

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE ENGENHARIA  
CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA**

**NAYANE CRISTINA PIRES BOMFIM**

**CRESCIMENTO, TOLERÂNCIA E POTENCIAL FITORREMEDIADOR DE  
*LEUCAENA LEUCOCEPHALA* EM SOLO CONTAMINADO POR COBRE E  
FERRO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**NAYANE CRISTINA PIRES BOMFIM**

**CRESCIMENTO, TOLERÂNCIA E POTENCIAL FITORREMEDIADOR DE  
*LEUCAENA LEUCOCEPHALA* EM SOLO CONTAMINADO POR COBRE E  
FERRO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira – UNESP como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Especialidade: Sistemas de Produção

**Profa. Dra. Liliane Santos de Camargos**

Orientadora

**Prof. Dr. Lucas Anjos de Souza**

Coorientador

Ilha Solteira  
2020

FICHA CATALOGRÁFICA  
Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

B695c Bomfim, Nayane Cristina Pires.  
Crescimento, tolerância e potencial fitorremediador de *Leucaena leucocephala* em solo contaminado por cobre e ferro / Nayane Cristina Pires Bomfim. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2020  
71 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Área de conhecimento: Sistemas de Produção, 2020

Orientador: Liliâne Santos de Camargos

Coorientador: Lucas Anjos de Souza

Inclui bibliografia

1. Biomassa. 2. Metal pesado. 3. Contaminação. 4. Extração. 5. Fitorremediação.

  
Raiane da Silva Santos  
Supervisora Técnica de Seção  
Seção Técnica de Bibliografia, Arquivística, Avaliação e Documentação  
Unidade Técnica de Biblioteca e Documentação  
CSRS - 9999

## ATESTADO DE APROVAÇÃO - DEFESA

Atestamos que **NAYANE CRISTINA PIRES BOMFIM**, RA nº: AGR180076, RG nº 48.882.852-1, expedido pela SSP/SP, defendeu, no dia 09/04/2020, a dissertação intitulada **CRESCIMENTO, TOLERÂNCIA E POTENCIAL FITORREMEDIADOR DE LEUCAENA LEUCOCEPHALA EM SOLO CONTAMINADO POR COBRE E FERRO**, junto ao Programa de Pós Graduação em Agronomia, Curso de Mestrado Acadêmico, tendo sido 'APROVADA'.

Atestamos ainda que a obtenção do título dependerá de homologação pelo Órgão Colegiado competente.

Ilha Solteira, 09 de abril de 2020



---

**Márcia Regina Nagamachi Chaves**  
Supervisora Técnica de Seção - STPG

### **DEDICO**

A meus pais, Carlos e Rita, e a minha irmã querida, Nayelle, que sempre apoiaram meus estudos, minha pós-graduação e meus sonhos. E aos meus amados avós, Aurelino e Arminda.

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grata por todas as escolhas e caminhos que fiz e percorri ao longo desses anos, até os dias atuais. Tive privilégios, mas ainda assim, sem meu esforço e meus anseios eu não estaria defendendo meu Mestrado, na Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira - SP, reconheço meu valor enquanto pessoa e pesquisadora.

É gratificante ter tido a oportunidade de fazer pesquisa em uma instituição pública, tão amada e admirada por mim, mas que diante deste cenário político, torna-se triste e incerto a pesquisa na pós-graduação, da universidade pública, nos próximos anos.

Com muito prazer, eu agradeço as pessoas maravilhosas que estiveram ao meu lado me dando apoio, amor, força, amizade, compartilhando conhecimento e experiências, incentivo, e inspiração para que eu pudesse realizar a minha pesquisa. São elas:

- Carlos, Rita, Nayelle: amada família;
- Eduardo: companheiro;
- Liliane: professora, orientadora e amiga;
- Aline: professora querida;
- Lucas: professor, coorientador e colaborador da pesquisa;
- Gláucia: professora querida e colaboradora da pesquisa;
- Jeisa: amiga e irmã;
- Jailson, Wesller, Marilaine, Patrícia, Mariana, Maycon, Beatriz: amigos do laboratório.
- Ao apoio dos processos nº: 2018/13008-3-BM-NCPB; 2018/01498-6-APR, Fundação de Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.
- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A essas pessoas, CAPES e a FAPESP, meu muito obrigada!

“Em um mundo moldado pela ciência, a educação de qualidade, especialmente na ciência, é essencial para o desenvolvimento do cidadão, para que seja qualificado para resolver problemas com a criatividade e para participar conscientemente e ativamente das demandas coletivas da sociedade”

Raupp (2009)

## RESUMO

As intensas atividades antropogênicas têm aumentado as concentrações de metais pesados no solo, por meio do uso excessivo de produtos químicos e do descarte inadequado e acúmulo de resíduos sólidos e líquidos, por exemplo, surgindo assim riscos de poluição do solo e corpos d'água. O desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, efetivas e de baixo custo para recuperação de áreas contaminadas por metais pesados é de extrema necessidade. A fitorremediação é uma técnica, de baixo custo, que utiliza plantas na recuperação de solos contaminados por metais pesados. Espécies de leguminosas apresentam características favoráveis para crescerem rapidamente em solos degradados, o que é uma característica importante quando considera-se o potencial para fitorremediação destes contaminantes. Objetivou-se caracterizar a resposta fisiológica, determinar a tolerância e o potencial fitorremediador de *Leucaena leucocephala* aos metais cobre e ferro. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em delineamento inteiramente casualizado para ambos os metais. O solo foi tratado com cinco doses, além do controle (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> solo), em sacos de mudas com capacidade para 2 dm<sup>3</sup> de solo. Sementes de *L. leucocephala* foram semeadas diretamente no solo contaminado e cultivadas por 120 dias. Os parâmetros fotossintéticos, foram analisados; o material vegetal foi coletado e os tecidos foram separados, medidos e pesados para avaliação de crescimento. Teores de clorofila e carotenoides foram quantificados nas folhas. Foi determinado os teores de nutrientes nas plantas e no solo. Foi avaliado a tolerância e o potencial fitorremediador da espécie. *Leucaena leucocephala* é tolerante as doses de cobre e ferro testadas. Os metais extraídos do solo foram acumulados principalmente nas raízes. O conteúdo de clorofilas foi reduzido, entretanto, a taxa de fotossíntese líquida não foi afetada pelo Cu e pelo Fe (>300 mg/dm<sup>3</sup>). *L. leucocephala* apresenta potencial para o uso na recuperação de áreas degradadas por Cu e Fe, pois as concentrações de ambos os metais tiveram redução significativa no solo após o cultivo das plantas. *Leucaena leucocephala* é fitoestabilizadora de Cu e Fe e pode ser utilizada na fitorremediação de solo contaminado por esses metais.

**Palavras- chave:** Biomassa. Metal pesado. Contaminação. Extração. Fitorremediação.

## ABSTRACT



The intense anthropogenic activities have increased the concentrations of heavy metals in the soil, through the excessive use of chemicals and the improper disposal and accumulation of solid and liquid residues, for example, thus resulting in risks of pollution of the soil and water bodies. The development of sustainable, effective and low-cost technologies for the recovery of areas contaminated by heavy metals is extremely necessary. Phytoremediation is a technique that uses plants to recover soils contaminated by heavy metals. Legume species have favorable characteristics to grow quickly in degraded soils, which is an important characteristic when considering the potential for phytoremediation of these contaminants. The objective was to characterize the physiological response, to determine the tolerance and phytoremediation potential of *Leucaena leucocephala* to copper and iron metals. The experiment was carried out in a greenhouse, in a completely randomized design for both metals. The soil was treated with five doses, in addition to the control (100, 200, 300, 400 and 500 mg/dm<sup>3</sup> soil), in seedling bags with a capacity of 2 dm<sup>3</sup> soil. *Leucaena leucocephala* seeds were sown and cultivated for 120 days. The photosynthetic parameters were analyzed; the plant material was collected and the tissues were separated, measured and weighed for growth evaluation. Chlorophyll and carotenoid contents were quantified in the leaves. Nutrient contents in plants and soil were determined. The species tolerance and phytoremediation potential were evaluated. *Leucaena leucocephala* is tolerant of the tested copper and iron doses. The metals extracted from the soil were accumulated mainly in the roots. The chlorophyll content was reduced, however, the rate of liquid photosynthesis was not affected by Cu and Fe (> 300 mg / dm<sup>3</sup>). *L. leucocephala* has potential use in the recovery of areas degraded by Cu and Fe, as the concentrations of both had a significant reduction in the soil after the cultivation of plants. *Leucaena leucocephala* is a phytostabilizer of Cu and Fe and can be used in phytoremediation of soil contaminated by these metals.

**Keywords:** Biomass. Heavy metal. Contamination. Extraction. Phytoremediation.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                        |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO, TOLERÂNCIA E POTENCIAL FITORREMEDIADOR DE <i>LEUCAENA LEUCOCEPHALA</i> CULTIVADA EM SOLO COM EXCESSO DE COBRE.....</b> | <b>10</b> |
| 1.1 INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                    | 10        |
| 1.2 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                            | 15        |
| 1.2.1 Instalação do experimento, caracterização das amostras e delineamento experimental.....                                                          | 15        |
| 1.2.2 Avaliação de trocas gasosas.....                                                                                                                 | 16        |
| 1.2.3 Coleta e determinação de compostos.....                                                                                                          | 17        |
| 1.2.4 Determinação do teor de cobre nos tecidos vegetais e no solo.....                                                                                | 17        |
| 1.2.5 Determinação do potencial fitorremediador.....                                                                                                   | 18        |
| 1.2.6 Análise estatística.....                                                                                                                         | 19        |
| 1.3 RESULTADOS.....                                                                                                                                    | 19        |
| 1.3.1 Aspectos fisiológicos.....                                                                                                                       | 19        |
| 1.3.2 Tolerância e potencial fitorremediador.....                                                                                                      | 20        |
| 1.4 DISCUSSÃO.....                                                                                                                                     | 21        |
| 1.4.1 Aspectos fisiológicos, tolerância e potencial fitorremediador.....                                                                               | 21        |
| 1.4.2 Perspectivas para o estudo de espécies leguminosas com alta produção de biomassa na fitorremediação de elementos potencialmente tóxicos.....     | 27        |
| 1.5 CONCLUSÃO.....                                                                                                                                     | 28        |
| 1.6 FIGURAS E TABELAS.....                                                                                                                             | 28        |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                       | 28        |
| <b>CAPÍTULO II: FITOESTABILIZAÇÃO DE FERRO POR <i>LEUCAENA LEUCOCEPHALA</i>.....</b>                                                                   | <b>41</b> |
| 2.1 INTRODUÇÃO.....                                                                                                                                    | 41        |
| 2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                                            | 45        |
| 2.2.1 Instalação do experimento, caracterização das amostras e delineamento experimental.....                                                          | 45        |
| 2.2.2 Avaliação de trocas gasosas.....                                                                                                                 | 46        |
| 2.2.3 Coleta e determinação de compostos.....                                                                                                          | 47        |
| 2.2.4 Determinação do teor de ferro nos tecidos vegetais e no solo.....                                                                                | 47        |
| 2.2.5 Determinação do potencial fitorremediador.....                                                                                                   | 48        |
| 2.2.6 Análise estatística.....                                                                                                                         | 49        |
| 2.3 RESULTADOS.....                                                                                                                                    | 49        |
| 2.3.1 Aspectos fisiológicos.....                                                                                                                       | 49        |
| 2.3.2 Tolerância e potencial fitorremediador.....                                                                                                      | 50        |
| 2.4 DISCUSSÃO.....                                                                                                                                     | 51        |
| 2.4.1 Aspectos fisiológicos, tolerância e potencial fitorremediador.....                                                                               | 51        |
| 2.4.2 Perspectivas para o estudo de espécies leguminosas com alta produção de biomassa na fitorremediação de elementos potencialmente tóxicos.....     | 54        |
| 2.5 CONCLUSÃO.....                                                                                                                                     | 56        |
| 2.6 FIGURAS E TABELAS.....                                                                                                                             | 64        |
| REFERÊNCIAS.....                                                                                                                                       | 57        |

## **CAPÍTULO I: DESENVOLVIMENTO, TOLERÂNCIA E POTENCIAL FITORREMEIADOR DE *LEUCAENA LEUCOCEPHALA* CULTIVADA EM SOLO COM EXCESSO DE COBRE**

### **1.1 INTRODUÇÃO**

Os micronutrientes, ou oligoelementos, os quais incluem cloro, boro, cobre, ferro, manganês, molibdênio, níquel e zinco, geralmente, estão presentes em <100 mg/kg de peso seco de tecido vegetal (PILON-SMITS *et al.*, 2009). Esses elementos promovem o crescimento de várias espécies sob certas condições ambientais, todavia, a função e a concentração variam para cada elemento e espécie de planta. Os micronutrientes podem ser tóxicos em um limiar de concentração mais baixos que os macronutrientes (ERNST, 2006; PILON-SMITS *et al.*, 2009), podendo afetar profundamente a distribuição das espécies.

O cobre (Cu) é conhecido como micronutriente redox ativo essencial para plantas (YRUELA, 2005), funciona como cofator para várias enzimas, ajuda na estabilidade estrutural das proteínas e desempenha papéis críticos em vários processos metabólicos, transporte e sinalização celular (KOCH *et al.* 1997; TURSKI; THIELE, 2009). As propriedades redox do Cu, isto é, sua presença na forma cuprosa ( $\text{Cu}^+$ ) ou cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ), ajudam a executar várias funções estruturais e catalíticas das proteínas (SHARMA *et al.*, 2019).

O Cu é um oligoelemento metálico nos solos, e sua presença depende do material de origem (HOUGH, 2010). O conteúdo total médio de Cu no solo é de cerca de 30 mg/kg de peso seco, com pequenas diferenças entre as zonas geográficas (HOUGH, 2010), e com menos de 10 mg/kg de peso seco em tecidos vegetais (YRUELA, 2005).

Dependendo das propriedades do solo, uma proporção da concentração total de metal está biodisponível para plantas e microrganismos (DE GRUYSE *et al.*, 2009). Muitos fatores estão em constante interação e afetam a biodisponibilidade do metal, mobilidade, absorção e bioacumulação nos vegetais, tais como: o total de metal presente no solo; pH; teor de argila e óxido hidratado; matéria orgânica e condições redox; capacidade de troca catiônica do solo; clima; deposições atmosféricas; natureza e quantidade de elementos; permissibilidade do metal; interface solo-planta; atividade microbiana na rizosfera; balanço de nutrientes; seletividade e capacidade de absorção das espécies (REICHMAN, 2002; ANTONIADIS *et al.*, 2017; DOS SANTOS-ARAÚJO *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2017).

O pH do solo abaixo de 6 aumenta a disponibilidade de Cu (ADRIANO, 2001) devido ao aumento das cargas variáveis positivas no solo, enquanto que a matéria orgânica do solo diminui a disponibilidade de Cu devido à alta afinidade pelo Cu na superfície de grupos funcionais (BAKSHI *et al.*, 2014).

O Cu é um dos contaminantes mais comuns e não biodegradáveis do solo entre os metais pesados (HOUGH, 2010). A contaminação por Cu em solos agrícolas é muito comum e resulta do uso frequente de fertilizantes e pesticidas para aumentar a produção agrícola e reduzir a incidência de pragas e doenças (STELLACCI *et al.*, 2013; GONZAGA *et al.*, 2020). Os fungicidas à base de Cu têm sido utilizados em pomares de frutas, vinhas e hortaliças para controlar doenças fúngicas (MERRY *et al.*, 1983); esses fungicidas são a principal fonte de contaminação com Cu em muitas fazendas e vinhedos de base orgânica (MEIER *et al.*, 2017). A quantidade de Cu potencialmente biodisponível em solos de vinhedos, em que a mistura de bordeaux é usada, pode atingir até 60% do Cu total na camada superior do solo, diminuindo em direção as camadas mais profundas (PIETRZAK; MCPHAIL, 2004).

Os níveis elevados de Cu no solo podem afetar a produtividade das culturas pela sua toxicidade, apresentando riscos para toda cadeia trófica, incluindo animais e seres humanos (KABATA-PENDIAS, 2011). A remediação de solos agrícolas contaminados com Cu é de suma importância para evitar a contaminação da cadeia alimentar e manter a produtividade das culturas (GONZAGA *et al.*, 2020).

Outra fonte relevante de resíduos de Cu provém da atividade de mineração. Essas atividades produzem efeitos prejudiciais significativos nos ecossistemas naturais devido à alta quantidade de material particulado enriquecido com Cu depositado no solo, entre outros elementos, o que reduz a cobertura e o crescimento das plantas e limita o estabelecimento das plantas (GINOCCHIO, 2000). O descarte de resíduos metálicos em minas a céu aberto representa um sério problema ambiental em todo o mundo, pois é uma das principais rotas de liberação de metais tóxicos para o meio ambiente (LOTTERMOSER, 2007).

O descarte inadequado desses resíduos no solo, pode acarretar em um excesso de disponibilidade de metais pesados, sendo micronutrientes ou não, no solo. O excesso de um determinado metal pode ainda, dificultar a absorção de outros íons necessários ao desenvolvimento das plantas. Os limiares de toxicidade ou deficiência de metal dependem de cada espécie. Concentrações elevadas desses metais induzem efeitos tóxicos, como inibição de vários processos no metabolismo das plantas: as propriedades redox do Cu o

permite ser usado por inúmeras proteínas, o que pode elevar a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (PRASAD; HAGEMEYER, 1999; HUSAK, 2015; IMRAN *et al.*, 2019; REHMAN *et al.*, 2019; SALEEM *et al.*, 2019).

Em todas as fases do crescimento, altas concentrações de Cu, nas culturas alimentares, afetam significativamente a morfologia e fisiologia das plantas (LI *et al.*, 2018; REHMAN *et al.*, 2019; SALEEM *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2019). Anteriormente, vários estudos, incluindo trigo e arroz mostraram que altas concentrações de Cu no solo reduzem o crescimento e a produção de biomassa das plantas, por meio da atividade biológica reduzida e subsequente perda de fertilidade (MOSTOFA; FUJITA, 2013; KELLER *et al.*, 2015).

A CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, em 2016, publicou a aprovação dos valores orientadores para solos no Estado de São Paulo, Brasil, (Decisão de Diretoria nº: 256/2016/E, de 22 de novembro de 2016). A decisão traz sobre o Cu: valor de referência de qualidade de 35 mg/kg de peso seco; valor de prevenção 60 mg/kg e valores de intervenção de acordo com a área, agrícola, residencial e industrial, respectivamente, 760, 2100 e 10000 mg/kg (CETESB, 2016).

Pela regulamentação válida no Brasil, em vigência, não consta limites próprios, para cada metal, de poluição ou toxicidade, somente os valores de intervenção estabelecidos, acima, para avaliação de riscos da alteração da qualidade do local e implementação de medidas de controle (CETESB, 2017). No entanto, de acordo com o Ministério da Ecologia e o Meio Ambiente, a Agência de Proteção Ambiental da China e outras autoridades reguladoras internacionais estabeleceram limites para a poluição do Cu no solo, com um limite de 100 mg/kg em terras agrícolas (JIN *et al.*, 2019).

No Brasil, há uma falta de dados acerca da relação solo-planta nas condições de clima tropical, condições e tipos de solo, práticas de manejo de culturas na captação e acumulação de metais pesados pelas plantas (DOS SANTOS-ARAUJO *et al.*, 2017). Como consequência, as relações solo-planta a serem usadas nas avaliações de risco ou na derivação dos valores de triagem para toxicidade do solo não estão disponíveis, compilados, publicados e acessíveis a população ou essa triagem não foi realizada, tanto, em todo o território nacional, quanto em microrregiões (DOS SANTOS-ARAUJO *et al.*, 2017).

A maioria das pesquisas sobre modelos de transferência solo-planta foi realizada em regiões não tropicais, e poucos estudos focaram nas relações entre as concentrações de metais nos solos e plantas em regiões tropicais úmidas, especialmente no Brasil (DOS

SANTOS-ARAÚJO *et al.*, 2017). São escassos os estudos, no Brasil, que utilizam a avaliação de riscos como procedimento complementar para determinar os impactos da contaminação do solo e da água na saúde humana.

Abordar o impacto indesejável do Cu no ambiente do solo, imobilização, limpeza do solo, métodos de fitorremediação, o uso *in situ* de materiais verdes são frequentemente identificados entre as melhores tecnologias disponíveis para remediar e minimizar a contaminação do solo. (WANG *et al.*, 2019a, 2019b, 2019c).

Fitorremediação é uma tecnologia verde, definida como o uso de plantas para remover, conter ou tornar potenciais contaminantes inofensivos, como metais, metalóides, oligoelementos, compostos orgânicos e inorgânicos no solo ou na água (SHARMA; PANDEY, 2014). Dentre as estratégias de fitorremediação das plantas, a fitoestabilização é o uso de determinadas plantas para estabilização de contaminantes em solos contaminados (CHANEY *et al.*, 1997).

Plantas adequadas para fitorremediação podem ser divididas em dois grupos com base em sua função: hiperacumuladores de metais e produtores de biomassa (ROBINSON *et al.*, 1998; MORENO *et al.*, 2004). Os hiperacumuladores de metais são plantas que exibem níveis mais altos de absorção de íons metálicos em seus tecidos, mas geralmente não produzem uma quantidade alta de biomassa e apresentam uma taxa de crescimento lenta. Sabe-se que as espécies de Brassicaceae possuem capacidades de acumulação de metais muito altas (BELIMOV *et al.*, 2005). Os produtores de biomassa incluem plantas que possuem alta taxa de produção e crescimento de biomassa, embora, a capacidade de absorção e acúmulo de metal seja relativamente baixa (BELIMOV *et al.*, 2005).

Estudos anteriores identificaram várias espécies adequadas para fitorremediação de solos poluídos por metais, mas a maioria são de espécies herbáceas e arbustivas (KOPTSIK, 2014), cuja biomassa final é menor que a das árvores. Além disso, a fitorremediação pode beneficiar a estabilização do solo, a produção de biomassa/biocombustível e o sequestro de carbono, uma vez que muitas espécies de plantas mostram uma excelente capacidade de produzir biomassa e acumular vários poluentes ambientais (AFZAL *et al.*, 2014). Em geral, as plantas tratam terras contaminadas sem destruir o solo superficial, mantendo ou melhorando a utilidade e fertilidade do solo (ALI *et al.*, 2013).

Portanto, é importante identificar espécies arbóreas de rápido crescimento e alta biomassa, capazes de extrair ou fitostabilizar metais em solos poluídos. Embora a fitorremediação com árvores tenha recebido crescente atenção nos últimos anos, como o

uso de salgueiros no Canadá (COURCHESNE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2013; PAJEVIĆ *et al.*, 2016), há pouca informação sobre espécies arbóreas tropicais com potencial para fitorremediação de solos poluídos por metais (CAIRES *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2011), inclusive no Brasil.

Para a fitoestabilização, as plantas são usadas como cobertura de vegetação para não apenas reduzir a mobilidade e a biodisponibilidade contaminantes no ambiente natural, mas também a disponibilidade para entrada na cadeia alimentar humana.

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, é uma planta arbóreo-arbustiva, pioneira na categoria sucessional, exótica, originária da América Central, pertencente à família Mimosaceae. É uma leguminosa que por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* promove a fixação do nitrogênio. Destaca-se como recuperadora de áreas degradadas pela deposição de rejeitos da mineração de Cu, alcançando 2,9 m de altura, aos oito meses de idade, com 100% de sobrevivência (DRUMOND; RIBASKI, 2010).

Chaer *et al.* (2011) descreveram alguns resultados bem-sucedidos no Brasil utilizando espécies de leguminosas, nativas e não nativas, fixadoras de nitrogênio para recuperação de áreas degradadas pela erosão do solo, atividades de construção e mineração, são elas: *A. mangium*, *M. artemisiana*, *M. caesalpiniiifolia*, *P. guachapele*, *A. auriculiformis*, *M. tenuiflora*, *E. contortisiliquum*, *G. sepium*, *Leucaena leucocephala*, e *F. molucanna* (em duas áreas no Rio de Janeiro); *M. tenuiflora*, *M. caesalpiniiifolia*, *P. guachapele*, *C. férrea*, *A. farnesiana*, e a *G. sepium* (Rio Grande do Norte). Foi relatado que em locais onde se acumulam resíduos permanecem por longos períodos com pouca ou nenhuma vegetação e a *L. leucocephala* é uma das plantas utilizadas nessas ações de revegetação (LINS *et al.*, 2006).

As raízes das plantas evitam a erosão pela água, imobilizam metais pesados e evitam a lixiviação. Assim, a fitoestabilização é uma técnica promissora para a estabilização a longo prazo dos rejeitos, criando um limite de vegetação (WANG *et al.*, 2017).

Apesar de todas as características favoráveis, não há estudos caracterizando os aspectos fisiológicos da espécie quanto a contaminação e tolerância a solo contaminado por Cu e o potencial de fitorremediação de *L. leucocephala*, o que pode significar um importante avanço na possibilidade de uso de leguminosas arbóreas para recuperação de áreas impactadas.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a resposta fisiológica de *L. leucocephala* e determinar a tolerância da espécie a solos contaminados por Cu, avaliando, ainda, o efeito na fotossíntese e o potencial fitorremediador.

## 1.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1 Instalação do experimento, caracterização das amostras e delineamento experimental

O solo foi coletado, superficialmente (camada de 0 – 20 cm), de uma propriedade agrícola (17°30'051''S; 50°37'722''a 580 m de elevação) em Rio Verde- GO, centro-oeste do Brasil, uma das regiões responsáveis por grande parte da produção de grãos do país, onde, também, se encontra o bioma Cerrado. O histórico da área é de cultivo de soja e milho nos dois anos anteriores à coleta de solo. Após a coleta, o solo foi destorroado, homogeneizado em betoneira, passado em peneira de 2 mm de abertura de malha e espalhado em lona para secar ao ar.

Duas amostras compostas, cada uma com 10 sub amostras, do solo foram retiradas para a caracterização química (RAIJ, 1991) e classificação textural (EMBRAPA, 2018). O solo em estudo, Latossolo Vermelho Distroférrico, apresenta acidez média e saturação por bases alta (pH 5,38 e V% 59); soma de bases- SB de 71,1 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>, rico em bases trocáveis, especialmente Ca<sup>2+</sup> (51 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), K<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (14,06 e 6 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>); acidez potencial (Al<sup>3+</sup> + H<sup>+</sup>) de 50 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>; com 45,9 g/dm<sup>3</sup> de matéria orgânica; e possui boa capacidade de troca catiônica- CTC (121 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>). De acordo com as características acima, o solo se caracteriza por ter textura muito argilosa, rico em nutrientes (eutrófico), e a CTC deste solo pode reter mais da metade de cátions trocáveis, de acordo com Abreu *et al.* (2001), na camada de 0 – 20 cm.

De acordo com a análise de micronutrientes (RAIJ *et al.* 2001), o solo apresenta altos teores de Mn, Fe e Cu (73,7; 52,3; e 4,4 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente); médio teor de Zn (1,0 mg/dm<sup>3</sup>); e baixo teor de B (0,4 mg/dm<sup>3</sup>). Os altos teores de micronutrientes e matéria orgânica se devem tanto pela intensa atividade agrícola praticada no local anteriormente (rico em nutrientes), quanto pela natureza do solo, com devida atenção ao teor de Cu disponível.

Um volume de solo de 2 dm<sup>3</sup> foi acondicionado em sacos plásticos transparentes e armazenados em casa de vegetação para contaminação artificial do solo. Os níveis de Cu testados foram: 0 (controle), 100, 200, 300, 400 e 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo. As soluções foram preparadas utilizando sulfato de cobre pentahidratado na concentração de 10 g/L.



Os volumes 0, 20, 40, 60, 80 e 100 ml desta solução foram diluídos até formar o volume total de 400 ml de água e adicionado a cada unidade experimental de solo (2 dm<sup>3</sup>). Após esse procedimento, o solo foi homogeneizado manualmente e permaneceu incubado por 15 dias (LIMA *et al.*, 2019), para estabilização do metal ao solo. Após o período de incubação, as amostras de solo compostas foram submetidas a análise química de disponibilidade de cobre, por meio do método de DTPA e leitura por espectrometria de absorção atômica em chamas- AAS (RAIJ *et al.*, 2001), para obter a concentração disponível de Cu, após os tratamentos. O solo foi transferido para sacos de muda com capacidade para 2 dm<sup>3</sup> de solo.

A viabilidade das sementes de *L. leucocephala*, adquiridas comercialmente, foram submetidas ao teste de Tetrazólio, conforme descrito por Brasil (2009). De acordo com o resultado, as sementes do lote adquirido apresentaram 100% de viabilidade para germinação.

As sementes foram selecionadas manualmente e visualmente de acordo com seu vigor para homogeneidade nos parâmetros visíveis. Previamente ao plantio, as sementes foram escarificadas mecanicamente, embebidas em água durante 24 horas e então foram semeadas cinco sementes por unidade experimental. Posteriormente, foi realizado o desbaste e o experimento foi conduzido com uma planta por unidade experimental.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação tendo duração de aproximadamente 120 dias da semeadura a coleta. Para cada um dos seis tratamentos foram utilizadas cinco repetições biológicas compostas por um indivíduo em cada unidade experimental, totalizando 30 unidades experimentais, em delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi realizado em casa de vegetação, sem controle de temperatura e com irrigação controlada, nas dependências do Laboratório de Fisiologia do Metabolismo Vegetal, na UNESP, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira- SP, Brasil, de agosto a novembro de 2018.

### **1.2.2 Avaliação de trocas gasosas**

Para determinação da resposta fotossintética das plantas, foi realizada uma medida de trocas gasosas em cada repetição, ao final de 120 dias, utilizando um analisador portátil de trocas gasosas, CIRAS-3 (Portable Photosynthesis System- PP Systems), de acordo com as condições ambientais. As medidas foram realizadas em folhas completamente desenvolvidas e aparentemente saudáveis, na região da segunda ou terceira folha abaixo do meristema apical, entre as 09:00 e as 12:00 horas da manhã, para todos os tratamentos.

As seguintes configurações para trocas gasosas foram ajustadas: dois folíolos dentro da cubeta universal da folha PLC3 (18 x 25 mm); 390  $\mu\text{mol/mol}^1$  de  $\text{CO}_2$  de referência; 60% de referência de água (umidade); fluxo da cubeta de 300  $\text{cc/min}^1$ ; fluxo do analisador de 100  $\text{cc/min}^1$ ; fonte de luz ambiente; sensor de radiação infravermelho (IR) para medição da temperatura da folha; área foliar de 4,50  $\text{cm}^2$ ; resistência da camada limite de 0,40  $\text{m}^2/\text{s/mol}^1$ ; relação estomacal de 50%; com calibração do sistema auto - zero. Os seguintes parâmetros foram analisados: taxa fotossintética (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}$ ); condutância estomática (gs,  $\text{mol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) e transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ).

### 1.2.3 Coleta e determinação de compostos

Ao final de 120 dias de cultivo foi feita a coleta do material vegetal, separado em parte aérea (folhas e caule) e raízes, lavados em água destilada e secos com papel toalha. Foram mensurados comprimento (cm) do caule e das raízes; e contado o número de folhas completamente desenvolvidas. Determinou-se a massa (g) fresca da parte aérea e das raízes. Todas as medidas de crescimento vegetal foram realizadas de acordo com Benincasa (2003).

As folhas, ainda frescas, foram utilizadas para quantificação de clorofilas (a, b e total) e carotenoides totais. Foi utilizado DMSO para a extração de clorofila e carotenoides e as leituras foram feitas a 645 e 663 nm, para clorofilas e a 480 nm, para carotenoides, de acordo com Hiscox e Israelstam (1979) e Wellburn (1994) respectivamente. Posteriormente, o restante das folhas e raízes foram acondicionadas em sacos de papel e postos para secar em estufa de circulação forçada a 60 °C por 76 horas. Após secos, foram pesados para obtenção da massa (g) seca total e moídos.

### 1.2.4 Determinação do teor de cobre nos tecidos vegetais e no solo

As amostras secas e moídas de folhas e raízes, foram utilizadas para análises de disponibilidade de Cu, dos quais pelo cálculo do acúmulo no remanescente de matéria seca foram mensuradas as taxas de liberação de nutrientes no tempo, conforme metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997): 250 mg do extrato vegetal seco foi digerido em 3 ml de ácido  $\text{HNO}_3$ :  $\text{HClO}_4$  solução (5: 1 v/v) por 12 h. Depois disso, a temperatura do bloco digestor foi aumentada em 50 °C a cada 30 minutos até atingir 200 °C e completou a digestão do material vegetal. O extrato transparente resultante foi ajustado para 25 ml com água milli-Q que foi usada para detectar a concentração de Cu

em um espectrômetro de absorção atômica de chama (FAAS). Esses resultados foram utilizados para os cálculos de fitoextração.

Após o cultivo de *L. leucocephala*, amostras compostas de solo de cada tratamento, foram submetidas a análise química de disponibilidade de Cu, novamente, afim de comparar os teores de Cu disponíveis no solo, e verificar se houve ou não redução do teor de Cu disponível.

### 1.2.5 Determinação do potencial fitorremediador

Utilizando-se os dados de massa e quantidade acumulada de Cu, foram realizados os cálculos para determinação do potencial fitorremediador: índice de tolerância (IT) e índice de translocação (IT%) de acordo com Rahman *et al.* (2013), fator de transferência (FT) de acordo com Lubben e Sauerback (1991). Onde, IT é a biomassa total de cada tratamento/biomassa total do controle; IT% é a concentração de metais pesados da parte aérea/concentração de metais pesados da parte aérea e das raízes, multiplicado por 100 e FT é a concentração de metais pesados nas plantas/concentração de metais pesados na solução do solo.

A partir desses índices, foi determinada a eficiência de remoção (E%) de Cu, dada pela seguinte equação:  $E\% = (QPA/QR) \cdot 100$  (QPA: quantidade acumulada de Cu na parte aérea, em mg/vaso<sup>1</sup> e QR: quantidade acumulada total de Cu a ser extraído do solo, em mg/vaso<sup>1</sup>, de acordo com Jorge *et al.* (2010).

Com os dados da média de Cu e biomassa total seca (raiz e parte aérea), foram calculadas as seguintes equações: (1º) total de metal absorvido por tratamento – TM, em g/kg:  $TM = (MR + MA)/2$  (MR: metal absorvido pela raiz; MA: metal absorvido pela parte aérea, dividido por dois para resultar no TM de uma planta inteira); (2º) acúmulo relativo de metal por tratamento – ART, em g/kg:  $ART = (TM \cdot BS)/E$  (BS: média da biomassa total seca do tratamento em g; E: peso da amostra de extração de 4x que é igual a 1g); (3º) acúmulo relativo de metal por planta, em g/kg:  $ARP = ART/R$  (R: número de repetições). O termo tratamento, utilizado nesses cálculos, é a média das repetições de cada concentração testada, nesse caso, foram utilizadas 5 repetições. Com base nessas equações pôde se calcular o acúmulo relativo de Cu por planta (ARP).

O tempo de remoção - T, em anos, necessário para reduzir em 100% o teor de Cu do solo, foi calculado pela fórmula:  $T = (R/E\%)/NC$  (R: porcentagem de Cu a ser removida do solo, nesse caso foi atribuído em 100%; E%: eficiência de remoção e NC: número de ciclos da cultura (JORGE *et al.* 2010). O percentual de remoção de Cu foi

arbitrado em 100%. Uma vez que a *L. leucocephala* é uma planta arbóreo-arbustiva de ciclo longo, podendo ser cultivada por anos, por isso, nestes cálculos consideramos o NC = 3 anos.

Assim como o cálculo de acúmulo relativo dos metais por planta, o tempo necessário para reduzir 100% dos metais são dados estimativos, para descrever a projeção do potencial fitorremediador da *L. leucocephala* em relação ao excesso de Cu no solo e não sobre a fração total do solo. A concentração total de metais no solo permanece inalterada durante o processo de remediação, mas a biodisponibilidade deles foram substancialmente reduzidas, sendo o foco de estudo.

### 1.2.6 Análise estatística

Foi realizado estudo de outlier antes da análise estatística, afim de retirar os dados discrepantes entre os tratamentos. Os dados foram analisados através do software SISVAR (FERREIRA, 2019). A hipótese da normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk, foi realizada a análise de variância (ANOVA) sendo aplicado o teste F a 5% de probabilidade para detectar as diferenças entre os tratamentos. Quando encontrada diferença significativa para cada variável foi realizada a análise de variância na regressão, sendo o modelo verificado a partir do p-valor do desvio da regressão (não significativo) e os modelos de regressão polinomial selecionados baseados nos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores, dentre as regressões significativas pelo teste F.

## 1.3 RESULTADOS

### 1.3.1 Aspectos fisiológicos

As plantas de *L. leucocephala* cultivadas em solo com excesso de cobre foram coletadas aos 120 dias de cultivo e seu desenvolvimento pode ser observado na Fig. 1.

Houve diferença significativa entre os tratamentos para clorofilas a, b e total, o acúmulo de clorofilas de 0 a 200 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo foi maior (Tabela 1 e Fig. 2). A partir da dose de 300 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, o acúmulo de clorofilas foi baixo devido a concentração alta de cobre no solo (Tabela 1 e Fig. 2). O acúmulo de carotenoides não diferiu estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 1).

A taxa de transpiração (E) e a condutância estomática (gs) diferiram estatisticamente entre os tratamentos, a média dos tratamentos 300 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo foram altos, em relação as doses baixas de cobre. A taxa de fotossíntese líquida (A)

de *L. leucocephala* não apresentou diferença significativa estatisticamente (Tabela 2 e Fig. 3).

Quanto as medidas de crescimento de *L. leucocephala*, número de folhas, comprimento do caule, massa fresca da raiz e da parte aérea e biomassa fresca não apresentaram diferença estatística (Tabelas 3 e 4). Apenas o comprimento da raiz e biomassa seca diferiram estatisticamente entre os tratamentos, evidenciando maior comprimento entre as doses de 200 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo e maior biomassa seca no tratamento de 400 e 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, evidenciado na Fig. 1.

### 1.3.2 Tolerância e potencial fitorremediador

A biodisponibilidade média de Cu no solo, antes e depois do cultivo de *L. leucocephala*, está descrito nas Fig 6. A disponibilidade de Cu, antes e depois do cultivo de *L. leucocephala*, apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. A concentração de Cu no solo, antes do cultivo, foi de: 3,20; 38,50; 65,00; 105,70; 125,5 e 161,12 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, para os tratamentos de 0 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, respectivamente. A concentração de Cu no solo, depois do cultivo, foi de: 2,40; 18,40; 42,60; 62,50; 90,90 e 121,10 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, respectivamente. A diferença entre a disponibilidade inicial e final foram de: 0,80; 20,10; 22,40; 43,20; 34,60 e 40,02 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo. Fica evidente a redução de Cu no solo após o cultivo de *L. leucocephala* de acordo com a Fig. 6.

Com os dados de biomassa acumulada, foi calculado o índice de tolerância- IT de *L. leucocephala* ao Cu. Os índices de tolerância da *L. leucocephala* ao Cu foram: 0,98; 1,16; 1,03; 1,33 e 1,60, de 100 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, respectivamente. De acordo com isso, a *L. leucocephala* é altamente tolerante as doses de 100 a 400 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo. Os valores encontrados para o fator de transferência – FT, solo- planta, de 0 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo foram: 3,91; 0,64; 0,82; 0,36; 0,38 e 0,37, respectivamente. Na Fig. 7 podemos observar o teor (%) de Cu nas raízes e o índice de translocação (IT%) de Cu para a parte aérea. Aproximadamente 80,41% do Cu extraído do solo, foi acumulado nas raízes e 19,59% de Cu foi translocado para a parte aérea de acordo com a Fig. 7.

Com base na biomassa seca das plantas e fator de absorção e teor de Cu acumulado, calculou-se a média do acúmulo relativo de Cu (mg/kg de uma planta) por *L. leucocephala* em cada tratamento (Fig. 8). O acúmulo relativo (mg/kg) de Cu por biomassa seca (mg/kg) de *L. leucocephala* entre os tratamentos de 100 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo foi: 2,00; 4,00; 11,00; 7,00; 11,00 e 17,00 mg Cu/kg de biomassa seca, uma média

de aproximadamente, 50 mg Cu/kg de biomassa, considerando a biomassa média das cinco repetições/tratamento (Fig. 8). A eficiência de remoção (E%) de Cu por *L. leucocephala* não apresentou diferença significativa entre os tratamentos de 100 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, e os valores de E% foram: 31,82; 41,15; 17,98; 19,12 e 25,60%, respectivamente.

Considerando os tratamentos de 100 e 200, o E% foi de aproximadamente 36,49% de Cu removido do solo, e o tempo necessário para remover 100% de Cu seria de nove meses, aproximadamente, com diferenças entre os tratamentos (Fig. 9). O E% de Cu é menor para os tratamentos acima de 300 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo: com cerca de 18,57% de eficiência de remoção de Cu foi removido do solo. O tempo de remoção de Cu no solo nos tratamentos de 300 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo é de aproximadamente um ano e oito meses, de acordo com a Fig. 9.

## 1.4 DISCUSSÃO

### 1.4.1 Aspectos fisiológicos, tolerância e potencial fitorremediador

Danos ao aparato fotossintético, sensível ao Cu, podem refletir alterações no crescimento, ao longo do desenvolvimento. O excesso de Cu pode afetar negativamente o funcionamento dos cloroplastos (SHIKANAI *et al.*, 2003; ABDEL-GHANY *et al.*, 2005) com consequente formação de espécies reativas de oxigênio (SANCENON *et al.*, 2004). Com isso, a determinação do teor de clorofilas nas folhas é um importante parâmetro biológico para a avaliação do estresse das plantas (REHMAN *et al.*, 2019).

Em *Leucaena leucocephala*, o excesso de cobre influenciou no conteúdo de clorofilas, com redução a partir do tratamento de 300 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo e esses dados diferem dos resultados encontrados por Hammerschmitt *et al.* (2020), os quais não apresentaram diferenças significativas observada para clorofila *a*, *b* e total, nas folhas de pêssogo, *Prunus salicina* Lindl, (cv. Genovesa), com adição de cobre e zinco no solo. Este efeito negativo, no acúmulo de clorofilas, não é percebido no conteúdo de carotenoides, o mesmo relatado por Hammerschmitt *et al.* (2020).

Altas concentrações de Cu, nas folhas podem ser tóxicas, interrompendo o transporte de elétrons entre os fotossistemas, resultando em um fluxo de elétrons reduzido, conforme descrito para as folhas de *Nicotiana tabacum*, (cv. John Williams Broadleaf) por (BURDA *et al.*, 2003).

Estudos anteriores mostraram que altas concentrações de Cu (> 20 mg/l) inibem o processo fotossintético (LIDON; HENRIQUES, 1991; BIBI; HUSSAIN, 2005;

VASSILEV *et al.*, 2002), entretanto, a taxa fotossintética de *L. leucocephala* não diferiu estatisticamente entre os tratamentos de Cu, resultado semelhante ao de *L. monopetalum*, a níveis excessivos de Cu de até 15 mmol/l (1.000 mg Cu/l) (CAMBROLLÉ *et al.*, 2013).

Foram observadas algumas respostas a toxicidade de Cu nas plantas de milho, cultivadas com altas concentrações de Cu no solo (150 mg Cu/kg), tais como o fechamento estomático e a redução da condutância estomática (PAULA *et al.*, 2015), assim como, menor densidade e menor tamanho dos estômatos, além de diferenças estruturais nos lados adaxial e abaxial (SAGARDOY *et al.*, 2010). A redução da transpiração e a diminuição do número dos estômatos ocasiona e diminui a perda de água para a atmosfera em plantas sujeitas à aplicação de altas doses de Cu no solo, devido à diminuição da condutância estomática (PAULA *et al.*, 2015).

No entanto, a média da condutância estomática e da transpiração, em *L. leucocephala*, diferiram entre si (Fig. 3). O acúmulo de clorofilas e a taxa de transpiração de *L. leucocephala* diminuiu com o aumento das doses de Cu ( $> 300 \text{ mg/dm}^3$ ) e a taxa de condutância estomática aumentou. Embora o excesso de Cu tenha diminuído o acúmulo de clorofilas e a taxa de transpiração, a taxa de fotossíntese líquida não foi afetada, portanto, o excesso de Cu ( $> 300 \text{ mg/dm}^3$ ) parece não afetar diretamente o processo fotossintético.

Marques *et al.* (2019) avaliaram o desenvolvimento de *P. dubium* (Caesalpinioideae), arbórea nativa do Brasil, sob os tratamentos 0 (controle), 100, 200 e 400 mg/kg de cobre (sulfato de cobre). Plantas com 150 dias foram transplantadas para vaso de solo que posteriormente foram contaminados com os respectivos tratamentos de cobre. As medidas de trocas gasosas foram avaliadas aos 15 e 120 dias de cultivo (plantas com 165 e 270 dias), respectivamente, e as medidas de crescimento foram avaliados aos 120 dias após a aplicação do Cu.

Segundo Marques *et al.* 2019, o excesso de Cu no solo, após 15 dias de cultivo, afetou negativamente a taxa de fotossíntese líquida e a transpiração de *P. dubium* sob os tratamentos de 200 e 400 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, resultado semelhante Yruela, 2005. No entanto, após 120 dias de cultivo, não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros, acima. No presente estudo, essas mesmas doses de Cu no solo não interferiram na taxa de fotossíntese líquida, aos 120 dias de cultivo, expostos ao excesso de Cu no solo.

Os principais sintomas do excesso de Cu nos tecidos das plantas são o aumento da espessura das folhas, a diminuição da superfície das folhas e o dobramento das folhas,

resultando em perdas consideráveis no rendimento das culturas (PANOU-FILOTHEOU *et al.*, 2001). Outros autores relatam que as plantas que sofrem com a toxicidade do Cu parecem atrofiadas, com coloração azulada, e eventualmente amareladas ou amarronzadas (REHMAN *et al.*, 2019). No entanto, não foram observados quaisquer desses sintomas de fitotoxicidade em *L. leucocephala* (Fig. 1).

A redução da produção de biomassa da planta é uma resposta comum em plantas cultivadas em solo com excesso de Cu, essas plantas apresentaram redução significativa na sua biomassa, por exemplo em *Brassica napus* L (PIETRZAK; UREN, 2011; LI *et al.*, 2018). Há relatos de redução na massa seca das plantas de *Festuca arundinacea* L. e *Lolium perene* expostas ao estresse por Cu, redução do crescimento da parte aérea e de raízes em *Arabidopsis thaliana* L. (ZHAO *et al.*, 2010; KOLBERT *et al.*, 2012).

O excesso de Cu resultou no crescimento inibido das plantas e no comprometimento dos processos celulares, por exemplo, transporte de elétrons fotossintéticos relatados por Yruela 2005, por exemplo, *P. dubium*, apresentou redução significativa no crescimento/biomassa em solo com excesso de Cu (MARQUES *et al.*, 2019).

Ao contrário dos resultados de *P. dubium*, relatados por Marques *et al.*, 2019, não houve redução de biomassa, o desenvolvimento foi uniforme e isso demonstra que o excesso de cobre não afeta negativamente os parâmetros de crescimento e acúmulo de biomassa em *L. leucocephala*. O caule apresentou 19 cm de altura, com 8 folhas completamente desenvolvidas, e 4,99 g de biomassa fresca em média, sem diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 3 e 4).

As raízes de *L. leucocephala* atingiram/percorreram todo o perfil do solo em vaso, e de acordo com os dados, houve maior comprimento de raízes nos tratamentos a partir de 200 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, principalmente nos tratamentos de 400 e 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, assim como, para biomassa seca (Tabela 3 e 4, Fig. 4 e 5). Entretanto, o volume, comprimento e biomassa de raízes de *P. dubium*, foram severamente comprometidas devido ao excesso de Cu (MARQUES *et al.*, 2019).

Diferentemente, dos relatos acima, no geral, houve incremento de biomassa (g) nos tratamentos de 400 e 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo em relação ao tratamento de 100 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, para comprimento da raiz e biomassa seca (Tabelas 2 e 3 e Fig. 5 e 6). O aumento da produção de biomassa é uma resposta importante ao desenvolvimento de *L. leucocephala* exposta a concentrações excessivas de Cu, embora o conteúdo de clorofilas e a taxa de transpiração tenham diminuído, isto é, o excesso de Cu presente no solo parece não afetar diretamente o processo fotossintético e a fixação de carbono.



A biodisponibilidade de nutrientes e metais no solo pode mudar em uma área de acordo com as variações locais de pH e a capacidade de acidificação das plantas (MARSCHNER *et al.*, 1986). Houve uma pequena variação de pH no solo, antes do cultivo, o pH foi de 5,38 e após o cultivo de *L. leucocephala* o pH do solo aumentou para 6,2, mas dentro da faixa ideal de pH para disponibilidade de Cu, isto é, não houve acidificação do solo, de acordo com Malavolta *et al.* (1997). A biodisponibilidade de Cu no solo não foi afetada pela acidificação do solo.

As concentrações tóxicas de cobre para as plantas são ainda pouco conhecidas, alvo de discussão, porém são concentrações variadas, para espécies arbóreas tropicais nativas não cultivadas. De acordo com Raij *et al.* (2001), são consideradas concentrações excessivas de Cu, potencialmente tóxicas, os teores superiores a 10,00 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo. Teores de 0,00 a 10,00 mg/dm<sup>3</sup> no solo são concentrações adequadas/normais de Cu no solo (RAIJ *et al.*, 2001).

Outros autores consideram que acima de 100 mg Cu/kg de solo são considerados tóxicos para a maioria das plantas (SILVA *et al.*, 2011; ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000) e podem causar uma redução no desenvolvimento das plantas. Concentrações de cobre no solo, variando de 40 mg/kg para solo arenoso e 100 mg/kg para solo argiloso tem sido considerada tóxicas para as plantas de acordo com Accioly e Siqueira, 2000.

A alta disponibilidade de Cu no solo, antes e depois do cultivo das plantas (100 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo) são consideradas concentrações de Cu excessivas no solo (Fig. 6) de acordo com Raij *et al.* (2001). No entanto, segundo Silva *et al.*, 2011; Accioly e Siqueira, 2000, os tratamentos acima de 300 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, antes do cultivo, apresentam disponibilidade de Cu, superior a 100 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo, isto é, concentração excessiva, igualmente para o tratamento 500, depois do cultivo de *L. leucocephala*.

Marques *et al.* (2019), detectaram valores de 24, 45 e 86 mg Cu/kg entre os tratamentos de 100, 200 e 400 mg Cu/kg de solo, respectivamente, indicando que, em média, 21% de Cu foi reduzido. No presente trabalho, as concentrações de Cu, após o cultivo de *L. leucocephala* para os mesmos tratamentos foram: 18,4; 42,6; e 90,9 mg Cu/dm<sup>3</sup> de solo e a diferença de Cu no solo foi de 25,92% de redução. E considerando os tratamentos acima de 100 resultou em 32,33% de redução de Cu no solo.

A partir dos dados de biomassa acumulada, pode-se calcular o índice de tolerância de *L. leucocephala* ao Cu. A classificação de tolerante ou não se baseia nos seguintes parâmetros: (a) 0- 0.5: não tolerante; (b) 0.5-1.0: tolerante de acordo com Jia *et al.* (2017), sendo assim, a *L. leucocephala* é tolerante as doses de Cu testadas. A tolerância ao Cu

pode ser atribuída à capacidade da planta em acumular metal em suas raízes e impedir a translocação para as folhas, conforme proposto por Cambrollé *et al.* (2013). A *L. leucocephala* demonstrou uma alta tolerância ao excesso de Cu, como indicado por várias avaliações (medidas de crescimento e trocas gasosas) comumente usadas de limiares de toxicidade de metais.

Plantas que se desenvolvem em solos contaminados adaptam mecanismos de tolerância, os quais vão da exclusão de metais (não absorção) ao sequestro de metais em tecidos específicos (VIEHWEGER, 2014). *L. leucocephala* se desenvolveu, desde a germinação, em solo já contaminado com os tratamentos de Cu e além de sua alta tolerância, teve um crescimento aumentado, sob concentrações excessivas de Cu, com consequente maior produção de biomassa (Fig. 5), devido a adaptação de seus mecanismos.

*P. dubium* (MARQUES *et al.*, 2019) foi transplantada (com 150 dias de idade) para o solo contaminado, e aos 15 dias expostas ao Cu não foi suficiente para adaptar seus mecanismos de tolerância, e isso explica o fato de a taxa de fotossíntese líquida ter diminuído significativamente nos tratamentos de 200 e 400 mg Cu/kg de solo (MARQUES *et al.*, 2019). Entretanto, após 120 dias de cultivo fez-se uma nova análise e os parâmetros fotossintéticos não foram afetados, indicando um período de adaptação e tolerância ao Cu.

Pesquisas recentes investigaram o mecanismo de transferência solo-raiz-folha de metais pesados (YIN *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2016). O fator de transferência - FT indica a capacidade de uma planta de translocar ou transferir metais de suas raízes para sua parte aérea. O valor de FT menor que 1, indica que o metal foi acumulado nas raízes das plantas e valores maiores de FT indicam translocação do metal para a parte aérea da planta (ESRINGÜ *et al.*, 2014). Os valores de FT em *L. leucocephala*, indicam que o Cu é acumulado, nas raízes.

Além de restringir o transporte de metais para as folhas, as plantas apresentam uma variedade de mecanismos diferentes para se protegerem contra o estresse causado por metais pesados. Tais mecanismos incluem compartimentalização e sequestro subcelular, concentrando efetivamente o metal no sistema radicular da planta (HALL, 2002). A diminuição do transporte de Cu para a parte aérea é importante devido aos efeitos tóxicos do excesso de concentração do metal nas folhas, o que pode causar graves danos ultraestruturais e no aparato fotossintético (DE FREITAS *et al.*, 2015).

Segundo o IT% de *L. leucocephala*, aproximadamente, 19,60% do Cu foi translocado para a parte aérea (100 a 500 mg Cu/dm<sup>3</sup>), e 80,41% do teor de Cu no solo foi absorvido e acumulado nas raízes (Fig. 7), resultado semelhante descrito por Lins *et al.* (2006) e por Tiecher *et al.* (2017), em que mais de 80% do cobre e zinco absorvido pelas plantas foram acumulados nas raízes das plantas de videira. Yang *et al.* (2011) relataram, também, maior acúmulo de metais em raízes (órgãos menos sensíveis, como estratégia de sobrevivência, enquanto, nas folhas (órgãos mais sensíveis, com aparato fotossintético), os teores de metais eram menores. De acordo com o FT e o IT% a *L. leucocephala* acumula Cu no sistema radicular, indicando uma estratégia de fitoestabilização de Cu.

Altas concentrações de Cu no solo reduz significativamente a produtividade das plantas e o rendimento das culturas (RIZWAN *et al.*, 2016) e o efeito negativo da toxicidade do Cu é, principalmente, no crescimento e na morfologia das raízes, porque o Cu é absorvido e acumulado nas raízes, dificilmente translocado para parte aérea da planta (REHMAN *et al.*, 2019). No entanto, não foram observados sintomas de toxicidade de Cu nas raízes, tampouco redução da arquitetura radicular de *L. leucocephala*, possivelmente, devido a estratégia de compartimentalização de Cu no tecido radicular.

Podem haver diferentes características de absorção nas plantas, tanto absorção e acúmulo das raízes quanto para a parte aérea, devido à variabilidade genética das espécies vegetais (DUDKA; MILLER, 1999). Modelos mecanicistas, equações que preveem concentrações de metais pesados acumuladas nas plantas ainda não foram suficientemente desenvolvidas, muito menos validados em condições de campo (SWARTJES, 2011).

Pode-se concluir que com o aumento da biomassa (mg/kg) de *L. leucocephala*, também, aumenta a absorção e o acúmulo de Cu nos tecidos das plantas (Fig. 8). Esse tempo de remoção foi calculado com base nos dados de biomassa produzida por *L. leucocephala* em aproximadamente 120 dias, isto é, estágio de plântula ainda. Com maior tempo de cultivo, mais biomassa será produzida e, portanto, mais Cu poderá ser absorvido.

Algumas espécies de plantas podem regular a biodisponibilidade dos metais no solo (MURRAY *et al.*, 2009) e reduzir a biodisponibilidade na zona da raiz (DE VRIES *et al.*, 2007). Algumas espécies de plantas acumulam grandes quantidades de metais, sendo extremamente tolerantes a um certo contaminante no solo e outras apresentam alta

tolerância, mas acumulam baixas concentrações de metal em seus tecidos (SWARTJES *et al.*, 2007).

Comparando a idade das arbóreas, *L. leucocephala* e *P. dubium* (120 e 270 dias), tempo de cultivo exposto ao metal (120 dias), cultivadas sob os mesmos tratamentos, pode se considerar que *L. leucocephala* tem maior tolerância e capacidade de absorção e acúmulo de Cu em seus tecidos, com alta produção de biomassa, do que *P. dubium* (MARQUES *et al.*, 2019). Devido aos resultados encontrados *L. leucocephala* é tolerante as doses de Cu, e tem potencial para absorção e acúmulo de Cu, ou seja, apresenta potencial para a fitoestabilização de Cu no solo.

#### **1.4.2 Perspectivas para o estudo de espécies leguminosas com alta produção de biomassa na fitorremediação de elementos potencialmente tóxicos**

Estudos realizados em áreas contaminadas por metais pesados indicam (ou sugerem) que árvores, especialmente as leguminosas ou pioneiras têm maiores taxas de sobrevivência nesses locais, pois se desenvolvem em ambientes de sucessão precocemente (MALMER, 2007, MENGE; CHAZDON, 2016), como é o caso de *L. leucocephala*. Alguns exemplos de gêneros das espécies arbóreas mencionadas são: *Albizia* (SINGH *et al.*, 2004; GREIPSSON, 2011), *Senegalia* e *Leucaena* (MENSAH, 2015). Além disso, é importante entender as respostas morfofisiológicas das plantas expostas a metais pesados para a seleção e identificação de espécies em potencial que possam ser utilizadas na recuperação de áreas contaminadas (MARQUES *et al.*, 2019).

De acordo com Asensio, *et al.* (2019), árvores nativas brasileiras, como *Myracrodruon urundeuva* (aroeira) ou *Cedrela fissilis* (cedro rosa) apresentaram capacidade de imobilizar o Cu, e ambas têm potencial para atuar como fitoextratora e fitoestabilizadora de Cu em solos contaminados.

A seleção das espécies de plantas apropriadas para absorção e acúmulo de metais pesados é uma das considerações mais importantes no processo de fitorremediação. As espécies devem ser capazes de tolerar altos níveis de metal e condições extremas do solo, como alta acidez, salinidade ou alcalinidade (WU *et al.*, 2013). As plantas para revegetação devem ter outros atributos favoráveis, como sistemas densos de enraizamento, taxas de crescimento relativamente rápidas e alta produção de biomassa (MARQUES *et al.*, 2009).

A *L. leucocephala* apresenta tais atributos; no entanto, as plantas consideradas apropriadas precisam ter capacidade de absorver e acumular um teor considerável de

metal em seus tecidos, o que pode ser constatado em *L. leucocephala*, uma vez que houve acúmulo de uma considerável concentração de Cu em suas raízes.

A *L. leucocephala* é tolerante até 500 mg/dm<sup>3</sup> solo de Cu e por isso pode ser cultivada em áreas contaminadas por Cu para remediação do solo e reestabelecimento vegetal do local, enriquecimento e melhoria das condições dos solos, sombra para cultivos, controle de erosão, alimentação animal e produção de energia (lenha e carvão). A espécie associa-se simbioticamente com bactérias do gênero *Rhizobium*, que fixam até 500 a 600 kg/ha<sup>1</sup>/ano<sup>1</sup> de nitrogênio (DRUMOND; RIBASKI, 2010).

Também apresenta potencial para ser usada como forrageira, os frutos, a folhagem e os ramos delgados verdes ou fenados são utilizados na dieta de bovinos, caprinos, porcos e outros animais domésticos. A quantidade de proteína bruta nas folhas está em torno de 20%, sendo que a folhagem e os frutos mais novos chegam a apresentar teores de até 35% (DRUMOND; RIBASKI, 2010), o que possibilita indicar a espécie como fitoestabilizadora de Cu, com potencial uso no restabelecimento vegetacional ou ocupação de áreas contaminadas.

## 1.5 CONCLUSÃO

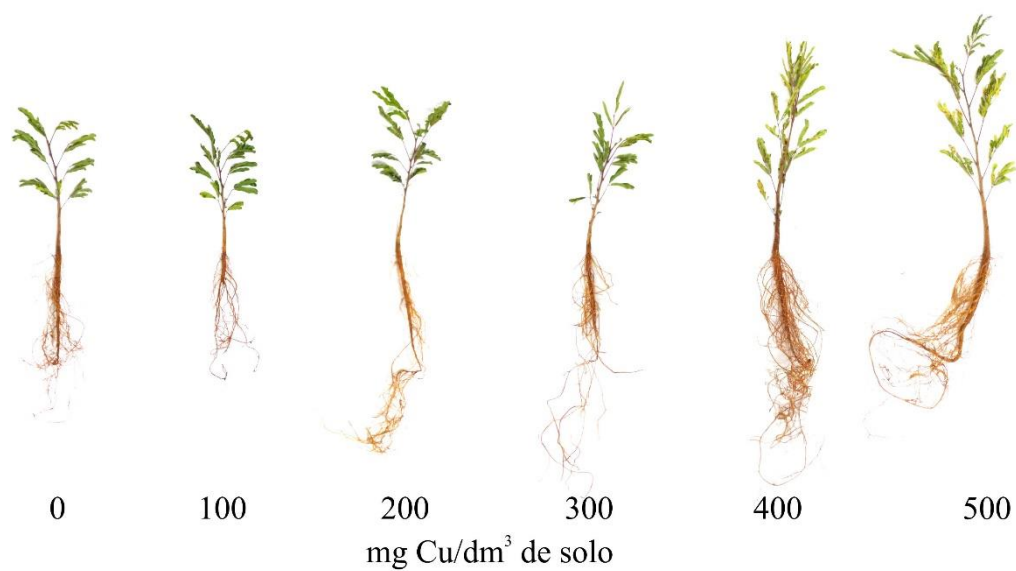
*Leucaena leucocephala* apresenta elevada tolerância ao cobre (100 a 500 mg/dm<sup>3</sup> solo), o qual foi absorvido e acumulado majoritariamente no sistema radicular. Os tratamentos acima de 200 mg Cu/dm<sup>3</sup> solo evidenciaram efeito nutricional, com incremento de biomassa em *L. leucocephala* fator importante para a fitorremediação de metais potencialmente tóxicos.

Considerando-se o tempo de cultivo e a biomassa produzida, podemos inferir que ao longo do ciclo de vida há potencial para remoção de mais de 40% do cobre disponível no solo, o qual, pode ser absorvido e acumulado no sistema radicular pela *L. leucocephala*; caracterizando a espécie como fitoestabilizadora de cobre do solo.

A *L. leucocephala*, também, pode ser útil para revegetação (pioneira) e melhoria da qualidade do solo (leguminosa) de uma área degradada por cobre e ser explorada para produção de forragem para os animais, já que suas folhas não acumulam teores elevados de cobre, além disso, possui ampla distribuição geográfica, podendo ser cultivada em muitas regiões do mundo.

## 1.6 FIGURAS E TABELAS

**Figura 1** - Visão geral de plântulas de *Leucaena leucocephala* cultivadas em seis concentrações de cobre: 0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo, respectivamente, em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

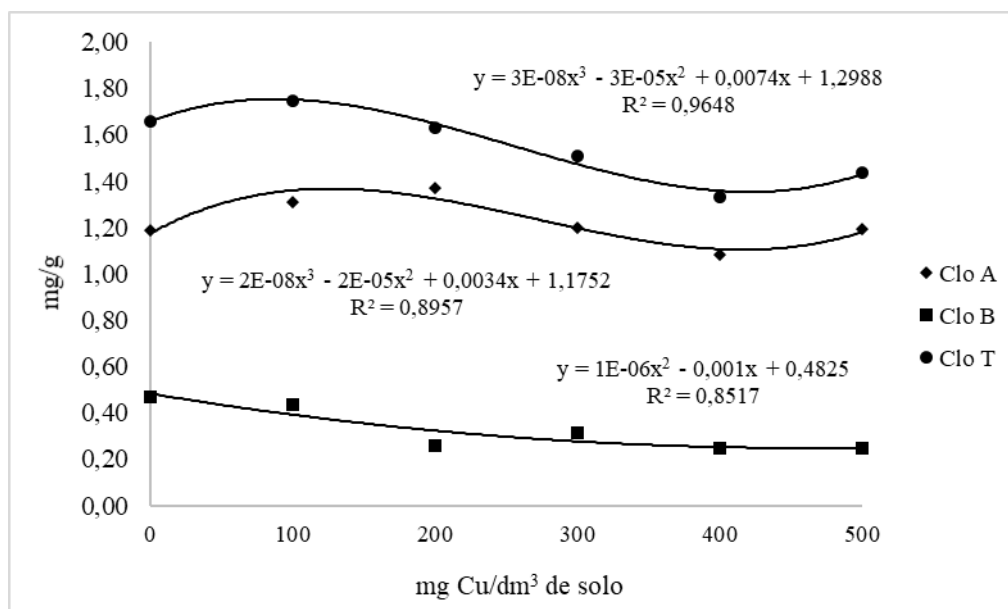
**Tabela 1** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para a quantificação das variáveis: Clorofila *a*, *b*, *total*; e carotenoides (mg/g de massa fresca) em folhas de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por cobre (mg/dm<sup>3</sup> de solo). Número de observações: 30

| Quadrado médio dos tratamentos de cobre em <i>Leucaena leucocephala</i> |               |             |                 |                      |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|-----------------|----------------------|
| FV                                                                      | Clorofila A   | Clorofila B | Clorofila Total | Carotenoides         |
| Tratamentos                                                             | 0,0053*       | 0,0002**    | 0,0000**        | 0,9878 <sup>ns</sup> |
| Média                                                                   | 1,22 ± 0,02   | 0,33 ± 0,02 | 1,55 ± 0,03     | 34,04 ± 0,84         |
| CV (%)                                                                  | 8,77          | 24,89       | 6,66            | 12,75                |
| Cu (mg/dm <sup>3</sup> de solo)                                         | Médias (mg/g) |             |                 |                      |
| 0                                                                       | 1,19 ± 0,03   | 0,47 ± 0,05 | 1,66 ± 0,04     | 36,79 ± 2,44         |
| 100                                                                     | 1,31 ± 0,09   | 0,44 ± 0,05 | 1,75 ± 0,08     | 36,54 ± 1,89         |
| 200                                                                     | 1,37 ± 0,03   | 0,26 ± 0,03 | 1,63 ± 0,04     | 35,06 ± 0,79         |
| 300                                                                     | 1,20 ± 0,06   | 0,31 ± 0,03 | 1,51 ± 0,02     | 33,54 ± 2,17         |
| 400                                                                     | 1,08 ± 0,02   | 0,25 ± 0,02 | 1,33 ± 0,03     | 30,77 ± 1,93         |
| 500                                                                     | 1,19 ± 0,03   | 0,25 ± 0,03 | 1,44 ± 0,05     | 31,54 ± 2,00         |
| Regressão p valor                                                       |               |             |                 |                      |
| Linear                                                                  | 0,0053        | 0,0002      | 0,0000          | 0,9878               |
| Quadrática                                                              | 0,0053        | 0,0002      | 0,0000          | -                    |
| Cúbica                                                                  | 0,0053        | 0,0002      | 0,0000          | -                    |
| Desvio da regressão                                                     | 0,342         | 0,075       | 0,548           | 0,971                |

Nota: FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*: diferença significativa a 5%; \*\*: diferença significativa a 1%; <sup>ns</sup>: não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

**Figura 2** - Quantificação de Clorofila *a*, *b* e *total* (mg/g de massa fresca) em folhas de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

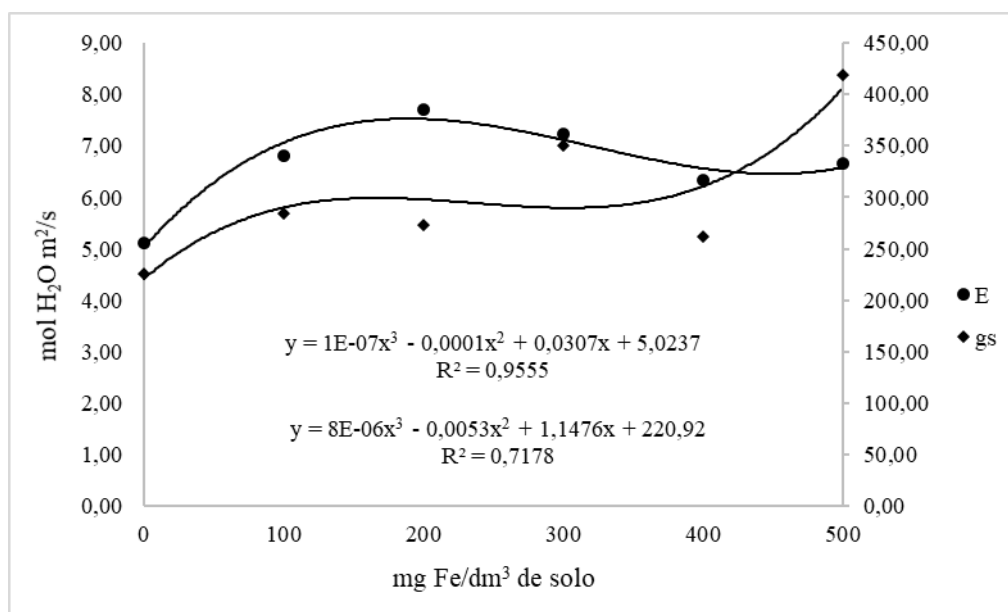
**Tabela 2** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para trocas gasosas: taxa fotossintética (A:  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}$ ); transpiração (E:  $\text{mmol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ); condutância estomática (gs:  $\text{mol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por cobre ( $\text{mg/dm}^3$  de solo). Número de observações: 30

| Quadrado médio dos tratamentos de cobre em <i>Leucaena leucocephala</i> |                                                    |                                                 |                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| FV                                                                      | A<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}$ ) | E<br>( $\text{mmol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) | gs<br>( $\text{mol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) |
| Tratamentos                                                             | 0,9205 <sup>ns</sup>                               | 0,0401*                                         | 0,0016**                                        |
| Média                                                                   | 28,91 $\pm$ 0,27                                   | 6,64 $\pm$ 0,25                                 | 302,43 $\pm$ 16,26                              |
| CV (%)                                                                  | 5,47                                               | 17,98                                           | 22,07                                           |
| Cu ( $\text{mg/dm}^3$ de solo)                                          | Médias                                             |                                                 |                                                 |
| 0                                                                       | 5,47 $\pm$ 0,71                                    | 5,11 $\pm$ 0,62                                 | 225,60 $\pm$ 38,81                              |
| 100                                                                     | 5,36 $\pm$ 0,27                                    | 6,81 $\pm$ 0,55                                 | 284,60 $\pm$ 17,50                              |
| 200                                                                     | 5,03 $\pm$ 1,01                                    | 7,71 $\pm$ 0,62                                 | 272,80 $\pm$ 32,98                              |
| 300                                                                     | 6,16 $\pm$ 0,85                                    | 7,24 $\pm$ 0,53                                 | 350,80 $\pm$ 23,22                              |
| 400                                                                     | 5,36 $\pm$ 0,62                                    | 6,34 $\pm$ 0,35                                 | 262,00 $\pm$ 18,71                              |
| 500                                                                     | 5,45 $\pm$ 0,54                                    | 6,65 $\pm$ 0,48                                 | 418,80 $\pm$ 39,49                              |
| Regressão p valor                                                       |                                                    |                                                 |                                                 |
| Linear                                                                  | 0,9205                                             | 0,0401                                          | 0,0016                                          |
| Quadrática                                                              | -                                                  | 0,0401                                          | 0,0016                                          |
| Cúbica                                                                  | -                                                  | 0,0401                                          | 0,0016                                          |
| Desvio da regressão                                                     | -                                                  | 0,736                                           | 0,034                                           |

Nota: FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*\*: diferença significativa a 1%; <sup>ns</sup>: não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

**Figura 3** - Quantificação da taxa de transpiração (E) e condutância estomática (gs), ( $\text{mol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ), em folhas de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg/dm}^3$  de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.



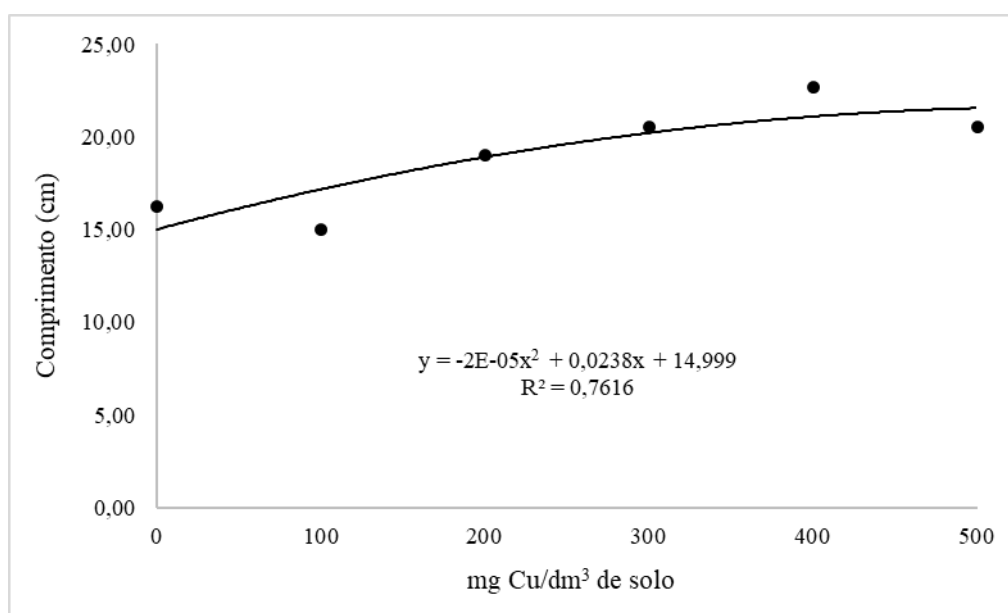
**Tabela 3** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para medidas de crescimento: número de folhas; comprimento do caule e da raiz (cm); massa fresca do caule e da raiz (g) de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por cobre (mg/dm<sup>3</sup> de solo). Número de observações: 30.

| Quadrado médio dos tratamentos de cobre em <i>Leucaena leucocephala</i> |                      |                           |                          |                          |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| FV                                                                      | Número de folhas     | Comprimento do caule (cm) | Comprimento da raiz (cm) | Massa fresca da raiz (g) | Massa fresca da parte aérea (g) |
| Tratamentos                                                             | 0,0570 <sup>ns</sup> | 0,3105 <sup>ns</sup>      | 0,0174*                  | 0,6110 <sup>ns</sup>     | 0,5010 <sup>ns</sup>            |
| Média                                                                   | 7,86 ± 0,28          | 12,22 ± 0,34              | 18,99 ± 0,76             | 2,61 ± 0,16              | 2,39 ± 0,08                     |
| CV (%)                                                                  | 17,65                | 15,03                     | 18,32                    | 33,47                    | 19,09                           |
| Cu (mg/dm <sup>3</sup> de solo)                                         | Médias               |                           |                          |                          |                                 |
| 0                                                                       | 7,25 ± 0,86          | 11,02 ± 1,11              | 16,24 ± 1,50             | 2,59 ± 0,36              | 2,34 ± 0,32                     |
| 100                                                                     | 8,25 ± 0,37          | 12,90 ± 0,90              | 15,00 ± 1,96             | 2,04 ± 0,27              | 2,09 ± 0,08                     |
| 200                                                                     | 6,64 ± 0,18          | 12,62 ± 0,48              | 19,00 ± 1,04             | 2,72 ± 0,49              | 2,50 ± 0,19                     |
| 300                                                                     | 8,00 ± 0,32          | 11,22 ± 0,69              | 20,50 ± 2,04             | 2,47 ± 0,39              | 2,25 ± 0,12                     |
| 400                                                                     | 9,50 ± 0,92          | 12,25 ± 1,03              | 22,68 ± 1,53             | 2,81 ± 0,42              | 2,52 ± 0,29                     |
| 500                                                                     | 7,50 ± 0,67          | 13,32 ± 0,49              | 20,50 ± 0,94             | 3,00 ± 0,37              | 2,61 ± 0,09                     |
| Regressão p valor                                                       |                      |                           |                          |                          |                                 |
| Linear                                                                  | 0,0570               | 0,3105                    | 0,0174                   | 0,6110                   | 0,5010                          |
| Quadrática                                                              | -                    | -                         | 0,0174                   | -                        | -                               |
| Desvio da regressão                                                     | -                    | -                         | -                        | -                        | -                               |

Nota: FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*: diferença significativa a 5%; \*\*: diferença significativa a 1%; <sup>ns</sup>: não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

**Figura 4** - Comprimento (cm) de raiz de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

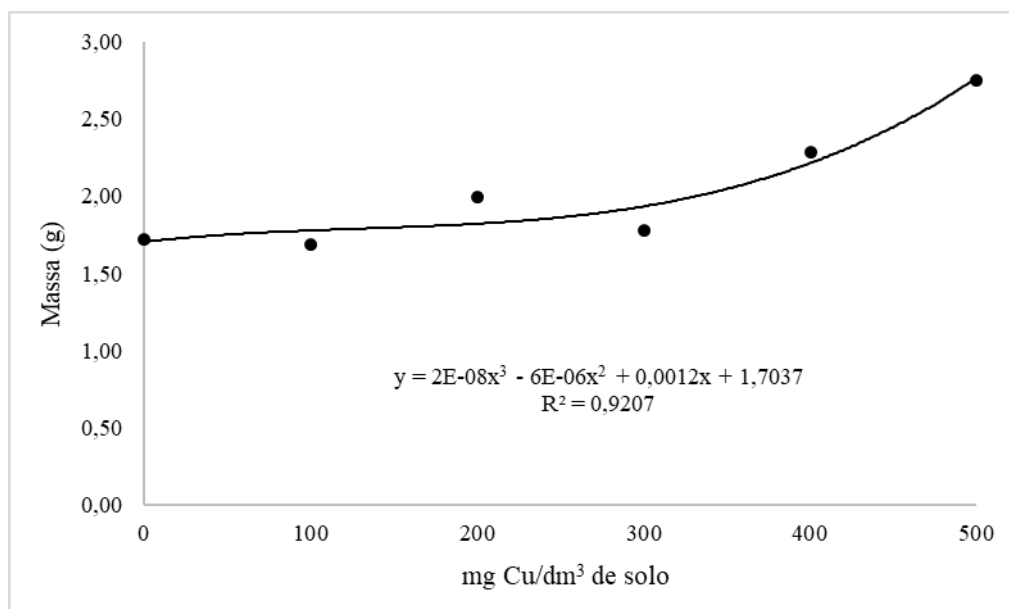
**Tabela 4** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para a biomassa (g) fresca e seca de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por cobre (mg/dm<sup>3</sup> de solo). Número de observações: 30

| Quadrado médio dos tratamentos de cobre em <i>Leucaena leucocephala</i> |                      |               |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------|
| FV                                                                      | Biomassa Fresca      | Biomassa Seca |
| Tratamentos                                                             | 0,4698 <sup>ns</sup> | 0,0454*       |
| Média                                                                   | 4,99 ± 0,22          | 2,04 ± 0,12   |
| CV (%)                                                                  | 24,05                | 27,90         |
| Cu (mg/dm <sup>3</sup> de solo)                                         | Médias (g)           |               |
| 0                                                                       | 4,93 ± 0,62          | 1,72 ± 0,31   |
| 100                                                                     | 4,13 ± 0,34          | 1,68 ± 0,20   |
| 200                                                                     | 5,22 ± 0,67          | 1,99 ± 0,30   |
| 300                                                                     | 4,73 ± 0,50          | 1,78 ± 0,17   |
| 400                                                                     | 5,33 ± 0,59          | 2,28 ± 0,28   |
| 500                                                                     | 5,61 ± 0,43          | 2,75 ± 0,24   |
| Regressão p valor                                                       |                      |               |
| Linear                                                                  | 0,4698               | 0,0454        |
| Quadrática                                                              | -                    | 0,0454        |
| Cúbica                                                                  | -                    | 0,0454        |
| Desvio da regressão                                                     | -                    | 0,624         |

Nota: FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*\*: significativo a 1% de probabilidade.

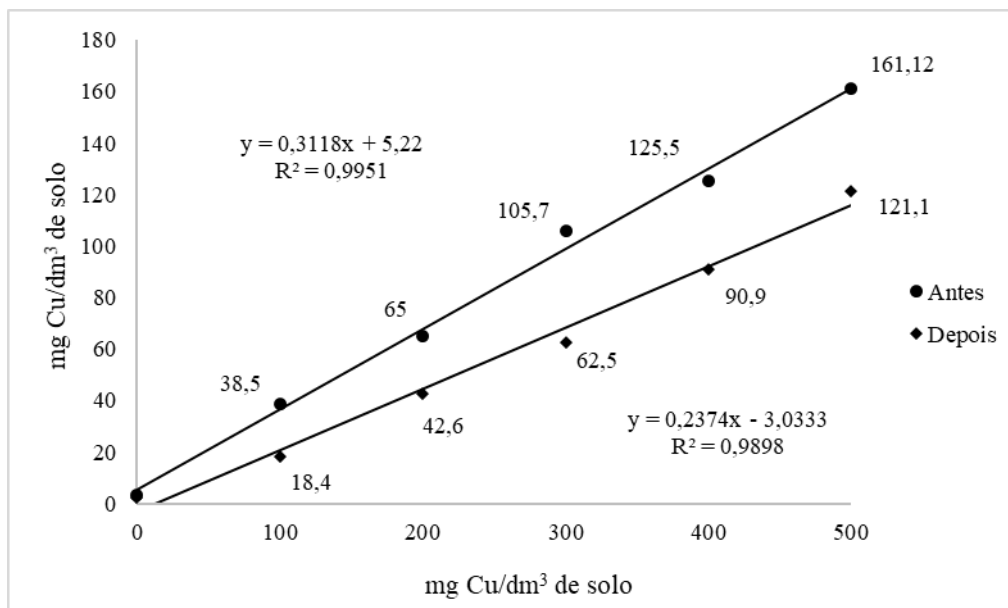
Fonte: Próprio autor.

**Figura 5** - Quantificação da biomassa total seca, em gramas, de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



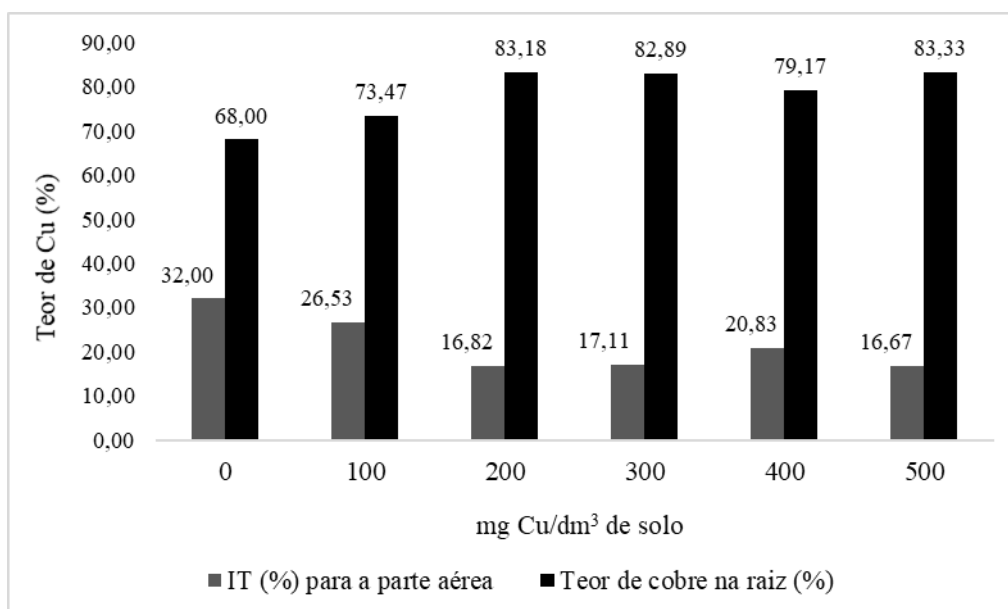
Fonte: Próprio autor.

**Figura 6** - Disponibilidade de cobre no solo ( $\text{mg/dm}^3$  de solo), antes e depois, do cultivo de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg/dm}^3$  de solo) em casa de vegetação



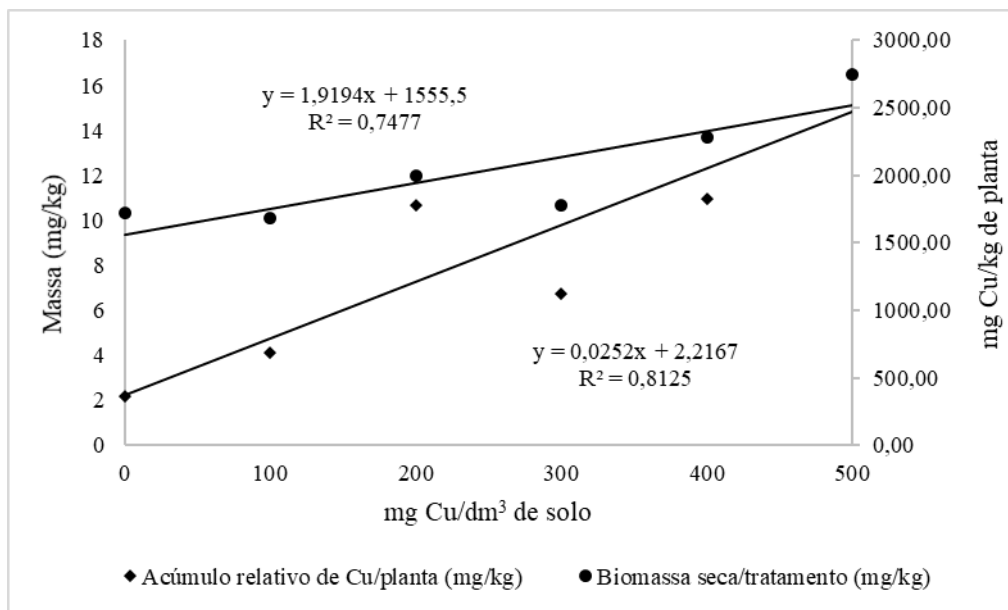
Fonte: Próprio autor.

**Figura 7** - Teor (%) de cobre na raiz e índice de translocação (IT%) para a parte aérea de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg/dm}^3$  de solo) em casa de vegetação



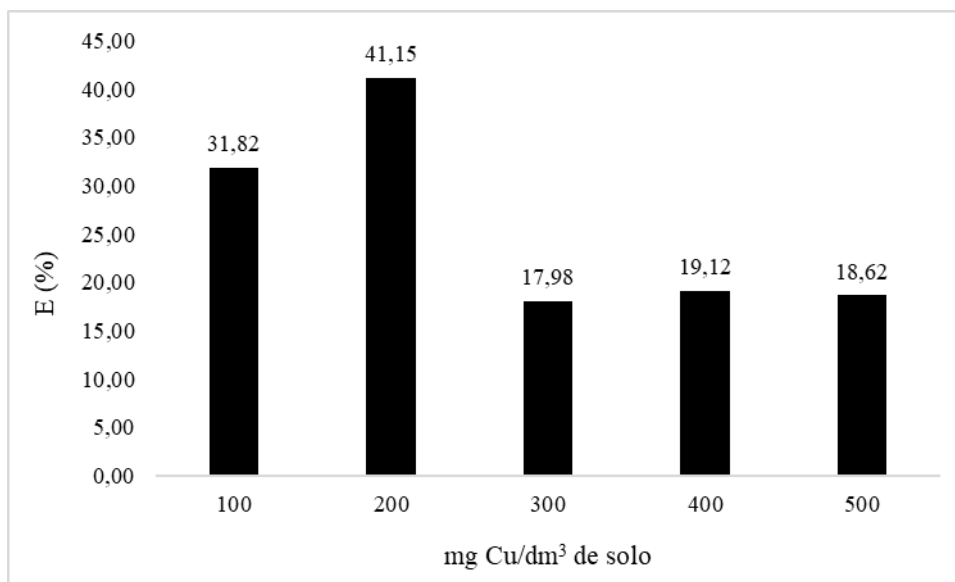
Fonte: Próprio autor.

**Figura 8** - Acúmulo relativo (g/kg) de cobre por planta e biomassa (g/kg) total seca de *Leucaena leucocephala* (raiz e parte aérea) por tratamento, cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



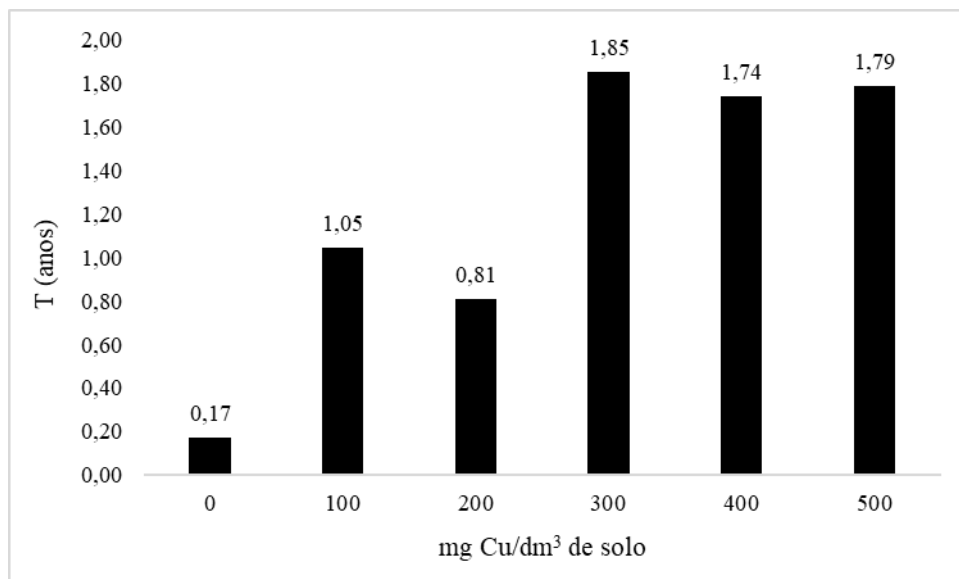
Fonte: Próprio autor.

**Figura 9** - Eficiência de remoção (%) de cobre por *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

**Figura 10** - Tempo, em anos, para remoção de cobre por *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de cobre (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, S. E.; MÜLLER-MOULÉ, P.; NIYOGI, K. K.; PILON, M. *et al.* Two P-Type ATPases Are Required for Copper Delivery in *Arabidopsis thaliana* em Chloroplasts. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 4, p. 1233-1251, 2005.
- ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAES, R. F.; ALVAREZ, V. H. V.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em Ciência do Solo**. Viçosa, MG: SBCS, 2000. p. 299-352.
- ASENSIO, V.; FLÓRIDO, F. G.; RUIZ, F.; PERLATTI, F. *et al.* The potential of a Technosol and tropical native trees for reclamation of copper-polluted soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 220, p. 892-899, 2019.
- BIBI, M.; HUSSAIN, M. Effect of Copper and Lead on Photosynthesis and Plant Pigments in Black Gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 74, n. 6, p. 1126-1133, 2005.
- BURDA, K.; KRUK, J.; SCHMID, G. H.; STRZALKA, K. Inhibition of oxygen evolution in Photosystem II by Cu (II) ions is associated with oxidation of cytochrome b559. **The Biochemical Journal**, London, v. 371, n. Pt 2, p. 597-601, 2003.
- CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTÓN, J. M.; MUÑOZ-VALLÉS, S.; FIGUEROA-LUQUE, E. *et al.* Effects of copper sulfate on growth and physiological responses of *Limoniastrum monopetalum*. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 8839-8847, 2013.
- DE FREITAS, T. A.; FRANÇA, M. G. C.; DE ALMEIDA, A.-A. F.; DE OLIVEIRA, S. J. R. *et al.* Morphology, ultrastructure and mineral uptake is affected by copper toxicity in young plants of *Inga subnuda* subs. *luschnathiana* (Benth.) T.D. Penn. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 20, p. 15479-15494, 2015.
- DE VRIES, W.; RÖMKENS, P. F. A. M.; SCHÜTZE, G. Critical soil concentrations of cadmium, lead, and mercury in view of health effects on humans and animals. In: WARE, G. W. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. New York: Springer New York, 2007. p. 91-130.
- DRUMOND, M. A.; RIBASKI, J. **Leucena (Leucaena leucocephala)**: leguminosa de uso múltiplo para o semiárido brasileiro. Colombo: Embrapa Florestas, 2010; Petrolina: Embrapa Semiárido, 8. 2010. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 262; Embrapa Semiárido. Comunicado técnico, 142)
- DUDKA, S.; MILLER, W. P. Accumulation of potentially toxic elements in plants and their transfer to human food chain. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 681-708, 1999.

ESRINGÜ, A.; TURAN, M.; GÜNEŞ, A.; KARAMAN, M. R. Roles of *Bacillus megaterium* in remediation of boron, lead, and cadmium from contaminated soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 45, n. 13, p. 1741-1759, 2014.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HAMMERSCHMITT, R. K.; TIECHER, T. L.; FACCO, D. B.; SILVA, L. O. S. *et al.* Copper and zinc distribution and toxicity in 'Jade'/'Genovesa' young peach tree. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 259, p. 108763, 2020.

JIA, W.; MIAO, F.; LV, S.; FENG, J. *et al.* Identification for the capability of Cd-tolerance, accumulation and translocation of 96 sorghum genotypes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 145, p. 391-397, 2017.

KHAN, A.; KHAN, S.; ALAM, M.; KHAN, M. A. *et al.* Toxic metal interactions affect the bioaccumulation and dietary intake of macro- and micro-nutrients. **Chemosphere**, Oxford, v. 146, p. 121-128, 2016.

KOLBERT, Z.; PETŐ, A.; LEHOTAI, N.; FEIGL, G. *et al.* Long-term copper (Cu<sup>2+</sup>) exposure impacts on auxin, nitric oxide (NO) metabolism and morphology of *Arabidopsis thaliana* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 68, n. 2, p. 151-159, 2012.

LI, L.; ZHANG, K.; GILL, R. A.; ISLAM, F. *et al.* ecotoxicological and interactive effects of copper and chromium on physiochemical, ultrastructural, and molecular profiling in *Brassica napus* L. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2018, p. 9248123, 2018. DOI: 10.1155/2018/9248123.

LIDON, F. C.; HENRIQUES, F. S. Copper toxicity in rice: Diagnostic criteria and effect on tissue Mn and Fe. **Soil Science**, Baltimore, v. 154, n. 2, 1992.

LINS, C. E. L.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MESSIAS, A. S. *et al.* Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 181-185, 2006.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato- POTAFOS, 2. ed. rev. e atual., 1997. 319 p.

MALMER, A. General ecological features of miombo woodlands and considerations for utilization and management. **Working Papers of the Finnish Forest Research Institute**, [s. l.], v. 50, p. 34-42, 2007.

MARQUES, D. M.; DA SILVA, A. B.; MANTOVANI, J. R.; MAGALHÃES, P. C. *et al.* Root morphology and leaf gas exchange in *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub. (Caesalpinioideae) exposed to copper-induced toxicity. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 121, p. 186-192, 2019.

MARSCHNER, H.; RÖMHELD, V.; HORST, W. J.; MARTIN, P. Root-induced changes in the rhizosphere: Importance for the mineral nutrition of plants. **Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde**, Weinheim, v. 149, n. 4, p. 441-456, 1986.

MENGE, D. N. L.; CHAZDON, R. L. Higher survival drives the success of nitrogen-fixing trees through succession in Costa Rican rainforests. **New Phytologist**, Cambridge, v. 209, n. 3, p. 965-977, 2016.

MENSAH, A. K. Role of revegetation in restoring fertility of degraded mined soils in Ghana: a review. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 7, n. 2, p. 57-80, 2015.

MURRAY, H.; THOMPSON, K.; MACFIE, S. Site- and species-specific patterns of metal bioavailability in edible plants. This paper is one of a selection published in a Special Issue comprising papers presented at the 50th Annual Meeting of the Canadian Society of Plant Physiologists (CSPP) held at the University of Ottawa, Ontario, in June 2008. **Botany**, Ottawa, v. 87, p. 702-711, 2009.

PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effects of Copper Toxicity on Leaves of Oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Annals of Botany**, London, v. 88, n. 2, p. 207-214, 2001.

PAULA, L. de S.; SILVA, B. d. C.; PINHO, W. C. S. d.; BARBOSA, M. A. M. *et al.* Silicon (Si) ameliorates the gas exchange and reduces negative impacts on photosynthetic pigments in maize plants under Zinc (Zn) toxicity. **Australian Journal of Crop Science**, [s. l.], v. 9, n. 10, p. 901-908, 2015.

PIETRZAK, U.; UREN, N. C. Remedial options for copper-contaminated vineyard soils. **Soil Research**, Rome, v. 49, n. 1, p. 44-55, 2011.

RAIJ, B. VAN.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A. Análise química para avaliação de fertilidade de solos climáticos. **Instituto Agrônômico**, Campinas, p. 285, 2011.

REHMAN, M.; LIU, L.; WANG, Q.; SALEEM, M. H. *et al.* Copper environmental toxicology, recent advances, and future outlook: a review. **Environmental science and pollution research international**, [s. l.], v. 26, n. 18, p. 18003-18016, 2019.

RIZWAN, M.; ALI, S.; ADREES, M.; RIZVI, H. *et al.* Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms, and management: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], 23, n. 18, p. 17859-17879, 2016.

SAGARDOY, R.; VÁZQUEZ, S.; FLOREZ-SARASA, I. D.; ALBACETE, A. *et al.* Stomatal and mesophyll conductances to CO<sub>2</sub> are the main limitations to photosynthesis in sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. **New Phytologist**, Cambridge, v. 187, n. 1, p. 145-158, 2010.

SANCENÓN, V.; PUIG, S.; MATEU-ANDRÉS, I.; DORCEY, E. *et al.* The Arabidopsis copper transporter COPT1 functions in root elongation and pollen



development. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 15, p. 15348-15355, 2004.

SHIKANAI, T.; MÜLLER-MOULÉ, P.; MUNEKAGE, Y.; NIYOGI, K. K. *et al.* PAA1, a P-Type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts. **The Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 6, p. 1333-1346, 2003.

SILVA, R. F. d.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z. I.; LEAL, L. T. *et al.* Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21, p. 103-110, 2011.

SWARTJES, F. A. **Dealing with contaminated sites: from theory towards practical application**. [S. l.]: Springer Netherlands, 2011.

SWARTJES, F. A. **Human health risks due to consumption of vegetables from contaminated sites: towards a protocol for site-specific assessment**. Bilthoven: RIVM, 2007.

TIECHER, T. L.; TIECHER, T.; CERETTA, C. A.; FERREIRA, P. A. A. *et al.* Tolerance and translocation of heavy metals in young grapevine (*Vitis vinifera*) grown in sandy acidic soil with interaction of high doses of copper and zinc. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 222, p. 203-212, 2017.

VASSILEV, A.; LIDON, F. C.; MATOS, M. d. C.; RAMALHO, J. C. *et al.* Photosynthetic performance and content of some nutrients in cadmium- and copper-treated barley plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, n. 11, p. 2343-2360, 2002.

VIEHWEGER, K. How plants cope with heavy metals. **Botanical Studies**, Indianapolis, v. 55, n. 1, p. 35, 2014.

WU, Y.; LI, Y.; ZHENG, C.; ZHANG, Y. *et al.* Organic amendment application influence soil organism abundance in saline alkali soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 54, p. 32-40, 2013.

YANG, Y.; SUN, C.; YAO, Y.; ZHANG, Y. *et al.* Growth and physiological responses of grape (*Vitis vinifera* “Combier”) to excess zinc. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 4, p. 1483-1491, 2011.

YIN, L.; CHENG, Y.; ESPINASSE, B.; COLMAN, B. P. *et al.* More than the ions: the effects of silver nanoparticles on *Lolium multiflorum*. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 45, n. 6, p. 2360-2367, 2011.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 145-156, 2005.

ZHAO, G. Q.; MA, B. L.; REN, C. Z. Growth, Gas Exchange, Chlorophyll Fluorescence, and Ion Content of Naked Oat in Response to Salinity. **Crop Science**, Madison, v. 47, n. 1, p. 123-131, 2007.

## **CAPÍTULO II: FITOESTABILIZAÇÃO DE FERRO POR *LEUCAENA LEUCOCEPHALA***

### **2.1 INTRODUÇÃO**

Os metais pesados são elementos que possuem densidade atômica maior que 5 Kg/dm<sup>3</sup> e que estão associados à poluição ambiental e toxicidade aos seres vivos, podendo ser elementos essenciais ou não essenciais (MIKULA *et al.*, 2020). Podem causar toxicidade severa nas plantas, por perturbar grupos essenciais de enzimas, destruindo a integridade de importantes biomoléculas, modificando algumas macromoléculas, substituindo íons metálicos essenciais de fórmulas estruturais de biomoléculas e alterando mecanismos de defesa antioxidante como resultado da produção de ROS (SARWAR *et al.*, 2010; CHAFFAI; KOYAMA, 2011; CHOPPALA *et al.*, 2014; SARWAR *et al.*, 2017).

Metais essenciais como cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn), níquel (Ni) e ferro (Fe) são requeridos em baixas concentrações sendo, portanto, classificados como micronutrientes para as culturas. Estes têm importantes papéis regulatórios em vários processos biológicos, como na transferência de elétrons, proteínas e como cofatores de numerosas enzimas (FAGERIA *et al.*, 2009; CHAFFAI; KOYAMA, 2011). As principais fontes são: lodo de esgoto, resíduos industriais, compostos de lixo urbano, fertilizantes minerais, agrotóxicos, esterco, gases de exaustão de automóveis e minerações.

Uma das principais problemáticas relacionadas ao acúmulo de metais pesados (densidade atômica maior que 5 kg/dm<sup>3</sup>) é o fato de que esses interagem com uma vasta quantidade de moléculas que não são metabolizáveis, ou seja, são altamente bioacumulados nos organismos vivos, além de provocar ampla degradação da área contaminada atingindo a flora, a fauna, águas superficiais e subterrâneas, prejudicando as plantas e alterando, assim, os ciclos naturais, processos bioquímicos e causando problemas à saúde humana (ARAÚJO; CEDENO-MACIAS, 2016; JOSE; RAY, 2018).

O ferro é um micronutriente requerido para a manutenção da vida, porém está pouco disponível na maioria dos solos (MARSCHNER *et al.* 2011), entretanto, em solos muito intemperizados, como é o caso dos Latossolos brasileiros, há predominância de óxidos de ferro (hematita e goethita), frequentemente, com alta disponibilidade de ferro (KER, 1997; FERNANDES *et al.*, 2004). Em plantas, ele está relacionado a diversas atividades metabólicas, participando como componente de enzimas como: catalase, peroxidase,

citocromo oxidase e xantina oxidase, além de ser indispensável nos processos de respiração, fotossíntese, fixação de nitrogênio e transferência de elétrons por meio das alternâncias entre as espécies iônicas  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ , tradução de proteínas (LILL, 2009; BALK; PILON, 2011; GUERINOT; YI, 1994; MARENCO; LOPES, 2009).

O excesso de Fe é citotóxico, pois medeia a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (MARSCHNER, 1995); levando ao aumento na produção de EROs e respostas ao estresse oxidativo e distúrbios fisiológicos (CARO; PUNTARULO, 1996; PEKKER *et al.*, 2002; RAVET *et al.*, 2009). Assim, as plantas também regulam a expressão gênica em resposta ao excesso de Fe. Essa resposta foi caracterizada em estudos da expressão da proteína ferritina de armazenamento de Fe (BRIAT *et al.*, 2009).

Áreas de mineração e seu entorno apresentam grandes quantidades de rejeitos de mineração de Fe, por exemplo, e representam riscos significativos a saúde humana e ao ambiente, dependendo de sua natureza, podendo fluir facilmente e colapsar quando empilhados (YANG *et al.*, 2012; SANCHEZ-LOPEZ *et al.*, 2015); barragens de rejeitos podem romper-se frequentemente e causar desastres em todo o mundo, resultando em perdas de propriedade e vitimando pessoas (DARY *et al.*, 2010). No Brasil, o número de falhas nas barragens de rejeitos dobrou, nos últimos anos. O Brasil enfrentou dois grandes desastres envolvendo a ruptura da barragem de rejeitos de ferro: a barragem de Fundão (5 de novembro de 2016) e a barragem de Brumadinho (25 de janeiro de 2019), com o lançamento de cerca de 45 e 12 milhões de metros cúbicos de rejeitos de mineração no meio ambiente, respectivamente (ARMSTRONG *et al.*, 2019; THOMPSON, 2020).

O rompimento da barragem de Fundão (Samarco, BHP-Vale) em Mariana (MG), foi o maior desastre socioambiental do país no setor de mineração, composta principalmente por óxido de ferro e sílica. O desastre causou a destruição de 1.469 hectares, incluindo Áreas de Preservação Permanente (APPs) (IBAMA, 2015). Maia (2017) detectou valores considerados tóxicos de Cd, Cr, Hg, Mo, Zn e Ni em sedimentos dos rios da bacia do Rio Doce, e as concentrações de metais na água excederam os valores máximos permitidos pela legislação brasileira em vigor (CARVALHO *et al.*, 2017).

O desastre mais recente, ocorrido em 2019, foi o colapso da barragem de rejeito de Córrego do Feijão (Vale S.A) na cidade de Brumadinho- MG. Os rejeitos foram espalhados pelo rio Paraopeba e arredores (THOMPSON, 2020). Além das perdas sociais e econômicas, os danos à biodiversidade são incalculáveis. Pelo menos 269,84 ha foram destruídos, dos quais 133,27 ha de vegetação nativa da Mata Atlântica (um hotspot de biodiversidade) e 70,65 ha de APPs ao longo de cursos de água (IBAMA, 2019). As duas

barragens colapsadas pertencem à Vale S. A., que possui 133 barragens de minério de ferro no Brasil, das quais 80% delas (105) estão no estado de Minas Gerais, e os concentrados de minério produzidos pela Samarco normalmente contêm 67% de ferro (ROTTA *et al.*, 2020; SEGURA *et al.*, 2016).

No setor agrícola, há também o uso de fertilização foliar ou injeções de fertilizantes que contêm Fe em sua composição, em culturas agrícolas. Em ambos, a fertilização com Fe pode acarretar em alta concentração de Fe na rizosfera das raízes (fertilização do solo ou substrato de crescimento) ou nos tecidos das plantas (fertilização foliar e injeções de fertilizantes) (ABADÍA *et al.*, 2011).

Tanto a deficiência quanto o excesso de Fe afetam negativamente o metabolismo da planta, logo, a homeostase do Fe é uma tarefa crucial para o desenvolvimento vegetal (BLOKHINA; FAGERSTEDT, 2010). Pouco se sabe sobre a concentração suficiente e tóxica de Fe, no solo, para as culturas, tampouco para a *L. leucocephala*. Em um manual internacional de fertilidade do solo (LOPES, 1998) foi documentado que o teor de Fe suficiente é de 56 – 78 mg/kg em folhas maduras de milho; folhas de arroz: maior que 63 mg/kg; brotos de soja (34 dias): 44 – 60 mg/kg. E não há valores estabelecidos para o teor de Fe tóxico nas plantas (LOPES, 1998), tampouco valores orientadores (referência de qualidade, prevenção e intervenção) para a fixação de limite de concentração de ferro no solo (mg/kg peso seco de solo) de acordo com a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, Brasil- CETESB, 2016.

Métodos físico-químicos de remediação do solo geralmente são mais caros e resultam em uma deterioração do ecossistema. Estima-se que os custos de fitorremediação, na maioria dos casos, sejam 50% menores que os custos de escavação (VANGRONSVELD *et al.*, 2009). A fitorremediação do solo é geralmente vista como custo-benefício quando comparada a métodos convencionais de disposição e tratamento de resíduos, como escavação e aterro, tratamento térmico (incineração, dessorção), lavagem do solo e lixiviação (VANGRONSVELD *et al.*, 2009; GERHARDT *et al.*, 2015; YAVARI; MALAKAHMAD; SAPARI, 2015; ULLAH *et al.*, 2015. Em geral, a fitorremediação pode custar menos de 5% dos métodos alternativos de limpeza (lavagem do solo, redução/oxidação química, escavação, recuperação e descarte do solo fora do local) e sua aplicação em solos contaminados por metais pesados tem sido amplamente utilizada na remediação de áreas contaminadas por elementos químicos potencialmente tóxicos (PRASAD, 2003).

Neste cenário, as plantas com elevada produção de biomassa são extremamente vantajosas quando se considera a fitorremediação de metais tóxicos, pois mesmo que estas plantas não exibam taxas elevadas de alguns metais em seus órgãos, a alta produção de biomassa proporcionam-lhes maior eficácia na extração de metais, quando em comparação com hiperacumuladoras, cujo crescimento é baixo e lento, pois apresentam ciclo rápido, entre 6 e 12 meses (HASSAN; AARTS, 2011; SOUZA *et al.*, 2018). Além de que, plantas de rápido crescimento e alta produção de biomassa, podem ser utilizadas, não somente para a fitorremediação, mas também para a produção de energia (ABHILASH *et al.*, 2012).

Além da produção de grandes quantidades de biomassa, as leguminosas: *Canavalia ensiformis*, *Calopogonium mucunoides*, *Stizolobium aterrimum*, *Canavalia gladiata*, *Crotalaria juncea* (SOUZA *et al.* 2018), realizam a fixação biológica de nitrogênio, conferindo vantagem de crescimento em solos pobres em nitrogênio, como pode ser o caso de solos contaminados.

*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit, é uma planta arbóreo-arbustiva, pioneira na categoria sucessional, exótica, originária da América Central, pertencente à família Mimosaceae. É uma leguminosa que por meio da simbiose com bactérias do gênero *Rhizobium* promove a fixação do nitrogênio. Foi relatado que em locais onde se acumulam resíduos permanecem por longos períodos com pouca ou nenhuma vegetação e a *L. leucocephala* é uma das plantas utilizadas nessas ações de revegetação (LINS *et al.*, 2006).

Apesar de todas as características favoráveis, não há estudos caracterizando a tolerância e potencial de fitorremediação de *L. leucocephala* à contaminação por metais, tais como o Fe, o que pode significar um importante avanço na possibilidade de uso de leguminosas arbóreas para recuperação de áreas impactadas, após crimes/desastres ambientais causados por rompimento de barragens de rejeitos, por exemplo.

O presente trabalho teve como foco o potencial de tolerância, absorção e translocação de ferro por *L. leucocephala*, bem como a resposta do mecanismo fotossintético e o potencial fitorremediador de *L. leucocephala* cultivada em solo com concentrações elevadas de ferro.

## 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1.1 Instalação do experimento, caracterização das amostras e delineamento experimental

O solo foi coletado, superficialmente (camada de 0 – 20 cm), de uma propriedade agrícola (17°30'051''S; 50°37'722''a 580 m de elevação) em Rio Verde- GO, centro-oeste do Brasil, uma das regiões responsáveis por grande parte da produção de grãos do país, onde, também, se encontra o bioma Cerrado. O histórico da área é de cultivo de soja e milho nos dois anos anteriores à coleta de solo. Após a coleta, o solo foi destorroado, homogeneizado em betoneira, passado em peneira de 2 mm de abertura de malha e espalhado em lona para secar ao ar.

Duas amostras compostas, cada uma com 10 sub amostras, do solo foram retiradas para a caracterização química (RAIJ, 1991) e classificação textural (EMBRAPA, 2018). O solo em estudo, Latossolo Vermelho Distroférico, apresenta acidez média e saturação por bases alta (pH 5,38 e V% 59); soma de bases- SB de 71,1 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>, rico em bases trocáveis, especialmente Ca<sup>2+</sup> (51 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>), K<sup>+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (14,06 e 6 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>); acidez potencial (Al<sup>3+</sup> + H<sup>+</sup>) de 50 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>; com 45,9 g/dm<sup>3</sup> de matéria orgânica; e possui boa capacidade de troca catiônica- CTC (121 mmol<sub>c</sub>/dm<sup>3</sup>). De acordo com as características acima, o solo se caracteriza por ter textura muito argilosa, rico em nutrientes (eutrófico), e a CTC deste solo pode reter mais da metade de cátions trocáveis, de acordo com Abreu *et al.* (2001), na camada de 0 – 20 cm.

De acordo com a análise de micronutrientes (RAIJ *et al.* 2001), o solo apresenta altos teores de Mn, Fe e Cu (73,7; 52,3; e 4,4 mg/dm<sup>3</sup> respectivamente); médio teor de Zn (1,0 mg/dm<sup>3</sup>); e baixo teor de B (0,4 mg/dm<sup>3</sup>). Os altos teores de micronutrientes e matéria orgânica se devem tanto pela intensa atividade agrícola praticada no local anteriormente (rico em nutrientes), quanto pela natureza do solo, com devida atenção ao teor de Cu disponível.

Um volume de solo de 2 dm<sup>3</sup> foi acondicionado em sacos plásticos transparentes e armazenados em casa de vegetação para contaminação artificial do solo. Os níveis de Fe testados foram: 0 (controle), 100, 200, 300, 400 e 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo. As soluções foram preparadas utilizando sulfato de ferro heptahidratado na concentração de 10 g/L. Os volumes 0, 20, 40, 60, 80 e 100 ml desta solução foram diluídos até formar o volume total de 400 ml de água e adicionado a cada unidade experimental de solo (2 dm<sup>3</sup>). Após esse procedimento, o solo foi homogeneizado manualmente e permaneceu incubado por

15 dias (LIMA *et al.*, 2019), para estabilização do metal ao solo. Após o período de incubação, as amostras de solo compostas foram submetidas a análise química de disponibilidade de ferro, por meio do método de DTPA e leitura por espectrometria de absorção atômica em chamas- AAS (RAIJ *et al.*, 2001), para obter a concentração disponível de Fe, após os tratamentos. O solo foi transferido para sacos de muda com capacidade para 2 dm<sup>3</sup> de solo.

A viabilidade das sementes de *L. leucocephala*, adquiridas comercialmente, foram submetidas ao teste de Tetrazólio, conforme descrito por Brasil (2009). De acordo com o resultado, as sementes do lote adquirido apresentaram 100% de viabilidade para germinação.

As sementes foram selecionadas manualmente e visualmente de acordo com seu vigor para homogeneidade nos parâmetros visíveis. Previamente ao plantio, as sementes foram escarificadas mecanicamente, embebidas em água durante 24 horas e então foram semeadas cinco sementes por unidade experimental. Posteriormente, foi realizado o desbaste e o experimento foi conduzido com uma planta por unidade experimental.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação tendo duração de aproximadamente 120 dias da semeadura a coleta. Para cada um dos seis tratamentos foram utilizadas cinco repetições biológicas compostas por um indivíduo em cada unidade experimental, totalizando 30 unidades experimentais, em delineamento inteiramente casualizado. O experimento foi realizado em casa de vegetação, sem controle de temperatura e com irrigação controlada, nas dependências do Laboratório de Fisiologia do Metabolismo Vegetal, na UNESP, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira- SP, Brasil, de agosto a novembro de 2018.

### **2.1.2 Avaliação de trocas gasosas**

Para determinação da resposta fotossintética das plantas, foi realizada uma medida de trocas gasosas em cada repetição, ao final de 120 dias, utilizando um analisador portátil de trocas gasosas, CIRAS-3 (Portable Photosynthesis System- PP Systems), de acordo com as condições ambientais. As medidas foram realizadas em folhas completamente desenvolvidas e aparentemente saudáveis, na região da segunda ou terceira folha abaixo do meristema apical, entre as 09:00 e as 12:00 horas da manhã, para todos os tratamentos.

As seguintes configurações para trocas gasosas foram ajustadas: dois folíolos dentro da cubeta universal da folha PLC3 (18 x 25 mm); 390 µmol/mol<sup>1</sup> de CO<sub>2</sub> de referência; 60% de referência de água (umidade); fluxo da cubeta de 300 cc/min<sup>1</sup>; fluxo

do analisador de 100 cc/min<sup>1</sup>; fonte de luz ambiente; sensor de radiação infravermelho (IR) para medição da temperatura da folha; área foliar de 4,50 cm<sup>2</sup>; resistência da camada limite de 0,40 m<sup>2</sup>/s/mol<sup>1</sup>; relação estomacal de 50%; com calibração do sistema auto-zero. Os seguintes parâmetros foram analisados: taxa fotossintética (A,  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}$ ); condutância estomática (gs,  $\text{mol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) e transpiração (E,  $\text{mmol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ).

### 2.1.3 Coleta e determinação de compostos

Ao final de 120 dias de cultivo foi feita a coleta do material vegetal, separado em parte aérea (folhas e caule) e raízes, lavados em água destilada e secos com papel toalha. Foram mensurados comprimento (cm) do caule e das raízes; e contado o número de folhas completamente desenvolvidas. Determinou-se a massa (g) fresca da parte aérea e das raízes. Todas as medidas de crescimento vegetal foram realizadas de acordo com Benincasa (2003).

As folhas, ainda frescas, foram utilizadas para quantificação de clorofilas (a, b e total) e carotenoides totais. Foi utilizado DMSO para a extração de clorofila e carotenoides e as leituras foram feitas a 645 e 663 nm, para clorofilas e a 480 nm, para carotenoides, de acordo com Hiscox e Israelstam (1979) e Wellburn (1994) respectivamente. Posteriormente, o restante das folhas e raízes foram acondicionadas em sacos de papel e postos para secar em estufa de circulação forçada a 60 °C por 76 horas. Após secos, foram pesados para obtenção da massa (g) seca total e moídos.

### 2.1.4 Determinação do teor de ferro nos tecidos vegetais e no solo

As amostras secas e moídas de folhas e raízes, foram utilizadas para análises de disponibilidade de Fe, dos quais pelo cálculo do acúmulo no remanescente de matéria seca foram mensuradas as taxas de liberação de nutrientes no tempo, conforme metodologia descrita por Malavolta *et al.* (1997): 250 mg do extrato vegetal seco foi digerido em 3 ml de ácido HNO<sub>3</sub>: HClO<sub>4</sub> solução (5: 1 v/v) por 12 h. Depois disso, a temperatura do bloco digestor foi aumentada em 50 °C a cada 30 minutos até atingir 200 °C e completou a digestão do material vegetal. O extrato transparente resultante foi ajustado para 25 ml com água milli-Q que foi usada para detectar a concentração de Fe em um espectrômetro de absorção atômica de chama (FAAS). Esses resultados foram utilizados para os cálculos de fitoextração.

Após o cultivo de *L. leucocephala*, amostras compostas de solo de cada tratamento, foram submetidas a análise química de disponibilidade de Fe, novamente, afim de



comparar os teores de Fe disponíveis no solo, e verificar se houve ou não redução do teor de Fe disponível.

### 2.1.5 Determinação do potencial fitorremediador

Utilizando-se os dados de massa e quantidade acumulada de Fe, foram realizados os cálculos para determinação do potencial fitorremediador: índice de tolerância (IT) e índice de translocação (IT%) de acordo com Rahman *et al.* (2013), fator de transferência (FT) de acordo com Lubben e Sauerback (1991). Onde, IT é a biomassa total de cada tratamento/biomassa total do controle; IT% é a concentração de metais pesados da parte aérea/ concentração de metais pesados da parte aérea e das raízes, multiplicado por 100 e FT é a concentração de metais pesados nas plantas/ concentração de metais pesados na solução do solo.

A partir desses índices, foi determinada a eficiência de remoção (E%) de Fe, dada pela seguinte equação:  $E\% = (QPA/QR) \cdot 100$  (QPA: quantidade acumulada de Fe na parte aérea, em mg/vaso<sup>1</sup> e QR: quantidade acumulada total de Fe a ser extraído do solo, em mg/vaso<sup>1</sup>, de acordo com Jorge *et al.* (2010).

Com os dados da média de Fe e biomassa total seca (raiz e parte aérea), foram calculadas as seguintes equações: (1º) total de metal absorvido por tratamento – TM, em g/kg:  $TM = (MR + MA)/2$  (MR: metal absorvido pela raiz; MA: metal absorvido pela parte aérea, dividido por dois para resultar no TM de uma planta inteira); (2º) acúmulo relativo de metal por tratamento – ART, em g/kg:  $ART = (TM \cdot BS)/E$  (BS: média da biomassa total seca do tratamento em g; E: peso da amostra de extração de 4x que é igual a 1g); (3º) acúmulo relativo de metal por planta, em g/kg:  $ARP = ART/R$  (R: número de repetições). O termo tratamento, utilizado nesses cálculos, é a média das repetições de cada concentração testada, nesse caso, foram utilizadas 5 repetições. Com base nessas equações pôde se calcular o acúmulo relativo de Fe por planta (ARP).

O tempo de remoção - T, em anos, necessário para reduzir em 100% o teor de Fe do solo, foi calculado pela fórmula:  $T = (R/E\%)/NC$  (R: porcentagem de Fe a ser removida do solo, nesse caso foi atribuído em 100%; E%: eficiência de remoção e NC: número de ciclos da cultura (JORGE *et al.*, 2010). O percentual de remoção de Fe foi arbitrado em 100%. Uma vez que a *L. leucocephala* é uma planta arbóreo-arbustiva de ciclo longo, podendo ser cultivada por anos, por isso, nestes cálculos consideramos o NC = 3 anos.

Assim como o cálculo de acúmulo relativo dos metais por planta, o tempo necessário para reduzir 100% dos metais são dados estimativos, para descrever a projeção do potencial fitorremediador da *L. leucocephala* em relação ao excesso de Fe no solo e não sobre a fração total do solo. A concentração total de metais no solo permanece inalterada durante o processo de remediação, mas a biodisponibilidade deles foram substancialmente reduzidas, sendo o foco de estudo.

### 2.1.6 Análise estatística

Foi realizado estudo de outlier antes da análise estatística, afim de retirar os dados discrepantes entre os tratamentos. Os dados foram analisados através do software SISVAR (FERREIRA, 2019). A hipótese da normalidade foi testada pelo teste de Shapiro-Wilk, foi realizada a análise de variância (ANOVA) sendo aplicado o teste F a 5% de probabilidade para detectar as diferenças entre os tratamentos. Quando encontrada diferença significativa para cada variável foi realizada a análise de variância na regressão, sendo o modelo verificado a partir do p-valor do desvio da regressão (não significativo) e os modelos de regressão polinomial selecionados baseados nos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) superiores, dentre as regressões significativas pelo teste F.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Aspectos fisiológicos

As plantas de *L. leucocephala* cultivadas em solo com excesso de ferro foram coletadas com 120 dias e seu desenvolvimento pode ser observado na Fig. 1. Sintomas visuais de fitotoxicidade, como bronzeamento foliar e formação de placas de ferro não foram observados nos folíolos e nas raízes de *L. leucocephala* (Fig. 1).

Em relação aos teores de pigmentos (Tabela 1), pode-se observar uma maior tendência de acúmulo de carotenoides nos tratamentos 100 e 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo respectivamente, mas, a quantificação de carotenoides não diferiu estatisticamente entre os tratamentos. No entanto, o acúmulo de clorofilas apresentou diferenças significativas entre os tratamentos. A partir do tratamento de 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo, houve baixo acúmulo de clorofilas a, b e totais, em relação ao aumento da dose de Fe no solo (Fig. 2).

A taxa fotossintética (A), transpiração (E) e a condutância estomática (gs) diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 2 e Fig. 3 e 4). Os tratamentos 0, 300 e 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo tiveram maior taxa de fotossíntese líquida, enquanto os tratamentos 100 e 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo tiveram a menor taxa (Tabela 2 e Fig. 3).

O tratamento controle obteve a menor média entre os demais tratamentos em relação a taxa de transpiração e condutância estomática (Tabela 2 e Fig. 4). O tratamento 100 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo exibiu a média mais alta para a taxa de transpiração e condutância estomática (Tabela 2 e Fig. 4). Como observado, E e gs exibiram o mesmo comportamento dos dados.

Quanto as medidas de crescimento de *L. leucocephala*, não houve diferença significativa entre os tratamentos para o comprimento (cm) do caule e da raiz, conforme os resultados da Tabela 3. O número de folhas, a massa (g) fresca da parte aérea (caule e folhas) e das raízes, e produção de biomassa fresca e seca diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 3, 4). As plantas dos tratamentos 100 e 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo tiveram maior produção de biomassa e número de folhas, enquanto que o tratamento 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo teve a menor produção de biomassa de *L. leucocephala* o que provavelmente deve-se à alta concentração de Fe (Tabela 3, 4 e Fig. 5, 6).

Nota-se uma similaridade entre as respostas dessas variáveis de crescimento, na Fig. 1, 5 e 6 fica evidente que entre as doses de 0 a 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo há incremento/estímulo de produção de biomassa (g), sendo que o maior acúmulo de biomassa foi no tratamento de 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo. De 300 a 500, houve diminuição da produção de biomassa (g) em geral.

### 2.3.2 Tolerância e potencial fitorremediador

A média da biodisponibilidade de Fe em cada tratamento, antes e depois do cultivo de *L. leucocephala*, está descrito na Fig. 7. A disponibilidade de Fe, a partir da contaminação do solo, apresentou diferença significativa entre os tratamentos. A partir do tratamento de 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo, a fração disponível de Fe no solo (antes do cultivo) é considerada potencialmente tóxica para o solo e para as culturas (Fig. 7).

Após o cultivo das plantas, a disponibilidade de Fe no solo, entre os tratamentos, também, apresentou diferença significativa (Fig. 7). A diminuição de Fe fica evidente, mostrando que a espécie absorveu de 33 a 50% de Fe do solo, entre os tratamentos de 100 a 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo e a disponibilidade de Fe ficou inferior que 20 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo (Fig. 7).

A partir dos dados de biomassa acumulada, pode-se calcular o índice de tolerância-IT de *L. leucocephala* ao Fe. De 100 a 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo, os índices de tolerância da *L. leucocephala* ao Fe foram: 1,97; 2,47; 0,92; 0,94 e 0,51, respectivamente. De acordo com isso, a *L. leucocephala* é altamente tolerante as doses de 100 a 400 mg Fe/dm<sup>3</sup> de

solo e moderadamente tolerante a dose de 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo. Com os resultados de IT e de biomassa (Fig. 6), podemos observar que as doses 100 e 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo acarretaram em efeito nutricional, com incremento de biomassa, em relação ao tratamento controle.

Os valores encontrados para o fator de transferência - FT de 0 a 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo foram: 0,49; 0,31; 0,26; 0,39; 0,24 e 0,08 respectivamente. Na Fig. 8 podemos observar o teor (%) de Fe nas raízes e o índice de translocação (IT%) para a parte aérea. Aproximadamente 94% do Fe extraído do solo, foi acumulado nas raízes e 6% de Fe foi translocado para a parte aérea, isto é, o Fe fica acumulado nas raízes (Fig. 8).

Para acúmulo relativo (g/kg) de Fe por biomassa seca (g/kg) de *L. leucocephala* (Fig. 9) foi encontrado maior acúmulo relativo de Fe por biomassa de *L. leucocephala* no tratamento de 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo seguido do tratamento 100 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo. Nota-se uma pequena diferença de biomassa entre as doses de 300 e 400 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo (Fig. 9), a dose com 300 mg Fe/dm<sup>3</sup> produziu menos biomassa que a dose 400 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo, mas ainda assim, acumulou mais Fe por biomassa total seca por tratamento.

Foi calculada a eficiência de remoção (E%) de Fe por *L. leucocephala* e de acordo com a Fig. 10, tem-se que a maior eficiência de remoção foi no tratamento 300, seguido dos tratamentos 100 e 200 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo. A eficiência da *L. leucocephala* na remoção de Fe do solo foi de apenas 4,04% no tratamento com 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo (Fig. 10).

O tempo de remoção, necessário para remover 100% de ferro no solo, em média, é de aproximadamente dois anos e três meses, considerando a concentração de 100 a 400 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo de acordo com a Fig. 11.

## 2.4 DISCUSSÃO

### 2.4.1 Aspectos fisiológicos, tolerância e potencial fitorremediador

As plantas tiveram um desenvolvimento uniforme conforme os resultados da Tabela 3. O caule apresentou 19 cm de altura, com 8 folhas completamente desenvolvidas em média (Tabela 3). A *L. leucocephala* apresenta um sistema radicular profundo, com poucas raízes laterais. As raízes apresentaram 19 cm de comprimento em média, atingindo/percorrendo todo o perfil do solo em vaso (Tabela 3).

Pôde-se considerar a estabilidade do aparato fotossintético de *L. leucocephala* e isso sugere, previamente, uma certa tolerância ao Fe, já que a taxa de fotossíntese líquida foi alta no tratamento 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo em relação ao controle. Entretanto, para as

gramíneas, *Paspalum densum* e *Echinochloa crus-galli* houve diminuição da taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática quando cultivadas sob excesso de Fe, relatadas por Siqueira-Silva *et al.*, (2019), os quais são sintomas típicos de toxicidade do Fe, como em outras espécies: *Ipomoea batatas*; *Eugenia uniflora*, *Clusia hilariana*; *Pisum sativum* (ADAMSKI *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2015).

Assim como em *L. leucocephala*, em resposta à toxicidade de Fe, o maior acúmulo de Fe ocorreu nas raízes de *Setaria parviflora*, *Paspalum urvillei* e *Echinochloa crus-galli*, sendo uma estratégia para evitar sua translocação para a parte aérea, prejudicar os tecidos foliares e consequentemente o aparato fotossintético (DE ARAÚJO *et al.*, 2014; SANTANA *et al.*, 2014; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2019). O excesso e o acúmulo de Fe nas raízes ocasionaram diminuição da biomassa (g) de *L. leucocephala* (Tabela 3 e Fig. 1 e 8), diferindo dos resultados encontrados pelos autores (DE ARAÚJO *et al.*, 2014; SANTANA *et al.*, 2014; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2019).

A fitotoxicidade do Fe pode ocorrer de duas maneiras: indireta ou direta. Indireta quando há formação de placas de Fe nas superfícies das raízes, afetando a absorção de nutrientes (ARAÚJO *et al.*, 2014; SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2012; ZHANG *et al.* 1999), e direta, quando o Fe é absorvido e acumulado nos tecidos das plantas (LOBRÉAUX *et al.*, 1995; SCHMIDT, 2006), e o aparecimento de manchas marrons nas folhas, conhecido também, por bronzeamento foliar, o qual ocorre em decorrência do acúmulo de Fe nos tecidos foliares e consequente dano aos componentes celulares (BECKER; ASCH, 2005, PINTO *et al.*, 2016; SANTANA *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2014).

Não foi observada a formação de placas de Fe na superfície das raízes, tampouco, bronzeamento foliar em *L. leucocephala*, mesmo em concentrações elevadas de Fe no solo. Siqueira-Silva *et al.* (2012) relataram a formação de placas de ferro em gramíneas, *Paspalum densum* e *Echinochloa crus-galli*, e bronzeamento foliar. Estes sintomas ocorrem porque o Fe foi absorvido e translocado para as partes aéreas, deixando a planta mais vulnerável a danos induzidos pela toxicidade do Fe (SIQUEIRA-SILVA *et al.*, 2019).

Quanto mais baixo o pH mais disponível o Fe está. De 6,0 a 7,0 corresponde a faixa média de disponibilidade de Fe de acordo com Malavolta *et al.* (1997). O pH do solo aumentou de 5,38 para 6,4, no entanto, ainda se encontra na faixa de disponibilidade do metal, isto é, não houve acidificação do solo. De acordo com Raij *et al.* 2001, no solo, concentrações de Fe entre 0,00 e 20,00 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo no solo são adequadas/normais,

o solo com teores de Fe superiores a 20,00 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo é considerado um solo com excesso de Fe, isto é, potencialmente tóxico.

Ao comparar a disponibilidade de Fe antes e depois do cultivo, é possível observar a diminuição da disponibilidade de Fe em todos os tratamentos, após o cultivo de *L. leucocephala* e a disponibilidade ficou abaixo do limite de 20 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo (Fig. 7). isto é, não é classificada como concentração potencialmente tóxica. Desprezando-se o tratamento controle, e considerando a biomassa acumulada e a disponibilidade de Fe antes e depois do cultivo de *L. leucocephala* (Fig. 6 e 7), houve redução de 10 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo. Em média, 12,72% do Fe pôde ser extraído por *L. leucocephala*, o que é uma margem positiva de remoção.

Os mecanismos envolvidos na tolerância das plantas a metais pesados nas células vegetais são: a ligação à parede celular, o transporte ativo de íons para o vacúolo e a quelatação através da indução de peptídeos de ligação a metais e a formação de complexos metálicos (MEJÁRE; BÜLOW, 2001; MEMON; SCHRÖDER, 2009). De acordo com Esringü *et al.* (2014), plantas tolerantes tendem a restringir as transferências do metal para a parte aérea, acumulando em sua maioria nas raízes, como descrito anteriormente, em enquanto as hiperacumuladoras absorvem e translocam o metal para a parte aérea.

Fatores como características do solo, condições climáticas, espécie, hábito e órgão da planta, elemento químico e o efeito das espécies competitivas podem influenciar nos valores do fator de transferência (BETTENCOURT *et al.*, 1988; VERA TOME *et al.*, 2003). O Fe fica complexado nas raízes (Fig. 8) e esses resultados indicam que a *L. leucocephala* pode ser considerada como fitoestabilizadora de Fe, apresentando uma estratégia de fitoestabilização.

Para os elementos essenciais, os valores do fator de transferência - FT diminuem com o aumento das concentrações no solo, em um pequeno intervalo e, quando a concentração de solo aumenta, acima desse intervalo, os valores de FT diminuem (MORTVERDT, 1994), assim como encontrado em nossos resultados.

Os resultados de fator de transferência e índice de translocação encontrados neste trabalho corroboram com Ishihara *et al.* 2016, que identificaram que o gene da nicotianamina sintetase, o qual sintetiza a nicotianamina- NA, foi regulado em mais de 100 vezes na raiz de *L. leucocephala*, em comparação com a parte aérea. A NA é um quelante de íons metálicos bivalentes, incluindo Fe (II), Zn (II) e Cu (II), e está envolvido em transporte intercelular e de longa distância destes metais, desempenha um papel importante na absorção de Fe da rizosfera (ISHIHARA *et al.*, 2016).

O acúmulo de Fe, acima de 500 mg/kg de massa seca de folhas é considerado níveis fitotóxicos de Fe nos tecidos foliares, podendo induzir toxicidade na maioria das espécies (BROADLEY *et al.*, 2012; PUGH *et al.*, 2002). Não foram encontrados teores de Fe acima de 500 mg/kg de massa seca nas folhas de *L. leucocephala* em ambos os tratamentos, assim como não foram visualizados sintomas de toxicidade de Fe, corroborando com os demais resultados descritos acima, como o índice de tolerância, fator de transferência e o índice de translocação.

Há uma relação diretamente proporcional entre biomassa versus absorção de Fe. Quanto maior a produção de biomassa, mais metal a planta pode absorver, influenciando na eficiência de remoção e acúmulo relativo de Fe por grama de biomassa. Esringü *et al.* (2014), também considera que a produção de biomassa desempenha um papel importante para remoção de metais pesados do solo.

Desprezando-se o tratamento controle e o de 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo, o tempo estimado para reduzir 100% do Fe no solo é de dois anos e três meses, em média, entre as doses de 100 a 400 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo; e de cerca de oito anos para remover 500 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo (Fig. 15). Esse tempo de remoção foi calculado com base nos dados de biomassa produzida por *L. leucocephala* em aproximadamente 120 dias, isto é, estágio de plântula ainda. É possível inferir que se o tempo de cultivo fosse maior, haveria um maior acúmulo de biomassa e, conseqüentemente, maior absorção, maior eficiência de remoção e menor o tempo de remoção de Fe da área.

#### **2.4.2 Perspectivas para o estudo de espécies leguminosas com alta produção de biomassa na fitorremediação de elementos potencialmente tóxicos**

Fitoestabilização ou fitoimobilização é o uso de plantas para estabilização de contaminantes em solos contaminados (SINGH, 2012), reduzir a mobilidade e a biodisponibilidade dos poluentes no ambiente, limita o acúmulo de metais pesados, impedindo sua dispersão para águas subterrâneas ou fazer parte da cadeia alimentar (ERAKHRUMEN, 2007). É uma estratégia de gerenciamento para estabilizar (inativar) contaminantes potencialmente tóxicos (VANGRONSVELD *et al.*, 2009).

É fundamental o estudo de espécies tolerantes ao Fe, capazes de se desenvolverem em ambientes degradados, por exemplo, pelas atividades de mineração, para programas de regeneração e conservação ambiental serem bem-sucedidos em determinados locais (DE LA FUENTE *et al.*, 2014; RIOS *et al.*, 2017). A *L. leucocephala* apresenta algumas características favoráveis para ser utilizada na fitorremediação, ela pode crescer em áreas

com diferentes condições edáficas, sendo que em áreas com condições edafoclimáticas mais favoráveis (principalmente em relação à pluviometria), apresenta grande facilidade de germinação e produção, anual, de sementes. É uma planta rústica capaz de rebrotar com facilidade mesmo após diversos cortes sucessivos (DRUMOND; RIBASKI, 2010).

A espécie é utilizada para enriquecimento e melhoramento de solos, sombra para cultivos, controle de erosão, alimentação animal e produção de energia (lenha e carvão), sendo usada em diversos sistemas agrícolas como melhoradora de solos. A espécie associa-se simbioticamente com bactérias do gênero *Rhizobium*, que fixam até 500 a 600 kg/ha<sup>1</sup>/ano<sup>1</sup> de nitrogênio (DRUMOND; RIBASKI, 2010).

A madeira de *L. leucocephala* também pode ser usada em indústrias de transformação para produção de celulose e aglomerados, os biocombustíveis de segunda geração utilizam a biomassa lenhosa como matéria-prima para desenvolver combustíveis líquidos, como etanol e diesel em projetos de biorrefinaria. Espécies perenes lignocelulósicas são realmente reconhecidas como matéria-prima para produtos químicos de plataforma e blocos de construção baseados em lignina, evidenciando o potencial da *L. leucocephala* de acordo com Rohde *et al.* 2018.

Também apresenta potencial para ser usada como forrageira, os frutos, a folhagem e os ramos delgados verdes ou fenados são utilizados na dieta de bovinos, caprinos, porcos e outros animais domésticos. A quantidade de proteína bruta nas folhas é em torno de 20%, sendo que a folhagem e os frutos mais novos chegam a apresentar teores de até 35% (DRUMOND; RIBASKI, 2010). De acordo com os resultados, o Fe extraído é acumulado nas raízes, sendo assim, a parte aérea pode ser utilizada na alimentação animal (forragem).

A biomassa tem sido uma alternativa essencial aos combustíveis fósseis para processos de fabricação como mineração, fundição e geração de energia (HAN *et al.*, 2018). A combinação de reservas cada vez menores de petróleo e crescimento populacional torna o desenvolvimento de energia renovável e recursos químicos mais prementes do que nunca. A biomassa vegetal é a fonte renovável mais abundante de energia e o reaproveitamento da biomassa remanescente dos processos empregados na agricultura e agroindústria, evitam a acumulação dos resíduos, contribuindo para o controle da poluição e proporcionando melhores condições de saúde pública, corroborando com Han *et al.* (2018).

A utilização destes resíduos para adubação permite a recuperação de nitrogênio, fósforo e potássio, além de outros, presentes na biomassa de *L. leucocephala*. Além disso,



a adição de matéria orgânica ao solo contribui para melhorar a estrutura física e a capacidade de absorção de água e de fornecimento de nutrientes para outras plantas (revegetação, parques), ou até mesmo para culturas agrícolas.

O desenvolvimento de tecnologias biológicas ecologicamente corretas, para remediar economicamente esses solos foi estimulado, nos últimos anos (HERNÁNDEZ-ALLICA *et al.*, 2006; GÓMEZ-SAGASTI *et al.*, 2012). Sendo assim, nossos resultados indicam o potencial da *L. leucocephala* para a fitorremediação, tecnologia eco inovadora, que pode remediar a rizosfera e fornecer biomassa arbórea de acordo com Robinson *et al.* 2009, que pode ser usada para atingir as metas de uso de fontes de energia renováveis como mencionado por Mench *et al.* 2009 e Ciadamidaro *et al.* 2017, portanto, respondem perfeitamente às necessidades do desenvolvimento sustentável, de acordo com Ciadamidaro *et al.* (2019).

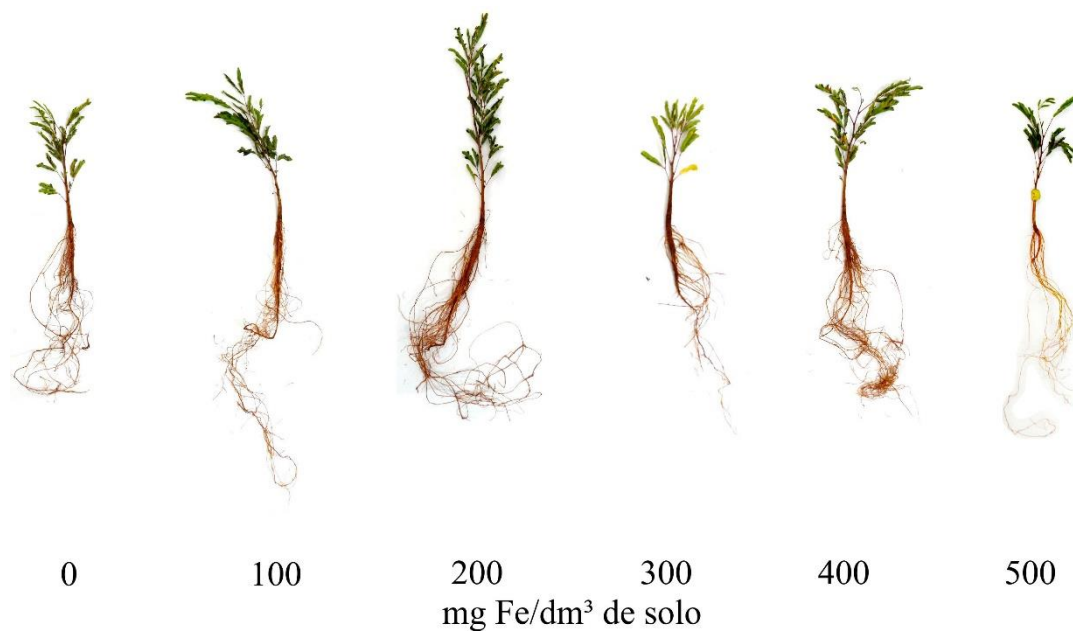
## 2.5 CONCLUSÃO

A *L. leucocephala*, é tolerante a doses tóxicas de ferro (100 a 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) e cerca de 50% do ferro disponível no solo foi absorvido pela *L. leucocephala* e acumulado, majoritariamente, nas raízes, o que caracteriza uma estratégia de fitoestabilização de ferro. O tempo, estipulado, necessário para remover o excesso de ferro do solo (de 100 a 400 mg Fe/dm<sup>3</sup> de solo) é relativamente curto, dependendo da produção de biomassa. A *L. leucocephala* pode extrair aproximadamente 2,07 g Fe/kg de biomassa, em 120 dias de cultivo. *Leucaena leucocephala* é fitoestabilizadora de ferro e, portanto, pode ser utilizada na fitorremediação de solo contaminado por ferro.

A produção de biomassa depende do tempo/duração de exposição da *L. leucocephala* ao ferro, estudos que investigam essa relação: tempo – biomassa – acúmulo de metal pelas espécies vegetais devem ser conduzidos para o conhecimento de quanto tempo cada espécie requer para remediar o solo contaminado, e dependendo do caso, o tempo necessário para a reutilização desta área, e qual potencial subproduto gerado, por meio da fitorremediação, possa ser explorado economicamente. Projetos como estes, de extrema importância, contribuem para o desenvolvimento sustentável aliando a remediação do solo, o retorno econômico, com a saúde humana e ambiental.

## 2.6 FIGURAS E TABELAS

**Figura 11** - Visão geral de plântulas de *Leucaena leucocephala* cultivadas em seis concentrações de ferro: 0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo, respectivamente, em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

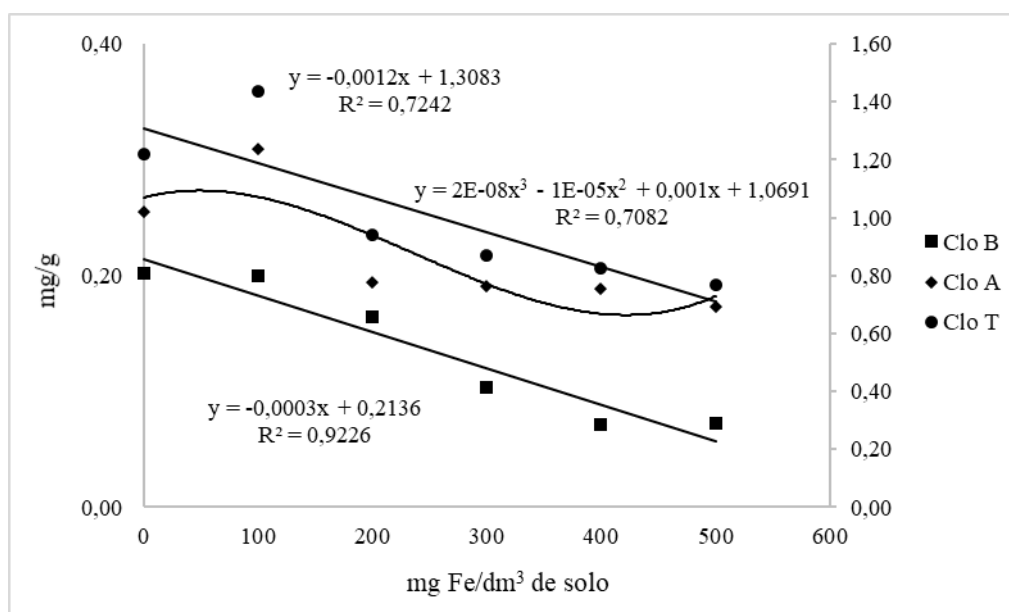
**Tabela 5** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para a quantificação das variáveis: Clorofila *a*, *b*, *total*; e carotenoides (mg/g de massa fresca) em folhas de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por ferro (mg/dm<sup>3</sup> de solo). Número de observações: 30

| Quadrado médio dos tratamentos de ferro em <i>Leucaena leucocephala</i> |               |             |                 |                      |
|-------------------------------------------------------------------------|---------------|-------------|-----------------|----------------------|
| FV                                                                      | Clorofila A   | Clorofila B | Clorofila Total | Carotenoides         |
| Tratamentos                                                             | 0,0023*       | 0,0000**    | 0,0002**        | 0,4296 <sup>ns</sup> |
| Média                                                                   | 0,87 ± 0,05   | 0,13 ± 0,01 | 1,01 ± 0,06     | 32,95 ± 0,89         |
| CV (%)                                                                  | 23,63         | 24,66       | 21,00           | 14,86                |
| Fe (mg/dm <sup>3</sup> de solo)                                         | Médias (mg/g) |             |                 |                      |
| 0                                                                       | 1,02 ± 0,12   | 0,20 ± 0,01 | 1,22 ± 0,12     | 32,57 ± 2,88         |
| 100                                                                     | 1,24 ± 0,09   | 0,20 ± 0,01 | 1,44 ± 0,09     | 36,54 ± 1,89         |
| 200                                                                     | 0,78 ± 0,05   | 0,16 ± 0,02 | 0,94 ± 0,05     | 34,64 ± 0,89         |
| 300                                                                     | 0,76 ± 0,08   | 0,10 ± 0,02 | 0,87 ± 0,08     | 31,63 ± 2,89         |
| 400                                                                     | 0,76 ± 0,10   | 0,07 ± 0,01 | 0,83 ± 0,11     | 30,77 ± 1,93         |
| 500                                                                     | 0,69 ± 0,10   | 0,07 ± 0,01 | 0,77 ± 0,10     | 31,54 ± 2,00         |
| Regressão p valor                                                       |               |             |                 |                      |
| Linear                                                                  | 0,0023        | 0,0000      | 0,0002          | 0,4296               |
| Quadrática                                                              | 0,0023        | -           | -               | -                    |
| Cúbica                                                                  | 0,0011        | -           | -               | -                    |
| Desvio da regressão                                                     | 0,036         | 0,188       | 0,060           | -                    |

Nota: FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*: diferença significativa a 5%; \*\*: diferença significativa a 1%; <sup>ns</sup>: não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

**Figura 12** - Quantificação de Clorofila *a*, *b* e *total* (mg/g de massa fresca) em folhas de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

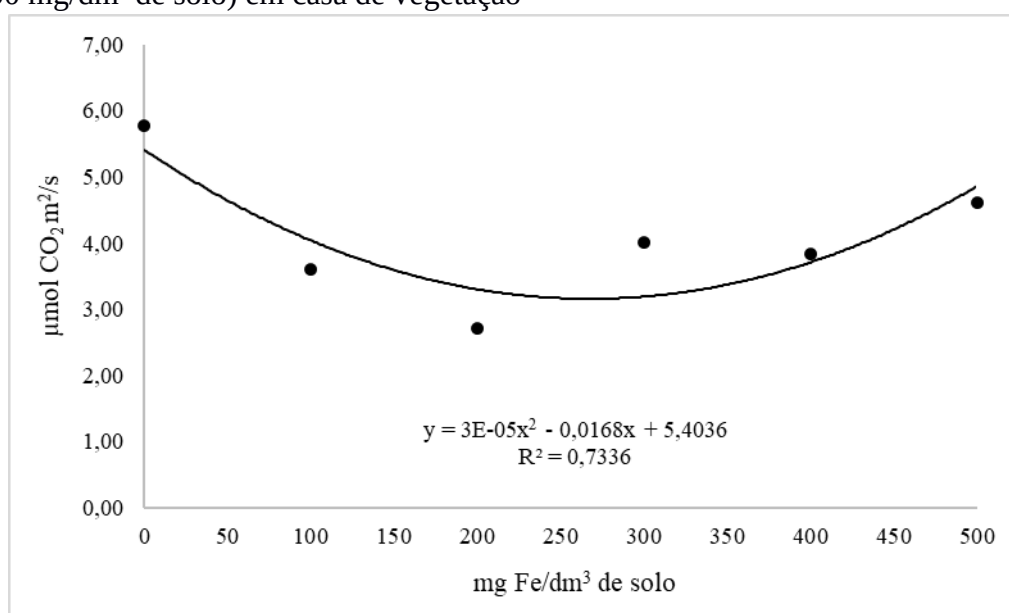
**Tabela 6** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para trocas gasosas: taxa fotossintética (A:  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}$ ); transpiração (E:  $\text{mmol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ); condutância estomática (gs:  $\text{mol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por ferro ( $\text{mg/dm}^3$  de solo). Número de observações: 30.

| Quadrado médio dos tratamentos de ferro em <i>Leucaena leucocephala</i> |                                                    |                                                 |                                                 |
|-------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| FV                                                                      | A<br>( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}$ ) | E<br>( $\text{mmol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) | gs<br>( $\text{mol H}_2\text{O m}^2/\text{s}$ ) |
| Tratamentos                                                             | 0,0011**                                           | 0,0001**                                        | 0,0049**                                        |
| Média                                                                   | $4,08 \pm 0,24$                                    | $8,14 \pm 0,36$                                 | $197,16 \pm 7,41$                               |
| CV (%)                                                                  | 23,35                                              | 16,19                                           | 16,26                                           |
| Fe ( $\text{mg/dm}^3$ de solo)                                          | Médias                                             |                                                 |                                                 |
| 0                                                                       | $5,76 \pm 0,67$                                    | $5,07 \pm 0,62$                                 | $144,00 \pm 15,71$                              |
| 100                                                                     | $3,60 \pm 0,16$                                    | $10,19 \pm 0,63$                                | $233,00 \pm 17,71$                              |
| 200                                                                     | $2,70 \pm 0,16$                                    | $8,78 \pm 0,43$                                 | $206,00 \pm 10,31$                              |
| 300                                                                     | $4,00 \pm 0,63$                                    | $7,93 \pm 0,73$                                 | $208,40 \pm 20,41$                              |
| 400                                                                     | $3,82 \pm 0,33$                                    | $8,82 \pm 0,47$                                 | $208,20 \pm 1,74$                               |
| 500                                                                     | $4,60 \pm 0,28$                                    | $8,03 \pm 0,60$                                 | $183,33 \pm 12,11$                              |
| Regressão p valor                                                       |                                                    |                                                 |                                                 |
| Linear                                                                  | 0,0011                                             | 0,0001                                          | 0,0049                                          |
| Quadrática                                                              | 0,0011                                             | 0,0001                                          | 0,0049                                          |
| Cúbica                                                                  | -                                                  | 0,0001                                          | 0,0049                                          |
| Quarta                                                                  | -                                                  | -                                               | 0,0049                                          |
| Desvio da regressão                                                     | 0,076                                              | 0,009                                           | 0,418                                           |

FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*\*: diferença significativa a 1%; ns: não significativo a 5% de probabilidade.

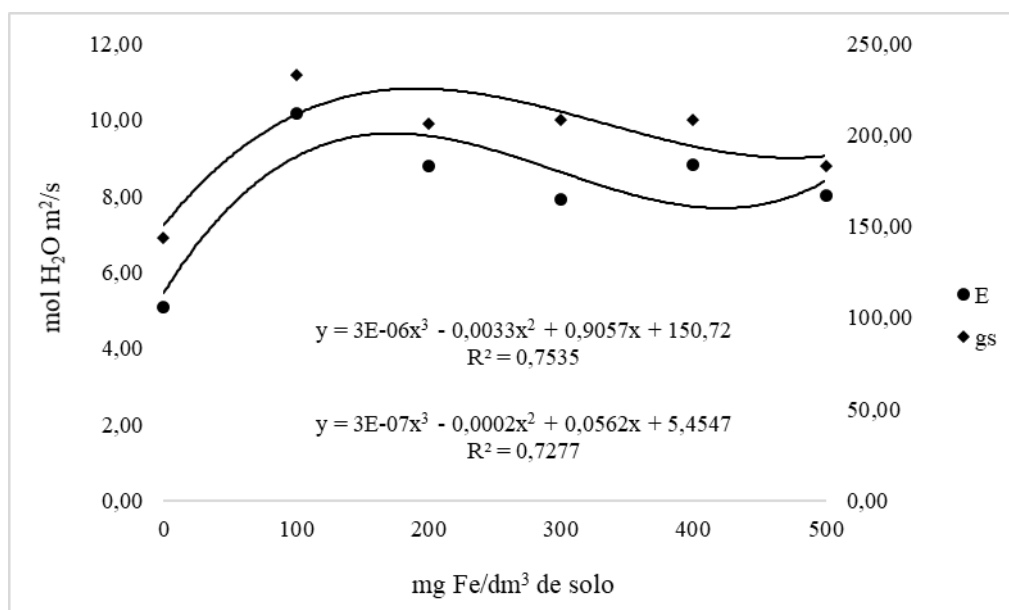
Fonte: Próprio autor.

**Figura 13** - Quantificação de fotossíntese líquida ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^2/\text{s}^1$ ) em folhas de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg/dm}^3$  de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

**Figura 14** - Quantificação da taxa de transpiração (E) e condutância estomática (gs), (mol H<sub>2</sub>O m<sup>2</sup>/s), em folhas de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

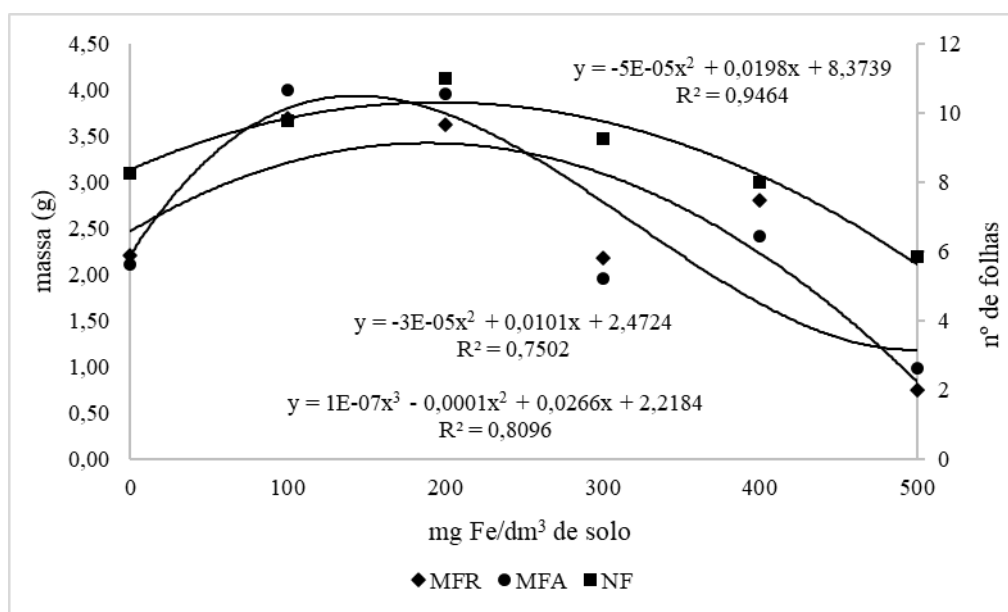
**Tabela 7** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para medidas de crescimento: número de folhas; comprimento do caule e da raiz (cm); massa fresca do caule e da raiz (g) de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por ferro (mg/dm<sup>3</sup> de solo). Número de observações: 30

| Quadrado médio dos tratamentos de ferro em <i>Leucaena leucocephala</i> |                  |                           |                          |                          |                                 |
|-------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| FV                                                                      | Número de folhas | Comprimento do caule (cm) | Comprimento da raiz (cm) | Massa fresca da raiz (g) | Massa fresca da parte aérea (g) |
| Tratamentos                                                             | 0,0085*          | 0,0713 <sup>ns</sup>      | 0,3025 <sup>ns</sup>     | 0,0000**                 | 0,0000**                        |
| Média                                                                   | 8,69 ± 0,44      | 19,12 ± 0,50              | 19,12 ± 0,75             | 2,55 ± 0,19              | 2,57 ± 0,23                     |
| CV (%)                                                                  | 22,69            | 20,99                     | 20,99                    | 15,14                    | 23,72                           |
| Fe (mg/dm <sup>3</sup> de solo)                                         | Médias           |                           |                          |                          |                                 |
| 0                                                                       | 8,25 ± 1,24      | 11,70 ± 0,77              | 15,35 ± 1,69             | 2,21 ± 0,14              | 2,12 ± 0,15                     |
| 100                                                                     | 9,80 ± 0,66      | 15,75 ± 1,07              | 19,12 ± 1,92             | 3,70 ± 0,21              | 4,01 ± 0,27                     |
| 200                                                                     | 11,00 ± 0,71     | 11,50 ± 0,57              | 21,36 ± 0,74             | 3,63 ± 0,15              | 3,96 ± 0,44                     |
| 300                                                                     | 9,25 ± 0,86      | 12,04 ± 1,13              | 19,00 ± 2,33             | 2,18 ± 18,17             | 1,96 ± 0,22                     |
| 400                                                                     | 8,00 ± 0,71      | 13,00 ± 0,88              | 20,16 ± 2,00             | 2,80 ± 0,20              | 2,41 ± 0,19                     |
| 500                                                                     | 5,84 ± 0,97      | 11,82 ± 1,59              | 19,74 ± 1,68             | 0,75 ± 0,14              | 0,98 ± 0,28                     |
| Regressão p valor                                                       |                  |                           |                          |                          |                                 |
| Linear                                                                  | 0,0049           | 0,0713                    | 0,3025                   | 0,0000                   | 0,0000                          |
| Quadrática                                                              | 0,0049           | -                         | -                        | 0,0000                   | 0,0000                          |
| Cúbica                                                                  | -                | -                         | -                        | -                        | 0,0000                          |
| Desvio da regressão                                                     | 0,782            | -                         | -                        | 0,000                    | 0,001                           |

Nota: FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*: diferença significativa a 5%; \*\*: diferença significativa a 1%; <sup>ns</sup>: não significativo a 5% de probabilidade.

Fonte: Próprio autor.

**Figura 15** - Quantificação da massa fresca das raízes (MFR) e da massa fresca da parte aérea (MFA), em gramas, e número de folhas (NF) de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

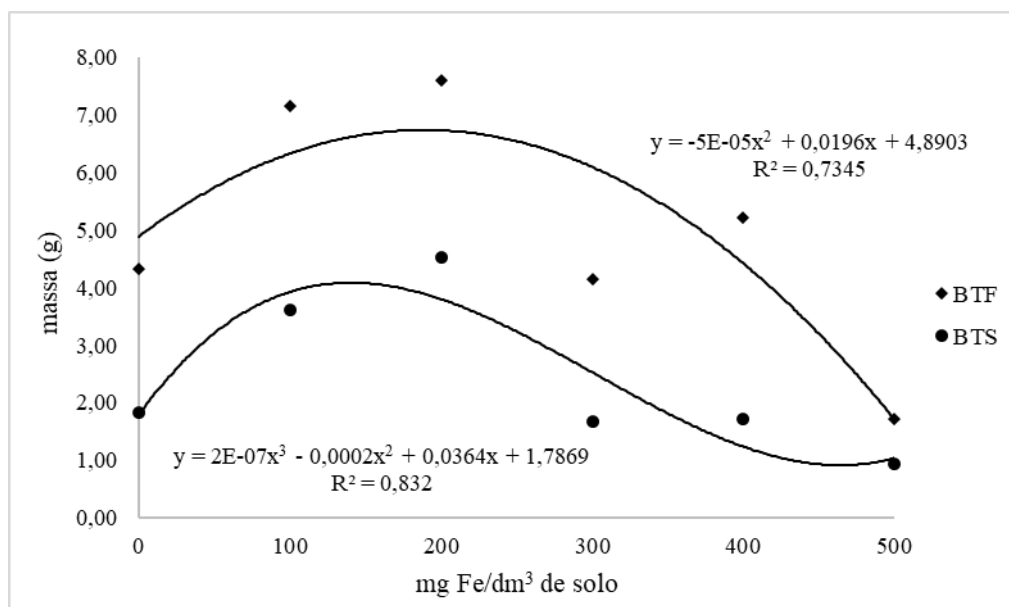
**Tabela 8** - Quadrado médio e significância da análise de variância, médias e regressões para a biomassa (g) fresca e seca de *Leucaena leucocephala* cultivadas em solo contaminado por ferro (mg/dm<sup>3</sup> de solo). Número de observações: 30

| Quadrado médio dos tratamentos de ferro em <i>Leucaena leucocephala</i> |                 |               |
|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|---------------|
| FV                                                                      | Biomassa Fresca | Biomassa Seca |
| Tratamentos                                                             | 0,0000**        | 0,0000**      |
| Média                                                                   | 5,03 ± 0,40     | 2,39 ± 0,26   |
| CV (%)                                                                  | 18,18           | 28,41         |
| Fe (mg/dm <sup>3</sup> de solo)                                         | Médias (g)      |               |
| 0                                                                       | 4,33 ± 0,27     | 1,84 ± 0,24   |
| 100                                                                     | 7,16 ± 0,40     | 3,62 ± 0,32   |
| 200                                                                     | 7,59 ± 0,58     | 4,53 ± 0,51   |
| 300                                                                     | 4,14 ± 0,36     | 1,68 ± 0,24   |
| 400                                                                     | 5,22 ± 0,39     | 1,72 ± 0,15   |
| 500                                                                     | 1,73 ± 0,39     | 0,93 ± 0,24   |
| Regressão p valor                                                       |                 |               |
| Linear                                                                  | 0,0000          | 0,0000        |
| Quadrática                                                              | 0,0000          | 0,0000        |
| Cúbica                                                                  | -               | 0,0000        |
| Desvio da regressão                                                     | 0,000           | 0,001         |

Nota: FV: fonte de variação; CV: coeficiente de variação; \*\*: significativo a 1% de probabilidade.

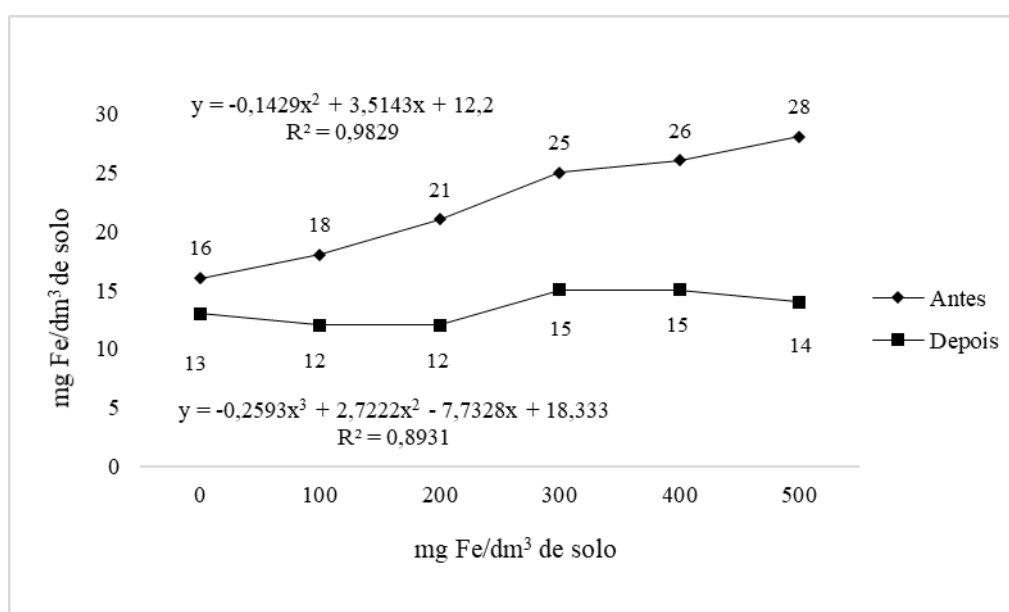
Fonte: Próprio autor.

**Figura 16** - Quantificação da biomassa total fresca (BTF) e da biomassa total seca (BTS), em gramas, de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



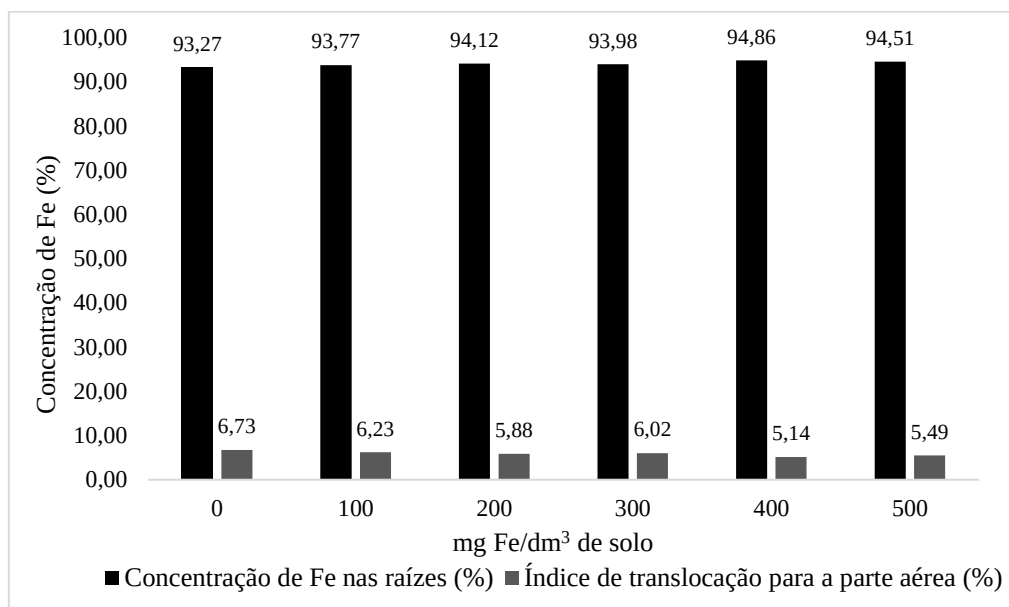
Fonte: Próprio autor.

**Figura 17** - Disponibilidade de ferro no solo (mg/dm<sup>3</sup> de solo), antes e depois, do cultivo de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



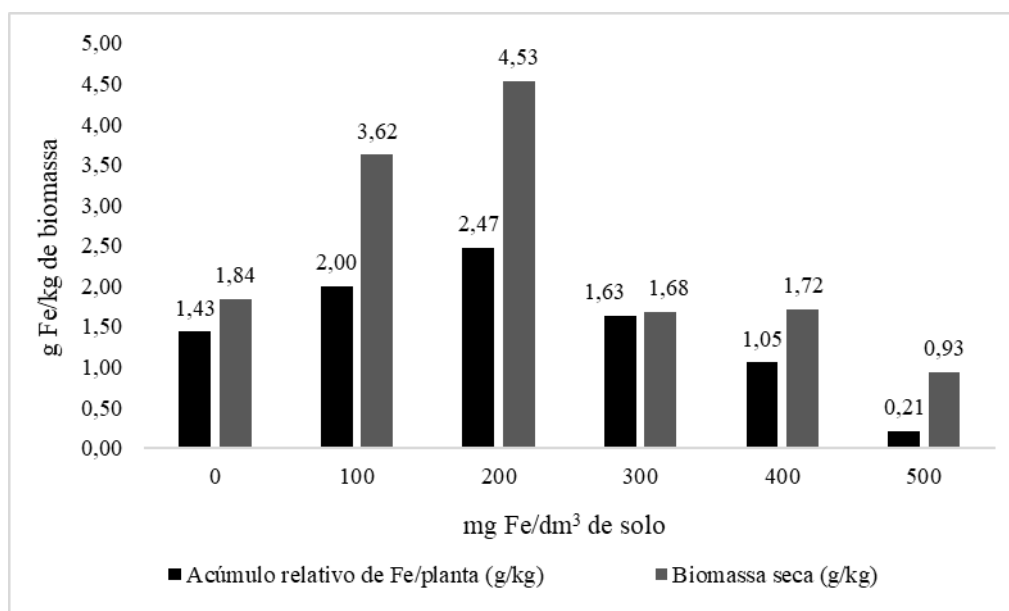
Fonte: Próprio autor.

**Figura 18** - Concentração (%) de ferro na raiz e índice de translocação (IT%) para a parte aérea de *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

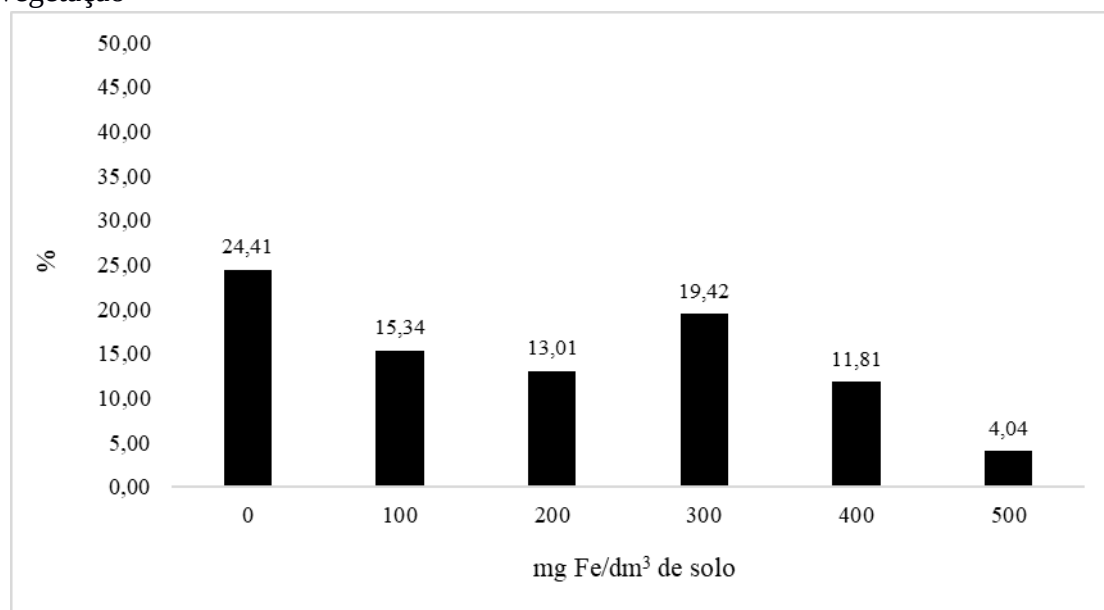
**Figura 19** - Acúmulo relativo (g/kg) de ferro por planta e biomassa (g/kg) total seca de *Leucaena leucocephala* (raiz e parte aérea) por tratamento, cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

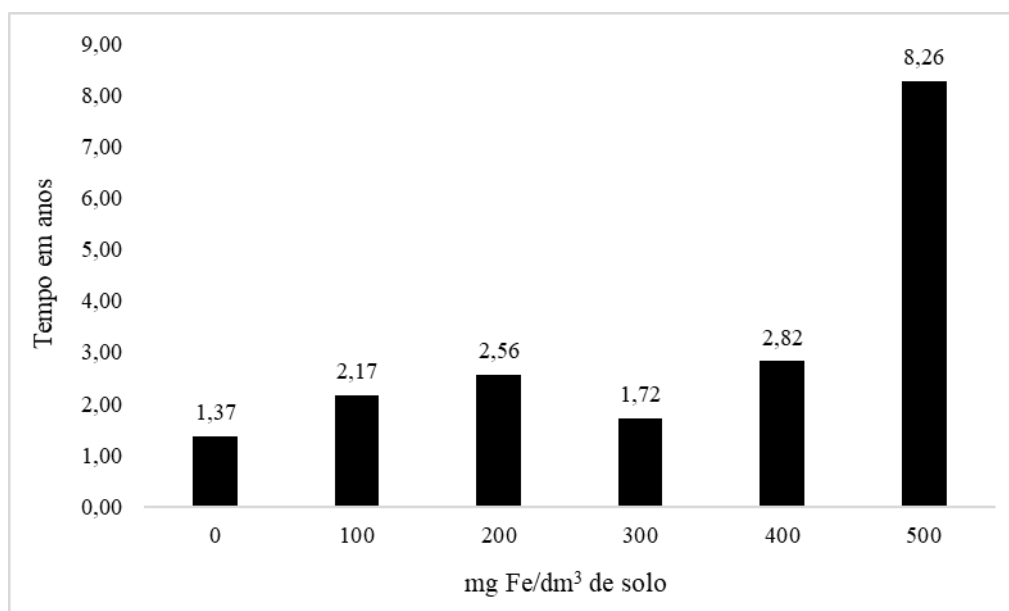


**Figura 20** - Eficiência de remoção (%) de ferro por *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

**Figura 21** - Tempo, em anos, para remoção de ferro por *Leucaena leucocephala* cultivada em seis concentrações de ferro (0, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/dm<sup>3</sup> de solo) em casa de vegetação



Fonte: Próprio autor.

## REFERÊNCIA

- ABADÍA, J.; VÁZQUEZ, S.; RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; EL-JENDOUBI, H. *et al.* Towards a knowledge-based correction of iron chlorosis. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 49, n. 5, p. 471-482, 2011.
- ABHILASH, P. C.; POWELL, J. R.; SINGH, H. B.; SINGH, B. K. Plant-microbe interactions: novel applications for exploitation in multipurpose remediation technologies. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 416-420, 2012.
- ADAMSKI, J. M.; PETERS, J. A.; DANIELOSKI, R.; BACARIN, M. A. Excess iron-induced changes in the photosynthetic characteristics of sweet potato. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 17, p. 2056-2062, 2011.
- ARAÚJO, C. V. M.; CEDEÑO-MACIAS, L. A. Heavy metals in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) landed on the Ecuadorian coast. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 541, p. 149-154, 2016.
- ARMSTRONG, M.; PETTER, R.; PETTER, C. Why have so many tailings dams failed in recent years? **Resources Policy**, Guildford, v. 63, p. 101412, 2019.
- BALK, J.; PILON, M. Ancient and essential: the assembly of iron-sulfur clusters in plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 218-226, 2011.
- BECKER, M.; ASCH, F. Iron toxicity in rice: conditions and management concepts. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, [s. l.], v. 168, n. 4, p. 558-573, 2005.
- BENINCASA, M. M. P. **Análise de crescimento de plantas: noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41 p.
- BETTENCOURT, A. O.; TEIXEIRA, M. M. G. R.; ELIAS, M. D. T.; FAISCA, M. C. Soil to plant transfer of Radium-226. **Journal of Environmental Radioactivity**, Oxford, v. 6, n. 1, p. 49-60, 1988.
- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 5, p. 359-373, 2010.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- BRIAT, J.-F.; RAVET, K.; ARNAUD, N.; DUC, C. *et al.* New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 5, p. 811-822, 2009.

BROADLEY, M.; BROWN, P.; CAKMAK, I.; RENGEL, Z. *et al.* Chapter 7 - Function of Nutrients: Micronutrients. In: MARSCHNER, P. (ed.). **Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants (Third Edition)**. San Diego: Academic Press, 2012. p. 191-248.

CARO, A.; PUNTARULO, S. Effect of in vivo iron supplementation on oxygen radical production by soybean roots. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1291, n. 3, p. 245-251, 1996.

CARVALHO, M. S. D.; RIBEIRO, K. D.; MOREIRA, R. M.; ALMEIDA, A. M. D. Concentração de metais no rio Doce em Mariana, Minas Gerais, Brasil. **Acta Brasiliensis**, Brasília, DF, v. 1 n. 3, 2017.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Decisão da diretoria nº 068/2016/E de 22 de novembro de 2016**: valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. São Paulo, 2016.

CHAFFAI, R.; KOYAMA, H. Chapter 1: Heavy Metal Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Advances in Botanical Research**, New York, v. 60, p. 1-49, 2011.

CHOPPALA, G.; SAIFULLAH; BOLAN, N.; BIBI, S. *et al.* Cellular mechanisms in higher plants governing tolerance to cadmium toxicity. **Critical reviews in plant sciences**, [s. l.], v. 33, n. 5, p. 374-391, 2014.

CIADAMIDARO, L.; GIRARD CLOS, O.; BERT, V.; ZAPPELINI, C. *et al.* Poplar biomass production at phytomanagement sites is significantly enhanced by mycorrhizal inoculation. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 139, p. 48-56, 2017.

DA SILVA, L. C.; DE ARAÚJO, T. O.; MARTINEZ, C. A.; DE ALMEIDA LOBO, F. *et al.* Differential responses of C3 and CAM native Brazilian plant species to a SO<sub>2</sub>- and SPMFe-contaminated Restinga. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 22, n. 18, p. 14007-14017, 2015.

DARY, M.; CHAMBER-PÉREZ, M.; PALOMARES, A.; PAJUELO, E. "In situ" phytostabilisation of heavy metal polluted soils using *Lupinus luteus* inoculated with metal resistant plant-growth promoting rhizobacteria. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 177, n. 1-3, p. 323-330, 2010.

DE ARAÚJO, T. O.; DE FREITAS-SILVA, L.; SANTANA, B. V. N.; KUKI, K. N. *et al.* Tolerance to iron accumulation and its effects on mineral composition and growth of two grass species. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 2777-2784, 2014.

DE LA FUENTE, C.; PARDO, T.; ALBURQUERQUE, J. A.; MARTÍNEZ-ALCALÁ, I. *et al.* Assessment of native shrubs for stabilisation of a trace elements-polluted soil as the final phase of a restoration process. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s. l.], v. 196, p. 103-111, 2014.

DRUMOND, M. A.; RIBASKI, J. **Leucena (*Leucaena leucocephala*):** leguminosa de uso múltiplo para o semiárido brasileiro. Colombo: Embrapa Florestas, 2010; Petrolina: Embrapa Semiárido, 8. (Embrapa Florestas. Comunicado técnico, 262; Embrapa Semiárido. Comunicado técnico, 142), 2010.

EMBRAPA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos.** 5 ed. rev. e ampl., Brasília, DF: Embrapa, 2018. 356 p.

ERAKHRUMEN, A.; AGBONTALOR, A. Phytoremediation: An environmentally sound technology for pollution prevention, control and remediation in developing countries. **Educational Research and Review**, Washington, v. 2, n. 7, p. 151-156, 2007.

ESRINGÜ, A.; TURAN, M.; GÜNEŞ, A.; KARAMAN, M. R. Roles of *Bacillus megaterium* in Remediation of Boron, Lead, and Cadmium from Contaminated Soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s. l.], v. 45, n. 13, p. 1741-1759, 2014/07/20 2014.

FERNANDES, R. B. A.; BARRÓN, V.; TORRENT, J.; FONTES, M. P. F. Quantificação de óxidos de ferro de Latossolos brasileiros por espectroscopia de refletância difusa. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Santa Maria, v. 28, p. 245-257, 2004.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

GERHARDT, K. E.; GERWING, P. D.; HUANG, X.-D.; GREENBERG, B. M. Microbe-assisted phytoremediation of petroleum impacted soil: a scientifically proven green technology., **Handbook of oil spill science and technology**. Wiley: Hoboken, 2015. p. 407-427.

GÓMEZ-SAGASTI, M. T.; ALKORTA, I.; BECERRIL, J. M.; EPELDE, L. *et al.* Microbial monitoring of the recovery of soil quality during heavy metal phytoremediation. **Water, Air, and Soil Pollution**, [s. l.], v. 223, n. 6, p. 3249-3262, 2012.

GUERINOT, M. L.; YI, Y. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 104, n. 3, p. 815-820, 1994.

HAN, Z.; GUO, Z.; ZHANG, Y.; XIAO, X. *et al.* Potential of Pyrolysis for the Recovery of Heavy Metals and Bioenergy from Contaminated *Broussonetia papyrifera* Biomass. **BioResources**, [s. l.], v. 13, p. 2932-2944, 2018.

HASSAN, Z.; AARTS, M. Opportunities and Feasibilities for Biotechnological Improvement of Zn, Cd or Ni Tolerance and Accumulation in Plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 72, p. 53-63, 2011.

HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J. M.; ZÁRATE, O.; GARBISU, C. Assessment of the efficiency of a metal phytoextraction process with biological indicators of soil health. **Plant and Soil**, The Hague, v. 281, n. 1-2, p. 147-158, 2006.

HISCOX, J.; ISRAELSTAM, G. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal of botany**, Ottawa, v. 57, n. 12, p. 1332-1334, 1979.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Rompimento da barragem do Vale em Brumadinho MG destruiu 269,84 hectares**. Brasília, DF, 2019.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Diretoria de Proteção Ambiental e DIPRO e Coordenação Geral de Emergências Ambientais - CGEMA. **Lauda Técnico Preliminar: impactos ambientais decorrentes do desastre envolvendo o rompimento da barragem de Fundão, em Mariana, Minas Gerais, Novembro de 2015**.

ISHIHARA, K.; HONDA, M. Transcriptome analysis of *Leucaena leucocephala* and identification of highly expressed genes in roots and shoots. **Transcriptomics: Open Access**, [s. l.], v. 4, 2016.

JORGE, R. A. B.; ABREU, C. A. d.; ANDRADE, C. A. d.; CAMARGO, O. A. d. Torta de filtro e turfa na mitigação de solo contaminado com resíduo de sucata rico em boro. **Bragantia**, Campinas, v. 69, p. 467-476, 2010.

JOSE, A.; RAY, J. G. Toxic heavy metals in human blood in relation to certain food and environmental samples in Kerala, South India. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 8, p. 7946-7953, 2018.

KER, J. C. Latossolos do Brasil: uma revisão. **Revista Geonomos**, Belo Horizonte, v. 5, n. 1, p. 17-40, 1997.

LILL, R. Function and biogenesis of iron-sulphur proteins. **Nature**, London, v. 460, n. 7257, p. 831-838, 2009.

LIMA, L. R.; SILVA, H. F.; BRIGNONI, A. S.; SILVA, F. G. *et al.* Characterization of biomass sorghum for copper phytoremediation: photosynthetic response and possibility as a bioenergy feedstock from contaminated land. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 433-441, 2019.

LINS, C. E. L.; CAVALCANTE, U. M. T.; SAMPAIO, E. V. S. B.; MESSIAS, A. S. *et al.* Growth of mycorrhized seedlings of *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit. in a copper contaminated soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 31, n. 3, p. 181-185, 2006.

LOBRÉAUX, S.; THOIRON, S.; BRIAT, J.-F. Induction of ferritin synthesis in maize leaves by an iron-mediated oxidative stress. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 443-449, 1995.

LOPES, A. S. **Manual internacional de fertilidade do solo**. Instituto da Potassa & Fósforo. 2 ed. rev. e ampl. Piracicaba: POTAFOS, 1998. 177 p.

LÜBBEN, S.; SAUERBECK, D. The uptake and distribution of heavy metals by spring wheat. **Water, Air, and Soil Pollution**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 239-247, 1991.

MAIA, F.F. **Elementos traços em sedimentos e qualidade da água dos rios afetados pelo rompimento da Barragem de Fundão, em Mariana, MG**. 44 f. 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2017.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2.ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MARENCO, R. A.; LOPES N. F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. Viçosa, MG: UFV, 2009. p. 267-297.

MARSCHNER, H. **Function of mineral nutrients: micronutrients**. [S. l.]: Mineral Nutrition of Higher Plants, 1995.

MEJÁRE, M.; BÜLOW, L. Metal-binding proteins and peptides in bioremediation and phytoremediation of heavy metals. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 19, n. 2, p. 67-73, 2001.

MEMON, A. R.; SCHRÖDER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 162-175, 2009.

MENCH, M.; SCHWITZGUÉBEL, J. P.; SCHROEDER, P.; BERT, V. *et al.* Assessment of successful experiments and limitations of phytotechnologies: Contaminant uptake, detoxification and sequestration, and consequences for food safety. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 876-900, 2009.

MIKULA, K.; IZYDORCZYK, G.; SKRZYPCZAK, D.; MIRONIUK, M. *et al.* Controlled release micronutrient fertilizers for precision agriculture: a review. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 712, p. 136365, 2020.

MORTVEDT, J. J. Plant and Soil Relationships of Uranium and Thorium Decay Series Radionuclides—A Review. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 23, n. 4, p. 643-650, 1994.

PEKKER, I.; TEL-OR, E.; MITTLER, R. Reactive oxygen intermediates and glutathione regulate the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during iron-mediated oxidative stress in bean. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 49, n. 5, p. 429-438, 2002.

PINTO, S. d. S.; SOUZA, A. E. d.; OLIVA, M. A.; PEREIRA, E. G. Oxidative damage and photosynthetic impairment in tropical rice cultivars upon exposure to excess iron. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 73, p. 217-226, 2016.

PRASAD, M. N. V. Phytoremediation of Metal-Polluted Ecosystems: Hype for Commercialization. **Russian Journal of Plant Physiology**, Birmingham, v. 50, n. 5, p. 686-701, 2003.

PUGH, R. E.; DICK, D. G.; FREDEEN, A. L. Heavy Metal (Pb, Zn, Cd, Fe, and Cu) Contents of Plant Foliage near the Anvil Range Lead/Zinc Mine, Faro, Yukon Territory. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 52, n. 3, p. 273-279, 2002.

RAHMAN, M. M.; AZIRUN, S. M.; BOYCE, A. N. Enhanced Accumulation of Copper and Lead in Amaranth (*Amaranthus paniculatus*), Indian Mustard (*Brassica juncea*) and Sunflower (*Helianthus annuus*). **PLOS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. e62941, 2013.

RAIJ, B. VAN. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Ceres, 1991. 343 p.

RAIJ, B. VAN.; ANDRADE, J. C.; CANTARELA, H.; QUAGGIO, J. A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001.

RAVET, K.; TOURAINE, B.; BOUCHEREZ, J.; BRIAT, J.-F. *et al.* Ferritins control interaction between iron homeostasis and oxidative stress in Arabidopsis. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 57, n. 3, p. 400-412, 2009.

RIOS, C. O.; DE SOUZA, B. C.; SIQUEIRA-SILVA, A. I.; PEREIRA, E. G. Assessment of iron toxicity in tropical grasses with potential for revegetating mined areas. **Polish Journal of Environmental Studies**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 2167-2173, 2017.

ROBINSON, B. H.; BAÑUELOS, G.; CONESA, H. M.; EVANGELOU, M. W. H. *et al.* The phytomanagement of trace elements in soil. **Critical Reviews in Plant Sciences**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 240-266, 2009.

ROHDE, V.; HAHN, T.; WAGNER, M.; BÖRINGER, S. *et al.* Potential of a short rotation coppice poplar as a feedstock for platform chemicals and lignin-based building blocks. **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 123, p. 698-706, 2018.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, A. S.; CARRILLO-GONZÁLEZ, R.; GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M. d. C. A.; ROSAS-SAITO, G. H. *et al.* Phytobarriers: Plants capture particles containing potentially toxic elements originating from mine tailings in semiarid regions. **Environmental Pollution**, Barking, v. 205, p. 33-42, 2015.

SANTANA, B. V. N.; DE ARAÚJO, T. O.; ANDRADE, G. C.; DE FREITAS-SILVA, L. *et al.* Leaf morphoanatomy of species tolerant to excess iron and evaluation of their phytoextraction potential. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 2550-2562, 2014.

SARWAR, N.; IMRAN, M.; SHAHEEN, M. R.; ISHAQUE, W. *et al.* Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. **Chemosphere**, Oxford, v. 171, p. 710-721, 2017.

SARWAR, N.; SAIFULLAH; MALHI, S. S.; ZIA, M. H. *et al.* Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 6, p. 925-937, 2010.

SCHMIDT, W. Iron Stress Responses in Roots of Strategy I Plants. In: BARTON, L. L. e ABADIA, J. (ed.). **Iron Nutrition in Plants and Rhizospheric Microorganisms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2006. p. 229-250.



SEGURA, F. R.; NUNES, E. A.; PANIZ, F. P.; PAULELLI, A. C. C. *et al.* Potential risks of the residue from Samarco's mine dam burst (Bento Rodrigues, Brazil). **Environmental Pollution**, Barking, v. 218, p. 813-825, 2016.

SILVA ROTTA, L. H.; ALCÂNTARA, E.; PARK, E.; NEGRI, R. G. *et al.* The 2019 Brumadinho tailings dam collapse: Possible cause and impacts of the worst human and environmental disaster in Brazil. **International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation**, [s. l.], v. 90, p. 102119, 2020.

SINGH, S. Phytoremediation: a sustainable alternative for environmental challenges. **Int J Gr Herb Chem**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 133-139, 2012.

SIQUEIRA-SILVA, A. I.; RIOS, C. O.; PEREIRA, E. G. Iron toxicity resistance strategies in tropical grasses: The role of apoplastic radicular barriers. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 78, p. 257-266, 2019.

SIQUEIRA-SILVA, A. I.; SILVA, L. C. d.; AZEVEDO, A. A.; OLIVA, M. A. Iron plaque formation and morphoanatomy of roots from species of restinga subjected to excess iron. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 78, p. 265-275, 2012.

SOUZA, L. A.; CAMARGOS, L. S.; CARVALHO, M. E. A. Toxic metal phytoremediation using high biomass non-hyperaccumulator crops: new possibilities for bioenergy resources. *In*: MATICHENKOV, V. *et al* (ed.). **Phytoremediation: methods, management and assessment**. New York: Nova Science Publishers, 2018. Cap. 1, p. 1-24.

THOMPSON, F.; DE OLIVEIRA, B. C.; CORDEIRO, M. C.; MASI, B. P. *et al.* Severe impacts of the Brumadinho dam failure (Minas Gerais, Brazil) on the water quality of the Paraopeba River. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 705, p. 135914, 2020.

ULLAH, A.; HENG, S.; MUNIS, M. F. H.; FAHAD, S. *et al.* Phytoremediation of heavy metals assisted by plant growth promoting (PGP) bacteria: a review. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 117, p. 28-40, 2015.

VANGRONSVELD, J.; HERZIG, R.; WEYENS, N.; BOULET, J. *et al.* Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: Lessons from the field. **Environmental Science and Pollution Research**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. 765-794, 2009.

VERA TOME, F.; BLANCO RODRÍGUEZ, M. P.; LOZANO, J. C. Soil-to-plant transfer factors for natural radionuclides and stable elements in a Mediterranean area. **Journal of environmental radioactivity**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 161-175, 2003.

WELLBURN, A. R. The Spectral Determination of Chlorophylls a and b, as well as Total Carotenoids, Using Various Solvents with Spectrophotometers of Different Resolution. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 144, n. 3, p. 307-313, 1994.



WU, L.-B.; SHHADI, M. Y.; GREGORIO, G.; MATTHUS, E. *et al.* Genetic and physiological analysis of tolerance to acute iron toxicity in rice. **Rice**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 8, 2014.

XU, S.; CHENG, Q.; ZHUANG, L.; TANG, B. *et al.* LNG vaporizers using various refrigerants as intermediate fluid: Comparison of the required heat transfer area. **Journal of Natural Gas Science and Engineering**, [s. l.], v. 25, p. 1-9, 2015.

YANG, D.; ZENG, D.-H.; ZHANG, J.; LI, L.-J. *et al.* Chemical and microbial properties in contaminated soils around a magnesite mine in northeast China. **Land Degradation & Development**, Chichester, v. 23, n. 3, p. 256-262, 2012.

YAVARI, S.; MALAKAHMAD, A.; SAPARI, N. B. A Review on Phytoremediation of Crude Oil Spills. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s. l.], v. 226, n. 8, p. 279, 2015.

ZHANG, X.; ZHANG, F.; MAO, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): phosphorus uptake. **Plant and Soil**, The Hague, v. 209, n. 2, p. 187-192, 1999.