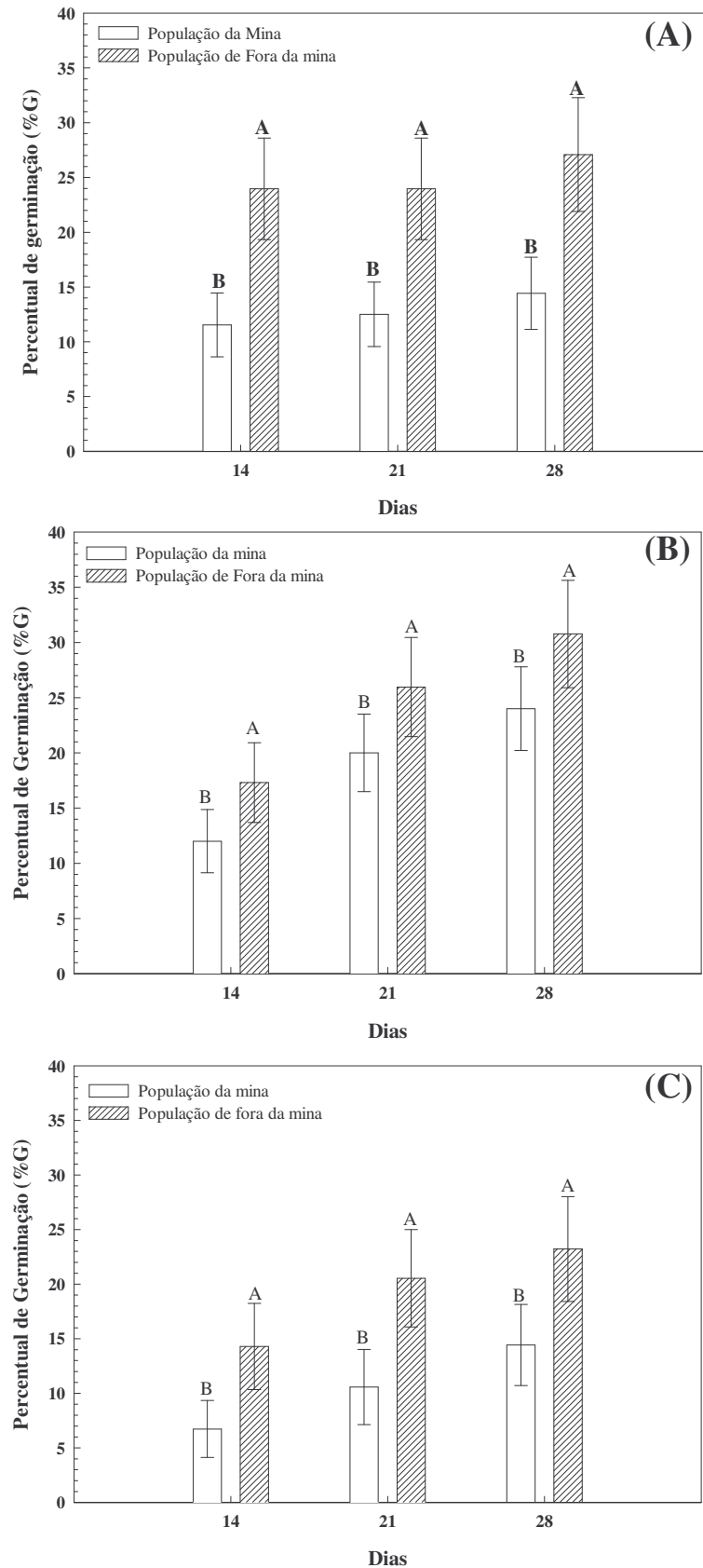


Figura 6. Percentual germinação de *S. lentiscifolius* nos substratos: (A) solo, (B) cinzas e (C) rejeitos. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na germinação das populações de *S. lentiscifolius*. Não ocorreram diferenças significativas entre tratamentos na mesma população (n=25 sementes/ tratamento). $P < 0,05$

3.3. Efeitos das cinzas e rejeitos de mineração na mortalidade das plantas

A partir dos resultados apresentados na figura 7, pode-se observar que os rejeitos de mineração influenciaram negativamente a sobrevivência de *S. terebinthifolius* e das duas populações de *S. lentiscifolius* estudadas. Todas as plantas cultivadas em rejeitos morreram até 140 dias após o transplante, não havendo diferenças no tempo ou percentual de sobrevivência entre as plantas estudadas. O mesmo efeito não foi observado em cinzas, em que a mortalidade não ocorreu durante o período de experimento avaliado e todas as plantas sobreviveram. Como em rejeitos não existiram plantas sobreviventes após 140 dias de experimento não foram avaliados os parâmetros de crescimento (TCR, biomassas aérea e de raiz), os quais foram avaliados nos demais substratos.

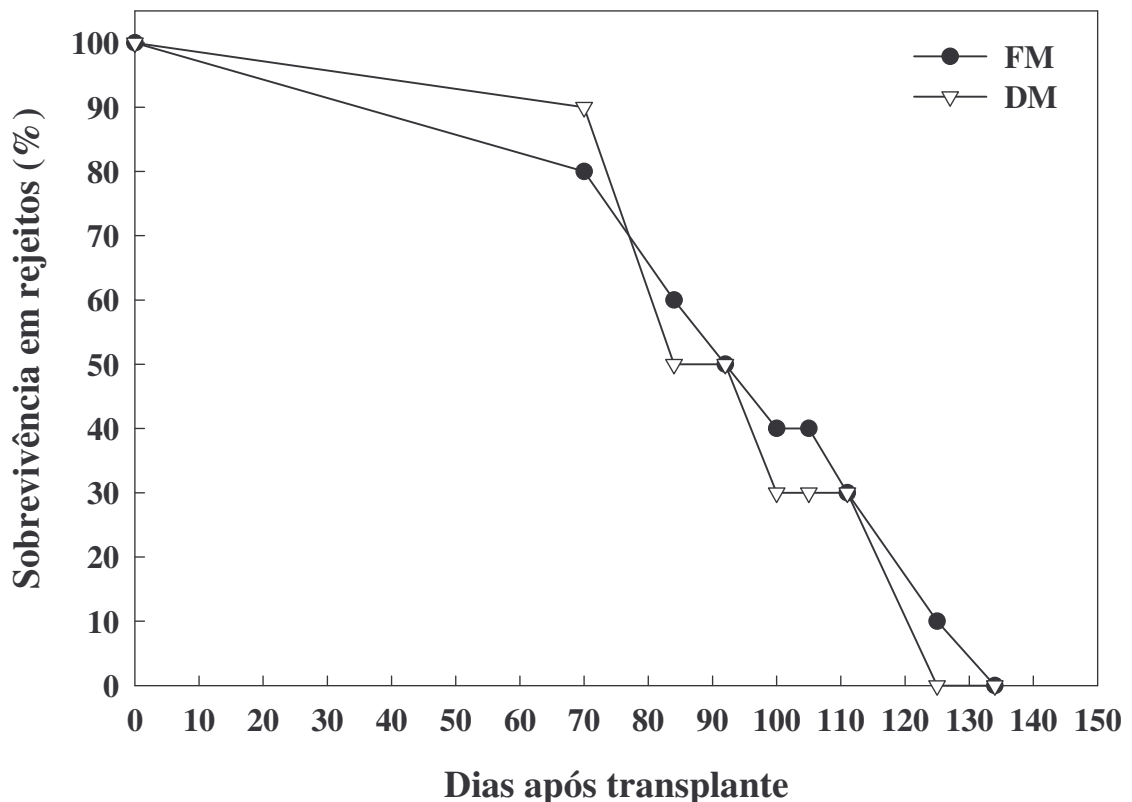


Figura 7. Sobrevivência em rejeitos de mineração de *Schinus lentiscifolius* - População Fora da mina (FM), de *Schinus lentiscifolius* - População da mina (DM). (n=10)

3.4. Efeitos dos substratos de mineração no crescimento das plantas

O local de coleta das sementes de *S. lentiscifolius* não influenciou as respostas das duas populações ao substrato (Tabela 3). No entanto, verificou-se influência significativa dos substratos ($P < 0,001$) em todos os parâmetros de crescimento avaliados. Os resultados

mostraram que as cinzas influenciaram negativamente o crescimento das espécies e populações de *Schinus* estudadas (Figura 9). Nas plantas cultivadas em cinzas, observou-se que as plantas apresentaram porte reduzido, mesmo após um período longo de cultivo, apresentando poucas folhas por planta e coloração foliar frequentemente avermelhada ou amarelada (Figura 10 A, C e E). Nas duas populações de *S. lentiscifolius*, com frequência, foram encontradas folhas encurvadas e orientadas para cima. Em solo as duas populações apresentaram maior crescimento nos parâmetros avaliados (Fig 8).

A taxa de crescimento de ambas as espécies e populações de *Schinus* reduziu nas duas populações de *S. lentiscifolius* (Tabela 4). As taxas de crescimento das plantas das duas populações de *S. lentiscifolius* crescidas em cinzas foram menores do que as das plantas crescidas em solo. A biomassa de raiz e parte aérea foi fortemente afetada nas plantas das duas populações de *S. lentiscifolius* crescidas em cinzas (Tabela 4).

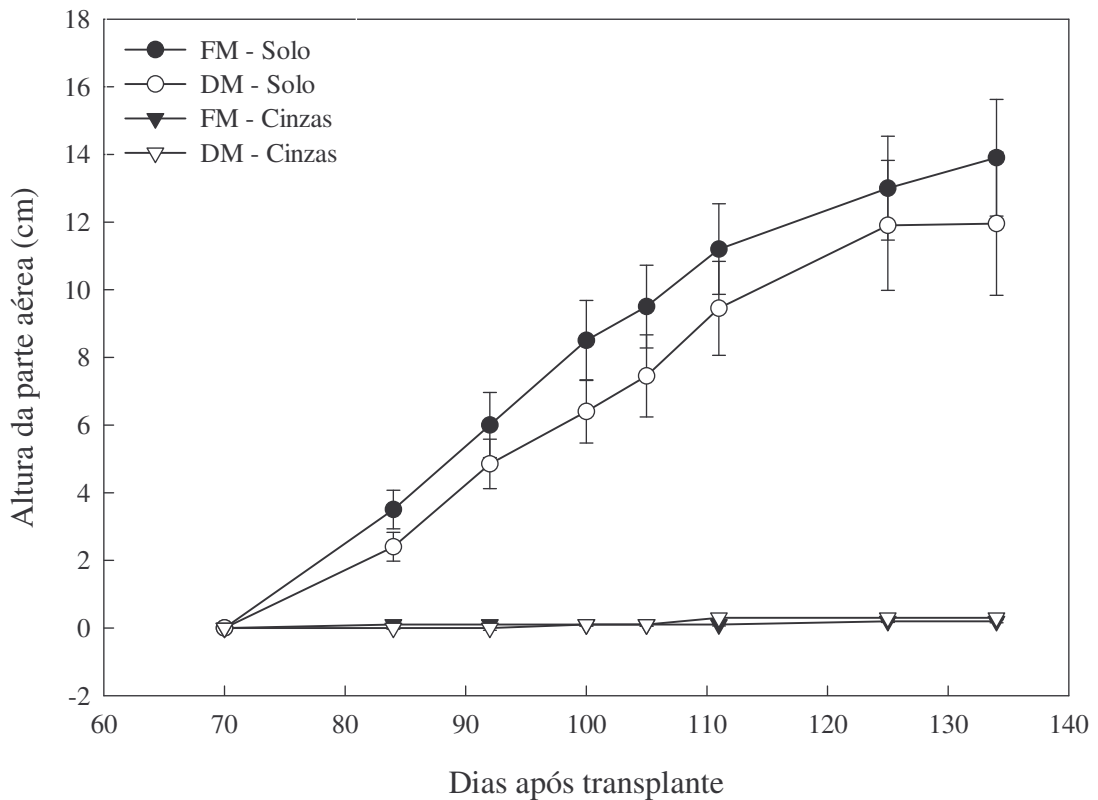


Figura 8. Relação entre substrato e crescimento da planta: Em *S. lentiscifolius* (A) População de Fora da mina e (B) População da mina e em (C) *S. terebinthifolius*. (n=13). Médias \pm erro padrão.

Tabela 3. Valores de P associados a probabilidade da análise de variância dos parâmetros de crescimento das duas populações de *S. lentiscifolius*. P<0,05. * resultados estatisticamente significativos. ^{NS} resultados não-significativos

FONTE DE VARIACÃO (DF)	VALORES DE P		
	TCR	BIOMASSA PARTE AÉREA	BIOMASSA RAIZ
Substratos (3)	<0,001*	<0,001*	<0,001*
Populações (2)	0,621 ^{NS} .	0,374 ^{NS} .	0,789 ^{NS} .
Substrato x População (6)	0,993 ^{NS} .	0,383 ^{NS} .	0,810 ^{NS} .

Tabela 4. Dados de crescimento de *Schinus lentiscifolius* Fora da mina (FM), *Schinus lentiscifolius* da Mina (DM). Média± Erro Padrão. Letras diferentes correspondem a diferenças significativas na germinação das populações de *S. lentiscifolius*. Não ocorreram diferenças significativas entre tratamentos na mesma população. ¹(n=13); ²(n=5). (P<0,05). TCR – Taxa de crescimento relativo

	SOLO		CINZAS	
	FM	DM	FM	DM
TCR ¹	0,021 ± 0,002	0,021 ± 0,003	0,003 ± 0,001	0,005 ± 0,001
Parte aérea ²	3,774 ± 0,810	3,248 ± 0,657	0,035 ± 0,007	0,021 ± 0,002
Raiz ²	2,094 ± 0,385	2,406 ± 0,332	0,043 ± 0,003	0,033 ± 0,005
Razão PA/Raiz ²	1,924 ± 0,144	1,538 ± 0,116	0,815 ± 0,156	0,585 ± 0,196

3.5. Germinação em diferentes proporções de cinzas e solo

A resposta das duas populações de *S. lentiscifolius* a diferentes misturas de cinzas e solo foram significativamente diferentes ($P < 0,05$). Entretanto, não ocorreram diferenças significativas da adição de solo nas cinzas na germinação das duas populações de *S. lentiscifolius* avaliadas (Tabela 5). As sementes provenientes da mina tiveram percentual de germinação e IVG inferiores às sementes provenientes da área fora da mina (Tabela 6). O início da germinação na população mina ocorreu entre o 6º e 10º dia de experimento e na população fora da mina entre o 5º e o 8º dia, mostrando mais rapidez na germinação (Fig 9).

Tabela 5. Valores de P associados a probabilidade da análise de variância do percentual e IVG de germinação de duas populações de *S. lentiscifolius*. * resultados estatisticamente significativos. ^{NS} resultados não-significativos

Fonte de variação (df)	% G	IVG
Substratos (5)	0,158 ^{NS}	0,280 ^{NS}
Populações (2)	0,026*	0,006*
Substrato x População (10)	0,400 ^{NS}	0,182 ^{NS}

Tabela 6. Média da percentagem de germinação aos 30 dias de experimento e Índice de Velocidade de emergência (IVG) das sementes das populações de *S. lentiscifolius*, em solo (S) e em cinzas (C). Letras iguais resultados estatisticamente iguais e letras diferentes, resultados estatisticamente diferentes. Médias de 4 potes com 12 sementes cada. Valores médios \pm Erro Padrão. $P < 0,05$.

Tratamentos	%G		IVG	
	DM	FM	DM	FM
C:S – 1:0	25 \pm 6,5	40 \pm 7,1	0,135 \pm 0,035	0,284 \pm 0,049
C:S – 2:1	23 \pm 2,5	45 \pm 2,9	0,180 \pm 0,035	0,379 \pm 0,039
C:S – 1:1	48 \pm 10,0	43 \pm 8,5	0,342 \pm 0,080	0,305 \pm 0,092
C:S – 1:4	35 \pm 9,6	40 \pm 9,1	0,240 \pm 0,088	0,297 \pm 0,073
C:S – 0:1	40 \pm 12,0	65 \pm 12,0	0,248 \pm 0,060	0,483 \pm 0,98

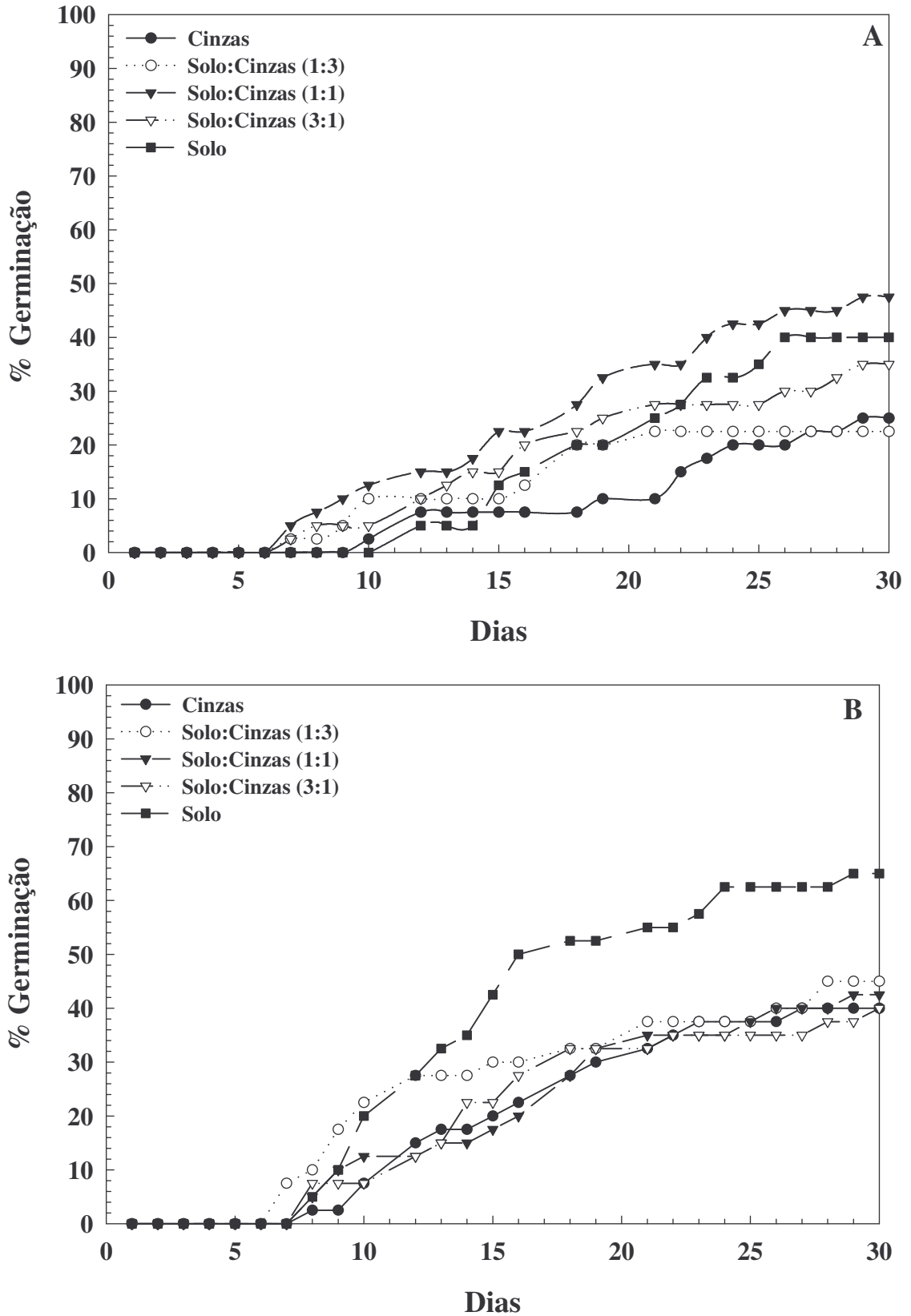


Figura 9. Curva de germinação cumulativa (%) de sementes de duas populações de *S. lentiscifolius*. (A) População da mina e (B) População Fora da Mina. Médias de 4 potes com 12 sementes cada.

4. DISCUSSÃO

Os resultados deste experimento mostram que, em cinzas, as duas populações de *Schinus lentiscifolius*, germinam com facilidade e sobrevivem neste substrato. No entanto, embora *Schinus lentiscifolius* germine em rejeitos, as duas espécies não sobreviveram quando cultivadas diretamente neste substrato.

Neste experimento, as duas populações de *S. lentiscifolius* germinaram diferentemente, não havendo diferenças significativas na germinação entre solo, cinzas e rejeitos. Os principais fatores ambientais que influenciam a germinação são: água, temperatura, oxigênio, luz e compactação do substrato (Forcella *et al.*, 2000); tanto a diferença na composição química dos substratos como as características físicas do mesmo influenciam estes parâmetros. No entanto, os resultados deste experimento indicam que os fatores físicos e químicos das cinzas e rejeitos não tiveram influência na germinação das populações de *S. lentiscifolius* testadas.

No segundo experimento, quando cultivadas em rejeitos, ambas as populações de *Schinus* testadas tiveram mortalidade de 100% até os 140 dias após o transplante. A mortalidade das plantas é um parâmetro importante de ser quantificado durante a implantação de um método em uma área degradada. Sugere-se como ideal uma mortalidade máxima de 10% (Almeida & Sanchez, 2005). Em geral, este parâmetro é fortemente influenciado pelas condições físicas e químicas do substrato. A elevada mortalidade observada, em rejeitos, neste experimento, possivelmente tenha relação com estas duas condições.

Fisicamente os rejeitos caracterizam-se pela textura grossa e pedregosa, pouco estável e pouco coesa, o que influi fortemente na umidade, uma vez que a percolação da água é facilitada (Silva *et al.*, 2006 A). Isto torna a superfície do substrato muito seca e com uma baixa capacidade de retenção de água (Tordoff *et al.*, 2000). As plantas de *Schinus* têm raízes muito finas e sensíveis e, quando num estágio inicial de crescimento, seu sistema radicular ainda é ralo e fortemente influenciável por fatores externos. Logo, é provável que todas as plantas cultivadas em rejeitos tenham tido dificuldades na adesão e fixação de suas raízes no substrato em função da granulometria do mesmo. Associado a isto poderia ocorrer a dessecação nas raízes de *Schinus*, uma vez que o substrato permanecia pouco úmido e que a água é um fator determinante no estabelecimento de plântulas (Vieira & Scariot, 2006

Além disso, a água associada às elevadas temperaturas observadas no período do experimento pode ter acelerado a degradação química dos rejeitos e liberação de seus componentes, os quais incluem elementos tóxicos como metais pesados, bem como a formação de ácido sulfúrico a partir da oxidação pirita (Tiwary, 2001). Em concordância, sintomas de toxidez e de deficiências foram observados nas plantas em rejeitos e cinzas, as quais apresentavam as folhas vermelhas, amareladas ou ainda com necroses nas pontas das folhas. Os sintomas observados indicam que, além de inúmeras limitações físicas, vários componentes dos rejeitos são potencialmente tóxicos e também podem influir na mortalidade das plantas.

Por outro lado, todas as plantas cultivadas em cinzas sobreviveram; entretanto, todas também apresentaram tamanho extremamente reduzido, com curtos períodos de crescimento e folhas avermelhadas com aparência estiolada. As cinzas têm textura arenosa que permite, mesmo que frouxamente, a adesão da raiz ao substrato e, além disso, a disposição de suas partículas permite maior retenção e menor evaporação de água do que os rejeitos, o que poderia ter favorecido a sobrevivência das plantas. Alguns trabalhos relatam ocorrer elevada mortalidade de plantas em cinzas, Pillman & Jusaitis (1997) observaram que *Nitraria billardierei* e *Enchylaena tomentosa*, crescidas diretamente sobre cinzas apresentaram, após 4 meses de experimento, sobrevivência de 60% e 0%, respectivamente. Os autores observaram também que a sobrevivência de ambas as espécies era maior se feitas misturas das cinzas com solo.

As plantas crescidas em cinzas tiveram seu crescimento fortemente afetado, possivelmente como influência das baixas quantidades de nutrientes disponíveis e também dos efeitos tóxicos dos constituintes das cinzas. Em mamona se verificou que a adição de macronutrientes promovia significativamente o crescimento das plantas cultivadas diretamente em cinzas de carvão mineral (Azzolini M., comunicação pessoal). Sugerindo ser esse um dos principais limitantes ao crescimento das plantas em cinzas, uma vez que existe baixa disponibilidade de nitrogênio e fósforo neste substrato (Adriano *et al.* 1980). Nas duas populações de *Schinus* trabalhadas, sugere-se que a sobrevivência das aroeiras após a germinação e estabelecimento poderia estar ligada à exaustão dos nutrientes nos cotilédones das sementes (Wisniewski & Dickinson, 2003). Consequentemente, o crescimento da planta estaria ligado à quantidade de reservas que sua semente carrega.

Nas duas populações de *S. lentiscifolius* foram observados sintomas foliares que sugerem tanto deficiências nutricionais nas plantas, bem como toxidez de elementos presentes nas cinzas. Em um estudo sobre plantas que crescem em um depósito de cinzas da

termelétrica de Nikola Tesla-A (Sérvia), os autores observaram diversos sintomas de danos foliares como cloroses e avermelhamentos nas folhas (*Tamarix* sp, *Populus* sp, *Amorpha* sp, etc) e necroses marginais e áreas secas da folha (*Populus* sp, *Ambrosia* sp, etc). Os sintomas observados foram relacionados às características químicas das cinzas como os baixos níveis de nitrogênio, os elevados níveis de boro, a presença de metais pesados, o desbalanço nutricional das plantas e o elevado pH das cinzas (Pavlović *et al.*, 2004). Embora não tenham sido analisados o conteúdo dos elementos nas folhas, as análises químicas do substrato mostram que as cinzas apresentam elevadas quantidades de magnésio, baixas quantidades de macronutrientes disponíveis e metais que possivelmente estariam provocando toxidez das plantas. Os efeitos tóxicos de elementos nas cinzas puderam ser observados por sintomas de toxidez e queda de folhas (Kohl & Lösh, 2004), que poderia ainda se relacionar a elevadas temperaturas observadas no período de experimento (resultados não mostrados). Desta forma, apesar das plantas de *Schinus* sobreviverem em cinzas, as plantas tiveram muitos sintomas de toxidez.

A melhoria das condições dos substratos é uma estratégia frequentemente adotada para acelerar o processo de recuperação de uma área. Neste trabalho, utilizou-se a germinação como parâmetro indicativo da capacidade das plantas de crescerem em diferentes misturas de cinzas e solo. Apesar disto, deve-se ressaltar que a germinação é, em geral, afetada em concentrações mais tóxicas de poluentes do que a planta adulta seria afetada (Kohl & Lösh, 2004).

As duas populações mostraram diferenças entre elas nos percentuais de germinação entre populações apenas, sendo que tanto no primeiro como no segundo experimento envolvendo germinação, observou-se maior percentual de germinação das plantas de fora da mina de cobre. Porto (1990) verificou que, embora tenha menor germinação que a população de fora da mina, as populações de *S. lentiscifolius* provenientes da mina de cobre germinam melhor com pequenas concentrações de metal.

Entretanto, embora existam estudos que indiquem que as cinzas aplicadas ao solo aumentam o pH, a condutividade hidráulica e a disponibilidade de nutrientes do substrato (Gupta *et al.*, 2002). Em *S. lentiscifolius* não foi verificado aumento da germinação nos tratamentos com a adição de solo nas cinzas. Alguns autores (Gupta *et al.*, 2002) mostraram que uma baixa aplicação de cinzas (5-10%) nos solos aumenta a germinação e o crescimento das plântulas. Em cinzas, outros trabalhos verificaram a inibição do percentual e tempo de germinação com a adição de 20- 30% de cinzas ao solo, sugerindo que o excesso de Ca, K, Mg, entre outros elementos e a presença de metais pesados poderia estar inibindo a

germinação (Singh *et al.*, 1997). A germinação poderia ainda ser inibida pela formação de um impedimento da matriz solo-cinza oferecido para as sementes (Kalra *et. al*, 1997). Apesar da adição de cinzas não ter provocado diferenças significativas na germinação das duas populações de *S. lentiscifolius*, possivelmente essas diferenças ocorrem no período pós-germinação. Pois, neste período, existem maiores requerimentos nutricionais por parte da planta e a mistura de solo às cinzas adiciona mais macronutrientes para a planta do que apenas cinzas.

5. CONCLUSÕES

- Não ocorreram diferenças significativas na germinação de *S. lentiscifolius* em solo, cinzas e rejeitos; sendo que as diferenças observadas correspondem apenas a diferenças na capacidade germinativa de cada população avaliada.
- A população proveniente da mina tem menor capacidade germinativa que a população coletada fora da mina.
- Os rejeitos de carvão mineral influenciaram negativamente a sobrevivência das duas populações de *S. lentiscifolius*.
- As cinzas de carvão mineral influenciaram negativamente o crescimento das duas populações avaliadas; no entanto, não tiveram influência na sobrevivência das plantas no período avaliado.
- A melhoria das condições nutricionais das cinzas através da adição de solo não causou diferenças significativas na germinação das duas populações de *S. lentiscifolius* analisadas, existindo diferenças apenas na capacidade germinativa de cada uma delas.

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE PLANTAS DE *Schinus lentiscifolius* March. E *S. terebinthifolius* Raddi SUBMETIDAS AO ESTRESSE POR EXCESSO DE COBRE

1. INTRODUÇÃO

O cobre é um importante micronutriente no metabolismo vegetal, mas é fitotóxico em concentrações elevadas (Marschner, 1995), causando diminuição do crescimento, em especial o de raiz, cloroses nas folhas e redução na fotossíntese devido a danos no aparato fotoquímico e bioquímico (Maksymiec, 1997), entre outros efeitos. As fontes de poluição por cobre são diversas, incluindo a mineração de metais e carvão, os fungicidas da agricultura e atividades industriais (Song *et al.*, 2004).

Embora o cobre seja tóxico para a maioria das plantas, é possível observar a existência de espécies que crescem em solos contaminados com o metal sem aparentes sintomas de toxidez. Algumas destas espécies apresentam mecanismos de tolerância aos metais pesados e têm sido cogitadas para uso em fitorremediação, principalmente as chamadas de acumuladoras e exclusoras (Baker, 1981), sendo usadas para fitoextração e para fitoestabilização, respectivamente (Accioly & Siqueira, 2000).

No Rio Grande do Sul, a aroeira-do-campo (*Schinus lentiscifolius* March) cresce naturalmente sobre uma mina de cobre abandonada, a Mina de Volta Grande, situada em Lavras do Sul, onde se observa que *S. lentiscifolius* é a espécie arbóreo-arbustiva dominante. Trabalhos anteriores mostraram que, com a adição de cobre em excesso, as sementes de *S. lentiscifolius* apresentavam maior percentual de germinação do que quando cultivadas sem adição de cobre, sugerindo que a espécie apresenta tolerância ao cobre (Porto, 1990). Outra espécie de aroeira (*S. terebinthifolius* Raddi) tem sido amplamente utilizada em trabalhos de recuperação de áreas degradadas; no entanto, não se conhecem as respostas desta espécie ao cobre. Desta forma, os objetivos do presente trabalho são avaliar as respostas fisiológicas e a tolerância ao cobre de duas espécies de *Schinus* (*S. lentiscifolius* e *S. terebinthifolius*) com base em suas respostas de crescimento, fotossíntese e acumulação, quando submetidas ao excesso de cobre.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. A escolha das espécies

A escolha das espécies se deu com base nos experimentos do capítulo 1. Desta forma, não foi utilizada a população de *Schinus lentiscifolius* ocorrente de fora da mina de cobre. Entre os motivos que nos fizeram retirá-la dos experimentos contendo cobre estão estes:

- i. Nenhuma das populações apresentou melhor desempenho quando cultivada em cinzas ou rejeitos nos experimentos;
- ii. Embora ambas as populações respondam diferentemente quando avaliadas a sua germinação, poderiam ter respostas semelhantes quando adultas o que prejudicaria a avaliação da tolerância das plantas;
- iii. A população com maiores possibilidades de apresentar tolerância ao cobre seria a população da mina, por ela já habitar a mina.

Além da população de *S. lentiscifolius* da mina, foi utilizada outra espécie que não habitava um local com contaminação de cobre ou qualquer outro metal. A espécie escolhida foi *Schinus terebinthifolius*, entre as questões que motivaram a escolha estão as seguintes:

- i. Devido à espécie ser filogeneticamente próxima a *S. lentiscifolius*, o que poderia proporcionar um adequado teste para verificar a tolerância de uma planta que vive numa mineração de cobre e outra próxima;
- ii. Pela rusticidade que a espécie apresenta, que tem a levado a ser amplamente escolhida em trabalhos envolvendo recuperação de áreas degradadas.

2.2. Coleta de sementes

A coleta de todas as sementes foi realizada em abril de 2006. Procedeu-se a coleta em pelo menos 10-12 árvores de uma população de *S. lentiscifolius* situada no interior da mina de Volta Grando em Lavras do Sul (RS). A cidade de Lavras do Sul se situa entre as coordenadas UTM 228500 a 230500 E e 6588000 a 6584000 N. Neste local as temperaturas médias do ano são de 18°C e as precipitações entre 1.300 e 1.600mm, bem distribuídas ao longo do ano (Frizzo & Porto, 2004). No laboratório, as sementes foram selecionadas manualmente, conforme a aparência saudável e a presença ou ausência de perfurações causadas por larvas de insetos.

As sementes de *S. terebinthifolius* foram coletadas em áreas de floresta baixa do campus do Vale, Porto Alegre, RS, (30°3'21,2"S a 30°3'38,9"S; 51°7'16,1"O a 51°7'24,2"O) e selecionadas segundo sua aparência e ausência de perfurações.

Após serem selecionadas, as sementes foram acondicionadas em sacos de papel e colocadas prateleiras sob temperatura ambiente, conforme indicado por Medeiros & Zanon (1998), para conservação das sementes. Antes de serem utilizadas nos experimentos, as sementes foram imersas em água por 15 minutos e posteriormente foram excluídas aquelas que flutuavam na água neste período. Foram usadas para os experimentos apenas as sementes que não flutuaram na água durante a seleção.

2.3. Cultivo das plantas

As plantas foram obtidas a partir de sementes germinadas em areia limpa previamente esterilizada por duas horas em estufa 200°C. Para a germinação, as sementes foram desinfestadas, durante 15 minutos, em uma solução 1:1 (hipoclorito comercial: água deionizada). Posteriormente, foram lavadas até a retirada completa do hipoclorito e colocadas imediatamente para germinar.

Duas semanas após sua emergência, as plantas foram transferidas para floreiras coletivas de 4L, com aeração constante (Figura 10 A). As floreiras foram mantidas com solução nutritiva de Hoagland modificada $\frac{1}{4}$, logo após a transferência, e durante duas semanas, posteriormente cultivadas em solução de Hoagland $\frac{1}{2}$ por mais duas semanas. O pH da solução foi ajustado em pHâmetro para pH 5, usando HCl e NaOH 0,1M. As soluções eram trocadas de uma a duas vezes por semana. Após um mês de cultivo na solução, as plantas começaram a ser cultivadas em solução de Hoagland padrão (1/1): KNO₃ (6000 μ M), Ca(NO₃)₂.4H₂O (4000 μ M), NH₄H₂PO₄ (2000 μ M), MgSO₄.7H₂O (1000 μ M), KCl (50 μ M), H₃BO₃ (25 μ M), MnSO₄.H₂O (2 μ M), ZnSO₄.7H₂O (2 μ M), CuSO₄.5H₂O (0,5 μ M), NaMoO₄ (0,5 μ M), Fe-EDTA (53 μ M).

Alguns cuidados foram tomados em relação à aclimação das plantas à luz. As plantas permaneceram em bancada com baixa intensidade luminosa por 30 dias. Posteriormente os vasos foram colocados sob sombrite (Fig 10 B) por 60 dias. Após este tempo as plantas foram finalmente retiradas do sombrite e transferidas para vasos de 500mL, no qual foram colocadas duas a duas em luz plena (Fig 10 C). Este cuidado foi necessário porque em experimentos prévios se observou que *Schinus terebinthifolius* mostrava alta sensibilidade à luz intensa, ocorrendo um branqueamento foliar quando exposta diretamente a luz (Figura 10 D). Desta

forma, foi necessário um longo período de aclimação da planta antes de sua exposição à luminosidade natural dentro da casa de vegetação.



Figura 10. (A) Visão geral das plantas recém colocadas em floreiras coletivas, (B) Plantas sob sombrite (C) Visão geral do experimento e (D) detalhe de folha de *S. terebinthifolius* não aclimatada e recém exposta ao Sol.

2.4. Tratamentos com adição de cobre

Após aproximadamente 65 dias do início do cultivo em solução Hoagland modificada, iniciou-se a aplicação de cobre nas plantas. O cobre foi aplicado em uma escala logarítmica de exposição na forma de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. As concentrações de cobre utilizadas foram as seguintes: $16\mu\text{M}$ ($\approx 1,017$ ppm), $32\mu\text{M}$ ($\approx 2,033$ ppm), $64\mu\text{M}$ ($\approx 4,067$ ppm) e $128\mu\text{M}$ ($\approx 8,133$ ppm). O tratamento controle continha cobre na concentração $0,5\mu\text{M}$ ($\approx 0,032$ ppm). A concentração de cobre disponível em solução foi calculada, para cada tratamento de cobre utilizado, usando o programa GeoChem.

O delineamento experimental utilizado foi completamente casualizado consistindo em 2 espécies \times 5 níveis de cobre (Controle, $16\mu\text{M}$, $32\mu\text{M}$, $64\mu\text{M}$ e $128\mu\text{M}$). Foram utilizadas 10 repetições por tratamento, totalizando 100 plantas. As plantas foram cultivadas durante 100 dias com duas trocas semanais de solução. As variações morfológicas ocorridas nas plantas durante o experimento foram anotadas e fotografadas ao fim do experimento.

2.5. Análises de fotossíntese

2.5.1. Fluorescência da clorofila a

Após 30 dias da aplicação do metal foram realizadas curvas de fluorescência da clorofila a, usando um fluorômetro de luz modulada (FMS-2-Hansatech, UK). As medidas foram feitas dentro do laboratório em temperatura e luminosidade do ambiente. As medidas de fluorescência foram realizadas com as folhas que foram pré-adaptadas no escuro durante 30 minutos. Os parâmetros calculados foram os seguintes:

- F_o ,
- F_m ,
- F_v/F_m ,
- NPQ,
- qP ,
- ETR,
- Φ_{PSII} .

As análises foram feitas segundo a metodologia de Schreiber *et al.* (1986) e Genty *et al.* (1989), avaliando a emissão de fluorescência da superfície adaxial das folhas. O fluorômetro foi conectado a um computador e todos os resultados dos parâmetros foram obtidos da leitura direta do computador.

2.5.2. Taxas de fotossíntese

Após 10, 30, 40, 65 e 100 dias de exposição ao cobre foram realizadas medidas de taxas de fotossíntese, usando um aparelho portátil de medição de fotossíntese por análise de gases por infra-vermelho (Licor- 6400, Lincoln, NE, USA). Foram utilizadas 5 plantas de cada tratamento e as medidas foram realizadas todas no período da tarde, utilizando a folha mais jovem completamente expandida de cada tratamento. Os parâmetros da cubeta durante as análises foram os seguintes:

- luminosidade de 1000mmol.m².s⁻²;
- fluxo de CO₂ - 200 mmol.m².s⁻²;
- temperatura da folha de 20°C.

2.5.3. Análise de pigmentos

Ao fim do experimento, procedeu-se a análise de clorofila nos discos foliares de mesma porção da folha de 5 plantas por tratamento, num total de 50 amostras. Foram retirados 3

discos foliares por amostra, utilizando a segunda folha mais jovem completamente expandida de cada tratamento. Nos tratamentos com maior concentração de cobre algumas plantas não haviam emitido folhas mesmo após 100 dias, o que nos motivou a retirar discos foliares das folhas que haviam sido emitidas antes da aplicação dos tratamentos.

A extração foi feita com uso de etanol (100%) (Knudson *et al.*, 1977) e a leitura das amostras foi feita após 2 meses que foi o tempo em que ocorreu o branqueamento total dos discos. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro de luz visível nos comprimento de onda de 649 e 665nm. A concentração de clorofilas foi calculada de acordo com as equações de Wintermans & DeMots (1965) e o conteúdo expresso por massa foliar:

$$(7) \quad \text{Cl a (mg.mL}^{-1} \text{ solução)} = 13,7 A_{665} - 5,76 A_{649}$$

$$(8) \quad \text{Cl b (mg.mL}^{-1} \text{ solução)} = 25,8 A_{649} - 7,6 A_{665}$$

$$(9) \quad \text{Cl a+b (mg.mL}^{-1} \text{ solução)} = 6,1 A_{665} - 20,04 A_{649}$$

Em que Cl a, Cl b e Cl a+b são respectivamente as concentrações de clorofilas a, b e total. A_{649} e A_{665} são as absorbâncias em 649 e 665nm, respectivamente. A concentração de clorofilas (mg.g^{-1}) foi calculada pela equação:

$$(10) \quad \text{Conteúdo de clorofilas (mg.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Cl(a, b ou tot)} V_{\text{ext}} \cdot 10^{-3}}{\text{PS}}$$

Em que V_{ext} é o volume de solvente utilizado na extração (mL), e PS é o peso seco (g) do disco foliar utilizado.

2.6. Análises de crescimento

A altura das plantas começou a ser acompanhada a partir da adição do metal na solução, sendo medida quinzenalmente com uso de uma régua milimetrada conforme descrito no item 2.4.2.2, do capítulo anterior. A TCR foi calculada segundo a equação (2) presente no mesmo item.

Ao fim do experimento, as plantas foram separadas em parte aérea e raiz. Procedeu-se uma lavagem diferencial das porções da planta, sendo que a parte aérea foi lavada com água

destilada abundantemente e as raízes com água destilada, seguida por 10 min de solução EDTA e novamente água deionizada, para retirada do cobre (Cosio *et al.*, 2001).

Posteriormente, o material foi seco em estufa 60°C por 5 dias para determinação do peso seco. A partir desses valores biomassa de raiz e parte aérea foram construídas curvas de dose-resposta, que foram feitas com o auxílio do programa SigmaPlot 2000 v. 6.0. Utilizou-se o programa para traçar curvas de regressão tipo hipérbole (tipo “hyperbolic decay”) para traçar as equações de regressão das curvas. E assim, com uso das equações de regressão geradas, foi calculado o EC₁₀ e o EC₅₀ que correspondem à concentração de cobre contido na solução que vai causar 10 e 50% da da resposta, no caso a perda da biomassa, respectivamente.

2.7. Quantificação do metal

Foram selecionadas, ao acaso, três plantas por tratamento e procedeu-se a moagem manual da planta seca com almofariz e pistilo de porcelana. A parte aérea e raízes foram moídas separadamente até que o material fosse completamente pulverizado. Posteriormente, o pó foi acondicionado em recipientes de plástico com capacidade de 30mL e encaminhado para análise no Centro de Ecologia/UFRGS. O material vegetal pulverizado foi pesado e colocado em frascos de *teflon*, a quantidade de amostra utilizada variou de 0,1g até 0,5 g. Nos frascos foi adicionado 2mL de água tridestilada e 5mL de ácido nítrico PA 65%. A mistura foi deixada por aproximadamente 12 horas em bancada para digestão prévia. No dia seguinte as amostras foram digeridas em um sistema de digestão em microondas (modelo MDS 2000, CEM, Mattheus, USA) e o tempo de digestão foi de aproximadamente 30 minutos. Após a digestão, as amostras foram filtradas e avolumados para 50mL com água tridestilada. As concentrações de metais pesados nos extratos foram analisadas usando um espectrofotômetro de absorção atômica com chama de acetileno (modelo 3300, Perkin-Elmer). Posteriormente, as concentrações de metais foram calculadas para cada amostra de material vegetal. O fator de bioacumulação (FBA) foi calculado para todas as concentrações de cobre utilizadas (Zayed *et al.*, 1998):

$$(11) \quad \text{FBA} = \frac{[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tec}}}{[\text{Cu}^{2+}]_{\text{sol}}}$$

Onde $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tec}}$ é a concentração de cobre na parte aérea e $[\text{Cu}^{2+}]_{\text{tec}}$ (mg/kg) é a concentração de cobre na solução nutritiva (mg/L). Com as concentrações de cobre presentes na parte aérea e a correspondente na raiz foi calculado o índice de transporte (IT):

$$(12) \quad IT = \frac{[Cu^{2+}]_{PA}}{[Cu^{2+}]_{Total}} \times 100$$

Onde $[Cu^{2+}]_{PA}$ é a concentração total de cobre na parte aérea da planta, e $[Cu^{2+}]_{Total}$ (mg/kg) é a concentração total de cobre na planta inteira. O total de acumulação (TAC) do metal na planta foi calculado segundo a equação (Ali *et al.*, 2002):

$$(13) \quad TAC = \frac{[Cu^{2+}]_{PA} \times PS_{PA} + [Cu^{2+}]_R \times PS_R}{100 \times (PS_{PA} + PS_R)}$$

Em que $[Cu^{2+}]_{PA}$ e $[Cu^{2+}]_R$ são a concentração de cobre acumulada na parte aérea e raiz respectivamente, PS_R e PS_{PA} são a biomassa de raiz e parte aérea e 100 é referente ao número de dias do experimento.

2.8. Análises estatísticas

Realizou-se análise de variância simples (ANOVA) para comparação dos tratamentos. Posteriormente foi realizado o teste de Tukey para comparação das médias ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Sintomas visíveis de dano

3.1.1. Folhas

Aos trinta dias, iniciaram-se alguns sintomas de dano pelo cobre nas folhas, especialmente, pela presença de clorose no limbo foliar (em *S. lentiscifolius*), cloroses internervais (*S. terebinthifolius*) e necroses (*S. terebinthifolius*). Estes sintomas foram novamente verificados após 60 e 100 dias de exposição ao cobre (Fig 11 e 12) se tornando mais visíveis com o tempo, em que, por exemplo, as folhas de *S. lentiscifolius* intensificaram a coloração vermelha após 60 dias de exposição ao cobre (Fig 11).

Na mesma planta, as folhas responderam diferentemente ao cobre, em função da idade da folha quando o cobre foi aplicado. Folhas já formadas apresentaram menor despigmentação do que folhas jovens. Os sintomas de toxidez foram melhor visualizados nas folhas que cresceram após a aplicação de cobre e também ocorreu uma grande variação nas colorações e sintomas das folhas, em relação a idade e entre plantas do mesmo tratamento (Fig 13 e 14). Nos tratamentos 64 e 128 μ M a expansão das folhas foi mais lenta; por consequência, alguns sintomas na coloração comumente vistos em plantas submetidas a 16 e 32 μ M demoraram mais para aparecer ou não apareceram, porque os sintomas eram vistos em folhas mais novas. Mesmo dentro da mesma espécie e do mesmo tratamento as plantas responderam diferentemente à aplicação de cobre, ocorrendo grande variação dos sintomas nas folhas.

3.1.2. Raízes

As raízes de ambas as espécies apresentaram coloração amarronzada e maior fragilidade e redução no volume nos tratamentos com cobre. Além disso, apresentaram “nódulos” ao longo das raízes em *S. lentiscifolius* e engrossamento da raiz principal, e rachaduras nas raízes em *S. terebinthifolius* (Fig. 15).

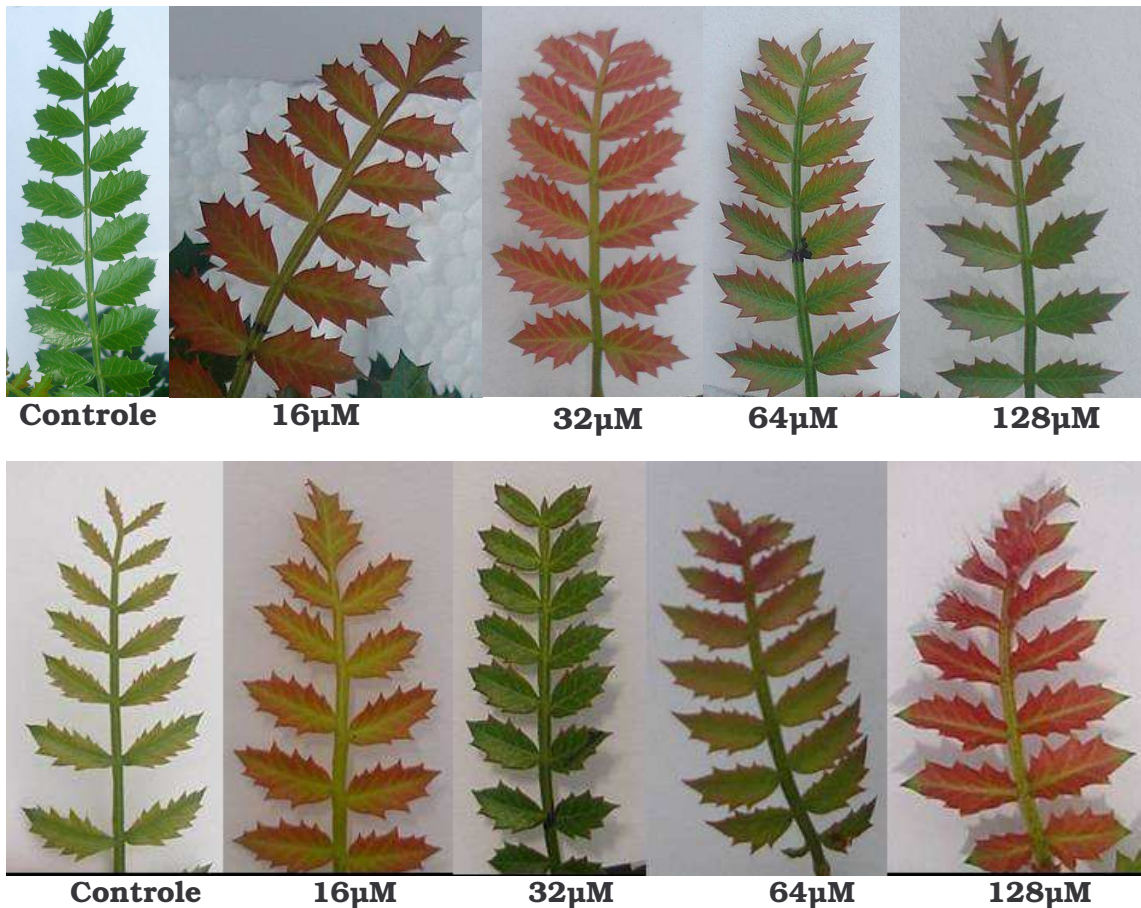


Figura 11 *Schinus lentiscifolius* mostrando os sintomas de exposição ao cobre: (acima) após 60 dias - visão geral de algumas folhas sintomáticas - e (abaixo) 100 dias - corresponde a folha mais jovem e completamente expandida de uma planta de cada tratamento.

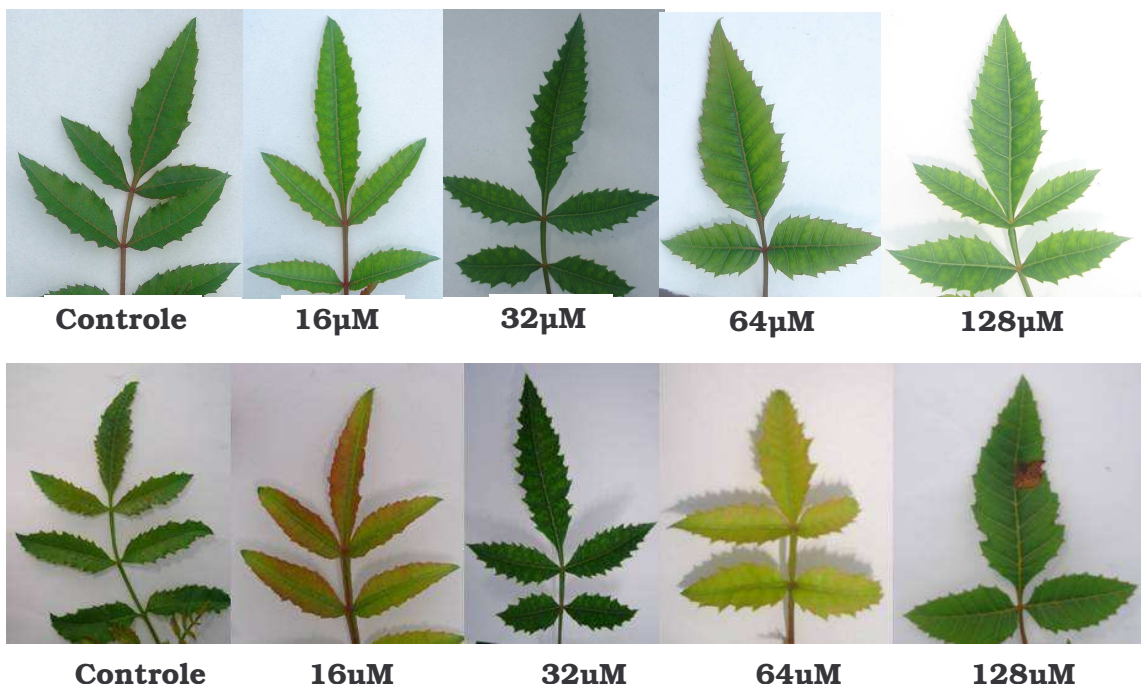


Figura 12. *Schinus terebinthifolius* mostrando os sintomas de exposição ao cobre: (acima) após 60 dias - visão geral de algumas folhas sintomáticas - e (abaixo) 100 dias - corresponde a folha mais jovem e completamente expandida de uma planta de cada tratamento.

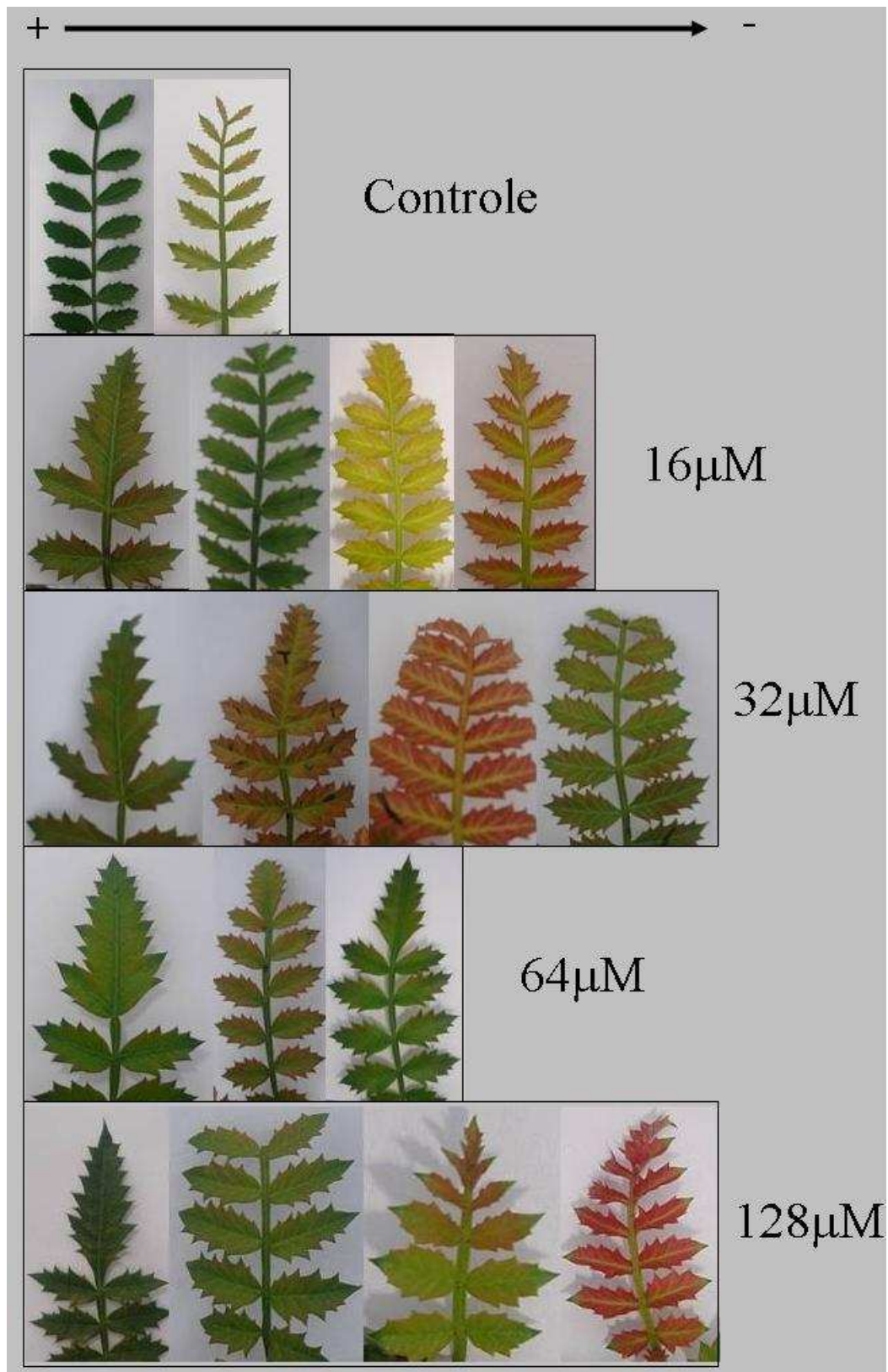


Figura 13. Respostas de *S. lentiscifolius* a diferentes doses de cobre, sintomas foliares apresentados em cada tratamento. As folhas correspondem aos padrões de coloração apresentados além do controle nos seguintes tratamentos: controle, 16 μ M, 32 μ M, 64 μ M e 128 μ M. Seta superior indica, da esquerda para direita, a folha mais velha sentido mais jovem, respectivamente.

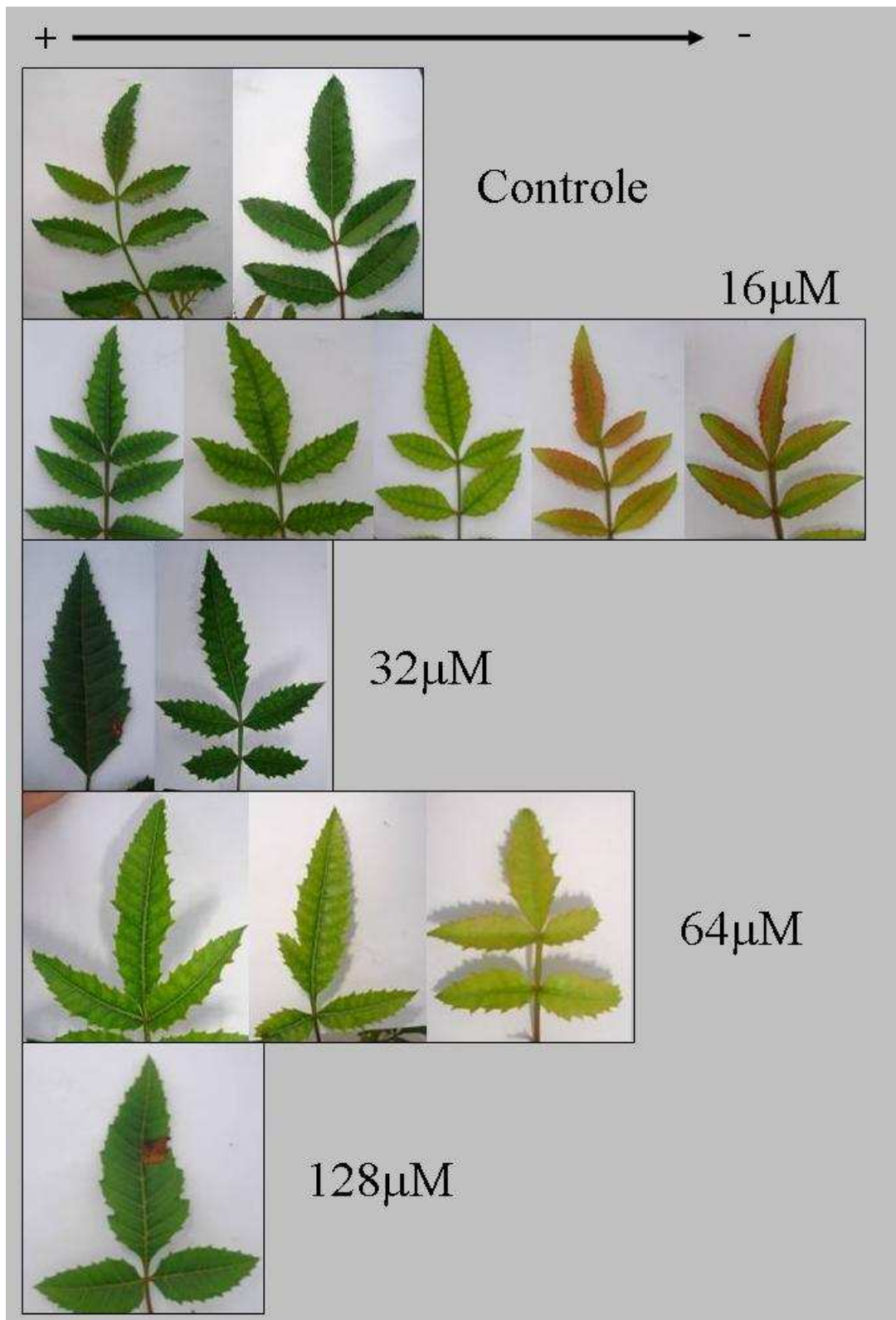


Figura 14. Respostas de *S. terebinthifolius* a diferentes doses de cobre, sintomas foliares apresentados em cada tratamento. As folhas correspondem aos padrões de coloração apresentados além do controle nos seguintes tratamentos: controle, 16 μM , 32 μM , 64 μM e 128 μM . Seta superior indica, da esquerda para direita, a folha mais velha sentido mais jovem, respectivamente.

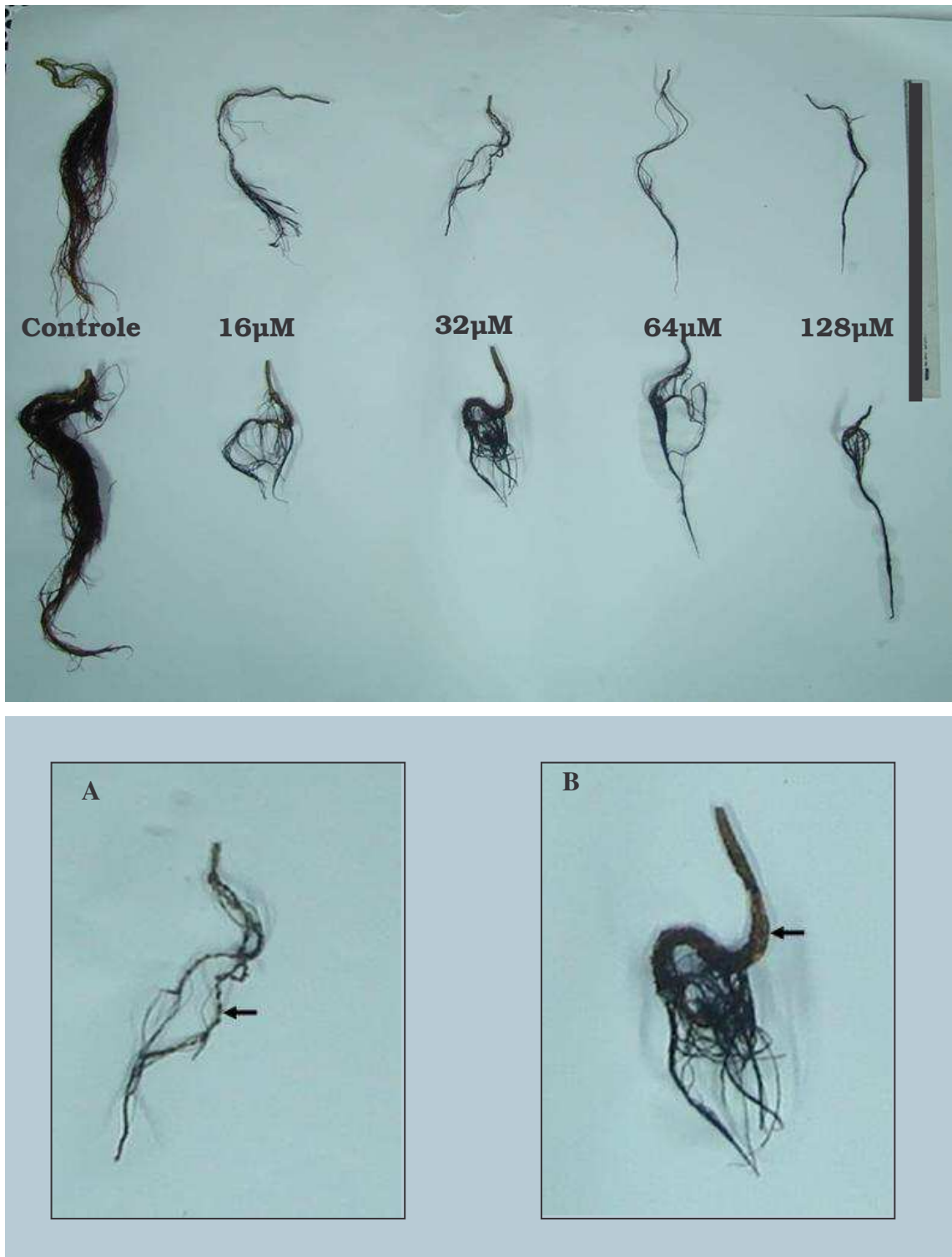


Figura 15. (Foto Acima) Raízes de *Schinus lentiscifolius* (Acima) e *S. terebinthifolius* (Abaixo) após 100 dias de exposição aos tratamentos com cobre. (Fotos Abaixo) Detalhe de plantas submetidas a 32µM de cobre (A) *S. lentiscifolius*, seta indica a presença de nódulos nesta porção da raiz. (B) *S. terebinthifolius*, seta indica rachaduras ao longo do eixo radicular. — (30cm).

3.2. Crescimento em altura e biomassa

A elevação das doses de cobre na solução nutritiva exerceu efeitos significativos no crescimento em altura e na biomassa final das duas espécies estudadas (Figura 16). Os efeitos do cobre sobre o crescimento das duas espécies de *Schinus* puderam ser observados a partir dos 30 dias de aplicação do cobre nas plantas, em que, para ambas as espécies, se observa redução no crescimento das plantas tratadas com cobre. Ao fim de 100 dias, foi possível observar que, nas duas espécies de *Schinus*, todas as plantas tratadas com cobre sofreram redução em suas taxas de crescimento relativo. A biomassa de raiz e parte aérea teve resposta semelhante aos demais parâmetros de crescimento já apresentados (Tabela 7), ocorrendo diminuição da biomassa de raiz e parte aérea com a adição de cobre.

As doses críticas de toxidez estimadas a partir das equações de regressão ajustadas na biomassa (Figura 17 e 18) indicam que, para ambas as espécies, as concentrações de cobre que inibem 10 e 50% da biomassa (EC_{10} e EC_{50}) foram maiores para as raízes (Fig. 17) do que para a parte aérea das plantas (Fig. 18). A espécie *S. lentiscifolius* apresentou EC_{10} e EC_{50} de maiores do que para *Schinus terebinthifolius* (Tabela 8).

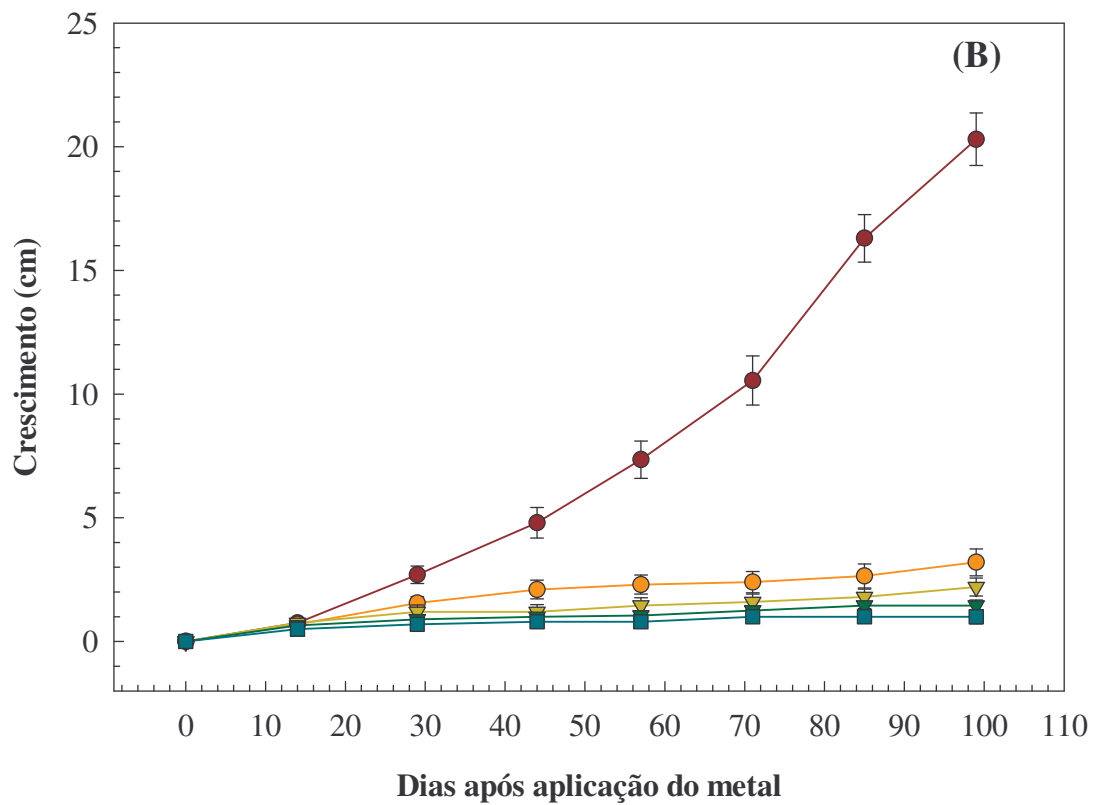
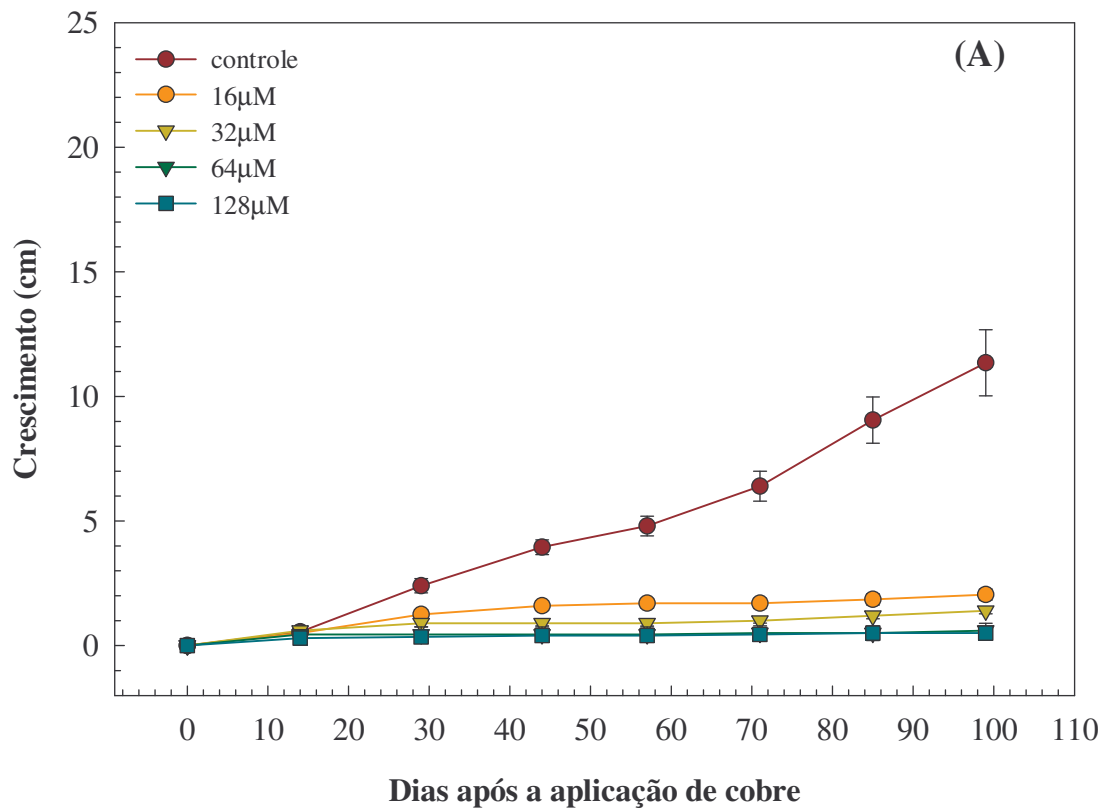


Figura 16. Crescimento médio da parte aérea de (A) *Schinus lentiscifolius* e de (B) *S. terebinthifolius* submetidas a diferentes concentrações de cobre, durante 100 dias de experimento. (n=10).

Tabela 7. Parâmetros de crescimento das plantas de *Schinus* tratadas com diferentes concentrações de cobre. Média \pm Erro Padrão das amostras. Letras diferentes, resultados estatisticamente significativos entre os tratamentos da mesma espécie. (n= 10) e (p<0,05).

	Concentrações de cobre									
	<i>Schinus lentiscifolius</i>					<i>Schinus terebinthifolius</i>				
	Cont	16 μ M	32 μ M	64 μ M	128 μ M	Cont	16 μ M	32 μ M	64 μ M	128 μ M
TCR	0,0145 \pm 0,0005 ^a	0,0046 \pm 0,0006 ^b	0,0026 \pm 0,0002 ^b	0,0021 \pm 0,0008 ^b	0,0016 \pm 0,0003 ^b	0,0148 \pm 0,0013 ^a	0,0039 \pm 0,0005 ^b	0,0023 \pm 0,0003 ^b	0,0022 \pm 0,0003 ^b	0,0020 \pm 0,0003 ^b
Biomassa Raiz	0,588 \pm 0,066 ^a	0,421 \pm 0,042 ^{ab}	0,309 \pm 0,047 ^b	0,129 \pm 0,012 ^b	0,097 \pm 0,011 ^b	1,670 \pm 0,179 ^a	0,888 \pm 0,178 ^b	0,640 \pm 0,136 ^{bc}	0,396 \pm 0,074 ^c	0,273 \pm 0,043 ^c
Biomassa Parte aérea	2,504 \pm 0,429 ^a	0,544 \pm 0,058 ^b	0,604 \pm 0,055 ^b	0,485 \pm 0,052 ^b	0,296 \pm 0,024 ^b	9,686 \pm 1,840 ^a	1,826 \pm 0,503 ^b	1,346 \pm 0,306 ^b	0,921 \pm 0,176 ^b	0,895 \pm 0,142 ^b

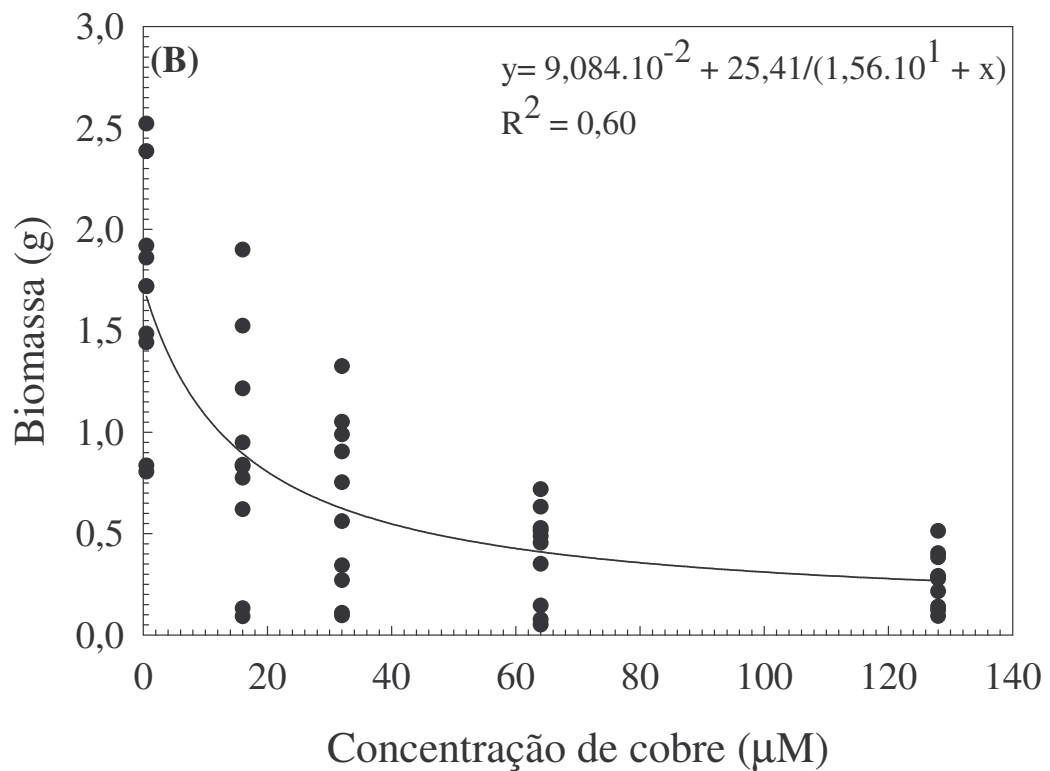
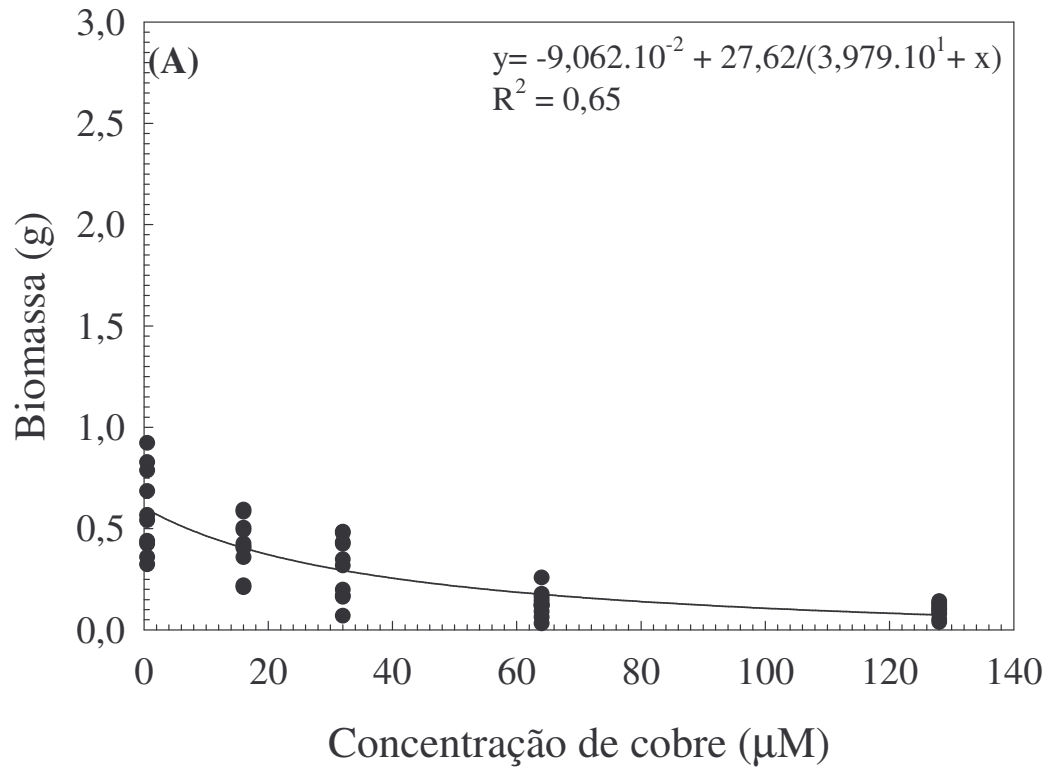


Figura 17. Curva de dose-resposta (regressão não-linear), a resposta corresponde aos valores de biomassa de raiz para cada tratamento de cobre. Raízes (A) *S. lentiscifolius* (B) *S. terebinthifolius*. Pontos correspondentes a todos os valores de biomassa de cada tratamento (n=10). $P < 0,0001$.

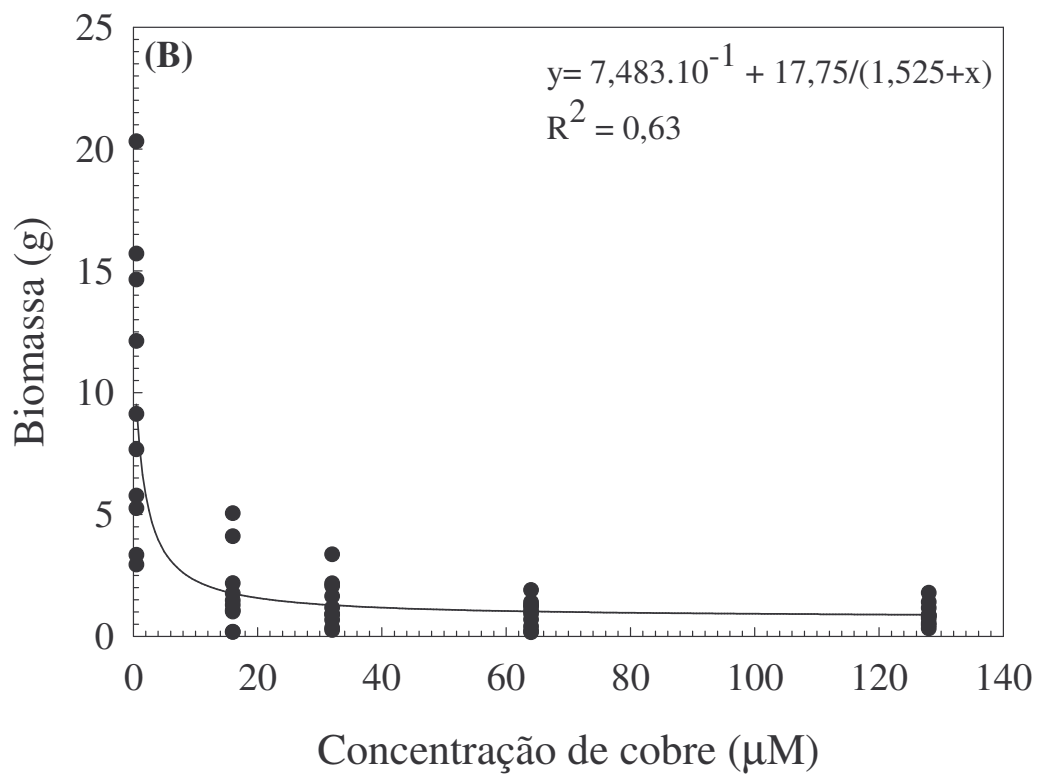
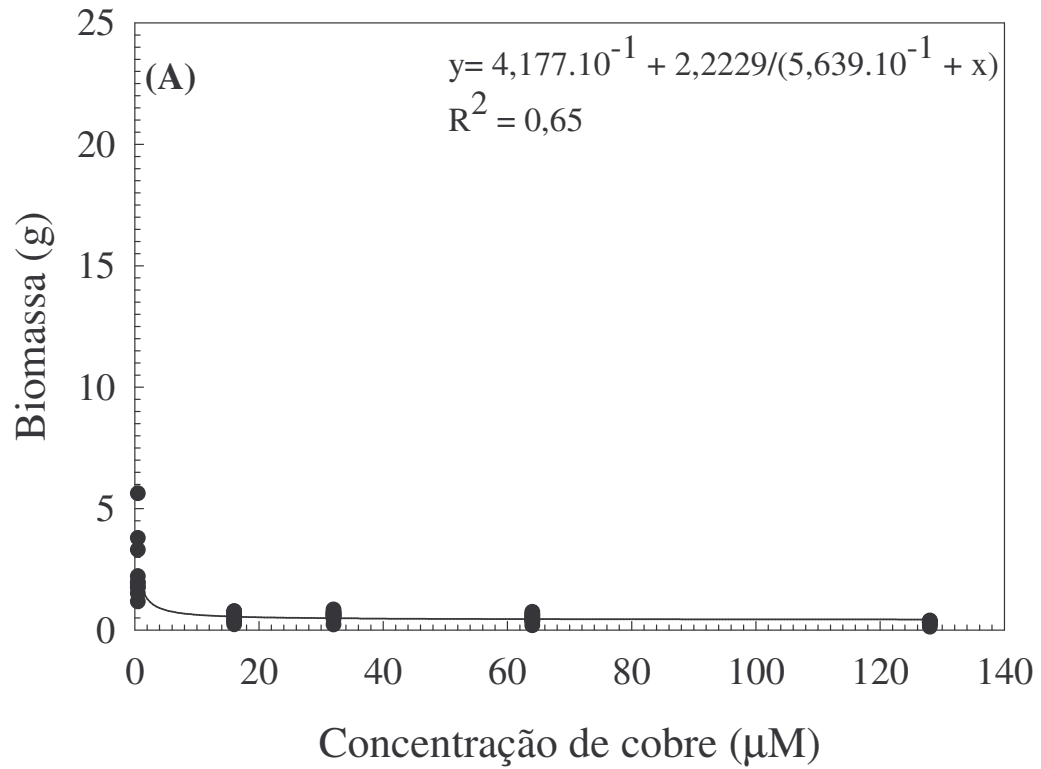


Figura 18. Curva de dose-resposta (regressão não-linear), a resposta corresponde aos valores de biomassa de parte aérea para cada tratamento de cobre. Parte aérea: (A) *S. lentiscifolius* (B) *S. terebinthifolius*. Pontos correspondentes a todos os valores de biomassa de cada tratamento (n=10). $P < 0,0001$.

Tabela 8. Doses críticas de toxidez do cobre nas plantas de *S. lentiscifolius* e *S. terebinthifolius* expostas ao cobre. As doses foram calculadas com o auxílio da equação ajustada ($P < 0,0001$) às curvas de dose-resposta. EC₁₀ - Concentração que resulta em 10% da perda de resposta e EC₅₀ - Concentração que resulta em 50% de perda da resposta. Kabata-Pendias (2001). (n=10).

	<i>S. lentiscifolius</i>	<i>S. terebinthifolius</i>
EC₁₀ (μM)		
Raiz	4,33	2,50
Parte aérea	0,65	0,50
EC₅₀ (μM)		
Raiz	31,38	18,55
Parte aérea	2,09	2,90

3.3. Fotossíntese

3.3.1. Fluorescência da clorofila a

Os resultados dos parâmetros avaliados na curva de indução de fluorescência da clorofila a são mostrados na figura 19. Não ocorreram diferenças significativas em ambas as espécies nos valores de Fm, Fv'/Fm', NPQ e ETR (Fig 19B, D, G e H, respectivamente). Apenas em *S. terebinthifolius*, foi observado aumento significativo de Fo (Fig 19A) e diminuição de Fv/Fm (Fig. 19C) e PSΦ_{2R} (Fig. 19E) nos tratamentos com cobre. Em ambas as espécies de *Schinus* estudadas ocorreram reduções significativas no coeficiente de decaimento fotoquímico (qP) nos tratamentos com adição de cobre (Fig. 19F).

3.3.2. Taxas de fotossíntese

Em ambas as espécies de *Schinus*, o cobre interferiu diretamente nas taxas fotossintéticas avaliadas durante o experimento (Fig. 20). Após 10 dias, foi possível observar uma redução acentuada nas taxas fotossintéticas do tratamento 64 e 128μM (Fig. 20 A). Após 30, 40 e 65 dias de exposição ao cobre, não havia diferenças nas taxas de fotossíntese entre todos os tratamentos com o cobre (Fig. 20 B, C, D). No entanto, aos 100 dias de exposição ao cobre, foi possível observar uma redução acentuada em todos os tratamentos com cobre (Fig. 20 E).

3.3.3. Conteúdo de clorofilas

Em alguns tratamentos com cobre, ocorreram reduções significativas dos teores de clorofila a, b e ab (Fig. 21 a, b e c). Isto foi observado especialmente nos tratamentos de 32 e 16 μ M de cobre, os tratamentos de 64 e 128mM de cobre apresentaram maiores quantidades de clorofila a, b e a+b. Não ocorreram diferenças significativas na razão entre clorofila a e b (Fig. 21 D).

3.4. Concentração e acumulação de cobre

As concentrações de cobre nos tecidos, de ambas as espécies de *Schinus*, aumentaram significativamente com o aumento da concentração do metal em solução (Tabela 9). A maior parte do cobre absorvido pelas duas espécies de *Schinus* foi encontrada nas raízes.

O fator de bioconcentração de cobre, da parte aérea, não sofreu aumento linear com o aumento das concentrações de cobre na solução (Tabela 9). Em *Schinus lentiscifolius* ocorreu maiores valores de bioacumulação nas raízes para todos os tratamentos com cobre (Tabela 9). O maior valor de FBA encontrado (587,47) foi nas raízes de *S. lentiscifolius* no tratamento de 64 μ M de cobre. Ambas as espécies apresentaram restrição no transporte de cobre para a parte aérea, verificado pelo índice de transporte (IT) (Tabela 9). A espécie *S. lentiscifolius* apresentou maiores taxas de acúmulo (TAC) do cobre do que *S. terebinthifolius* (Tabela 9).

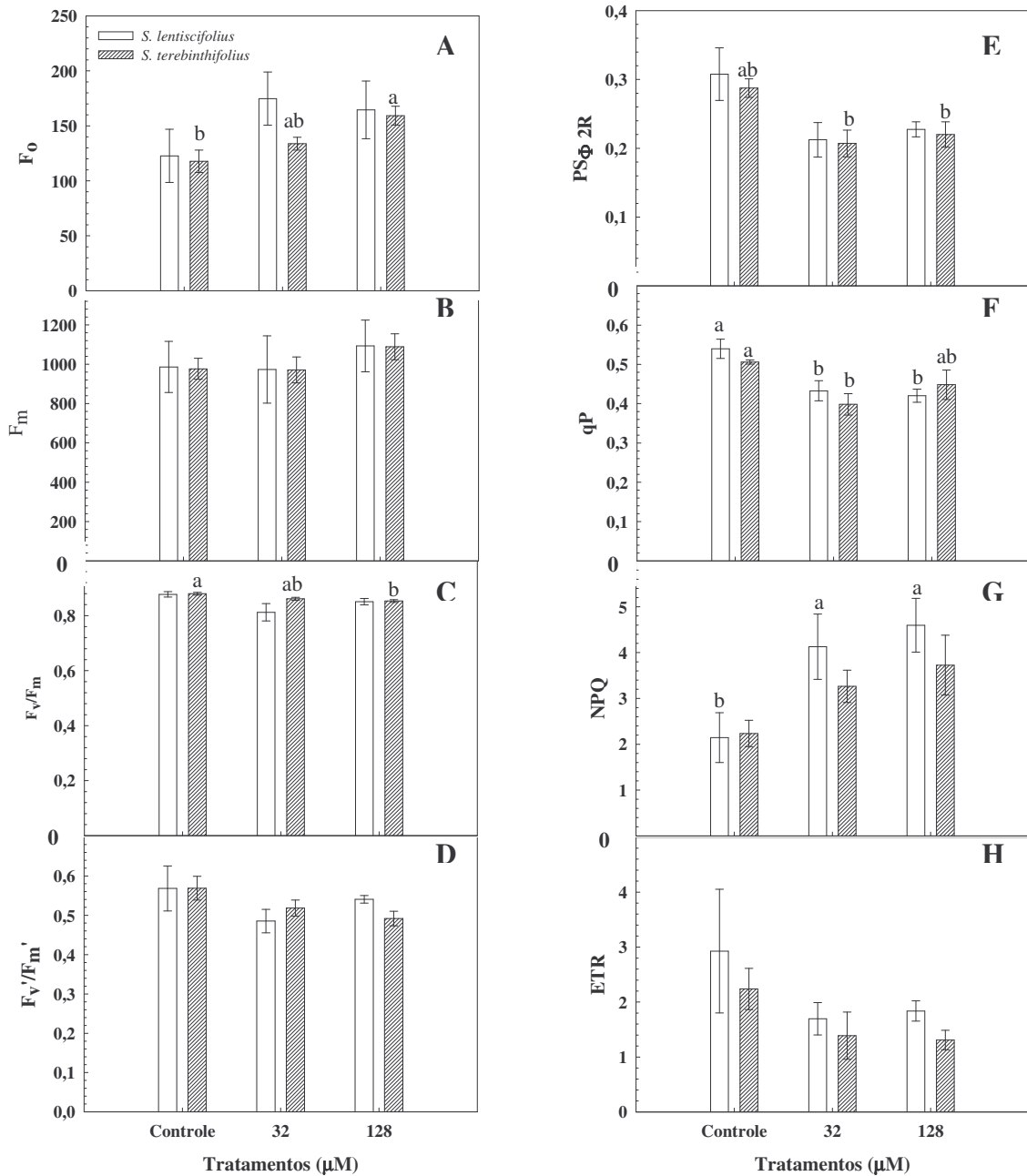


Figura 19. Respostas dos parâmetros de fluorescência da clorofila a de plantas de *Schinus lentiscifolius* e *S. terebinthifolius* submetidas a tratamentos com cobre após 30 dias de exposição ao metal. (A) F₀ – Fluorescência Basal; (B) F_m - Fluorescência máxima; (C) F_v/F_m – Eficiência quântica máxima do FSII; (D) F_v'/F_m' – Eficiência quântica efetiva do FSII. (E) Φ_{PSII} – Produtividade Quântica do FSII; (F) qP – Coeficiente de extinção fotoquímico; (G) NPQ – Coeficiente de extinção não- fotoquímico; (H) ETR – Taxa de transporte de elétrons. Letras diferentes correspondem a resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos da mesma espécie. n=5 plantas por tratamento. (p<0,05)

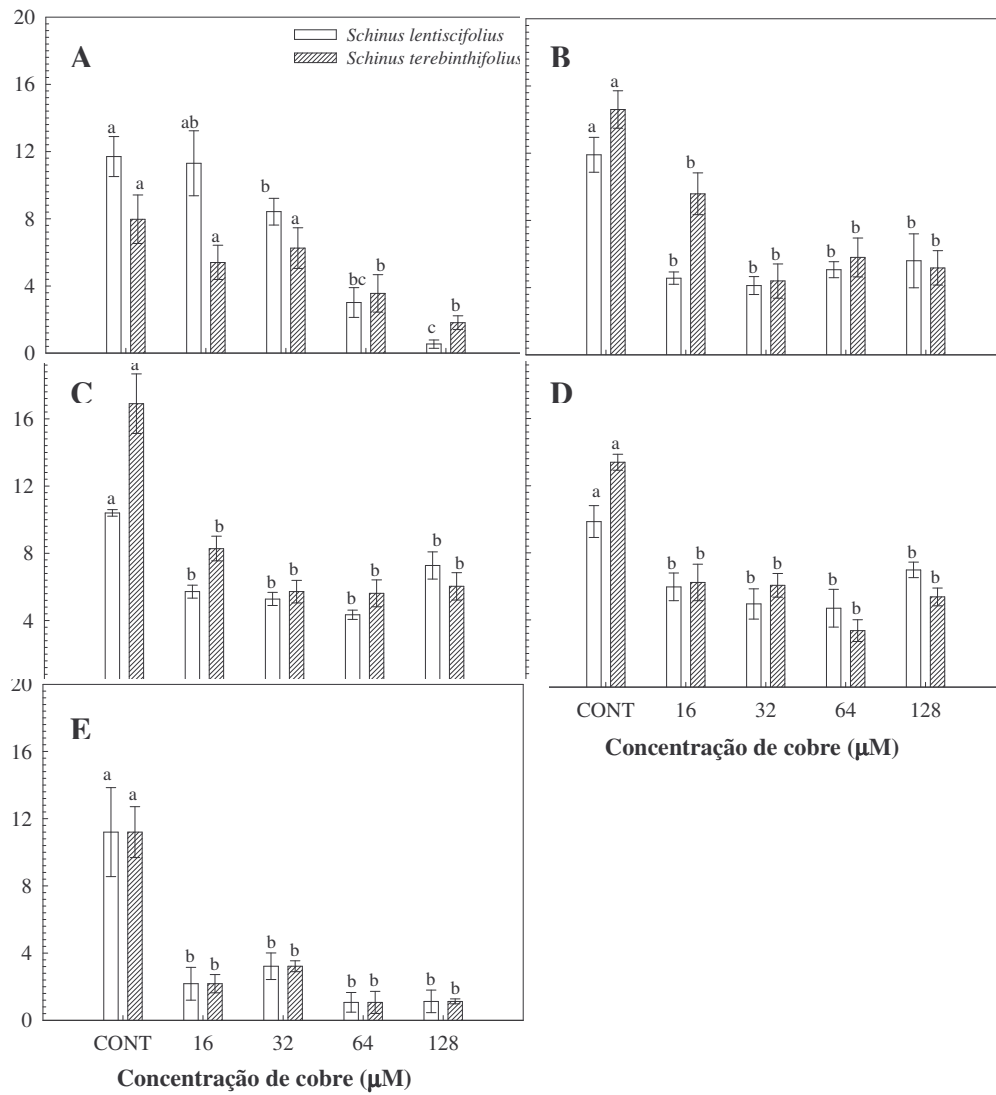


Figura 20. Taxas de fotossíntese líquida das plantas de *Schinus lentiscifolius* e *S. terebinthifolius* tratadas com cobre. Após (A) 10 dias, (B) 30 dias, (C) 40 dias, (D) 65 dias e (E) 100 dias de exposição. Letras diferentes correspondem a resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos da mesma espécie.

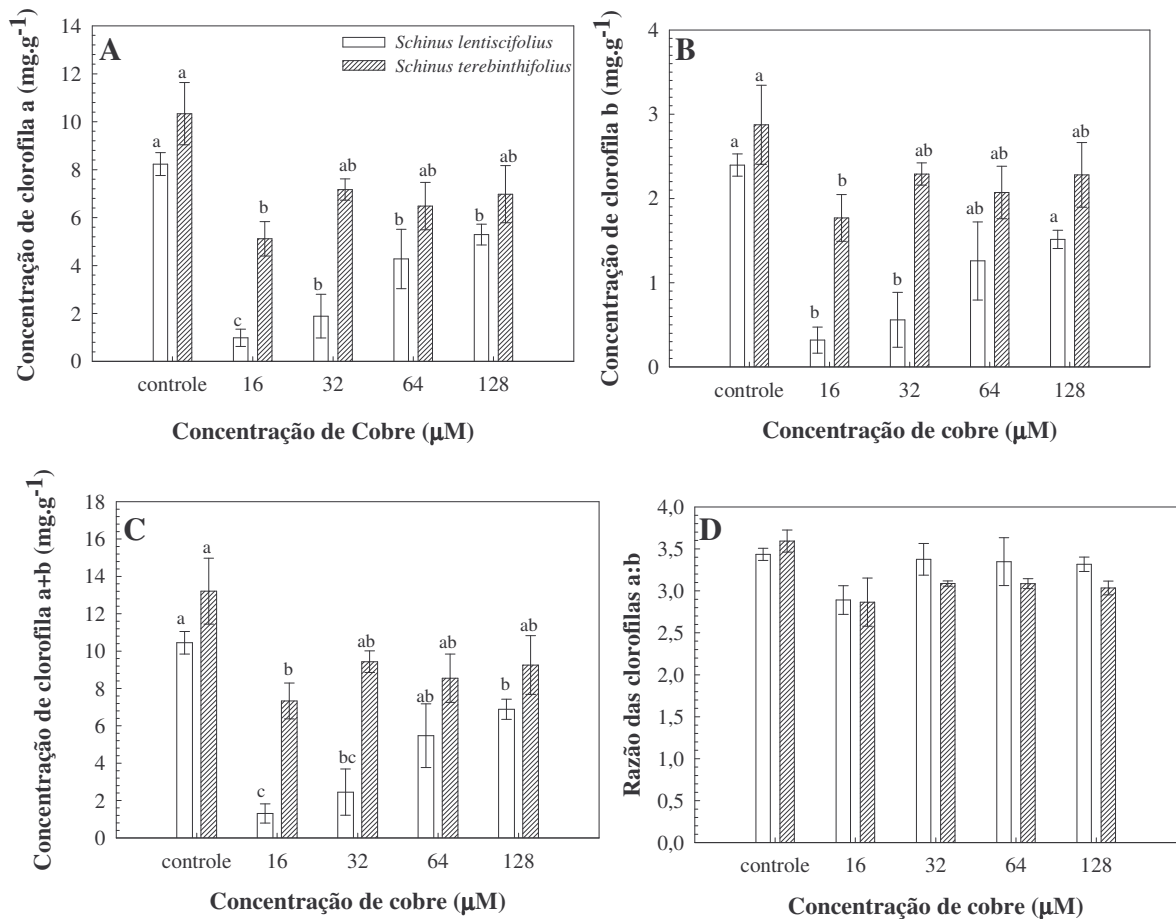


Figura 21. Concentração de clorofilas, após 100 dias de experimento, das plantas de *Schinus lentiscifolius* e *S. terebinthifolius* tratadas com cobre. (A) concentração de clorofila a; (B) concentração de clorofila b; (C) concentração de clorofila a+b e (D) Razão de clorofilas a:b. Letras diferentes correspondem a resultados estatisticamente diferentes entre os tratamentos da mesma espécie. n=5. ($p<0,05$)

Tabela 9. Concentrações de cobre das plantas de *Schinus lentiscifolius* e *S. terebinthifolius* tratadas com cobre após 100 dias de experimento. Média ± Erro Padrão das amostras. Letras iguais na linha resultados estatisticamente não significativos, letras diferentes resultados estatisticamente significativos. **Média de duas amostras. p<0,05 n= 3.

	Concentrações de cobre									
	<i>Schinus lentiscifolius</i>					<i>Schinus terebinthifolius</i>				
	Cont	16µM	32 µM	64 µM	128 µM	Cont	16µM	32 µM	64 µM	128 µM
[Cu] P.Aérea (µg.g ⁻¹ .PS)	2,86**± 0,22	8,17 ± 1,06 b	9,76 ± 1,77 b	31,60 ± 7,13 ^a	46,00 ± 5,67 ^a	8,45± 1,80 ^b	6,70 ± 1,13 ^b	18,60 ± 3,12 ^b	29,10 ± 5,53 b	52,60 ± 21,21 ^a
[Cu] Raiz (µg.g ⁻¹ .PS)	15,3 ± 1,94 b	413,00 ± 140,99 ^b	882,00 ± 92,83 ^{ba}	2389,00 ± 226,05 ^a	4054,00 ± 543,23 ^a	15,9± 1,87 c	304,00 ± 4,91 ^c	550,00 ± 78,82 ^c	1004,00 ± 120,55 ^b	2553,00 ± 383,31 ^a
FBA/ Parte aérea		8,04 ^a	4,80 ^a	7,77 ^a	5,65 ^a		6,59 ^a	9,15 ^a	7,16 ^a	6,47 ^a
FBA/ Raiz		406,24 ^a	433,78 ^a	587,47 ^a	498,46 ^a		299,02 ^a	270,50 ^b	246,89 ^b	313,90 ^a
IT%	64,62 ± 21,10	3,15**± 0,80	3,71 ± 0,57	6,30 ± 1,61	6,44 ± 1,13	78,20 ± 8,29	7,27 ± 0,59	11,82 ± 0,28	8,91 ± 2,03	14,98 ± 5,06
TAC (µg.g ⁻¹ .PS. d ⁻¹)		2,06 ^b	2,62 ^{ab}	4,72 ^{ab}	8,99 ^a		1,00 ^b	1,49 ^{ab}	3,76 ^{ab}	5,58 ^a

4. DISCUSSÃO

As concentrações de cobre normalmente encontradas nos solos não poluídos costumam variar de 15µg/g, em solos arenosos, até 25µg/g, em solos argilosos, onde a disponibilidade do metal diminui em função das cargas negativas existentes na argila (Greger, 2004). Na área da mina onde foram coletadas as sementes, as concentrações de cobre variavam de 1- >45µg/g em amostras de solo coletadas no interior da mina (Zocche, 2002), chegando a valores altamente tóxicos, de 889-2049µm/g, em locais próximos ou diretamente sobre filões de cobre (Porto, 1981). Diversas espécies que vivem em locais com cobre são conhecidas por apresentar elevada tolerância ao cobre ou a outros metais. Um exemplo é a hiperacumuladora *Haumaniastrum katangense* que chega a acumular 8356ppm de cobre em suas folhas amostradas do campo (Paton & Brooks, 1995). No entanto, os resultados deste experimento mostram que ambas as espécies de *Schinus* apresentaram sinais de toxidez a cobre, mesmo nas mais baixas concentrações a que foram expostas. Portanto, há fortes evidências de que a sobrevivência e abundância de *S. lentiscifolius* na mina abandonada de cobre deve ser consequência de outros fatores que não a presença de mecanismos internos de tolerância ao cobre.

Os sintomas visuais de toxidez ao cobre, em *Schinus*, puderam ser observados em todos os tratamentos a partir dos 30 dias de exposição. Neste período, já havia significativa diminuição do crescimento em altura, a presença de cloroses internervais e avermelhamento das folhas nas plantas tratadas com cobre. Estes sintomas se intensificaram com o tempo de experimento. Experimentos de longa duração podem resultar em respostas de aclimatação ou, então, na acumulação de efeitos tóxicos nas plantas (Kohl & Lösh, 2004). Tanto em *Schinus lentiscifolius* como em *S. lentiscifolius* observou-se que as cloroses manifestaram-se especialmente nas folhas que expandiram após os tratamentos com cobre. A clorose resultante do estresse por cobre costuma ocorrer em folhas jovens ou em expansão e acontece como resultado da diminuição do acúmulo de pigmentos, pois o acúmulo de pigmentos é dependente da idade que a folha no momento em que o cobre é aplicado (Maksymiec, 1997, Myśliwa-Kurdziel *et al.*, 2002). Outra possibilidade reside nos efeitos deletérios do cobre na biossíntese de clorofilas e demais pigmentos foliares (Joshi & Mohanty, 2004), pois durante o crescimento e expansão do limbo existe maior atividade da síntese de clorofilas (Myśliwa-Kurdziel & Strzalka, 2002). Logo, em folhas antigas, estes efeitos ocorrem em menor intensidade.

Entre os efeitos deletérios que resultam em cloroses estão a peroxidação de lipídeos pela destruição de membranas (Marschner, 1995), e a deficiência de ferro nas folhas (van Assch & Clijsters, 1985; Pätsikkä *et al.*, 2002). Em *Pisum sativum*, Pätsikkä *et al.* (2002) verificaram que, quando as plantas eram crescidas em solução com cobre e em excesso de ferro, os efeitos de toxidez ao cobre diminuíram, porque ambos os metais teriam rotas similares de absorção nas folhas. Embora em *Schinus* não tenham sido feitas análises dos nutrientes foliares individuais, as folhas também apresentavam coloração característica da deficiência de ferro, uma vez que o ferro está intimamente relacionado com a síntese de clorofilas. Além disso, se observou que, no mesmo tratamento, as plantas responderam diferentemente ao estresse por cobre. Isto, provavelmente foi resultado dos diferentes genótipos existentes na amostra, já que a acumulação de clorofila nas folhas depende também da tolerância individual da planta em superar a toxicidade do cobre (Myśliwa-Kurdziel *et al.*, 2002). Desta forma, o estresse por cobre demonstrou ter pouca influência na pigmentação de folhas antigas de *S. lentiscifolius* e *S. terebinthifolius*, mas influenciou a pigmentação de folhas jovens, possivelmente, como resultado da inibição de alguma via de síntese de clorofilas ou de algum outro efeito deletério do cobre nas células.

A inibição de crescimento aéreo, frequentemente observada no estresse por cobre, pode vir acompanhada por mudanças na morfologia de raiz (Maksymiec, 1997). Neste experimento, estas mudanças foram observadas, nas duas espécies de *Schinus*. Em *Schinus lentiscifolius* as raízes tinham coloração amarronzada, maior fragilidade e a presença de “nódulos” ao longo da raiz principal e, em *S. terebinthifolius*, a presença de rachaduras no eixo radicular. Sintomas semelhantes foram observados por Soares *et al.* (2000) em *Eucalyptus urophylla* e *E. maculata*, quando cultivadas em concentrações de 64 e 32 μM de cobre, respectivamente.

Alguns autores têm proposto que as rachaduras observadas nos tecidos externos se devem a diferenças na taxa de alongamento das células internas e externas da raiz (Wagatsuma *et al.*, 1987). Ou ainda, as rachaduras poderiam estar fortemente associadas com a deterioração da epiderme, uma vez que a epiderme constitui uma barreira do contato direto dos tecidos internos com o metal (Panou-Filotheou & Bosabalidis, 2004). A formação de nódulos na raiz já foi observada anteriormente em orégano (*Origanum vulgare*) e, a ela se atribuiu a restrição do alongamento celular associado à toxicidade ao cobre (Panou-Filotheou & Bosabalidis, 2004; Kopittke & Menzies, 2006).

Outros sintomas, como a coloração amarronzada das raízes, costumam se relacionar às deficiências nutricionais, em especial, a deficiência de cálcio (Baccouch *et al.*, 1998). Um

rompimento da epiderme prejudica a absorção de nutrientes pelas plantas, bem como a retenção e absorção de água pelas raízes, causando mudanças da coloração que são características desse fenômeno. Logo, os resultados deste experimento mostram que as raízes das duas espécies de *Schinus* foram afetadas pelo estresse por cobre, até na mais baixa concentração a que as plantas foram expostas.

A diminuição do alongamento do caule e da biomassa de raiz e parte aérea foi observada com o aumento das doses de cobre aplicadas nas duas espécies de *Schinus*, sendo que o alongamento do caule mostrou efeitos significativos a partir dos 30 dias após a aplicação do metal. A redução do crescimento em altura é um sintoma característico da inibição por cobre, podendo ser resultado de efeitos secundários da toxicidade do metal. Por exemplo, Kopittke & Menzies (2006) observaram que a redução do crescimento aéreo de feijão-fradinho (*Vigna unguiculata*) não deveria ser resultado dos efeitos diretos da toxicidade ao cobre na parte aérea, e sim dos efeitos das deficiências nutricionais causadas por danos físicos nas raízes da planta. A biomassa e o crescimento vegetal são dependentes do alongamento e da divisão celular. Acredita-se que o cobre teria influência direta sobre a biossíntese e o transporte de hormônios relacionados ao crescimento, como a auxinas e giberelinas, responsáveis pelo alongamento e a citocinina, responsável pela divisão celular (Panou-Filotheou & Bosabalidis, 2004). Na divisão celular, o cobre teria uma interferência direta na formação do fuso acromático e outras fases da mitose (Panou-Filotheou & Bosabalidis, 2004). Desta forma, nas duas espécies de *Schinus* os parâmetros de crescimento observados foram fortemente afetados pelo acréscimo de cobre.

Os valores críticos de toxidez, de ambas as espécies de *Schinus* tratadas com cobre, foram baixos e indicaram que a parte aérea das plantas foi mais sensível ao cobre do que a raiz. Os valores críticos de toxidez representados pela inibição de 10 e 50% da resposta (EC_{10} e EC_{50}) são parâmetros frequentemente utilizados para descrever a tolerância de uma população em curvas de dose-resposta. Embora este resultado possa variar em função das plantas apresentarem diferentes genótipos (Kohl & Lösh, 2004), eles são importantes para descrever o comportamento das espécies perante o estresse com metal. Em *Eucalyptus maculata* estimou-se que a redução de 50% na biomassa de parte aérea e raiz ocorreriam em 21,8 e 27,6 μM de cobre, respectivamente, e em *E. urophylla* estes valores seriam de 38,5 e 45,8 μM (Soares, 1999). Neste experimento, observou-se que *S. lentiscifolius* apresentou maior tolerância ao cobre do que *S. terebinthifolius*. No entanto, considerando os valores de EC_{10} de ambas as espécies de *Schinus* como um dos indicativos da existência ou não de tolerância, é possível que nenhuma das espécies seja tolerante, uma vez que *S. lentiscifolius*

apresentou EC_{10} de 4,33 e *S. terebinthifolius* de 2,50. Um teste padrão de tolerância usa a concentração de $7,85\mu\text{M}$ ($\approx 0,5\text{ppm}$ de cobre) para discernir plantas tolerantes de não-tolerantes (Bradshaw & MacNeilly, 1981 *apud* Ali *et al.*, 2002). Logo, os resultados deste experimento indicam que provavelmente nenhuma das espécies é tolerante ao cobre e que *S. lentiscifolius* é menos sensível ao cobre do que *S. terebinthifolius*.

O cobre é conhecido por ter elevado impacto no conteúdo de clorofila, como foi verificado nos experimentos aqui realizados, em que todos os tratamentos com cobre tiveram redução nos níveis de clorofila a, b e a+b. Diminuições nos pigmentos sugerem que a síntese de clorofila e atividade de clorofilase foram afetadas nas exposições com metal (Clijsters & Van Assche, 1985). Interferência em outras enzimas da rota de biossíntese de clorofilas também podem ocorrer, em especial, a ALA sintase, em que o cobre parece interagir diretamente com os grupos sulfidril da enzima (Mysliwa-Kurziel *et al.*, 2004). Modificações na composição de lipídios e estrutura da membrana interna do tilacóide (Maksymiec, 1997), substituição do magnésio da clorofila pelo cobre (Küpper *e. al.*, 1996) e a deficiência de ferro ocasionada pela competição destes metais no transporte da planta (Pätsikkä *et al.*, 2002) também são danos possíveis que contribuem para a diminuição da clorofila.

Na fotossíntese, sabe-se que o aparato fotossintético exhibe sintomas característicos que incluem o aumento da fluorescência da clorofila a, uma forte diminuição na fluorescência variável e aumento do coeficiente de extinção não-fotoquímico (Lichtenthaler & Miehe, 1997). Todas as plantas de *Schinus* mantiveram sua eficiência quântica efetiva acima de 0,80; que é considerado um valor normal para plantas saudáveis (Havaux, 1992). A eficiência quântica efetiva é um indicador das alterações estruturais do FSII (Joshi & Mohanty, 2004). Em *S. lentiscifolius* não ocorreram reduções significativas neste parâmetro. Em plantas de girassol (*Helianthus annuus*) expostas ao cobre, que não apresentaram alterações no F_v/F_m , Ouzounidou & Ilias (2005) sugeriram isto ser resultado da diminuição do tamanho da antena do FSII nas plantas estressadas com cobre. Em contrapartida, em *Schinus terebinthifolius*, ocorreu redução significativa deste parâmetro nas plantas tratadas com cobre. Segundo Küpper (2001), o cobre poderia induzir uma gradual diminuição do F_v/F_m e do F_v , indicando a inibição do processo fotoquímico primário em reações de luz, que seriam causadas pela inserção do cobre na molécula de feofitina do centro de reação do FSII.

O valor de F_o representa a emissão de fluorescência por moléculas da antena da clorofila a antes de acontecer reações fotoquímicas (Krause & Weiss, 1991). Em *S. terebinthifolius*, ocorreu aumento significativo dos valores de F_o nas plantas tratadas com cobre. Segundo Ouzounidou & Ilias (2005), poderia ser uma consequência da dissociação

física do complexo LHC II do FSII; isto, obviamente, interfere na transferência de energia até o centro de reação. O aumento dos valores de F_o poderia ainda se relacionar a inibição do acceptor primário do FSII, Q_A , que pode sofrer danos devido à afinidade do cobre aos resíduos de histidina (Maksymiec, 1997).

Em *S. lentiscifolius* foi verificada diminuição significativa de qP e aumento significativo de NPQ os quais poderiam ser resultados da inibição do recebimento de elétrons pelo centro de reação do fotossistema (Maksymiec *et al.*, 2007) e danos no aparato fotoquímico (Maksymiec, 1997). Além disso, o aumento do NPQ associado a diminuição dos conteúdos de clorofila poderia ser um indicativo da fotoinibição. A fotoinibição é um processo não-fotoquímico de dissipação de energia sob estresse luminoso, o qual usa o ciclo das xantofilas para sua execução. E assim, acredita-se que o estresse por cobre teria, nas membranas do cloroplasto, efeitos similares ao da fotoinibição (Pätsikkä *et al.*, 2002; Küpper, 2001) que seriam intensificados pela diminuição da clorofila, podendo ser o ciclo das xantofilas uma via alternativa de dissipação de energia não-fotoquímica (Pätsikkä *et al.*, 2002).

A queda nas taxas de fotossíntese de *Schinus* nos tratamentos com cobre poderia ser resultado de uma possível inibição das enzimas do Ciclo de Calvin. Vários trabalhos indicam a redução da fotossíntese por inibição no metabolismo de carbono (Clisters & Van Assche, 1985; Yruela, 2005). O cobre tem influência negativa sobre a rubisco através da ligação do metal sobre as pontes SH da enzima (Joshi & Mohanty, 2004). A diminuição das taxas de fotossíntese é frequentemente relacionada à substituição do Mg^{2+} da clorofila pelo cobre (Küpper, 1996) Desta forma, a curto prazo é possível que os efeitos observados sejam resultado da inibição do cobre nas enzimas do ciclo de Calvin das duas espécies de *Schinus*. No entanto, a longo prazo, os efeitos podem ser resultados tanto da inibição do ciclo de Calvin, como dos efeitos do cobre nos processos fotoquímicos, resultando na redução da disponibilidade de ATP e NADPH para o Ciclo de Calvin.

Em ambas as espécies de *Schinus*, o aumento das doses de cobre na solução nutritiva influenciou as concentrações de cobre acumuladas na biomassa de parte aérea e de raiz. Tanto na raiz como na parte aérea, as maiores concentrações de cobre foram encontradas nos tratamentos de 128 μ M. De modo geral, *S. lentiscifolius* teve maior acúmulo de cobre nas raízes do que *S. terebinthifolius*, ocorrendo o inverso na parte aérea. Os valores de acumulação nas plantas variam muito. As espécies ditas hiperacumuladoras acumulam, mesmo quando o metal está em baixas concentrações no ambiente, quantidades acima de 1000 μ g/g de cobre na biomassa do material retirado do campo (Brooks, 1998). Em espécies não-hiperacumuladoras os valores de acumulação são bem variáveis, na arbórea *Populus x*

euramericana foram encontradas concentrações máximas acumuladas de cobre de 8ppm, na parte aérea, e 12000ppm, nas raízes, quando as plantas foram cultivadas em tratamentos com 1000 μ M de cobre após 34 dias de tratamento (Borghetti *et al.*, 2007). Os autores sugerem que esta espécie poderia ser utilizada para fitoestabilização quando as concentrações de cobre no solo não fossem elevadas porque em concentrações acima de 100 μ M de cobre a espécie reduziu em 50% sua biomassa. Em *Eucalyptus maculata* a acumulação de cobre na parte aérea em tratamentos de 192 μ M foi de 500 μ g/g e nas raízes estes valores chegaram a 5000ppm (Soares, 1999). No campo Zocche (2002) encontrou valores de cobre, nas folhas de *Schinus lentiscifolius*, variando de 4,88 a 44,6 μ g/g em amostras coletadas diretamente sobre os filões de cobre.

Nas espécies de *Schinus* aqui trabalhadas observou-se que a acumulação foi maior nas raízes de ambas as espécies, chegando, na concentração de 128 μ M de cobre, a 4054 μ g.g⁻¹, em *S. lentiscifolius*, e 2553, em *S. terebinthifolius*, ocorrendo valores pelo menos 100 vezes menores na parte aérea de ambas as espécies. A absorção seguiu uma escala linear em relação a concentração do metal na solução, sugerindo que ambas espécies de *Schinus* tenham, no máximo, características de indicadoras de cobre (Baker, 1981). Neste experimento se observou que ambas as aroeiras acumularam mais metal nas raízes do que na parte aérea, sugerindo que a planta deve evitar o transporte do metal para a parte aérea, possivelmente para evitar danos em seus tecidos. Assim mesmo, as plantas apresentaram vários sintomas de toxidez mesmo nas concentrações mais baixas de metal.

Embora os valores de acumulação de metal sejam importantes na seleção de espécies acumuladoras, a concentração de metais nos tecidos não nos diz muito sobre a capacidade da planta em ser usada para fitorremediação. Em função disso o fator de bioacumulação - FBA tem sido usado (Zayed *et al.*, 1998). Este índice é útil porque demonstra a habilidade da planta em acumular o elemento-traço em relação à sua concentração do elemento no substrato. Usando o FBA é possível identificar plantas que possivelmente trariam bons resultados em trabalhos com fitorremediação. Desta forma, são consideradas boas acumuladoras (Zayed *et al.*, 1998): (1) plantas com concentrações nos tecidos maiores de 0,5% do peso seco (2) Plantas com um FBA maior de 1000 ou 100 vezes comparado com o peso fresco *in vivo*. Nossos resultados mostram uma bioacumulação máxima nas raízes de 587,47 e 313,90; e na parte aérea de 8,04 e 9,15 μ M em *S. lentiscifolius* e *S. terebinthifolius*, respectivamente. Seguindo os critérios acima nenhuma das espécies de *Schinus* estudadas seriam boas acumuladoras de cobre, apesar dos valores de cobre acumulados na raiz não serem baixos.

Grandes valores de bioacumulação parecem existir em espécies hidrófitas como *Alternanthera sessilis* e *Bacopa monnieri*, em que sua bioacumulação chega a 23000 e 29000 (Rai *et al.*, 1995), respectivamente. Em espécies arbóreas como *Prosopis juliflora* (Senthilkumar *et al.*, 2005), *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* (Soares, 1999) os fatores de acumulação máximos encontrados para as raízes foram respectivamente de 6,18; 51,3 e 454.

Os resultados deste experimento mostram baixa capacidade de translocação do cobre nas espécies de *Schinus* estudadas, concordando com diversos estudos que relatam que, em espécies arbóreas, a translocação do metal para a parte aérea é limitada (Borghetti *et al.*, 2007). Em um estudo realizado com *Pinus sylvestris* foi encontrado que a transferência de cobre para as partes aéreas foi menor que a de níquel (Kukkola *et al.*, 2000), podendo o transporte de cobre estar relacionado a mecanismos desconhecidos da mobilidade do metal nas plantas. Nas raízes o cobre fica ligado a grupos carboxilas das pectinas e do ácido poligalactourônico e ao nitrogênio em proteínas e enzimas da parede celular (Marschner, 1995).

As raízes de *Schinus* são abundantes e capazes de explorar grandes porções de solo, no caso de *S. lentiscifolius* a espécie possui uma raiz pivotante extremamente longa com muitas raízes laterais se ramificando da pivotante, e em *S. terebinthifolius* a raiz pivotante é menos longa; entretanto, ela emite muitas raízes laterais tendo grande volume de raízes. Considerando as características de suas raízes a utilização de *Schinus* seria interessante para fitoestabilização, uma vez que permitiram maior profundidade para acessar o cobre no perfil do solo, existindo assim uma divisão espacial do uso do metal no solo. Grande parte das gramíneas concentram suas raízes nos 20-50cm da superfície, enquanto espécies arbóreas costumam ter sistema radicular mais profundo, permitindo a ocupação de diversas camadas no perfil do solo e diminuindo a contaminação ambiental destas camadas. Porém, neste experimento observou-se que ambas as espécies apresentaram elevada toxidez ao cobre, mesmo na concentração de 16 μ M. Desta forma, sugere-se que a utilização de *Schinus* seria vantajosa apenas em concentrações muito baixas de cobre no ambiente, como após uma descontaminação de área contaminada, sendo necessária a utilização de alguma espécie de raízes longas para “resgatar” contaminantes de camadas mais profundas do solo, onde não é possível utilização de outro método.

Os resultados deste experimento indicam que a sobrevivência e o crescimento de plantas de *S. lentiscifolius* talvez não tenham relação com aquisição de característica fisiológica particular dentro da população da mina. Trabalhos anteriores (Porto, 1990) relatam a espécie *S. lentiscifolius* como tendo tolerância ao cobre, baseados em seu elevado percentual de germinação (77,7%) em concentrações de 10⁻³M (1.000 μ M). No entanto, nossos resultados

mostram que ambas as espécies de *Schinus* tiveram diminuição de suas atividades fisiológicas em concentrações inferiores a esta, sendo que a partir de 16 μ M de cobre em solução nutritiva já era possível identificar danos fisiológicos nas duas espécies. Embora se saiba que a germinação é afetada em concentrações maiores que o aparecimento de sintomas de toxidez na planta adulta (Kohl & Lösh, 2004), as plantas foram sensíveis a concentrações mais baixas de cobre.

Desta forma, a presença de mecanismos de tolerância aos metais pesados não parecem ser a principal explicação para a elevada densidade da população de *S. lentiscifolius* na mina de Volta Grande. Mesmo que a tolerância aos metais se apresente em uma baixa frequência nas populações naturais (Macnair, 1997), a espécie ocupa praticamente toda a extensão da mina. Então, como poderíamos explicar a abundância de *S. lentiscifolius* na mina de Volta Grande em Lavras do Sul (RS) que é uma antiga mineração de cobre? Para explicar a ocorrência natural de *S. lentiscifolius* dentro da antiga mina de cobre são propostas três hipóteses: (1) disponibilidade limitada do cobre no substrato (2) presença de micorrizas na espécie e (3) o cobre poderia ser evitado pela planta.

Segundo a primeira hipótese acredita-se que a disponibilidade do metal no solo poderia ser limitada, já que a disponibilidade do metal pode variar de acordo o pH, a matéria orgânica (Foy *et al.*, 1978), uma vez que os metais podem se complexar fortemente com a matéria orgânica, em especial com fósforo. Zocche (2002) sugere que a predominância de *S. lentiscifolius* na área da mina não estaria relacionada à presença de cobre no solo e sim a outros fatores ambientais, como a disponibilidade de água no solo e a concentração de fósforo, que poderiam reduzir a quantidade de cobre disponível para as plantas.

No entanto, outra possibilidade reside na concordância com a hipótese de Wisniewski & Dickinson (2003). Nesta, os autores estudando plantas de *Quercus robur*, provenientes de uma mina abandonada de cobre, observaram que a espécie não apresentava tolerância ao cobre. Os autores sugerem que entre os motivos da espécie crescer abundantemente em solos com o metal poderia estar a rápida colonização da planta por micorrizas, as quais protegeriam as raízes e aumentariam a tolerância da planta. Além disso, eles observaram que embora não seja evidente, é possível que as raízes de *Quercus robur* evitem áreas com cobre, mas que os padrões de dispersão da espécie não permitam esta visualização.

Na região onde é encontrada, a espécie *S. lentiscifolius* parece ter um padrão de dispersão regular. Mudanças no padrão de dispersão de *Schinus* no interior da mina de cobre, não são observadas, com exceção dos filões de cobre no qual a espécie tem menos indivíduos e com tamanho reduzido. Embora não existam estudos de possíveis fungos micorrízicos de *S.*

lentiscifolius, sabe-se, através de experimentos de inoculação, que *S. terebinthifolius* é colonizada por algumas espécies de micorrizas. Entre estas estão *Scutellospora pellucida*, *S. gregaria*, *Entrophospora colombiana*, *Gigaspora margarita* e *Glomus etunicatum* (Pouye-Rojas, 2006). Alguns trabalhos que relatam a ocorrência de micorrizas arbusculares em áreas de mineração de cobre e observam que a maior parte das espécies encontradas em áreas contendo metais pesados ($\approx 70\%$) são pertencentes ao gênero *Glomus*, incluindo a ocorrência de *G. etunicatum*, e que provavelmente isso reflita a tolerância destes fungos, especialmente deste gênero, aos metais (Silva *et al.*, 2005 B). Assim, é possível que no campo haja colonização de *S. lentiscifolius* por micorrizas o que permitiria a espécie viver em ambientes com metais sem apresentar sintomas de toxicidade, o que também explicaria a manutenção dos padrões de dispersão da espécie no interior da mina.

E por último, outra possibilidade estaria relacionada ao comprimento de raiz de *S. lentiscifolius*. Em outros trabalhos, Salemaa & Monni (2003) verificaram que plantas de *Arctostaphylos uva-ursi* que habitavam uma área ao redor de uma mina de cobre abandonada também sofriam os efeitos de toxidez, em experimentos de exposição ao metal. Os autores sugerem que a principal estratégia que permite as plantas sobreviverem aos efeitos fitotóxicos do cobre no campo, seria a divisão espacial das raízes. Isto porque já haviam sido encontradas na área plantas com raízes de mais de 50cm de profundidade, o que permitiria as plantas evitar a presença do cobre, já que o metal estaria concentrado nas camadas superficiais. Outros trabalhos relatam que nos primeiros 5cm de solo de uma mina, as concentrações de cobre encontradas seriam maiores, ocorrendo diminuições significativas em camadas mais profundas até os 20cm (Dahmani-Müller *et. al*, 2000).

A relação do comprimento de raiz e altura em plantas não estressadas de *S. lentiscifolius* de 3 meses era de aproximadamente 6:1 (dados não mostrados: $6,14 \pm 0,36$; média \pm EP; n=50 plantas), indicando um sistema radicular profundo. Sippel (2003) relata que os solos com predominância de *S. lentiscifolius* na região são pouco profundos. No entanto, no campo não existem relatos do comprimento da raiz de *S. lentiscifolius* no solo, tampouco escavações que permitam tal verificação. Desta forma, esta possível estratégia de sobrevivência, no ambiente com metais, também não deve ser excluída. O metal poderia estar concentrado nas camadas superficiais do solo não atingindo criticamente a fisiologia da planta, o que poderia auxiliar a explicar a abundância da espécie dentro da mina de cobre.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Este trabalho foi dividido em duas etapas, observando o potencial de se utilizar *Schinus lentiscifolius* March. em trabalhos de recuperação de áreas degradadas, em especial em áreas degradadas pela mineração do carvão mineral que é uma atividade geradora de impactos e contaminações no ambiente no Sul do Brasil. Na segunda etapa, foi testada a tolerância de *S. lentiscifolius* proveniente de dentro da mina de cobre e de *S. terebinthifolius*, que tem sido amplamente utilizada para recuperação de áreas degradadas.

Embora ambas as espécies tenham características interessantes para serem utilizadas, os resultados dos experimentos da primeira parte do trabalho mostraram que as plantas de *S. lentiscifolius* germinam, mas mostram diversas restrições no crescimento em cinzas. Provavelmente associadas às baixas disponibilidades de macronutrientes deste substrato, sendo necessárias melhorias nas condições nutricionais do substrato para melhorar o crescimento da espécie no substrato.

Os experimentos com cobre mostraram que ambas as espécies de *Schinus* não parecem ser tolerantes ao metal, apresentando muitos sintomas de toxidez durante a exposição. Podendo ser envolvidas apenas em trabalhos de recuperação ambiental que contenham cobre em quantidades baixas. No entanto, este resultado traz uma perspectiva promissora em estudos futuros destinados a compreensão das estratégias que a planta utiliza na área de mineração de cobre, bem como na comprovação das hipóteses aqui levantadas para explicar a ocorrência da espécie na área da mina e desafios no campo biotecnológico no que se referem a espécies para serem usadas na fitorremediação. A partir da comprovação das estratégias usadas pelas plantas é possível definir formas de manejo que viabilizem o uso de *Schinus* de forma mais eficiente em trabalhos de recuperação ambiental, na tentativa de melhorar o potencial de uso da planta para este fim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, A. M. A. & SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. *In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. (eds.). Tópicos em ciências do solo.* Sociedade Brasileira de Ciência do solo. Viçosa. 2000.
- ADRIANO, D. C.; PAGE, A. L.; ELSEEWI, A. A.; CHANG, A. C.; STRAUGHAN, I. Utilization and disposal of fly-ash and other coal residues in terrestrial ecosystems: a review. **Journal of Environmental Quality** **9**: 333-334. 1980.
- ALI, N. A.; BERNAL, M. P. & ATER, M. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. **Plant and Soil** **239**: 103–111, 2002.
- ALMEIDA, R. O. P. O.; SÁNCHEZ, L. E. Revegetação de áreas de mineração: critérios de monitoramento e avaliação de desempenho. **Revista Árvore** **29** (1): 47-54. 2005.
- ARAÚJO, F. S.; MARTINS, S. V.; MEIRA, J. A. N. A.; LANI, J. L. & PIRES, I. E. Florística da vegetação arbustivo – arbórea colonizadora de uma área degradada por mineração de caulim, em Brás Pires, MG. **Revista Árvore** **29** (6): 983-992. 2005.
- BACCOUCH, S; CHAOUI, A.; EL-FERJANI, E. Nickel toxicity: effects on growth and metabolism of maize. **Journal of Plant Nutrition** **21**: 577-588. 1998.
- BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders-strategies in the response of plants to heavy metals, **Journal of Plant Nutrition** **3**: 643–654. 1981.
- BAKER, A. J. M. & WALKER, P. L. Ecophysiology of metal uptake by tolerant plants. *In: SHAW, A.J. (Ed.). Heavy Metal Tolerance in Plants.* CRC Press: 1990. 155–178p
- BARBOSA, L. M; BARBOSA, J. M; BARBOSA, K. C.; POTOMATI, A.; MARTINS, S. E; ASPERTI, L. M.; MELO, A. C. G.; CARRASCO, P. G.; CASTANHEIRA, S. A.; PILIACKAS, J. M; CONTIERI, W. A.; MATTIOLI, D. S.; GUEDES, D. C.; JUNIOR, N. S.; SILVA, P. M. S.; PLAZA, A. P. Recuperação florestal com espécies nativas no estado de São Paulo: pesquisas apontam mudanças necessárias. **Florestar Estatístico** **6** (14): 28-34p. 2003.
- BEADLE, C.L. Plant growth analysis. COOMBS, J.; HALL, D.O.; LONG, S.P.; SCURLOCK, J.M.O. (Eds.). **Techniques in Bioproductivity and photosynthesis.** Oxford: Pergamon Press. 1985. p.20-25.
- BOOJAR, M. M. A. & GOODARZI F. The copper tolerance strategies and the role of antioxidative enzymes in three plant species grown on copper mine. **Chemosphere** **67**: 2138-2147. 2007.
- BORGHI, M.; TOGNETTI, R.; MONTEFORTI, G.; SEBASTIANI, L. Responses of *Populus x euramericana* (*P. deltóides* × *P. nigra*) clone *Adda* to increasing copper concentrations. **Environmental and Experimental Botany** **61** (1): 66-73. 2007

- BRADSHAW, A. D. & MCNEILLY, T. **Evolution and Pollution**. Edward Arnold, London. 76 p. 1981.
- BRADSHAW, A. D.. Underlying principles of restoration. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** **53**: 3–9. 1996.
- BRASIL, M. A. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 1989. 375p.
- BROOKS, R. R. (ed.). **Plants that hyperaccumulate heavy metals: their role in phytoremediation, microbiology, archaeology, mineral exploration and phytomining**. CAB International. Washington. 1998.
- CALLAHAN, D. L.; BAKER, A. J. M; KOLEV, S. P; WEDD, A. G. Metal ion ligands in hyperaccumulating plants. **Journal of Biological Inorganic Chemistry** **11**: 2–12. 2006.
- CETESB. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. CETESB, São Paulo. 2001.
- CHANEY, R. L. Plant uptake of inorganic waste constitutes. *In*: PAR, J.F.; MARSH, P.B. & KLA, J. M. (eds). **Land Treatment of Harzadous wastes**. Noyes Data Corp., Park Ridge. 1983. 50-76p.
- CHANEY, R. L.; MALIK, M.; LI, Y. M.; BROWN, S. L.; BREWER, E. P.; ANGLE, J. S.; BAKER, A. J. M. Phytoremediation of soil metals. **Current Opinion in Biotechnology** **8**: 279-284. 1997
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie** **88**: 1707–1719. 2006.
- CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G. & KRÄMER, U.. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**. **7**: 309-315. 2002.
- CLIJSTERS, H. & VAN ASSCHE, F. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. **Photosynthesis Research** **7**: 31–40. 1985.
- COSIO, C.; SANTIS, L.; FREY, B.; DIALLO, S.; KELLER, C. (2001). Distribuiton of cadmium in leaves of *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, **56**: 765-775.
- DAHMANI-MULLER, H.; VAN OORT, F.; GELIE, B. & BALABANE, M. Strategies of heavy metal uptake by three plant species growing near a metal smelter. **Environmental Pollution** **109**: 231–238. 2000.
- Decreto-Lei 97.632. Dispõe sobre a regulamentação do artigo 2º, Inciso VIII, da Lei nº 6.938, de 31 de Agosto de 1981, e dá outras providências. Brasília, 10 de abril de 1989.
- DNPM, Departamento Nacional de Produção Mineral. **Anuário mineral brasileiro**. V. **34**. Brasília. 2006.

- FORCELLA F., BENECH-ARNOLD R. L., SÁNCHEZ R. & GHERSA C. M. Modeling seedling emergence. **Field Crops Research** **67**: 123–139. 2000.
- FOY, C. D.; CHANEY, R. L. & WHITE, M. C. The Physiology of Metal Toxicity in Plants. **Annual Review of Plant Physiology** **29**: 511-566. 1978.
- FRIZZO, T. C. E. & PORTO, M. L. Zoneamento da Vegetação e sua relação com a ocorrência de estruturas mineralizadas com cobre, Mina Volta Grande, Lavras do Sul, RS. **Revista Iheringia - Série Botânica** **59** (1): 5-12, 2004.
- GENTY; B.; BRIANTAIS, J-M; BAKER, N. R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. **Biochimica et Biophysica Acta** **990**: 87–92. 1989.
- GOMES, A. J. P.; CRUZ, P. R.; BORGES, L. P. Recursos Minerais Energéticos: Carvão e Urânio. In: BIZZI, L. A.; SCHOBENHAUS, C.; VIDOTTI, R. M. & GONÇALVES, J. H. (eds.). **Geologia, Tectônica e Recursos Minerais do Brasil**. CPRM: Brasília. 2003. 577-601p.
- GRATÃO, P. L; PRASAD, M. N. V., CARDOSO; P. F.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. N. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology** **17**(1): 53-64, 2005.
- GREGER, M. Metal availability, uptake, transporte and accumulation in plants. In.: Prasad, M. N. V. (Ed.). **Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems**. Springer: 2004. 462p.
- GUPTA, D. K.; RAI, U. N.; TRIPATHI, R. D.; INOUE, M. Impacts of fly-ash on soil and plant responses. **Journal of Plant Resource**. **115**: 401-409. 2002.
- HAAG-KERWER, A.; SCHÄFER, H. J.; HEISS, S.; WALTER, C.; RAUSCH, T. Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. **Journal of Experimental Botany** **50**: 1827-1835. 1999.
- HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**. **53**: 1-11. 2002.
- HARBORNE, J. B. **Introduction to ecological biochemistry**. Cambridge. Academic Press, 1993. 318p.
- HAVAUX, M. Stress Tolerance of Photosystem II in Vivo. *Plant Physiol.* **100**, 424-432. 1992.
- IBGE. **Levantamento de Recursos Naturais: Ecologia, Geomorfologia, Pedologia, Vegetação, Uso potencial da Terra**. IBGE: Rio de Janeiro. 1986.
- JOSHI MK, MOHANTY P. Chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants. In: PAPAGEORGIOU, G. C. & GOVINDJEE, (eds.) **Chlorophyll a**

fluorescence: a signature of photosynthesis. Dordrecht, The Netherlands: Springer, 637–661. 2004.

KABATA-PENDIAS, A. AND PENDIAS, H. **Trace Elements in Soils and Plants** (3rd ed.), CRC Press, Boca Raton, FL. 2001.

KALRA, N., JOSHI, H. C., CHAUDHARY, A., CHOUDHARY, R. & SHARMA, S.K. Impact of fly ash incorporation in soil on germination of crops. **Bioresource Technology** **61**: 39–41. 1997.

KNUDSON, L. L.; TIBBILIS, T. W. & EDWARDS, G. E. Measurement of ozone injury by determination of leaf chlorophyll concentration. **Plant Physiology** **60**: 606-608. 1977.

KOCHIAN, L. V.; PENCE, N.S.; LETHAM, D.L.D.; PINEROS, M. A.; MAGALHÃES, J. V.; HOEKENGA, O. A. & GARVIN D. F. Mechanisms of metal resistance in plants: aluminum and heavy metals. **Plant and Soil** **247**: 109–119, 2002.

KOHL, K. L. & LÖSCH, R. Experimental characterisation of metal tolerance. *In*: Prasad, M. N. V. (Ed.). **Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems.** Springer: 2004. 462p.

KOPITTKE, P. M. & MENZIES, N. W. Effect of Cu toxicity on the growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Soil** **279**: 287–296. 2006.

KOPPE, J. C. & COSTA, F. C. L. C. Mineração. *In*: **Meio Ambiente e Carvão: impactos da exploração e utilização.** Porto Alegre: Fepam, 2002. 15-28p.

KRAUSE, G. H. & WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology** **42**: 313–349. 1991.

KUKKOLA, E., RAUTIO, P. & HUTTUNEN, S. Stress indicators in copper- and nickel-exposed Scots pine seedlings. **Environmental and Experimental Botany** **43**: 197–210. 2000.

KÜPPER, H. Physiology of hyperaccumulator and non-accumulator plants: heavy metal uptake, transport, compartmentation, stress and resistance. Tese de Doutorado. Konstanz. 2001.

KÜPPER, H.; KÜPPER, F. & SPILLER. Environmental relevance of heavy metal substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany** **47(295)**: 259–266. 1996.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology.** New York: Springer, 1998. 540p.

LASAT, M. M.; BAKER, A. J. & KOCHIAN, L. V. Physiological characterization of root Zn²⁺ absorption and translocation to shoots in Zn hyperaccumulator and nonaccumulator species of *Thlaspi*. **Plant Physiology** **112**: 1715–1722. 1996.

- Lei 6.938. Política Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Brasília, 31 de agosto de 1981.
- LICHTENTHALER, H. K. & MIEHÉ, J. A. Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. **Trends in Plant Sciences 2**: 316-320. 1997.
- LOMBI, E.; ZHAO, E. J.; MACGRATH, S. P.; YOUNG, S. D. & SACCHI, G. A. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transport highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. **New Phytologist 149**: 53-60. 2001.
- MACFARLANE, G. R. & BURCHETT, M. D. Photosynthetic pigments and peroxidase activity as indicators of heavy metal stress in the Grey Mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Veirh. **Marine Pollution Bulletin 42**: 233-240. 2001.
- MACNAIR, M. R. The evolution of plants in metal-contaminated environments. *In.*: BIJSMAN, R. & LOESCHCKE, V. (Eds.) **Environmental Stress, Adaptation and Evolution**. 1997. 3 -23p.
- MAGUIRRE, J. D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science 2**: p.176-177, 1962.
- MAKSYMIEC, W.. Effect of copper on cellular processes in higher plants. **Photosynthetica 34 (3)**: 321-342. 1997.
- MAKSYMIEC, W.; WÓJCIK, M. & KRUPA, Z. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. **Chemosphere 66**: 421-427. 2007.
- MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**. Academic Press. 1995.
- MAXWELL, K. & JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence: a practical guide. **Journal of Experimental Botany 51**: 659-668. 2000
- MCBRIDE, R.A. Soil consistency limits. *In*: CARTER, M.R. (Ed.) **Soil Sampling and Methods of Analysis** Canadian Society of Soil Science. CRC Press, Lewis Publishers, Boca Raton, FL. 1993. pp. 519-527.
- MEDEIROS, A. C.; ZANON, A. Conservação de sementes de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* RADDI). **Boletim de Pesquisa Florestal 36**: 11-20. 1998 A.
- MEDEIROS, A. C.; ZANON, A. Substratos e temperaturas para teste de germinação de sementes de aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Comunicado Técnico da Embrapa 32**: 1-3. 1998. B.
- MILLÁN, M. M. & FERRIZ, S. R. C. Arquitectura foliar de Anacardiaceae. **Anales del Instituto de Biología. Série Botânica 76 (2)**: 137-190. 2005.

- MYŚLIWA-KURDZIEL, B. & STRZALKA, K. Influence of metals on the biosynthesis of photosynthetic pigments. *In.*: PRASAD, M. N. V. & STRZALK, K (Eds.). **Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants**. Springer. 2002. 431p.
- MYŚLIWA-KURDZIEL, B; PRASAD M. N. V. & STRZALKA, K Photosynthesis in heavy metal stressed plants. *In.*: PRASAD, M. N. V. & STRZALK, K (Eds.). **Physiology and Biochemistry of Metal Toxicity and Tolerance in Plants**. Springer. 2002. 431p.
- OUZOUNIDOU, G., ILIAS, I. Hormone-induced protection of sunflower photosynthetic apparatus against copper toxicity. - **Biologia Plantarum** **49**: 223-228. 2005.
- PANOU-FILOTHEOU, H. & BOSABALIDIS, A. M. Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Plant Science** **166**: 1497-1504. 2004.
- PARROTTA, J. A. & KNOWLES, O. H.. Restoration of tropical moist forests on bauxite-mined lands in the Brazilian Amazon. **Restoration Ecology** **7**: 103–116. 1999.
- PATHAN, S. M.; AYLMOORE, A. G.; COLMER, T. D. Properties of several fly ash materials in relation to use as soil amendments. **Journal of Environmental Quality** **32**: 687-693. 2003.
- PATON, A & BROOKS, R. R. A re-evaluation of *Haumaniastrum* species as geobotanical indicators of copper and cobalt. **Journal of Geochemical Exploration** **56**, 37–45. 1995.
- PATSIKKA, E., KAIRAVUO, M., SERSEN, F., ARO, E.-M. AND TYYSTJARVI, E. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. **Plant Physiol.** **129**: 1359–1367. 2002.
- PAVLOVIC, P; MITROVIC, M; DJURDJEVIC, L. An ecophysiological study of plants growing on the fly ash deposits from the “Nikola Tesla-A” Thermal Power Station in Serbia. **Environmental Management** **33** (5): 654-663p. 2004
- PERALTA-VIDEA, J. R., GARDEA-TORRESDEY, J. L., DE LA ROSA, G., GONZALES, J. H. & HERRERA, I. Effect of heavy metals on alfalfa plants at different growth stages. **Advances in Environmental Research** **8**(3-4): 679-685. 2004.
- PILLMAN, A. & JUSAITIS, M. Revegetation of waste fly ash lagoons. II. Seedling transplants and plant nutrition. **Waste Management & Research** **15** (4): 359 - 370. 1997.
- PILON, M.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C. M.; GOGOLIN, K. A. & YE, H. Copper cofactor delivery in plant cells. **Current Opinion in Plant Biology** **9**: 256–263. 2006.
- PILON-SMITS, E. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Biology** **56**:15–39. 2005
- POLLARD, A. J.; POWELL, K. D.; HARPER, F. A. & SMITH J. A. C. The genetic basis of metal hyperaccumulation in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences** **21**: 539–566. 2002.

- PORTO, M. L. Beiträge zur Schwermetallvegetation von Rio Grande do Sul, Brasilien, Orientador: Sieghard Winkler. 1981.
- PORTO, M. L. Tolerância ao Cobre em Ecótipos de *Schinus lentifolius* March (Anacardiaceae) de áreas de mineração do RS, Brasil. **Acta Botânica Brasílica** **32** (3): 23-31. 1990.
- POUYE-ROJAS, E., SIQUEIRA, J.O. SANTOS, G. D. S. Compatibilidade simbiótica de fungos micorrízicos arbusculares com espécies arbóreas tropicais. **Revista Brasileira de Ciências do Solo** **30**: 413-424. 2006.
- PRASAD, M. N. V. & FREITAS, H. Metal hyperaccumulation in plants - Biodiversity prospecting for phytoremediation technology. **Electronic Journal of Biotechnology**. 2003. Disponível em <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582003000300012&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0717-3458.
- RAI, N.; SINHA, S; TRIPATHI, R.D. & CHANDRA, P Wastewater treatability potential of some aquatic macrophytes: removal of heavy metals. **Ecological Engineering** **5**: 5–12. 1995.
- RYAN, P. R; DELHAIZE, E. & JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **52**: 527–560. 2001.
- SALEMAA, M. & MONNI, S. Copper resistance of the evergreen dwarf shrub *Arctostaphylos uva-ursi*: an experimental exposure. **Environmental Pollution** **126**: 435–443. 2003.
- SAMPAIO, C. H. Beneficiamento. *In: Meio Ambiente e Carvão: impactos da exploração e utilização*. Porto Alegre: Fepam, 2002. 29-44p.
- SCHEIBE, L. F. O carvão de Santa Catarina: mineração e conseqüências ambientais. *In: Meio Ambiente e Carvão: impactos da exploração e utilização*. Porto Alegre: Fepam, 2002. 45-68p.
- SENTHILKUMAR, P.; PRINCE, W. S. P. M.; SIVAKUMAR, S.; SUBBHURA, A. M. C. *V. Prosopis juliflora*—a green solution to decontaminate heavy metal (Cu and Cd) contaminated soils. **Chemosphere** **60**: 1493– 1496. 2005.
- SHIOI, Y.; TAMAI, H.; SASA, T. Effects of copper on photosynthetic electron transport systems in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol** **19**: 203–209. 1978.
- SILVA, G. A.; TRUFEM, S. F. B.; JÚNIOR, O. J. S.; MAIA, L. C. Arbuscular mycorrhizal fungi in a semiarid copper mining area in Brazil. **Mycorrhiza** **15**: 47–53. 2005 B.
- SILVA, G. P.; FONTES, M. P. F.; COSTA, L. M. & BARROS, N. F. Caracterização química, física e mineralógica de estéreis e rejeito da mineração de ferro da mina de alegria, mariana-mg. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, **36** (1): 45-52, 2006. A.

- SILVA, G. P.; FONTES, M. P. F.; COSTA, L. M. & VENEGAS, V. H. A. Potencialidade de plantas para revegetação de estéreis e rejeito da mineração de ferro da Mina de Alegria, Mariana-MG. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, **36 (3)**: 165-172, 2006.B
- SINGH, S. N.; KULSHRESHTHA, K.; AHMAD, K. J. Impacts of fly-ash soil amendment on seed germination, seedling growth and metal composition of *Vicia faba* L. **Ecol Eng** **9**: 203-208. 1997.
- SINGH, O. V.; LABANA, S.; PANDEY, G.; BUDHIRAJA, R.; JAIN, R. K. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. **Applied Microbiology and Biotechnology** **61**: 405-412. 2003.
- SINHA, S.; RAI, U.N.; BHATT, K.; PANDEY, K. & GUPTA, A.K. Fly-ash induced oxidative stress and tolerance in *Prosopis juliflora* L. grown on different amendments substrates. **Environmental Monitoring and Assessment** **102**: 447–457. 2005
- SIPPEL, C.. Unidades da paisagem e suas relações com as características dos solos na área da mineração Volta grande, Lavras do Sul, RS- uma visão em diferentes escalas. Dissertação de Mestrado UFRGS. 2003.
- SOARES, C. R. F. S. Toxidez de zinco, cobre, cádmio e chumbo para o eucalipto em solução nutritiva. Dissertação de mestrado UFLavras. 1999.
- 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. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **12(3)** 2000. 213-225.
- SOARES, M. R. & CASAGRANDE, J. C. Fitorremediação como estratégia de recuperação de solos degradados em áreas mineradas. *In.*: BARBOSA, L. M. & JUNIOR, N. A. S. J. (Eds.). **A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas ambientais**. 2007. 529-533p.
- SONG, J.; ZHAO, F. J.; LUO, Y. M.; MCGRATH, S. P. & ZHANG, H. Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silene vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. **Environmental Pollution** **128**: 307–315. 2004.
- STEWART, B.R., DANIELS, W.L. Physical and chemical properties of coal refuse from southwest virginia. **Journal of Environmental Quality** **21 (4)**: 635-642. 1992.
- TIWARY, R. K. Environmental impact of coal mining on water regime and its management. **Water, Air, and Soil Pollution** **132**: 185–199. 2001.
- TORDOFF, G.M., BAKER, A.J.M., WILLIS, A.J. Current approaches to the revegetation and reclamation of metalliferous mine wastes. **Chemosphere** **41**: 218-219. 2000
- UGURLU, A. Leaching characteristics of fly ash. **Environmental Geology**. **46**: 890 – 895. 2004.

- VERMA, S. K.; SINGH, S. P., SINGH, R. K. Nutritional control of copper uptake in the cyanobacterium *Nostoc calcicola*. **Biology of Metals 4**: 192-196.
- VIEIRA, D. L. M. & SCARIOT, A.. Principles of natural regeneration of tropical dry forests for restoration. **Restoration Ecology 14**: 11-20. 2006
- WAGATSUMA, T.; KANEKO, M. & HAYASAKA, Y. Destruction process of plant-root cells by aluminum. **Soil Science Plant Nutrition 33**: 161–175. 1987.
- WHITING, S. N.; REEVES, R. D.; RICHARDS, D.; JOHNSON, M. S.; COOKE, J. A.; MALAISSE, F.; PATON, A.; SMITH, J. A. C.; ANGLE, J. S.; CHANEY, R. L.; GINOCCHIO, R.; JAFFRÉ, T.; JOHNS, R.; MCINTYRE, T.; PURVES, G. W.; SALT, D.E.; SCHAT, H.; ZHAO, F.J. & BAKER, A.J.M. Research priorities for conservation of metallophyte biodiversity and their potential for restoration and site remediation. **Restoration Ecology 12**: 106-116. 2004.
- WILKINS, D. A. The measurement of tolerance to edaphic factors by means of root growth. **New Phytologist 91**: 255–261. 1978.
- WINTERMANS, J. F. G. M. & DeMOTS, A. Spectrophotometric characteristics of chlorophylls a and b and their pheophytins in ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta 109**: 448-453. 1965.
- WISNIEWSKI, L. & DICKINSON, N. M. Toxicity of copper to *Quercus robur* (English Oak) seedlings from a copper-rich soil. **Environmental Experimental Botany 50**: 99–107. 2003.
- YRUELA, I. Copper in plants. Braz. **Journal Plant Physiology 17**: 145–156. 2005.
- YRUELA I., ALFONSO M., BARÓN M., PICOREL R. Copper effect on the protein composition of photosystem II. **Physiologia Plantarum 110**: 551–557. 2000
- ZAYED, A., GOWTHAMAN, S. & TERRY, N. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: I. Duckweed. **Journal Environmental Quality 27**: 715–721. 1998.
- ZOCHE, J. J.. Comunidades vegetais de savana sobre estruturas mineralizadas de cobre, na mina Volta Grande, Lavras do Sul, RS. Tese de Doutorado UFRGS Orientação: PORTO, M. L. 2002.