



LUDMILA MARIA GONÇALVES GODOI DE CAMARGOS

**TOLERÂNCIA E POTENCIAL BIOACUMULADOR DE *Vetiveria zizanioides* L. Nash
CULTIVADA *IN VITRO* SOB EFEITO DE ZINCO E COBRE**

**BAMBUÍ – MG
2017**

LUDMILA MARIA GONÇALVES GODOI DE CAMARGOS

**TOLERÂNCIA E POTENCIAL BIOACUMULADOR DE *Vetiveria zizanioides* L. Nash
CULTIVADA *IN VITRO* SOB EFEITO DE ZINCO E COBRE**

Dissertação apresentada ao Instituto Federal Minas Gerais – *Campus* Bambuí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental, para a obtenção do título de Mestre.

Dr. Ricardo Monteiro Corrêa
Orientador

Dr. Gustavo Augusto Lacorte
Coorientador

BAMBUÍ – MG
2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE MINAS GERAIS

Avenida Professor Mário Werneck, nº. 2590, Bairro Buritis, Belo Horizonte, CEP 30575-180,
Estado de Minas Gerais

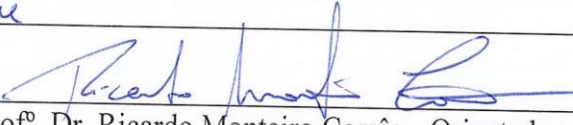


FICHA DE APROVAÇÃO

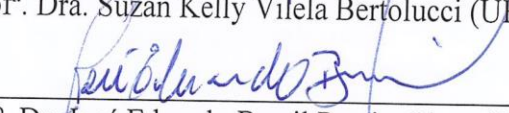
Dissertação de Mestrado, intitulada "*Aplicabilidade da Cultura de Tecidos Vegetais em Estudos de Fitorremediação: Avaliação in Vitro da Tolerância e do Potencial Bioacumulador de Chrysopogon zizanioides (Capim Vetiver) sob Efeito de Metais Pesados Emitidos pela Indústria Cimenteira*", de autoria da mestrandia em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental Ludmila Maria Gonçalves Godoi de Camargos, aprovada pela Banca Examinadora de Defesa, em 04/08/2017, com a média de pontuação de 95.

Título do Trabalho – houve alteração () Sim () Não

Se sim, qual o novo título Tolerância e potencial bioacumulador de vetiveria zizanioides L. Nash cultivada in vitro sob efeito de zinco e cobre


Prof. Dr. Ricardo Monteiro Corrêa - Orientador


Prof. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci (UFLA)


Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto (UFLA)


Prof. Dr. Ricardo Sousa Cavalcanti

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental do IFMG

C172a Camargos, Ludmila Maria Gonçalves Godoi de
Tolerância e potencial bioacumulador de *Vetiveria zizanioides* L.
Nash cultivada *in vitro* sob efeito de zinco e cobre. / Ludmila Maria
Gonçalves Godoi de Camargos. – 2017.
108f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Monteiro Corrêa
Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Minas Gerais – *campus*
BambuÍ, MG, Curso Mestrado Profissional em Sustentabilidade e
Tecnologia Ambiental, 2017.

1. Recuperação de solos contaminados. 2. Mineração. 3.
Elementos-traços. 4. Bioacumulação. 5. Capim vetiver. I. Corrêa,
Ricardo Monteiro. II. Título.

CDD 333.7072

*Aos meus queridos pais, irmãos, esposo e amigos,
pelo incentivo que me impulsiona a buscar novas conquistas.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por tudo que Ele representa em minha vida e pelo Seu amor incondicional que nunca me desampara.

Aos meus amados pais, Antonio Fernandes Godoi e Laurides Gonçalves Godoi, pilares da minha vida, que desde muito cedo me ensinaram valores e princípios fundamentais para a minha formação cristã e profissional. Minha eterna gratidão!

Aos meus queridos irmãos e cunhados que sempre me encorajam, por acreditarem no meu potencial. Minha família, minha fortaleza!

Ao meu esposo Alessandro Cristiano de Camargos pelo amor, paciência, compreensão e pela ajuda fundamental durante a montagem do experimento. Seu incentivo sempre me deu forças para a concretização deste trabalho!

A minha querida amiga Maísa Paula pelo apoio emocional, técnico e profissional em todos os momentos dessa jornada.

À amiga Sandra Faria pelas palavras de carinho, conforto, incentivo e confiança que sempre, direcionada por Deus, me concede.

Ao Instituto Federal Minas Gerais – *Campus* Bambuí (IFMG) e ao Programa de Pós-Graduação em Sustentabilidade e Tecnologia Ambiental (MPSTA), pela oportunidade e estrutura concedida para realização deste trabalho.

Ao secretário do MPSTA, Ronaldo dos Reis Barbosa, pela disponibilidade, competência e atenção dispensada, a nós alunos, durante todo o curso.

Aos meus colegas de Mestrado, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo sempre presente em nossa relação.

Aos meus colegas, Técnicos de Laboratório, do Departamento de Ciências Agrárias, IFMG – *Campus* Bambuí, pela compreensão e companheirismo.

Aos colegas do Laboratório de Análise de Solos, IFMG – *Campus* Bambuí, que atenciosamente me auxiliaram durante as análises foliares.

À professora Rosy Mary dos Santos Isaias, ao técnico Wagner Rocha e aos alunos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Botânica – UFMG, pela simpatia como que me receberam no laboratório para realização das análises microscópicas de anatomia foliar e radicular.

Ao meu orientador, professor Ricardo Monteiro Corrêa, pela amizade, exemplo profissional, ensinamentos, paciência, confiança e incentivo durante a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Ao meu coorientador, professor Gustavo Augusto Lacorte, pelo apoio, confiança e contribuições fundamentais para este trabalho.

Ao professor Ricardo Sousa Cavalcanti, pela demonstração sempre presente de amizade, carinho, incentivo e, principalmente, por acreditar verdadeiramente no meu potencial.

Aos demais professores do MPSTA, agradeço os ensinamentos valiosos para a minha formação. Em especial ao professor Neimar Freitas Duarte, que durante a disciplina “Metodologia Científica” nos ensinou técnicas que facilitaram a redação desta dissertação.

Aos membros da banca, professor José Eduardo Brasil Pereira Pinto (UFLA) e professora Suzan Kelly Vilela Bertolucci (UFLA), que gentilmente aceitaram o convite e se dispuseram a dar contribuições importantes para este trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização e finalização de mais uma etapa da minha vida. Muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO GERAL

Camargos, Ludmila Maria Gonçalves Godoi de. **Tolerância e potencial bioacumulador de *Vetiveria zizanioides* L. Nash cultivada *in vitro* sob efeito de zinco e cobre.** Bambuí: IFMG – *Campus Bambuí*, 2017. 108p.

A produção de cimento representa uma atividade industrial com elevado potencial poluidor, sendo que os níveis e as características das emissões estão diretamente relacionados com o perfil tecnológico e operacional do processo produtivo. Dentre os poluentes emitidos pelas indústrias cimenteiras destacam-se os metais pesados, uma vez que representam um grupo de contaminante com alta toxicidade e persistência nos ambientes naturais, sobretudo no solo. Técnicas de remediação baseadas em princípios químicos, físicos e biológicos têm sido propostas para a reabilitação de solos contaminados por metais pesados, entretanto a maioria delas exige alto investimento, o que acaba por inviabilizar tais procedimentos. Nesse contexto, a fitorremediação pode ser considerada um método promissor, visto que apresenta custo relativamente baixo e grande eficiência na estabilização e/ou recuperação de áreas degradadas por poluentes orgânicos e metais pesados. Todavia, uma das principais dificuldades dessa técnica é a seleção de plantas tolerantes ou acumuladoras de elementos-traço, através de protocolos ou metodologias eficientes, com resultados representativos e geração reduzida de resíduos contaminados para o ambiente. Técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos vegetais, podem representar ferramentas importantes para a otimização de protocolos que avaliem o potencial fitorremediador de espécies vegetais. O presente trabalho objetivou identificar os principais metais pesados emitidos pelas indústrias cimenteiras, avaliar a aplicabilidade da técnica de cultura de tecidos vegetais em estudos de fitorremediação, além de investigar a tolerância e o potencial bioacumulador de *Vetiveria zizanioides* (capim vetiver) cultivada *in vitro*, sob diferentes concentrações dos metais pesados cobre (Cu) e zinco (Zn), comumente emitidos durante a produção de cimento. Para tanto, utilizou-se o método de Revisão Sistemática da Literatura no levantamento de estudos que avaliaram a emissão de poluentes – em especial metais pesados – durante o processo de produção de cimento, assim como para a seleção de trabalhos que relacionaram o uso da técnica de cultura de tecidos na identificação e pré-seleção de espécies vegetais com potencial fitorremediador. Por fim, realizou-se um estudo experimental com a finalidade de avaliar o comportamento morfoanatômico e fisiológico de *V. zizanioides*, cultivado em condições microambientais controladas e em presença de doses crescentes de Cu e Zn. No primeiro

estudo observou-se que os principais elementos traços identificados em solos localizados no entorno de áreas de extração e beneficiamento de calcário para produção de cimento foram zinco, cobre, chumbo, cromo, níquel e cádmio. Já no segundo estudo constatou-se que, apesar de existirem particularidades entre a técnica de cultivo *in vitro* e aquelas que utilizam plantio direto no solo, a cultura de tecidos vegetais representa uma ferramenta confiável para obtenção de informações importantes em relação à toxicidade e à tolerância de espécies vegetais a contaminantes, dentre eles os metais pesados. No terceiro estudo observou-se que, nas condições do experimento, *V. zizanioides* apresentou ampla plasticidade fisiológica e anatômica em presença de estresse provocado pelo excesso de Cu e Zn, o que lhe confere potencial para utilização na recuperação de áreas contaminadas por esses metais.

Palavras-chave: Recuperação de solos contaminados. Mineração. Elementos-traços. Bioacumulação. Capim vetiver.

GENERAL ABSTRACT

Camargos, Ludmila Maria Gonçalves Godoi de. **Tolerance and bioaccumulative potential of *Vetiveria zizanioides* L. Nash cultured *in vitro* under the effect of zinc and copper.** Bambuí: IFMG – *Campus Bambuí*, 2017. 108p.

Cement production represents an industrial activity with high polluting potential, and the emission levels and characteristics are directly related to the technological and operational profile of the production process. Among the pollutants emitted by the cement industry stand out the heavy metals, since they represent a group of contaminants with high toxicity and persistence in natural environments, especially in the soil. Remediation techniques based on chemical, physical and biological principles have been proposed for the rehabilitation of soils contaminated by heavy metals; however, most of them require high investment, which ends up rendering such procedures unfeasible. In this context, phytoremediation can be considered a promising method, since it has a relatively low cost and great efficiency in the stabilization and/or recovery of areas degraded by organic pollutants and heavy metals. However, one of the main difficulties of this technique is the selection of tolerant or accumulating trace element plants, through efficient protocols or methodologies, with representative results and reduced generation of contaminated waste to the environment. Biotechnological techniques, such as plant tissue culture, may represent important tools for the optimization of protocols that evaluate the phytoremediation potential of vegetal species. The present work aimed to identify the main heavy metals emitted by the cement industry, to evaluate the applicability of the plant tissue culture technique in phytoremediation studies, in addition to investigate the tolerance and bioaccumulative potential of *Vetiveria zizanioides* (vetiver grass) cultivated *in vitro* under different concentrations of the heavy metals copper (Cu) and zinc (Zn), commonly emitted during the production of cement. For this purpose, the method of Systematic Review of Literature was used to gather studies that evaluated the emission of pollutants - especially heavy metals - during the cement production process, as well as for the selection of works that related the use of the technique of tissue culture in the identification and pre-selection of vegetal species with phytoremediation potential. Finally, an experimental study was carried out to evaluate the morphological and physiological behavior of *V. zizanioides*, cultivated under controlled microenvironmental conditions and in the presence of increasing doses of Cu and Zn. In the first study, zinc, copper, lead, chromium, nickel and cadmium were identified as the main trace elements identified in soils located around the limestone extraction and

processing areas for cement production. In the second study, it was observed that, although there are particularities between the technique of *in vitro* cultivation and those that use direct planting in the soil, plant tissue culture represents a reliable tool to obtain important information regarding toxicity and tolerance of vegetal species to contaminants, including heavy metals. In the third study, it was observed that, under the conditions of the experiment, *V. zizanioides* showed a great physiological and anatomical plasticity in the presence of stress caused by excess of Cu and Zn, which supply potential for using it in the recovery of areas contaminated by these metals.

Keywords: Recovery of contaminated soils. Mining. Elements-traces. Bioaccumulation. Vetiver grass.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO DE CIMENTO E A CONTAMINAÇÃO DE SOLOS POR METAIS PESADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA | 13 |
| RESUMO | 14 |
| ABSTRACT | 15 |
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 METODOLOGIA | 18 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 20 |
| 3.1 Análise bibliométrica das publicações selecionadas | 22 |
| 3.2 Análise comparativa dos artigos selecionados | 25 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 34 |
| REFERÊNCIAS | 35 |
| CAPÍTULO 2 – APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS EM ESTUDOS DE FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR METAIS PESADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA | 38 |
| RESUMO | 39 |
| ABSTRACT | 40 |
| 1 INTRODUÇÃO | 41 |
| 2 METODOLOGIA | 44 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 47 |
| 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 59 |
| REFERÊNCIAS | 60 |
| CAPÍTULO 3 – BIOACUMULAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE ZN E CU EM <i>Vetiveria zizanioides</i> CULTIVADA <i>IN VITRO</i> | 65 |
| RESUMO | 66 |
| ABSTRACT | 67 |
| 1 INTRODUÇÃO | 68 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 2.1 Obtenção do material vegetal e Estabelecimento <i>in vitro</i> | 71 |
| 2.2 Desenho Experimental – Bioensaio com metais pesados | 72 |
| 2.3 Parâmetros Avaliados | 73 |
| 2.3.1 Caracterização biométrica | 73 |
| 2.3.2 Determinação de biomassa | 74 |

| | |
|---|-----|
| <i>2.3.3 Teores de clorofila e carotenoides</i> | 74 |
| <i>2.3.4 Análise dos teores de Cu e Zn nas plantas</i> | 74 |
| <i>2.3.5 Avaliações anatômicas</i> | 75 |
| 2.4 Análises Estatísticas | 76 |
| 2.5 Manejo do Resíduo Gerado | 76 |
| 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 77 |
| 3.1 Caracterização Biométrica | 77 |
| 3.2 Determinação de Biomassa | 81 |
| 3.3 Teores de clorofila e carotenoides | 83 |
| 3.4 Análise dos teores de Cu e Zn nas plantas | 86 |
| 3.5 Avaliações anatômicas | 88 |
| <i>3.5.1 Respostas anatômicas radiculares de V. zizanioides em presença dos metais pesados</i> .. | 88 |
| <i>3.5.2 Respostas anatômicas foliares de V. zizanioides em presença dos metais pesados Cu</i> .. | 94 |
| 4 CONCLUSÕES | 102 |
| REFERÊNCIAS | 103 |

**CAPÍTULO 1 – PRODUÇÃO DE CIMENTO E A CONTAMINAÇÃO DE SOLOS
POR METAIS PESADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

RESUMO

As indústrias cimenteiras são consideradas importantes fontes de emissão de compostos químicos orgânicos e inorgânicos – dentre eles, os metais pesados. A poluição de solos por metais pesados torna-se especialmente importante, uma vez que a persistência desses contaminantes no solo é muito maior do que nos demais compartimentos da biosfera. O objetivo desta pesquisa foi identificar, por meio de revisão sistemática da literatura, estudos experimentais e observacionais que avaliaram a emissão de poluentes, em especial metais pesados, durante o processo de produção de cimento e sua relação com a qualidade de solos situados nas proximidades de indústrias cimenteiras. As bases de dados consultadas foram Google Acadêmico, LILACS, SciELO, Scopus e *Web of Science*, no período de 1990 e 2015. Foram selecionados, inicialmente, 354 artigos; entretanto, após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão predefinidos, a busca resultou em uma amostra final de 13 artigos. A presente pesquisa revelou que solos situados no entorno de áreas industriais de extração e beneficiamento de calcário para a produção de cimento podem estar sendo enriquecidos e/ou poluídos por metais pesados. Os estudos selecionados indicaram que os principais elementos-traço identificados nas amostras de solos avaliadas foram zinco, cobre, chumbo, cromo, níquel e cádmio. Os potenciais efeitos inerentes da presença desses elementos, em concentrações elevadas nos solos, incluem perda de áreas para uso agrícola, exposição de seres humanos e demais seres vivos a concentrações tóxicas desses elementos, desequilíbrios ao ecossistema local, poluição de águas superficiais e do lençol freático, além de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. Dessa forma, fica evidente a necessidade do emprego sistemático de ações voltadas para o monitoramento da qualidade do solo e da utilização de tecnologias adequadas, que visem à redução e ao controle da emissão de poluentes durante o processo industrial de produção de cimento.

Palavras-chave: Poluição do solo. Indústria cimenteira. Elementos-traço. Emissão de poluentes.

ABSTRACT

Cement industries are considered important sources of emission of organic and inorganic chemical compounds - among them, heavy metals. Pollution of soils by heavy metals is especially important as the persistence of these contaminants in the soil is greater than in other biosphere compartments. The aim of this research was to identify, through a systematic review of the literature, experimental and observational studies that evaluated the emission of pollutants, especially heavy metals, during the cement production process and their relation with the quality of soils located around the Cement industries. The databases consulted were Google Academic, LILACS, SciELO, Scopus and Web of Science, in the period of 1990 and 2015. Initially, 354 articles were selected; however, after applying the predefined inclusion and exclusion criteria, the search resulted in a final sample of 13 articles. The present research revealed that soils situated around industrial areas of extraction and processing of limestone for the production of cement may be enriched and/or polluted by heavy metals. The selected studies indicated that the main trace elements identified in the evaluated soil samples were zinc, copper, lead, chromium, nickel and cadmium. Potential inherent effects of the presence of these elements at high soil concentrations, include loss of land for agricultural use, exposure of humans and other living organisms, toxic concentrations of these elements, imbalances to the local ecosystem, pollution of surface water and groundwater , as well as bioaccumulation along the food chain. Thus, it is evident the need for the systematic use of actions aimed at the monitoring of soil quality and the use of appropriate technologies, aimed at reducing and controlling the emission of pollutants during the industrial process of cement production.

Keywords: Soil pollution. Cement industry. Trace elements. Emission of pollutants.

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental, resultante dos processos de urbanização e industrialização, tem sido tratada como uma questão internacional prioritária, dando-se ênfase à necessidade de conservação dos recursos naturais e conseqüente redução da degradação ambiental. Para tanto, diversos países têm estabelecido diretrizes e valores de referência para o monitoramento de parâmetros ambientais; dentre eles, para a qualidade do solo (MARTINS *et al.*, 2011; MICÓ *et al.*, 2006).

O solo desempenha um papel singular no ciclo biogeoquímico de contaminantes, uma vez que ele atua como um tampão natural, controlando o transporte de elementos químicos para a atmosfera, hidrosfera e biosfera. Quando comparado a outros poluentes, os metais pesados tornam-se especialmente importantes por representarem um grupo de contaminantes de alta toxicidade e persistência. Dessa forma, acumulados no solo, podem levar à perda de sua funcionalidade, comprometimento da produtividade, além de riscos à saúde humana e de outros seres vivos (BERMUDEZ *et al.*, 2010).

Os metais pesados podem ocorrer no solo a partir de processos geogênicos – responsáveis por garantir a concentração desses elementos em níveis considerados “traços”, sendo alguns deles essenciais para a manutenção de processos vitais de organismos vivos – ou antropogênicos – principais responsáveis pela elevação da concentração desses elementos para níveis classificados como tóxicos. O acúmulo de metais pesados e metalóides nos solos pode ser produzido a partir de diversas atividades humanas, dentre elas a emissão de poluente em áreas industriais, deposição inadequada de rejeitos de minas e outros depósitos residuais, utilização de combustível com chumbo, aplicação de fertilizantes e adubos animais em solos agrícolas, destinação inadequada de lodos de esgoto, aplicação de pesticidas, derramamento de produtos petroquímicos e deposição atmosférica (ABDUL RAHEEM; INYINBOR; ADEKOLA, 2012; WUANA; OKIEIMEN, 2011).

Nesse contexto, a produção de cimento representa uma atividade industrial potencial, no que diz respeito à introdução de metais pesados no ambiente (ADDO *et al.*, 2012). Estifanos e Degefa (2012) demonstraram que as propriedades físico-químicas do solo podem ser afetadas pela poeira emitida durante o processo de fabricação do cimento, provocando um acúmulo de metais pesados em níveis superiores àqueles considerados naturais. Além disso, diversas publicações têm avaliado a poluição de solos por químicos orgânicos e inorgânicos nas proximidades de plantas cimenteiras (AL-OMRAN *et al.*, 2011; BERMUDEZ *et al.*, 2010; ESTIFANOS, 2014; OGBONNA; NWOSU, 2011; OGUNKUNLE; FATOBA, 2013;

OLOWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015; UJOH; ALHASSAN, 2014; WUFEM *et al.*, 2014).

No Brasil, assim como em outros países, apesar de parte das fábricas atender à legislação vigente e cumprir as responsabilidades socioambientais inerentes à produção de cimento, ainda existem indústrias que atuam na contramão, tornando a atividade cimenteira mais um agravante dos problemas ambientais (MAURY; BLUMENSCHNEIN, 2012). Portanto, a determinação de compostos químicos, tais como os metais pesados, associados ao solo e a quantificação de suas concentrações em áreas adjacentes a complexos industriais de extração e beneficiamento de calcário tornam-se uma iniciativa importante para o monitoramento da poluição emitida pelas indústrias de cimento.

Devido à importância de tais informações, a identificação, seleção, avaliação e síntese de trabalhos científicos – disponíveis em bases de dados confiáveis – permitem a compilação de evidências relevantes relacionadas ao tema em questão. Segundo Cordeiro *et al.* (2007), a definição prévia de procedimentos sistemáticos e criteriosos para identificação e seleção dos estudos primários (unidades de análise) mais expressivos é essencial para que se minimize o viés e, conseqüentemente, garanta a qualidade e a credibilidade da metodologia aplicada (CORDEIRO *et al.*, 2007). Esse processo de sistematização de dados gera estudos secundários que podem representar uma ferramenta auxiliar valiosa para a fundamentação e melhor enquadramento de trabalhos científicos posteriores, bem como para apoiar gestores na tomada de decisões relacionadas ao controle e manejo de poluentes perigosos emitidos durante a produção de cimento.

Dessa forma, a presente revisão teve como objetivo investigar, por meio de uma revisão sistemática da literatura, os principais artigos científicos, publicados no período de 1990 a 2015, que avaliaram a emissão de poluentes, em especial metais pesados, durante o processo de produção de cimento. Além disso, buscou-se também avaliar a relação entre a presença de metais pesados e a qualidade de solos situados nas proximidades de indústrias cimenteiras.

2 METODOLOGIA

O levantamento de artigos que trataram da poluição por metais pesados em solos próximos a indústrias de produção de cimento baseou-se no método de Revisão Sistemática da Literatura. A seleção de estudos através desse processo de investigação científica permite a fundamentação da pesquisa com trabalhos mais alinhados ao contexto pesquisado e com maior relevância acadêmica (TASCA; ENSSLIN; ENSSLIN, 2013). Dessa forma, o método utilizado na presente revisão sistemática foi desenvolvido a partir da adaptação do processo de seleção proposto por Rosa *et al.* (2011).

Para delimitação da pesquisa, utilizaram-se, como espaço amostral, as bases de dados Google Acadêmico, LILACS, SciELO, Scopus e *Web of Science*. A definição do espaço amostral teve como finalidade a escolha de bases de dados de grande amplitude, extensão e reconhecimento dentro da comunidade científica.

Foram utilizados descritores preestabelecidos na língua inglesa, além de suas combinações através do operador *booleano* “AND”. À vista disso, as expressões – “soil pollution”, “heavy metal” e “cement production” – foram definidas como as palavras-chave mais indicadas para a pesquisa, uma vez que confeririam maior especificidade à busca que se pretendia realizar (TABELA 1). O levantamento de publicações utilizando descritores em língua portuguesa não será avaliado, dada a carência de artigos científicos, encontrados nesse idioma, que avaliem o objeto tema da presente revisão.

TABELA 1 – Descritores utilizados para busca nas bases de dados.

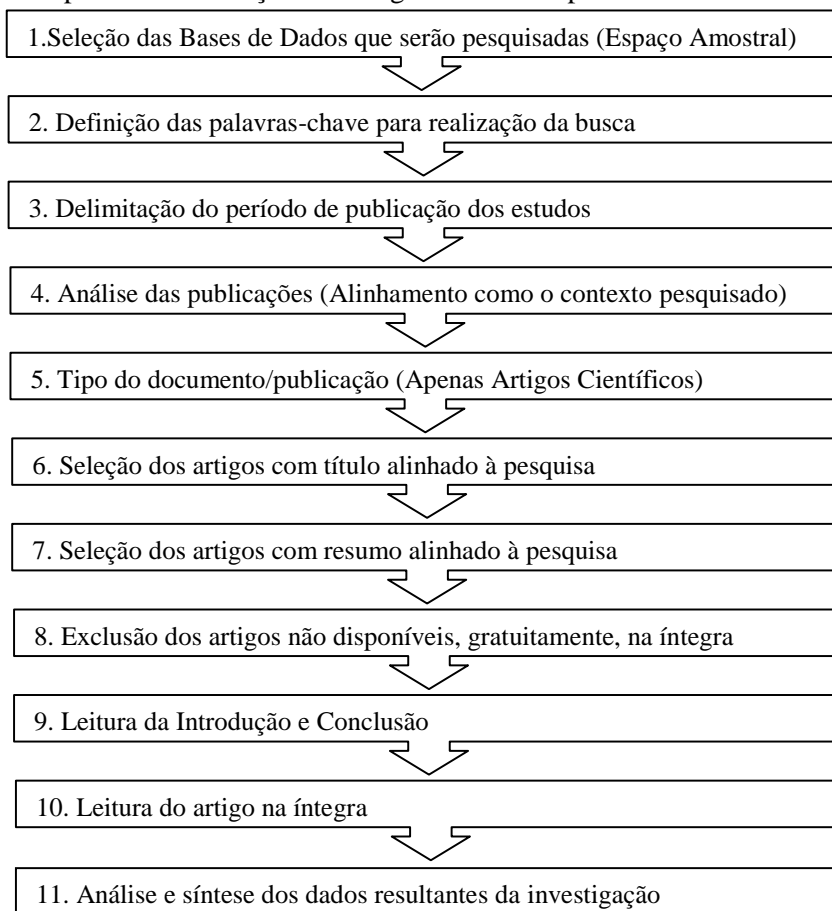
| Idioma | Descritores/Keywords |
|---------------|--|
| | “soil pollution” |
| Inglês | “soil pollution” AND “heavy metal” |
| | “soil pollution” AND “heavy metal” AND “cement production” |

Um dos critérios de exclusão empregado foi o ano de publicação dos artigos, sendo que a busca se concentrou no intervalo compreendido entre 1990 e 2015, com o intuito de retratar, confrontar e sintetizar as evidências científicas publicadas nos últimos 25 anos, em relação ao contexto avaliado. Vale ressaltar que apenas artigos científicos foram utilizados, não estando inclusas, neste estudo, outras publicações, como boletins, cartilhas, dissertações e/ou teses. Todos os artigos obtidos por meio da estratégia de busca foram classificados e

organizados, para seleção apenas daqueles que estivessem realmente alinhados aos objetivos da presente revisão sistemática.

Nas etapas subsequentes, os seguintes critérios de inclusão foram aplicados: leitura do título para confirmação do enquadramento ao objetivo da pesquisa; leitura do resumo para exclusão de artigos não alinhados ao tema da pesquisa; leitura da Introdução e Conclusão para seleção dos trabalhos mais relevantes; leitura do artigo, na íntegra, para seleção daqueles que abordassem e apresentassem resultados que auxiliassem no levantamento dos principais metais pesados emitidos durante o processo industrial de produção de cimento e que pudessem estar relacionados com a contaminação e a perda de funcionalidade de solos. A disponibilidade do artigo completo foi um critério de exclusão utilizado, sendo que os artigos inacessíveis gratuitamente foram excluídos da revisão. A Figura 1 ilustra o método empregado para levantamento e seleção das unidades de análise que integram a revisão sistemática em questão.

Figura 1 – Etapas do processo de seleção dos artigos científicos para Revisão Sistemática.



Fonte: Adaptado de Rosa *et al.* (2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

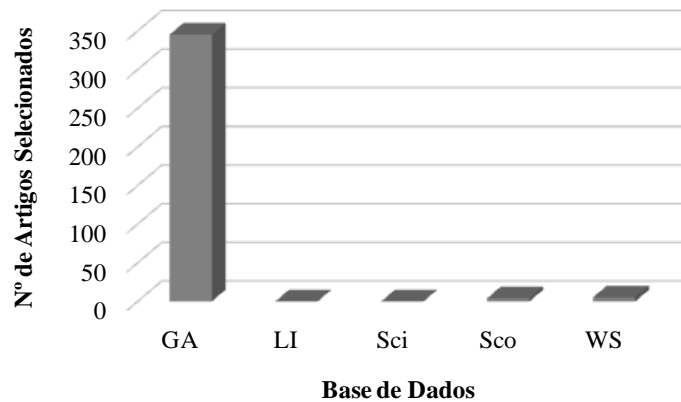
A busca realizada nas cinco bases de dados investigadas, utilizando combinações sucessivas dos descritores previamente definidos, resultou em um total de 354 artigos em inglês (TABELA 2).

TABELA 2 – Resultado da busca nas Bases de Dados.

| Base de Dados Pesquisada | Descritores/Keywords | Nº de Artigos encontrados |
|---------------------------------|--|----------------------------------|
| | “soil pollution” | 367.000 |
| Google | “soil pollution” AND “heavy metal” | 42.100 |
| Acadêmico | “soil pollution” AND “heavy metal” AND “cement production” | 371 |
| | 1990 a 2015 | 345 |
| | “soil pollution” | 154 |
| LILACS | “soil pollution” AND “heavy metal” | 0 |
| | “soil pollution” AND “heavy metal” AND “cement production” | 0 |
| | 1990 a 2015 | 0 |
| | “soil pollution” | 26 |
| SciELO | “soil pollution” AND “heavy metal” | 2 |
| | “soil pollution” AND “heavy metal” AND “cement production” | 0 |
| | 1990 a 2015 | 0 |
| | “soil pollution” | 50.748 |
| Scopus | “soil pollution” AND “heavy metal” | 10.393 |
| | “soil pollution” AND “heavy metal” AND “cement production” | 4 |
| | 1990 a 2015 | 4 |
| | “soil pollution” | 220.781 |
| Web of Science | “soil pollution” AND “heavy metal” | 13.672 |
| | “soil pollution” AND “heavy metal” AND “cement production” | 5 |
| | 1990 a 2015 | 5 |

A estratégia de busca aplicada apresentou um número mais significativo de artigos no Google Acadêmico, visto que as demais bases de dados exibiram um número pouco expressivo ou nulo de publicações. Tal tendência de distribuição pode ser confirmada através do Gráfico 1.

Gráfico 1– Distribuição dos artigos obtidos nas bases de dados pesquisadas.



(GA) Google Acadêmico; (LI) LILACS; (Sci) SciELO; (Sco) Scopus; (WS) *Web of Science*.

Fonte: Os autores (2016).

Entretanto, após a aplicação dos demais critérios de inclusão e exclusão, que foram preestabelecidos no protocolo de busca, a pesquisa permitiu a seleção de 14 artigos (TABELA 3).

TABELA 3 – Total de artigos selecionados após aplicação dos critérios de seleção predefinidos.

| | Google Acadêmico | LILACS | SciELO | Scopus | Web of Science | Total |
|--|------------------|--------|--------|--------|----------------|-------|
| Nº de Artigos encontrados | 345 | 0 | 0 | 4 | 5 | 354 |
| Critérios de inclusão | | | | | | |
| Título alinhado ao tema | 40 | 0 | 0 | 2 | 2 | 44 |
| Resumo alinhado ao tema | 15 | 0 | 0 | 0 | 1 | 16 |
| Disponível na Base de Dados | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14 |
| Introdução e Conclusão alinhadas ao tema | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14 |
| Artigos incluídos | 13 | 0 | 0 | 0 | 1 | 14 |

Com o intuito de se evitar duplicidades, foi realizada uma análise minuciosa das publicações levantadas. Assim sendo, observou-se que o estudo identificado na base de dados *Web of Science* já estava incluso dentre os trabalhos selecionados pela busca efetuada no Google Acadêmico. Dessa forma, o total de artigos selecionados para a presente revisão limitou-se a uma amostra final composta por 13 trabalhos.

3.1 Análise bibliométrica das publicações selecionadas

A metodologia utilizada permitiu o levantamento, em diferentes bases de dados, de uma amostra de artigos que apresentaram evidências científicas para fundamentar a identificação dos principais metais pesados emitidos durante o processo industrial de produção de cimento e que podem estar relacionados com a contaminação e a perda de funcionalidade de solos. Entretanto, deve-se levar em consideração que existem limitações em estudos de revisão sistemática; dentre elas, o fato de que eles representam uma pesquisa retrospectiva e que podem compartilhar falhas e vieses oriundos das unidades de análise selecionadas (CORDEIRO *et al.*, 2007).

Encontram-se listados, na Tabela 4, os 13 artigos que atenderam às particularidades do tema proposto para essa revisão sistemática.

A Tabela 4 também apresenta informações sobre o número de vezes que cada publicação foi citada por outros autores, de acordo com o *website* Google Acadêmico. Nota-se que as publicações de Bermudez *et al.* (2010) e Ogunkunle & Fatoba (2013) foram as mais citadas por outros autores, com 38 e 30 citações, respectivamente. Vale ressaltar também a referência de Wang (2013) com 13 citações. Os demais artigos foram citados entre 0 e 7 vezes. Segundo Rosa *et al.*(2011), esse dado é importante para identificar os trabalhos com maior reconhecimento acadêmico e, possivelmente, maior enquadramento ao tema pesquisado.

TABELA 4 - Artigos selecionados através da estratégia de busca aplicada para a Revisão Sistemática.

| Autor | Título | Citações | Referências |
|-------------------------------------|--|-----------------|--|
| BERMUDEZ, G. M. A. <i>et al.</i> | Heavy metal pollution in topsoils near a cement plant: The role of organic matter and distance to the source to predict total and HCl – extracted heavy metal concentrations | 38 | Chemosphere, v. 78, n. 4, p. 375-381, 2010. |
| AL-OMRAN, A. M. <i>et al.</i> | Impact of cement dust on some soil properties around the cement factory in Al-Hasa Oasis, Saudi Arabia | 7 | American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., v. 11, n. 6, p. 840-846, 2011. |
| OGBONNA, P. C.; NWOSU, A. N. | Metal concentration in soil and plants in abandoned cement factory | 5 | Intern. Conf. On Biotechnology and Environ. Management, v. 18, p. 146-150, 2011. |

(continuação)

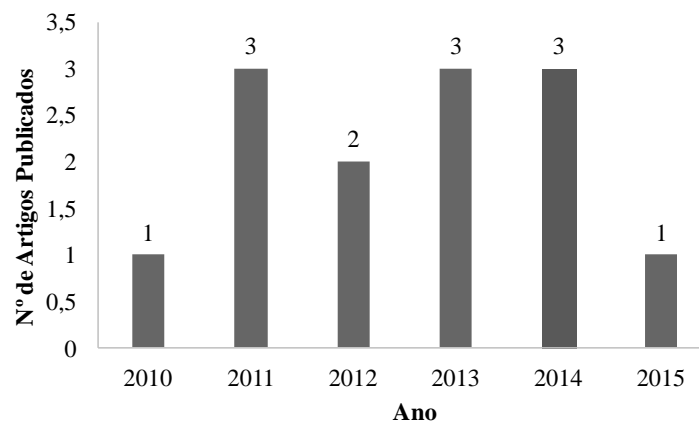
| Autor | Título | Citações | Referências |
|---|--|-----------------|--|
| OGEDENGBE, K.; OKE, A. O. | Pollution impact of cement production on air, soil and water in a production location in Nigeria | 1 | Journal of Science and Technology, v. 31, n. 2, p. 46-56, 2011. |
| ABDUL RAHEEM, A. M. O.; INYINBOR, A. A.; ADEKOLA, F. A. | Heavy metal distribution and speciation in soils around a mega cement factory in north-central Nigeria | 7 | Ethiopian Jour. of Environ. Studies and Manag., v. 5, n. 1, p. 11-19, 2012. |
| ESTIFANOS, S.; DEGEFA, A. | Assessing the effect of cement dust emission on the physicochemical nature of soil around Messebo area, Tigray, North Ethiopia | 2 | Int. J. Econ. Geol., v. 3, n. 2, p. 12-20, 2012. |
| ADDU, M. A. <i>et al.</i> | Heavy metal contaminations in soil and cassava harvested near a cement processing facility in the Volta Region, Ghana: Implications of health risk for the population living in the vicinity | 1 | e-Journal of Science & Technology, v. 3, n. 8, p. 71-83, 2013. |
| OGUNKUNLE, C.O.; FATOBA, P. O. | Pollution loads and the ecological risk assessment of soil heavy metal around a mega cement factory in southwest Nigeria | 30 | Pol. J. Environ. Stud., v. 22, n. 2, p. 487-493, 2013. |
| WANG, X. S. | Magnetic properties and heavy metal pollution of soil in the vicinity of a cement plant, Xuzhou (China) | 13 | Journal of Applied Geophysics, v. 98, p. 73-78, 2013. |
| ESTIFANOS, S. | Investigating the distribution of selected major and trace metals in lithogenic environment near cement factory, Mekelle, Ethiopia | 2 | Journal of Environmental Protection, v.5, p.144-155, 2014. |
| UJOH, F.; ALHASSAN, M. M. | Oxides and heavy metals concentration around a cement plant at Yandev, Central Nigeria | 0 | Intern. Journal of Plant & Soil Science, v. 3, n. 6, p. 777-789, 2014. |
| WUFEM, B. M. <i>et al.</i> | The impacts of cement dust deposits on soil available micronutrients | 1 | Intern. Journal of Science and Engineering App., v. 3, n. 4, p. 53-62, 2014. |

(continuação)

| Autor | Título | Citações | Referências |
|---|--|----------|--|
| OLOWOYO, J. O.; MUGIVHISA, L. L.; BUSA, N. G. | Trace metals in soil plants around a cement factory in, Pretoria, South Africa | 0 | Pol. J. Environ. Stud., v. 24, n. 5, p. 2087-2093, 2015. |

Em relação à evolução temporal, nota-se que, para o intervalo pesquisado (1990 a 2015), o processo de busca utilizado não identificou artigos que atenderam aos critérios preestabelecidos, no período que precede o ano de 2010 (Gráfico 2). De acordo com Ogbonna e Nwosu (2011), os problemas relacionados à contaminação ambiental por metais pesados vêm ganhando maior atenção ao longo do tempo, uma vez que podem levar à geoacumulação, bioacumulação e biomagnificação quando introduzidos, em excesso, nos ecossistemas.

Gráfico 2 – Evolução temporal dos artigos selecionados e publicados entre 1990-2015, de acordo com as bases de dados pesquisadas.



Fonte: Os autores (2016).

Considerando-se os países nos quais os estudos foram conduzidos, observa-se a seguinte frequência de publicações – Argentina (1), Arábia Saudita (1), China (1), Gana (1), África do Sul (1), Etiópia (2), Nigéria (6). A busca realizada sugere uma prevalência de países em desenvolvimento, em estudos que avaliaram a relação entre o processo de produção de cimento e a poluição de solos por metais pesados. Tal fato pode ser justificado pela produção e consumo elevados desse produto, que representa uma importante *commodity* dentro do processo de crescimento e desenvolvimento econômico (OLOWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015).

Entretanto, apesar do Brasil representar um país com grande atividade industrial voltada para a extração e beneficiamento de matérias-primas minerais – dentre elas, a extração de calcário e produção de cimento – nenhum dos trabalhos selecionados pela presente revisão foi desenvolvido em território brasileiro.

3.2 Análise comparativa dos artigos selecionados

A atividade industrial de produção de cimento representa uma importante fonte de poluentes químicos orgânicos e inorgânicos que são dissipados para o meio ambiente na forma de material particulado. Uma vez liberados, esses subprodutos – dentre eles, os metais pesados – são carregados pelas correntes de ar e depositados no solo, vegetação e águas superficiais (BERMUDEZ *et al.*, 2010; OGBONNA; NWOSU, 2011). A concentração de tais compostos em áreas adjacentes a fábricas de cimento pode ser atribuída à poeira liberada durante a atividade de extração do calcário, ação do vento sobre as pilha de clínquer (matéria-prima resultante da calcinação de calcário e argila, utilizada para a fabricação do cimento), empacotamento do produto final (cimento), remobilização de partículas devido ao intenso tráfego veicular na área industrial e queima de combustíveis alternativos, uma vez que a produção de cimento requer uma quantidade considerável de energia (OGEDENGBE; OKE, 2011; UJOH; ALHASSAN, 2014).

Na Tabela 5, foram compiladas as informações extraídas dos 13 estudos selecionados pela presente revisão, bem como os principais metais pesados identificados em concentrações acima daquelas consideradas aceitáveis para garantir a qualidade dos solos. O índice de contaminação do solo variou entre leve, moderado e alto, sendo essa a terminologia empregada por grande parte dos autores após análise, avaliação e comparação dos valores (concentrações do metal). Tais valores foram obtidos individualmente, sendo que os autores, via de regra, basearam-se em padrões de qualidade e/ou diretrizes nacionais e internacionais de qualidade de solos.

A concordância entre a maioria das técnicas utilizadas para análise e mensuração dos metais pesados também representa um ponto favorável, visto que isso facilitou a comparação dos resultados obtidos pelos estudos selecionados.

TABELA 5 - Metais pesados identificados em concentrações relevantes em solos próximos às fábricas de cimento.

| Técnicas utilizadas para análise | Amostragem (Profundidade) | Nível de Contaminação do Solo por Metais Pesados | | | | | Potenciais efeitos | Referências |
|-------------------------------------|---------------------------|--|-----------------|--------------------|------------------------------------|------|--|--------------------------------|
| | | Leve | Leve a Moderado | Moderado | Moderado a Alto | Alto | | |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-10cm | As, Co, Sb, Zn | | | Ba, Cr | | -Perda de áreas para uso agrícola e residencial; -Exposição de seres humanos e animais selvagens à toxicidade de Ba e Cr. | BERMUDEZ <i>et al.</i> , 2010. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-5cm e 20-30cm | | Zn | As, Cd, Cu, Ni, Pb | Cr | | -Contaminação do solo por metais pesados. | AL-OMRAN <i>et al.</i> , 2011. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-10cm | Cd | | | Cr, Fe, Mn, Zn | | -Desequilíbrios ambientais. | OGBONNA; NWOSU, 2011. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-20cm | | | | Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn | | -Contaminação de solos e rios; -Acúmulo indesejável de metais em tecidos vegetais e sua bioacumulação ao longo da cadeia alimentar; -Exposição de seres humanos e animais selvagens à toxicidade dos metais pesados identificados. | OGEDENGBE; OKE, 2011. |

(continuação)

| Técnicas utilizadas para análise | Amostragem (Profundidade) | Nível de Contaminação do Solo por Metais Pesados | | | | | Potenciais efeitos | Referências |
|-------------------------------------|---------------------------|--|-----------------|------------|-----------------|----------------|---|--|
| | | Leve | Leve a Moderado | Moderado | Moderado a Alto | Alto | | |
| | | | | | | | | |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-5cm e 5-15cm | | | | Cu, Pb, Mo, Zn | As, Cr, Co, Ni | -Alterações nas propriedades físico-químicas do solo. | ESTIFANOS; DEGEFA, 2012. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-15cm e 15-30cm | Zn | Pb | Cu | | | -Riscos de bioacumulação em plantas; -Riscos à saúde humana. | ABDUL RAHEEM; INYINBOR; ADEKOLA, 2012. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-20cm | | | Cu, Pb, Zn | | Cd | -Acúmulo elevado de metais pesados no solo. | WANG, 2013. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-15cm | | | | | Cd, Cr, Cu, Pb | -Riscos de contaminação de águas subterrâneas; -Risco de contaminação de plantas cultivadas e de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. | OGUNKUNLE ; FATOBA, 2013. |

(continuação)

| Técnicas utilizadas para análise | Amostragem (Profundidade) | Nível de Contaminação do Solo por Metais Pesados | | | | | Potenciais efeitos | Referências |
|-------------------------------------|---------------------------------|--|------------------------|------------------------|-----------------|----------------|---|--------------------------------------|
| | | Leve | Leve a Moderado | Moderado | Moderado a Alto | Alto | | |
| | | | | | | | | |
| Fluorescência de raio X (XRF) | Superficial - sem especificação | | | As | Cr, Ni, Pb | | -Bioacumulação de metais pesados ao longo da cadeia alimentar; -Riscos para saúde humana e de animais. | ADDO; DARKO; NYARKO, 2013. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-15cm | | | Cu, Pb, Zn | As, Fe, Mn | Co, Cr, Mo, Ni | -Alterações nas características físico-químicas no solo. | ESTIFANOS, 2014. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-30cm | | Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Zn | | | | -Alterações nas propriedades físico-químicas no solo; -Riscos para saúde humana e de animais. | WUFEM <i>et al.</i> , 2014. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | Sem especificação | | | | Zn | Cu, Fe, Mn, Pb | -Riscos para plantas, animais e populações humanas. | UJOH; ALHASSAN, 2014. |
| Extração ácida e Espectrofotometria | 0-15cm e 15-30cm | | | Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Zn | | | -Poluição do solo por metais pesados; -Bioacumulação de metais em plantas. | OLWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015. |

Durante a avaliação e o monitoramento de contaminação em solos, o processo de amostragem representa uma etapa de fundamental importância, sendo que a escolha dos pontos de coleta e da profundidade de amostragem merece atenção especial (FILIZOLA; GOMES; SOUZA, 2006). Na Tabela 5, observa-se que os processos de amostragem empregados basearam-se, predominantemente, na coleta de solos superficiais e subsuperficiais, com profundidade variando entre 0 e 30cm. Os pontos de coletas foram distribuídos, via de regra, randomizados e em um raio preestabelecido, no entorno das fábricas de cimento. As publicações também apontam uma alternância entre a utilização de técnicas de amostragem simples e composta, sendo que, na maioria dos trabalhos, o número de amostras coletadas pode ser considerado representativo. Em outros, o pouco detalhamento feito em relação à estratégia de coleta de amostras de solos dificultou o levantamento dessas informações.

Vale ressaltar que, nos trabalhos em que foram coletados solos em dois níveis de profundidade consecutivos, os resultados apontaram uma relação inversa entre as variáveis “profundidade do solo” e “concentração de metais pesados”. Dessa forma, notou-se uma tendência de decréscimo das médias de concentração de metais pesados verticalmente no solo, das porções mais superficiais em direção às porções mais profundas do solo (ABDUL RAHEEM; INYINBOR; ADEKOLA, 2012; AL-OMRAN *et al.*, 2011; ESTIFANOS; DEGEFA, 2012; OLOWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015).

Esse fato reforça a afirmação de Martins *et al.* (2011) de que a percolação e a mobilidade de metais-traço dependem não só da sua concentração, mas também da natureza físico-química do solo e das interações que se estabelecem entre o sistema solo e os metais ali presentes. Além disso, deve-se considerar também que características intrínsecas, como pH, constituição físico-química e teor de matéria orgânica, influenciam diretamente a percolação desses cátions no solo (OLOWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015; WUFEM *et al.*, 2014).

Portanto, entender o comportamento químico dos metais pesados, assim como suas interações, também é crucial para melhor compreensão da sua mobilidade e disponibilidade dentro do sistema solo.

Outro fator que influenciou a dispersão dos metais avaliados foi a distância entre o ponto de amostragem e a fonte geradora de poluição. Sendo assim, amostras de solos coletadas nas proximidades das fábricas de cimento apresentaram valores mais elevados de contaminantes do que aquelas coletadas em pontos mais distantes (AL-OMRAN *et al.*, 2011; BERMUDEZ *et al.*, 2010; OGBONNA; NWOSU, 2011). Ogedengbe e Oke (2011) também defendem que as atividades industriais que integram o ciclo de produção de cimento liberam

quantidades significativas de material particulado e em suspensão. Esse resíduo representaria, então, um sério problema ambiental, uma vez que a sua deposição pode ser influenciada pela localização e distância da fábrica de cimento, direção do vento e ação da gravidade.

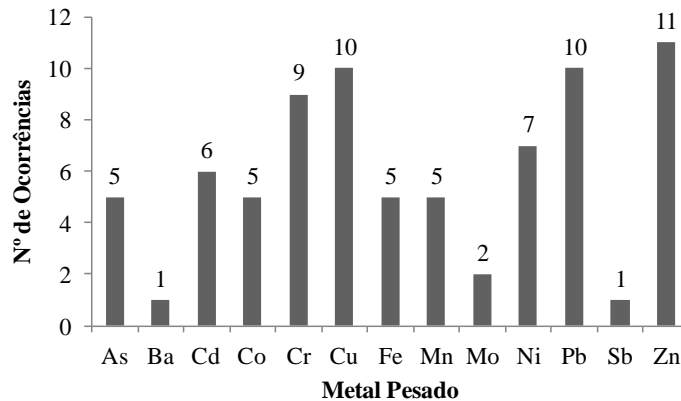
Nos treze estudos, objetos da presente revisão, a concentração da maioria dos metais pesados identificados no solo se encontrava acima dos limites estipulados por padrões e diretrizes nacionais e internacionais, condizentes com o uso das terras para fins residencial e/ou agrícola. Segundo Estifanos & Degefa (2012), o enriquecimento de íons metálicos na fase líquida do solo pode ocorrer a partir de dois fenômenos: desprendimento de cátions da sua estrutura cristalina ou através de descargas antropogênicas. Entretanto, o destacamento de metais de sua estrutura mineral exige um ataque ácido vigoroso e que, naturalmente, é improvável de ocorrer.

Portanto, houve uma relação positiva entre as características físico-químicas do ambiente litogênico e a atividade de produção de cimento – incluindo processo produtivo, transporte de matéria-prima/produtos e demais atividades humanas envolvidas na fabricação de cimento. Diante disso, há a possibilidade de perda e/ou comprometimento da funcionalidade de solos agrícolas, contaminação do lençol freático e, conseqüentemente, exposição de populações humanas e demais seres vivos a fluxos d'água e ambientes terrestres contaminados.

Entretanto, outros fatores foram diagnosticados como fontes secundárias de poluição, sendo eles a proximidade com áreas industriais diversas e o fluxo de caminhões e veículos em rodovias contíguas. Quando presentes, as fontes secundárias devem ser avaliadas com cautela para que não haja sub ou superestimação dos valores de contaminação atribuídos ao processo de produção de cimento (ADDO; DARKO; NYARKO, 2013; BERMUDEZ *et al.*, 2010; ESTIFANOS, 2014; ESTIFANOS; DEGEFA, 2012; OGEDENGBE; OKE, 2011; OGUNKUNLE; FATOBA, 2013; OLOWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015; WANG, 2013; WUFEM *et al.*, 2014).

Percebeu-se também que, dentre os estudos selecionados, o metal pesado que apresentou maior ocorrência nas amostras de solos analisadas foi o zinco (Zn), sendo identificado em concentrações acima do recomendado em onze dos treze artigos analisados (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Recorrência na identificação de metais pesados nas amostras de solos analisadas pelos estudos selecionados.



Fonte: Os autores (2016).

De acordo com Achternbosch *et al.* (2003), a diversificação dos combustíveis utilizados na produção de cimento exerce influência direta no teor de zinco presente no produto final, quando comparado à concentração do elemento nas matérias-primas empregadas no processo. Tal fato sugere que a utilização de rejeitos industriais como fonte de energia substitutiva – sobretudo, o emprego de resíduos gerados pelas indústrias automobilísticas, que apresentam óxido de zinco em sua constituição – tem exercido papel importante no aumento do conteúdo desse metal durante a fabricação de cimento. Nesse contexto, o zinco pode ser incorporado ao produto final, retido em sistemas de filtros coletores de pós ou emitido à atmosfera local na forma de material particulado. Por outro lado, Estifanos (2014) argumenta que a poluição por zinco em áreas próximas a indústrias cimenteiras também advém do trânsito intenso de veículos dentro dessas áreas industriais. Segundo o autor, o zinco utilizado na fabricação do pneu é despreendido, junto com outros resíduos, pelo desgaste por atrito entre os pneus de veículos de transporte de matéria-prima/produto final e o solo. Além disso, o metal também se origina de compostos utilizados como aditivos em óleos lubrificantes de veículos.

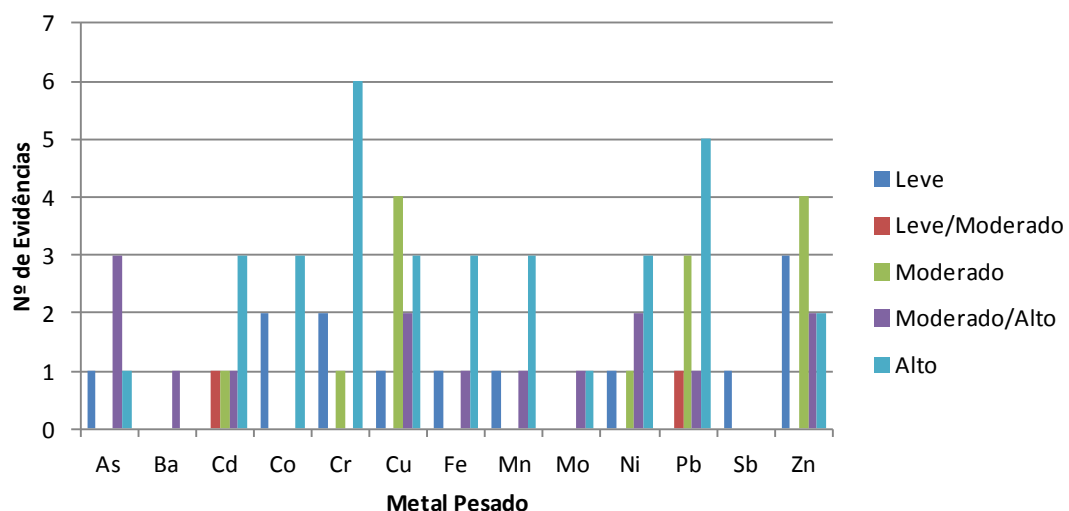
O zinco, assim como outros metais pesados, apesar de representar um elemento essencial para diversas funções fisiológicas dos seres vivos, é potencialmente tóxico quando em altas concentrações. Diversos estudos demonstraram que a toxidez do Zn nos vegetais provocou decréscimo na produção de matéria seca, necrose e morte da plântula (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002; SILVA *et al.*, 2010). Segundo Vale *et al.* (2011), concentrações elevadas de zinco também interferem no desenvolvimento de microrganismos, como o fungo *Aspergillus niger*, uma vez que o aumento progressivo da concentração desse íon metálico compromete o seu crescimento micelial e o processo germinativo.

Para seres humanos, o zinco oferece menos riscos diretos, quando comparado a outros íons metálicos com propriedades químicas semelhantes. Uma intoxicação aguda ao metal ocorre apenas quando o indivíduo é exposto a doses muito elevadas de zinco. Entretanto, estudos indicaram que a suplementação constante com doses elevadas de zinco, por períodos prolongados, pode comprometer o metabolismo e a absorção de cobre. Portanto, parte dos efeitos tóxicos do zinco em seres humanos resulta, na verdade, da deficiência de cobre produzido (PLUM; RINK; HAASE, 2010; SANTOS; FONSECA, 2012).

Todavia, deve-se levar em consideração a capacidade de bioacumulação e translocação, através da cadeia trófica, apresentada pela maioria dos metais pesados, visto que essa característica pode gerar uma série de problemas ao ecossistema e à saúde pública (MARENGONI *et al.*, 2013).

O Gráfico 4 compara a classificação de cada metal pesado em relação ao seu índice de contaminação no solo (leve, leve/moderado, moderado, moderado/alto, alto). Por meio do gráfico, pode-se constatar que o zinco (Zn) e o cobre (Cu) são os metais pesados com maior representatividade no tocante às contaminações de solos em nível moderado. Para índices de contaminação considerados de moderado a alto, o metal pesado que mais se destacou foi o arsênio (As). No entanto, os metais pesados que foram detectados em índices de contaminação mais elevados nas áreas avaliadas foram o cromo (Cr) e chumbo (Pb).

Gráfico 4 – Índice de Contaminação dos solos avaliados em relação a cada metal pesado.



Fonte: Os autores (2016).

Segundo Estifanos & Degefa (2012), o principal responsável pela elevada concentração de As diagnosticada em algumas áreas sob a influência do processo de produção

de cimento é a combustão de carvão mineral. Isso porque, quando o combustível é aquecido, ocorre a liberação do metal entre o vapor e o material particulado emitidos.

Em relação aos expressivos teores de Cr e Pb identificados, acredita-se que estejam somente em parte relacionados ao desgaste por atrito de componentes cromados que integram o processo de fabricação do cimento e à queima de combustíveis com adição de chumbo. Estudos defendem que fontes secundárias de poluição, como fluxo de caminhões e veículos de transporte em rodovias próximas, contribuam significativamente para que isso ocorra (ESTIFANOS, 2014; OLOWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015).

De acordo com Kabata-Pendias (2011), os metais-traço que mais representam riscos para a biosfera são prata (Ag), ouro (Au), cádmio (Cd), cromo (Cr), mercúrio (Hg), manganês (Mn), chumbo (Pb), antimônio (Sb), telúrio (Te), tungstênio (W) e zinco (Zn). Ainda segundo a autora, embora a química de contaminantes do solo venha sendo objeto de diversos estudos, o comportamento de poluentes – como os metais pesados – ainda não se encontra devidamente esclarecido.

Acredita-se que a persistência de contaminantes no solo seja muito maior que nos demais compartimentos da biosfera, e, conseqüentemente, a poluição de solos por metais pesados torna-se quase que permanente. Quando acumulados, esses elementos são translocados no solo através de fenômenos como a lixiviação, absorção por plantas e erosão. Todavia, a meia-vida desses metais no solo pode variar entre dezenas e milhares de anos, dependendo, sobretudo, do tipo de solo e do clima da região (KABATA-PENDIAS, 2011).

O risco de poluição de solos por metais pesados representa hoje um sério problema ambiental. Esses elementos, ao serem lançados antropicamente em uma área natural, podem provocar danos à atmosfera local, águas superficiais e subterrâneas, flora, fauna, além de comprometimento das competências e funcionalidades do solo (ALEXANDRE *et al.*, 2012; JESUS *et al.*, 2004; LUCAS; BENATTI, 2008).

Os artigos analisados corroboram com o exposto acima, posto que os potenciais efeitos identificados incluem perda de áreas para uso agrícola, exposição de seres humanos e demais seres vivos a concentrações tóxicas desses elementos, desequilíbrios ao ecossistema local, poluição de águas superficiais e do lençol freático, bioacumulação ao longo da cadeia alimentar, além de alteração nas características do solo.

Dessa forma, a poluição proveniente das atividades envolvidas nas etapas de produção de cimento pode representar riscos à qualidade ambiental, comprometendo as propriedades físico-químicas do solo e a dinâmica das comunidades (plantas, animais e homens) dispersas no entorno das indústrias cimenteiras.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa revelou que solos próximos a áreas industriais de produção de cimento podem estar sendo enriquecidos e/ou poluídos por metais pesados, sendo que os elementos-traço que apresentaram maior ocorrência nas amostras de solos analisadas pelos estudos foram zinco, cobre, chumbo, cromo, níquel e cádmio. Uma vez que atingem o solo, a compreensão da mobilidade e da disponibilidade desses metais depende diretamente do seu comportamento químico e das interações estabelecidas com os demais constituintes (orgânicos, inorgânicos e biológicos) dentro do sistema solo.

Os potenciais efeitos observados estão diretamente relacionados aos desequilíbrios ambientais gerados devido à contaminação de solos e águas por poluentes tóxicos, em especial os metais pesados.

Os níveis e as características físico-químicas dos poluentes liberados vão depender, sobretudo, do padrão tecnológico e operacional empregado no processo industrial. Portanto, a adoção de ações como o monitoramento da qualidade do solo e o emprego de tecnologias apropriadas no processo industrial é indispensável para a redução da emissão de poluentes passíveis de transporte e deposição e, conseqüentemente, do comprometimento da qualidade de ecossistemas adjacentes a complexos industriais de extração e beneficiamento de calcário para a produção de cimento. Em se tratando de áreas já comprometidas, nota-se a necessidade do estabelecimento de métodos eficientes e de custo efetivo razoável para a remediação de solos poluídos por contaminantes orgânicos e inorgânicos.

As informações concatenadas na presente revisão podem auxiliar e direcionar futuros estudos dentro dessa área de pesquisa, além de serem úteis como suporte para gestores públicos e privados na tomada de decisões, gerando reflexões sobre a responsabilidade socioambiental inerente a qualquer processo industrial.

REFERÊNCIAS

- ABDUL RAHEEM, A. M. O.; INYINBOR, A. A.; ADEKOLA, F. A. Heavy metal distribution and speciation in soils around a mega cement factory in north-central Nigeria. **Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management**, v. 5, n. 1, p. 11–19, 2012.
- ACHTERNBOSCH, M. *et al.* Heavy Metals in Cement and Concrete Resulting from the Co-incineration of Wastes in Cement Kilns with Regard to the Legitimacy of Waste Utilisation. Karlsruhe: Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, 2003. Disponível em: <<http://bibliothek.fzk.de/zb/berichte/FZKA6923.pdf>>. Acesso em: 06 ago. 2016.
- ADDO, M. A. *et al.* Evaluation of heavy metals contamination of soil and vegetation in the vicinity of a cement factory in the Volta Region, Ghana. **International Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 40–50, 2012.
- ADDO, M. A.; DARKO, E. O.; NYARKO, B. J. B. Heavy metal contaminations in soil and cassava harvested near a cement processing facility in the Volta Region, Ghana : Implications of health risk for the population living in the vicinity. **e-Journal of Science & Technology**, v. 3, n. 8, p. 71–83, 2013.
- AL-OMRAN, A. M. *et al.* Impact of cement dust on some soil properties around the cement factory in Al-Hasa Oasis, Saudi Arabia. **American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science**, v. 11, n. 6, p. 840–846, 2011.
- ALEXANDRE, J. R. *et al.* Zinco e ferro : de micronutrientes a contaminantes do solo Zinc and iron : micronutrients to soil contaminants. **Natureza on line**, v. 10, n. 1, p. 23–28, 2012.
- BERMUDEZ, G. M. A. *et al.* Heavy metal pollution in topsoils near a cement plant: The role of organic matter and distance to the source to predict total and HCl-extracted heavy metal concentrations. **Chemosphere**, v. 78, n. 4, p. 375–381, 2010.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1629–1638, 2002.
- CORDEIRO, A. M. *et al.* Revisão Sistemática : Uma Revisão Narrativa. **Revisão sistemática**, v. 34, n. 6, p. 428–431, 2007.
- ESTIFANOS, S. Investigating the distribution of selected major and trace metals in lithogenic environment near cement factory, Mekelle, Ethiopia. **Journal of Environmental Protection**, v. 5, p. 144–155, 2014.
- ESTIFANOS, S.; DEGEFA, A. Assessing the effect of cement dust emission on the physico-chemical nature of soils around Messebo area, Tigray, North Ethiopia. **International Journal of Economical and Environmental Geology**, v. 3, n. 2, p. 9, 2012.
- FILIZOLA, H. F.; GOMES, M. A. F.; SOUZA, M. D. **Manual de Procedimentos de Coleta de Amostras em Áreas Agrícolas para Análise da Qualidade Ambiental : Solo , Água e Sedimentos**. 1ª ed. Jaguariúna - São Paulo: [s.n.].

JESUS, H. C. *et al.* Distribuição de metais pesados em sedimentos do sistema estuarino da Ilha de Vitória-ES. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 378–386, 2004.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4th ed. New York: CRC Press, 2011.

LUCAS, D.; BENATTI, C. T. Utilização de resíduos industriais para a produção de artefatos cimentícios e argilosos empregados na construção civil. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 1, n. 3, p. 405–418, 2008.

MARENGONI, N. G. *et al.* Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu Binacional. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 359–363, 2013.

MARTINS, C. A. S. *et al.* A dinâmica de metais-traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 3–4, p. 383–391, 2011.

MAURY, M. B.; BLUMENSCHHEIN, R. N. Produção de cimento: Impactos à saúde e ao meio ambiente. **Sustentabilidade em Debate**, v. 3, n. 1, p. 75–96, 2012.

MICÓ, C. *et al.* Heavy metal content of agricultural soils in a Mediterranean semiarid area: The Segura River Valley (Alicante, Spain). **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 4, n. 4, p. 363–372, 2006.

OGBONNA, C.; NWOSU, A. N. Metal concentration in soil and plants in abandoned cement factory. **International Conference on Biotechnology and Environment Management**, v. 18, p. 146–150, 2011.

OGEDENGBE, K.; OKE, A. O. Pollution impact of cement production on air, soil and water in a production location in Nigeria. **Journal of Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 46–56, 2011.

OGUNKUNLE, C. O.; FATOBA, P. O. Pollution loads and the ecological risk assessment of soil heavy metals around a mega cement factory in southwest Nigeria. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 22, n. 2, p. 487–493, 2013.

OLOWOYO, J. O.; MUGIVHISA, L. L.; BUSA, N. G. Trace metals in soil and plants around a cement factory in Pretoria, South Africa. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 24, n. 5, p. 2087–2093, 2015.

PLUM, L. M.; RINK, L.; HAASE, H. The Essential Toxin: Impact of zinc on human health. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 1342–1365, 2010.

ROSA, I. O.; ENSSLIN, L.; ENSSLIN, S. R. Processo para seleção do referencial teórico para o gerenciamento de riscos afins à segurança empresarial. **P&D em Engenharia de Produção**, v. 9, n. 2, p. 67–80, 2011.

SANTOS, C. A.; FONSECA, J. Zinco: fisiopatologia, clínica e nutrição. **Associação Portuguesa de Nutrição Entérica e Parentérica**, v. VI, n. 1, p. 2–9, 2012.

SILVA, T. M. R. *et al.* Toxicidade do zinco em milho cultivado em Latossolo Vermelho Distrófico. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 5, n. 3, p. 336–340, 2010.

TASCA, J. E.; ENSSLIN, L.; ENSSLIN, S. R. A construção de um referencial teórico sobre a avaliação de desempenho de programas de capacitação. **Ensaio: Avaliação e Políticas Públicas em Educação**, v. 21, n. 79, p. 203–238, 2013.

UJOH, F.; ALHASSAN, M. M. Oxides and heavy metals concentration around a cement plant at Yandev, Central Nigeria. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 3, n. 6, p. 777–789, 2014.

VALE, M. S. *et al.* Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentosso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 16, n. 3i, p. 237–244, 2011.

WANG, X. S. Magnetic properties and heavy metal pollution of soils in the vicinity of a cement plant, Xuzhou (China). **Journal of Applied Geophysics**, v. 98, p. 73–78, 2013.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **International Scholarly Research Network**, v. 2011, p. 1–20, 2011.

WUFEM, B. M. *et al.* The impacts of cement dust deposits on soil available micronutrients. **International Journal of Science and Engineering Applications**, v. 3, n. 4, p. 53–62, 2014.

**CAPÍTULO 2 – APLICAÇÃO DA CULTURA DE TECIDOS VEGETAIS EM
ESTUDOS DE FITORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS POR METAIS
PESADOS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA DA LITERATURA**

RESUMO

A contaminação de ecossistemas aquáticos e terrestres por metais pesados, resultantes de processos industriais, tem se tornado um dos grandes problemas do ponto de vista ambiental. Grande parte das técnicas de remediação propostas para reabilitação de solos contaminados por metais pesados exige altos investimentos, o que acaba por inviabilizar esses procedimentos. Nesse contexto, a fitorremediação pode ser considerada um método promissor, pois é uma técnica de baixo custo e de grande eficiência na remediação *in situ* de solos contaminados por poluentes orgânicos e metais pesados. Técnicas biotecnológicas, como a cultura de tecidos vegetais, têm sido consideradas ferramentas auxiliares para avaliar potencial fitorremediador de espécies vegetais e investigar as alterações no metabolismo vegetal, com a finalidade de otimizar tais procedimentos de despoluição com o emprego de plantas. O objetivo do presente trabalho foi levantar estudos, publicados na literatura científica, que relacionassem o uso da técnica de cultura de tecidos vegetais na identificação e pré-seleção de espécies vegetais com potencial fitorremediador, passíveis de serem empregadas na recuperação de solos contaminados por metais pesados. As bases de dados consultadas foram Google Acadêmico, LILACS, SciELO, Scopus e *Web of Science*, entre 1990 e 2015. A estratégia de busca utilizou descritores predefinidos e critérios de inclusão/exclusão para seleção dos artigos. Dessa forma, dos 1142 trabalhos resultantes da busca inicial, apenas 30 artigos foram selecionados. A pesquisa revelou que houve um predomínio no emprego de plantas herbáceas nos estudos selecionados pela presente revisão. Em relação ao material vegetal utilizado para o estabelecimento *in vitro*, observou-se uma diversidade nos tipos de explantes inoculados. Neste estudo, também foi possível constatar que, apesar de existirem particularidades, o cultivo *in vitro* representa uma ferramenta útil para estudos de fitorremediação, uma vez que permite o estabelecimento de sistemas vegetais modelos que podem ser usados para a obtenção de informações importantes em relação à toxicidade e à tolerância de espécies vegetais a metais pesados.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*. Metais pesados. Plantas hiperacumuladoras. Recuperação de solos.

ABSTRACT

Contamination of aquatic and terrestrial ecosystems by heavy metals, resulting from industrial processes, has become one of the major environmental problems. A large part of the remediation techniques proposed for the rehabilitation of soil contaminated by heavy metals requires high investments, which end up making these procedures unfeasible. In this context, phytoremediation can be considered a promising method, since it is a low-cost and highly efficient technique for the *in situ* remediation of soils contaminated by organic pollutants and heavy metals. Biotechnological techniques, such as plant tissue culture, have been considered auxiliary tools to evaluate phytoremediation potential of vegetal species and to investigate alterations in vegetal metabolism, in order to optimize such depollution procedures with the use of plants. The objective of the present study was to collect studies published in the scientific literature that relate the use of plant tissue culture technique in the identification and pre-selection of vegetal species with phytoremediation potential that can be used to recover soils contaminated by heavy metals. The databases consulted were Google Scholar, LILACS, SciELO, Scopus and Web of Science, between 1990 and 2015. The search strategy used predefined descriptors and inclusion/exclusion criteria for article selection. Thus, of the 1142 papers resulting from the initial search, only 30 papers were selected. The research revealed that there was a predominance in the use of herbaceous plants in the studies selected by the present review. In relation to the vegetal material used for *in vitro* establishment, a diversity in the types of inoculated explants was observed. In this study, it was also possible to verify that, although there are particularities, *in vitro* cultivation represents a useful tool for phytoremediation studies, since it allows the establishment of vegetal models that can be used to obtain important information regarding the toxicity and tolerance of vegetal species to heavy metals.

Keywords: *In vitro* culture. Heavy metals. Hyperaccumulating plants. Soil recovery.

1 INTRODUÇÃO

A intensificação dos processos industriais, dentre outras atividades humanas, tem aumentado o risco de contaminação de solos por poluentes inorgânicos, tais como os metais pesados. Dada a sua importância socioeconômica e ambiental, a descontaminação desses sítios poluídos está se tornando uma grande preocupação nos dias atuais, uma vez que esse fato pode representar um risco para a saúde humana e dos animais, além de provocar o comprometimento da produtividade agrícola e da dinâmica das comunidades (fauna e flora) locais (BEN GHNAYA *et al.*, 2009; TÓTH *et al.*, 2016; YONG *et al.*, 2014).

O potencial de toxicidade da grande maioria dos metais pesados está relacionado, em parte, com a incapacidade de sua biodegradação natural (WAOO; KHARE; GANGULY, 2015a).

Dessa forma, métodos de remediação baseados em princípios físicos, químicos e biológicos estão sendo propostos com o intuito de reabilitar solos contaminados por metais pesados e, conseqüentemente, possibilitar o retorno da funcionalidade e da estabilidade do ecossistema afetado. No entanto, fatores como localização, tamanho e acessibilidade ao sítio poluído, histórico e características do solo contaminado, assim como o grau de contaminação devem ser levados em consideração durante a escolha do procedimento de remediação mais adequado (ARTHUR *et al.*, 2005; WAOO; KHARE; GANGULY, 2015a).

Por outro lado, a escolha de alternativas para descontaminação de áreas poluídas também envolve a observação de critérios como eficiência, facilidade de execução, tempo e custos do processo a ser adotado (PIRES *et al.*, 2003). Neste contexto, a fitorremediação – que, segundo Peer *et al.* (2005), é o emprego de espécies vegetais para redução, remoção, degradação, transformação ou imobilização de contaminantes ambientais, principalmente de origem antropogênica, com a finalidade de restaurar sítios poluídos – tem ganhado a atenção do meio científico. Tal tecnologia, quando comparada aos outros métodos tradicionais de remediação química e física, pode ser considerada uma técnica promissora, esteticamente agradável, de baixo custo e de grande eficiência na remediação *in situ* de solos contaminados por poluentes inorgânicos, como os metais pesados (ARTHUR *et al.*, 2005; WAOO; KHARE; GANGULY, 2014a).

Segundo Santos-Díaz *et al.* (2007), diversas estratégias têm sido desenvolvidas, por diferentes espécies vegetais, para tolerar ou acumular metais pesados presentes no solo. Por conseguinte, a fitorremediação inclui mecanismos de fitofiltração, rizofiltração, fitoextração, fitoimobilização, fitoestabilização, fitodegradação e rizodegradação.

A fitofiltração e a rizofiltração são tecnologias de remediação utilizadas pelas plantas para remoção de contaminantes presentes na água. Já a fitoimobilização e a fitoestabilização representam estratégias vegetais empregadas para a transformação de poluentes tóxicos em formas inertes ou menos perigosas, sendo que, através da sua imobilização, reduzem a biodisponibilidade do contaminante no solo. Na fitodegradação e na rizodegradação, ocorre a quebra dos contaminantes em compostos menores, muitas vezes com toxicidade reduzida e maior facilidade de liberação na forma de exsudatos. Por fim, a fitoextração caracteriza o uso da habilidade de plantas para absorção de contaminantes, principalmente metais e metalóides do solo, e o seu acúmulo em seus tecidos (ARTHUR *et al.*, 2005; BEN GHAYYA *et al.*, 2007; HUANG; CUNNINGHAM, 1996).

A capacidade de absorção de metais pesados por espécies vegetais está relacionada a uma exigência vital. Durante todo o ciclo de vida, as plantas dependem de mecanismos específicos e eficientes para absorver, translocar e estocar não só macronutrientes (N, P, K, S, Ca, Mg), mas também pequenas quantidades de micronutrientes essenciais, como ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), níquel (Ni), cobre (Cu) e molibdênio (Mo). Em geral, as plantas acumulam apenas quantidades suficientes para atender às demandas metabólicas. Entretanto, existem plantas, conhecidas como acumuladoras ou hiperacumuladoras, capazes de absorver ativamente grandes quantidades de metais (essenciais ou não) do solo, acumulando-os em formas não tóxicas, em suas massas aéreas (KIDD *et al.*, 2007; LASAT, 2000).

Para as práticas de fitorremediação, o ideal é que sejam utilizadas plantas que apresentem, dentre outros aspectos, as seguintes características: habilidade para absorção e metabolização do contaminante, tolerância a altas concentrações de metais no solo, sistema radicular denso e profundo, além de rápido crescimento e alta produção de biomassa (LAMEGO; VIDAL, 2007).

Segundo Pires *et al.* (2003), embora a fitorremediação já seja considerada, na Europa e nos Estados Unidos, uma alternativa viável para a descontaminação de solos e águas comprometidos pela presença de compostos orgânicos e inorgânicos, no Brasil o seu uso ainda continua limitado. O autor também ressalta a importância da condução de estudos que visem à identificação de espécies, potencialmente fitorremediadoras, nas condições edafoclimáticas brasileiras.

Sendo assim, a cultura de tecidos vegetais surge como uma técnica auxiliar para o levantamento de sistemas vegetais modelos em pesquisas de fitorremediação, uma vez que permite investigar a capacidade de plantas em tolerar toxicidade sob condições controladas.

Tal característica oferece ferramenta importante para melhor compreensão das transformações metabólicas de compostos tóxicos por plantas hiperacumuladoras (DORAN, 2009).

Entretanto, a cultura de tecidos vegetais possui limitações, que devem ser consideradas e avaliadas em função dos estudos que se deseja realizar, visto que a habilidade de certas plantas para tolerar, detoxificar e estocar altas concentrações de metais pesados e compostos orgânicos presentes no solo envolve uma série de interações que se estabelecem entre plantas, solo e microrganismos (DORAN, 2009).

Com vistas a sistematizar trabalhos relevantes que associem a utilização da técnica de cultura de tecidos vegetais a estudos de rotas metabólicas e de mecanismos de tolerância de espécies vegetais a compostos tóxicos, a presente pesquisa utilizou a metodologia de revisão sistemática da literatura.

A revisão sistemática da literatura, embora seja um método originalmente difundido dentro do contexto das ciências médicas para obtenção de evidências científicas de intervenções na saúde, vem ganhando espaço em diversas outras áreas de conhecimento. Segundo De-la-Torre-Ugarte-Guanilo *et al.* (2011), a revisão sistemática permite identificar, de forma rigorosa, estudos publicados sobre um determinado tema que se deseja estudar, avaliá-los de forma crítica e estabelecer uma síntese com base nos estudos primários selecionados. O protocolo estabelecido pela revisão sistemática deve ser desenvolvido considerando-se o bom enquadramento da pergunta formulada e a utilização de critérios que minimizem o viés, com o intuito de garantir a qualidade do trabalho final (CORDEIRO *et al.*, 2007).

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi identificar, na literatura, por meio de uma revisão sistemática, os artigos relacionados à utilização da técnica de cultura de tecidos vegetais como ferramenta para identificação e pré-seleção de espécies vegetais com potencial fitorremediador, no período de 1990 a 2015.

2 METODOLOGIA

Este trabalho tomou por base a metodologia de revisão sistemática da literatura, que busca a integração de estudos primários produzidos por diversos grupos de pesquisadores, em relação ao tema, objeto do estudo (GALVÃO; SAWADA; TREVIZAN, 2004). De acordo com Lima, Soares e Bacaltchuk (2000), para que a revisão seja objetiva e reprodutível, métodos explícitos e sistematizados de busca devem ser empregados.

Portanto, as unidades de análise – tratadas aqui como estudos primários – foram identificadas e selecionadas a partir de uma estratégia científica de busca predefinida, baseada em critérios de inclusão e exclusão claros e que, em conjunto, pudessem proporcionar maior credibilidade à metodologia empregada (CORDEIRO *et al.*, 2007).

Para fins desta pesquisa, realizou-se uma busca por artigos científicos indexados nas bases eletrônicas de dados Google Acadêmico, LILACS, SciELO, Scopus e *Web of Science*. Segundo Rosa *et al.* (2011), a escolha do espaço amostral deve estar fundamentada na capacidade de abrangência das bases de dados e no seu reconhecimento pela comunidade científica brasileira.

Foram levantados artigos, publicados na literatura científica, relacionando o uso da técnica de cultura de tecidos vegetais a estudos de identificação e pré-seleção de espécies vegetais com potencial fitorremediador, passíveis de serem empregadas na recuperação de solos contaminados por metais pesados. O método empregado para seleção dos estudos primários tomou como base o processo proposto por Rosa *et al.* (2011).

A estratégia de busca baseou-se no uso de descritores preestabelecidos, sendo que as palavras-chaves – “tissue culture”, “phytoremediation”, “heavy metal” – foram definidas como as mais apropriadas para pesquisa em língua inglesa. As suas traduções – “cultura de tecidos”, “fitorremediação”, “metal pesado” – também foram empregadas para buscas, dentro do espaço amostral. Entretanto, o levantamento de publicações utilizando descritores em língua portuguesa não será avaliado, devido à carência de artigos científicos, nesse idioma, que avaliem o objeto proposto pela presente revisão.

A fim de se restringir a pesquisa e refinar os resultados obtidos, os descritores foram testados em combinações sucessivas, através do operador *booleano* “AND” (TABELA 1).

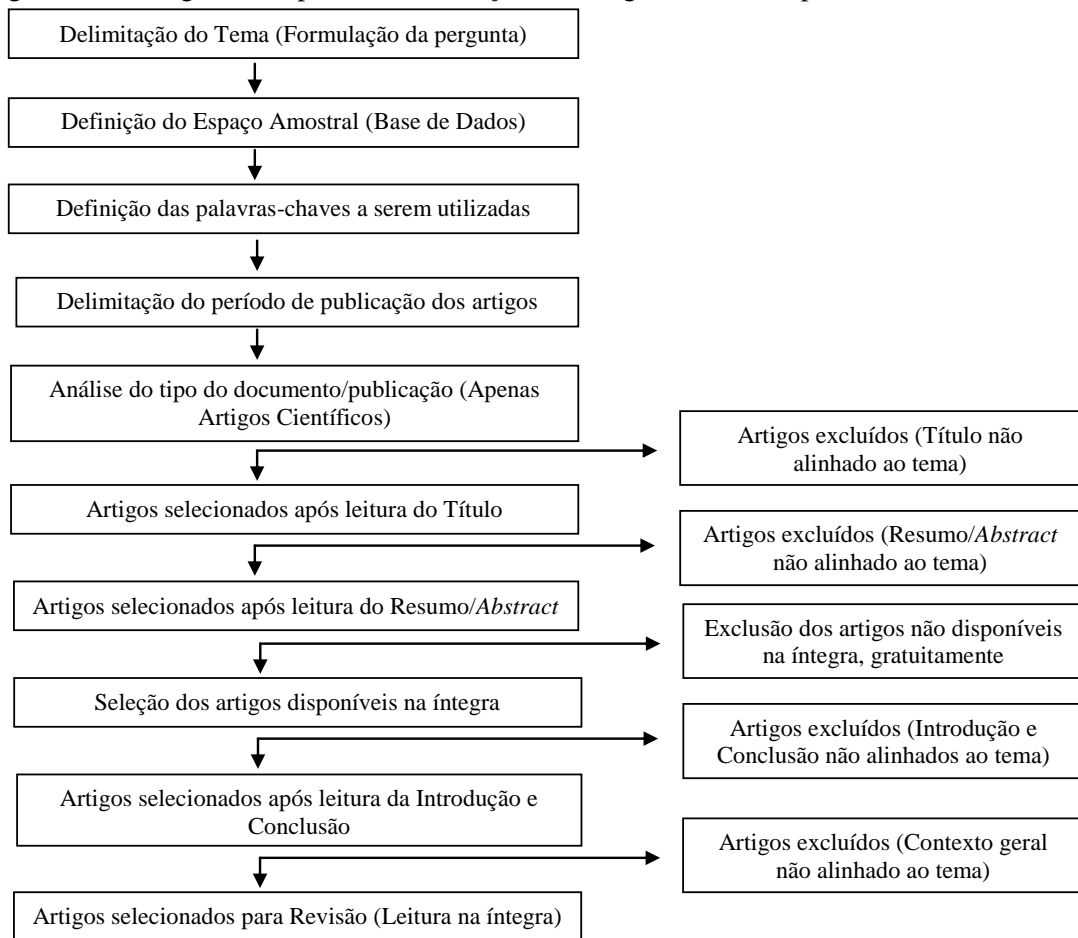
TABELA 1 – Descritores estabelecidos para busca nas bases eletrônicas de dados.

| Idioma | Descritores/ <i>Keywords</i> |
|--------|---|
| | “tissue culture” |
| Inglês | “tissue culture” AND “phytoremediation” |
| | “tissue culture” AND “phytoremediation” AND “heavy metal” |

Vale ressaltar que a presente investigação científica buscou reunir, avaliar criticamente e sintetizar os resultados de estudos primários publicados no período de 1990 a 2015. Além do ano, outro critério de inclusão empregado foi o tipo de publicação, sendo que apenas artigos científicos integraram as unidades de análise. Dessa forma, cartilhas, boletins, dissertações e teses não foram incluídos neste estudo.

Os artigos obtidos pela estratégia de busca inicial foram filtrados, a fim de identificar e selecionar os que estivessem alinhados com o tema de interesse da presente revisão sistemática. Para tanto, foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: leitura dos títulos para seleção daqueles que melhor se enquadrassem ao objeto da pesquisa; leitura do resumo para seleção dos trabalhos mais pertinentes ao objetivo deste estudo; leitura da Introdução e Conclusão para exclusão de artigos não alinhados à pesquisa; leitura dos artigos na íntegra para seleção dos trabalhos mais relevantes. Um critério de exclusão aplicado foi a acessibilidade gratuita do artigo na íntegra, sendo que todos os artigos não disponíveis foram excluídos da revisão. A Figura 1 ilustra o processo, adaptado de Rosa *et al.* (2011), empregado para seleção e análise dos artigos que integralizam a presente revisão.

Figura 1 – Fluxograma do processo de seleção dos artigos científicos para Revisão Sistemática.



Fonte: Adaptado de Rosa *et al.* (2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estratégia inicial de busca, baseada no emprego dos descritores preestabelecidos, resultou na seleção de 1140 artigos, dentro das cinco bases de dados (TABELA 2).

TABELA 2 – Resultado da busca nas Bases de Dados – Língua Inglesa.

| Base de Dados Pesquisada | Descritores/Keywords | Nº de Artigos encontrados |
|---------------------------------|---|----------------------------------|
| Google Acadêmico | “tissue culture” | 2.460.000 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation” | 3.650 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation”+“heavy metal” | 1140 |
| | 1990 a 2015 | 1110 |
| LILACS | “tissue culture” | 218 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation” | 0 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation”+“heavy metal” | 0 |
| | 1990 a 2015 | 0 |
| SciELO | “tissue culture” | 319 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation” | 1 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation”+heavy metal” | 0 |
| | 1990 a 2015 | 0 |
| Scopus | “tissue culture” | 111.805 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation” | 83 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation”+heavy metal” | 19 |
| | 1990 a 2015 | 19 |
| Web of Science | “tissue culture” | 138.404 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation” | 98 |
| | “tissue culture”+“phytoremediation”+heavy metal” | 11 |
| | 1990 a 2015 | 11 |

É notável que o Google Acadêmico permitiu o acesso a um número final mais expressivo de publicações (1110) em comparação com as demais bases de dados, que, por sua vez, resultaram em um número pouco significativo de artigos.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão predefinidos no processo de seleção dos artigos, o levantamento bibliográfico realizado permitiu a seleção de uma amostra composta por 33 artigos (TABELA 3). Essa redução significativa no número de artigos justifica-se pelo fato de que a busca por descritores dentro das bases eletrônicas,

normalmente, não se limita apenas ao título e às palavras-chaves das publicações. Via de regra, ela se estende aos resumos, o que acaba permitindo que trabalhos que apresentem as palavras-chaves, mas que não tratem especificamente do tema objeto da pesquisa, sejam incorporados ao resultado final da busca.

TABELA 3 – Amostra final de artigos incluídos na Revisão Sistemática.

| | Google Acadêmico | LILACS | SciELO | Scopus | Web of Science | Total |
|---|---------------------|--------|--------|--------|-------------------|-------|
| Nº de Artigos encontrados | 1110 | 0 | 0 | 19 | 11 | 1142 |
| Critérios de inclusão | | | | | | |
| Título alinhado ao tema | 125 | 0 | 0 | 19 | 4 | 149 |
| Resumo alinhado ao tema | 84 | 0 | 0 | 12 | 4 | 100 |
| Disponível na Base de Dados | 35 | 0 | 0 | 5 | 3 | 43 |
| Introdução e Conclusão alinhadas ao tema | 28 | 0 | 0 | 4 | 1 | 33 |
| Artigos incluídos | 28 | 0 | 0 | 4 | 1 | 33 |

Contudo, tanto a publicação obtida através da busca na base eletrônica *Web of Science* quanto duas daquelas resultantes da pesquisa realizada no *website* Scopus já haviam sido identificadas pelo Google Acadêmico. Portanto, o total de artigos utilizados na presente revisão, após exclusão das duplicidades, restringiu-se a apenas 30 trabalhos.

Dessa forma, a busca permitiu acessar publicações que demonstraram como a técnica de cultura de tecidos vegetais vem sendo utilizada como ferramenta em pesquisas que avaliaram os efeitos da presença de metais pesados no metabolismo e no desenvolvimento de diversas espécies vegetais. No entanto, apesar da relevância dos artigos selecionados, devem-se considerar as limitações da metodologia empregada, principalmente em relação à disponibilidade – de forma gratuita – de trabalhos, na íntegra, nas bases de dados investigadas. Além disso, como a revisão sistemática é um tipo de estudo secundário, a sua qualidade está diretamente relacionada à qualidade das unidades de análise primárias selecionadas (SAMPAIO; MANCINI, 2007).

Na Tabela 4, foram relacionados, de acordo com o ano de publicação, os artigos classificados como de relevância para o tema abordado pela presente revisão sistemática.

TABELA 4 – Publicações selecionadas para a Revisão Sistemática.

| Autor | Título | Citações | Referências |
|---|--|----------|---|
| RUGH, C. L. <i>et al.</i> | Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation | 431 | Nature Biotechnology, v. 16, p. 925–928, 1998. |
| ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. | <i>In vitro</i> selection and biochemical characterization of zinc and magnesium adapted callus lines in <i>Brassica</i> spp. | 37 | Plant Science, v.137, p. 89-100, 1999. |
| SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R.; DAS, P. | Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of <i>Echinochloa colona</i> (L.) Link <i>in vitro</i> | 25 | Journal of Plant Physiology, v. 158, p. 1281-1290, 2001. |
| GYULAI, G. <i>et al.</i> | Clonal propagation and improved phytoextraction activity of poplar clones (<i>Populus canescens</i>) <i>in vitro</i> | 0 | Genetic Variation for Plant Breeding. p. 279-283, 2004. |
| BITTSÁNSZKY, A. <i>et al.</i> | Stress tolerance and <i>in vitro</i> phytoremediation of poplar (<i>Populus</i> sp.) | 0 | Hungarian Agricultural Research, v.1, p.13-15, 2005. |
| GYULAI, G. <i>et al.</i> | AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic gshI-poplar clones (<i>Populus x canescens</i> L.) for Copper <i>in vitro</i> | 22 | Z. Naturforsch, v. 60, p.300-306, 2005. |
| BEN GHNAYA, A. <i>et al.</i> | Morphological and physiological characteristics of rapeseed plants regenerated <i>in vitro</i> from thin cell layers in the presence of zinc | 18 | Comptes Rendus Biologies, v. 330, n. 10, p. 728–734, 2007. |
| ROUT, G. R.; SAHOO, S. | <i>In vitro</i> selection and plant regeneration of copper-tolerant plants from leaf explants of <i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. “Xanthi” | 5 | Plant Breeding, v. 126, p.403-409, 2007. |
| SANTOS-DÍAZ, M. D. S.; BARRÓN-CRUZ, M. D. C.; ALFARO-DE LA TORRE, M. C. | Induction of <i>in vitro</i> roots cultures of <i>Thypha latifolia</i> and <i>Scirpus americanus</i> and study of their capacity to remove heavy metals. | 10 | Electronic Journal of Biotechnology, v. 10, n. 3, p. 417–424, 2007. |

(continuação)

| Autor | Título | Citações | Referências |
|--|--|----------|---|
| KATANIC, M. <i>et al.</i> | The influence of lead on the <i>in vitro</i> growth and concentration of photosynthetic pigments in shoots of the white poplar (<i>Populus alba</i>) clones | 1 | Forestry Journal, v. 54, n. 1, p. 29-36, 2008. |
| DORAN, P. M. | Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations | 99 | Biotechnology and Bioengineering, v. 103, n. 1, p. 60-76, 2009. |
| BUENDÍA-GONZÁLEZ, L. <i>et al.</i> | <i>In vitro</i> lead and nickel accumulation in mesquite (<i>Prosopis laevigata</i>) seedlings | 6 | Revista Mexicana de Ingeniería Química, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2010. |
| CAPUANA, M. | Heavy metals and woody plants - Biotechnologies for phytoremediation | 33 | iForest, v. 4, p. 7-15, 2011. |
| ORTEGA-ORTEGA, R. E.; BELTRÁN-HERRERA, J. D.; MARRUGO-NEGRETE, J. L. | Accumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (<i>Gynerium sagittatum</i>) (Aubl) Beauv. <i>in vitro</i> | 5 | Rev. Colomb. Biotecnol., v. XIII, n. 1, p. 33-41, 2011. |
| KHAN, F. <i>et al.</i> | Comparative evaluation of copper, cobalt, cadmium and iron scavenging efficiency by <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> grown <i>Momordica charantia</i> using atomic absorption spectroscopy | 3 | J. of Medicinal Plants Research, v. 6, n. 17, p. 3301-3305, 2012. |
| KOVACEVIC, B. <i>et al.</i> | Lead tolerance and accumulation in White Poplar cultivated <i>in vitro</i> | 3 | South-East European Forestry, v. 4, n. 1, p. 3-12, 2013. |
| BEN-BAHRI, N.; LARIBI, B.; BETTAIEB, T. | Morphological effects of zinc and its accumulation in micropropagated plants of <i>Paulownia tomentosa</i> (Thunb.) Steud. | 0 | Int. J. Med. Arom. Plants, v. 3, n. 1, p. 40-46, 2013. |

(continuação)

| Autor | Título | Citações | Referências |
|---|---|-----------------|---|
| MALDONADO-MAGAÑA, A. <i>et al.</i> | Establishment of cell suspension cultures of <i>Prosopis laevigata</i> (Humb.& Bonpl. ex Willd) M. C. Johnst to determine the effect of zinc on the uptake and accumulation of lead | 2 | Revista Mexicana de Ingeniería Química, v. 12, n. 3, p. 489–498, 2013. |
| KHAN, F. <i>et al.</i> | Phytoremediative potential of <i>in vitro</i> grown <i>Tropaeolum majus</i> L. for heavy metals uptake from the tanneries contaminated soils of Kasur | 0 | Pakistan Journal of Science, v. 66, n. 4, p. 306-310, 2014. |
| YONG, W. T. L. <i>et al.</i> | Uptake and accumulation of aluminium, copper and cobalt in tissue cultured <i>Melastoma malabathricum</i> Linn. plantlets | 0 | Intern. Jour. of Plant & Soil Science, v. 3, n.8, p. 1018-1030, 2014. |
| WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. | Comparative <i>in vitro</i> studies on native plant species at heavy metal polluted soil having phytoremediation potential | 5 | Int. J. of Scientific Research in Environmental Sciences, v. 2, n. 2, p. 49–55, 2014. |
| WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. | Effect of Increasing concentrations of chromium on <i>in vitro</i> culture of <i>Datura innoxia</i> | 1 | Int. J. of Applied Science-Research and Review, v. 1, n. 3, p. 82-87, 2014. |
| WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. | Micro-propagation of <i>Datura innoxia</i> as a heavy metal accumulator plant | 0 | Global Journal of Advanced Research, v. 1, n. 2, p. 104–109, 2014. |
| WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. | Toxic effect of different lead concentrations on <i>in vitro</i> culture of <i>Datura innoxia</i> | 0 | Journal of Scientific & Innovative Research, v. 3, n. 5, p. 532-535, 2014. |
| DOMOKOS-SZABOLCSY <i>et al.</i> | <i>In vitro</i> comparative study of two <i>Arundo donax</i> L. ecotypes selenium tolerance | 9 | Int. Journal of Horticultural Science, v. 20, n. 3-4, p. 119-122, 2014. |

(continuação)

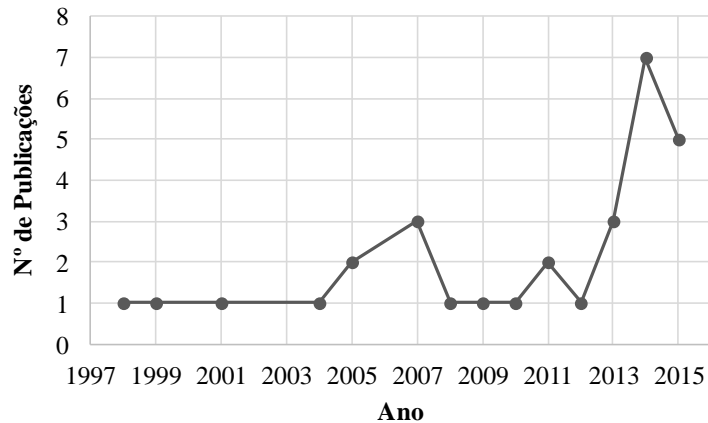
| Autor | Título | Citações | Referências |
|---|---|-----------------|--|
| WISZNIEWSKA, A. <i>et al.</i> | <i>In vitro</i> selection for lead tolerance in shoot culture of <i>Daphne</i> species | 3 | Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, v. 14, n. 1, p. 129-142, 2015. |
| WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. | <i>In vitro</i> studies on effect of chromium on <i>Lantana camara</i> | 0 | Climate Change, v. 1, n. 1, p. 45-48, 2015. |
| WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. | Toxic Effect of Lead Concentrations on <i>Lantana camara</i> Tissue Cultured Plantlets. | 0 | Int. J. of Scientific Research in Sci., Eng. and Technology, v. 1, n. 1, p. 70-74, 2015. |
| TAGHIZADEH, M.; KAFI, M.; MOGHADAM, M. R. F. | Breeding by <i>in vitro</i> culture to improve tolerance and accumulation of lead in <i>Cynodon dactylon</i> L. | 0 | J. Agr. Sci. Tech., v. 17, p. 1851-1860, 2015. |
| KATANIC, M. <i>et al.</i> | Nickel phytoremediation potencial of White Poplar clones grown <i>in vitro</i> | 1 | Romanian Biotechn. Letters, v. 20, n. 1, p. 10085-10096, 2015. |

A tabela acima também discrimina o número de citações que cada artigo possui, com base em informação obtida através da ferramenta de busca Google Acadêmico. Segundo Afonso *et al.* (2011), tais dados são importantes para a confirmação do reconhecimento científico dos artigos. Entretanto, o ideal é que cada situação seja avaliada individualmente, visto que fatores como notoriedade científica do autor e ano de publicação recente do trabalho devem ser levados em consideração. Notou-se que, dentre os artigos selecionados, o trabalho com maior evidência no meio científico foi aquele realizado por Rugh *et al.* (1998), seguido por Doran (2009), Rout *et al.* (1999) e Capuana (2011). Dessas publicações, duas consistem em revisões bibliográficas (CAPUANA, 2011; DORAN, 2009), o que reforça a importância desse tipo de estudo no contexto analisado.

Em termos temporais, observou-se que, no intervalo avaliado (1990 a 2015) e de acordo com o método de pesquisa adotado, apenas quatro artigos de relevância foram encontrados no período que antecede o ano de 2005 (Gráfico 1). A carência de trabalhos

publicados nesse período pode estar relacionada ao fato de que o emprego da biotecnologia (especificamente da técnica de cultura de tecidos vegetais), como ferramenta de investigação em estudos de fitorremediação, vem ganhando espaço gradualmente. Todavia, sua conveniência ainda hoje divide opiniões entre grupos de pesquisadores (DORAN, 2009).

Gráfico 1 – Evolução temporal das publicações selecionadas a partir das bases eletrônicas pesquisadas (1990-2015).



Fonte: Os autores (2016).

A principal crítica que se faz ao emprego da cultura de tecidos em estudos de fitorremediação é a incapacidade dessa técnica em produzir e simular toda a complexa rede de interações que ocorrem quando as plantas são cultivadas nas condições convencionais. Isso posto, a interpretação dos resultados obtidos com tais pesquisas deve ser avaliada criteriosamente, a fim de se evitar conclusões equivocadas (DORAN, 2009).

Em contrapartida, aqueles que defendem seu emprego acreditam que, na verdade, a técnica de cultivo *in vitro* representa um sistema-modelo, no qual existe uma maior facilidade de condução de estudos dessa natureza. Essa afirmação é corroborada por Golan-Goldhirsh *et al.* (2004), que citam como principais vantagens da cultura de tecidos vegetais a reprodutibilidade de crescimento por longos períodos de tempo, controle das atividades fisiológicas e de fatores ambientais, maior superfície de absorção, além de permitir análise e isolamento simples de metabólitos. Os autores ressaltam ainda a possibilidade de avaliar apenas as respostas desencadeadas na planta frente ao poluente, uma vez que, nesses sistemas, ocorre a fragmentação da complexa interação planta-solo-microrganismos, presente no ambiente natural.

Doran (2009) destaca também o fato de que as plantas cultivadas *in vitro* podem ser mantidas em condições axênicas – livres de contaminação microbiana que poderiam

amplificar ou inibir a capacidade vegetal em degradar os metais contaminantes. Além disso, o autor defende que o cultivo *in vitro* permite a utilização de material vegetal derivado de uma mesma planta – o que evita os efeitos causados pela variabilidade genética entre indivíduos, embora a variação somaclonal em tecidos vegetais não diferenciados possa representar uma fonte de variabilidade. Outra vantagem levantada é relativa ao grande número de plântulas regeneradas em um curto período de tempo – o que garante maior agilidade na obtenção dos resultados.

A Tabela 5 apresenta os principais metais pesados estudados, o tipo de explante utilizado para iniciar o cultivo *in vitro* e as espécies vegetais avaliadas nos estudos selecionados pela presente revisão sistemática. Os demais trabalhos selecionados pela estratégia de busca, mas que não se encontram descritos na presente tabela, consistiram em artigos de revisão bibliográfica.

TABELA 5 – Técnicas de cultura de tecidos vegetais *in vitro* empregadas em estudos de fitorremediação.

| Metal Pesado | Forma de cultivo - Explante | Espécie Vegetal | Referências |
|--------------------------|--|---|---|
| Mercúrio | Massas pró-embriogênicas | <i>Liriodendron tulipifera</i> | RUGH <i>et al.</i> (1998) |
| Zinco e Magnésio | Calos | <i>Brassica</i> spp. | ROUT; SAMANTARAY; DAS (1999) |
| Cromo e Níquel | Calos | <i>Echinochloa colona</i> | SAMANTARAY; ROUT; DAS (2001) |
| Zinco | Discos foliares | <i>Populus canescens</i> | GYULAI <i>et al.</i> (2004) |
| Zinco | Discos foliares | <i>Populus</i> sp. | BITTSÁNSZKY <i>et al.</i> (2005) |
| Cobre | Discos foliares | <i>Populus x canescens</i> | GYULAI <i>et al.</i> (2005) |
| Zinco | Hipocótilos e Pecíolos | <i>Brassica napus</i> | BEN GHNAYA <i>et al.</i> (2007) |
| Cobre | Calos | <i>Nicotiana tabacum</i> | ROUT; SAHOO (2007) |
| Chumbo, Cromo e Manganês | Raízes | <i>Thypha latifolia</i> e <i>Scirpus americanus</i> | SANTOS-DÍAZ; BARRÓN-CRUZ; ALFARO-DE LA TORRE (2007) |

(continuação)

| Metal Pesado | Forma de cultivo - Explante | Espécie Vegetal | Referências |
|--------------------------------------|---|--|---|
| Chumbo | Meristemas apicais | <i>Populus alba</i> | KATANIC <i>et al.</i> (2008) |
| Chumbo e Níquel | Sementes | <i>Prosopis Laevigata</i> | BUENDÍA-GONZÁLEZ <i>et al.</i> (2010) |
| Mercúrio | Plântulas | <i>Gynerium sagittatum</i> | ORTEGA-ORTEGA; BELTRÁN-HERRERA; MARRUGO-NEGRETE (2011) |
| Cobre, Cobalto, Cádmio e Ferro | Folhas, Cotilédones, Entrenós e Raízes | <i>Momordica charantia</i> | KHAN <i>et al.</i> (2012) |
| Chumbo | Meristemas apicais | <i>Populus alba</i> | KOVACEVIC <i>et al.</i> (2013) |
| Zinco | Segmentos nodais | <i>Paulownia tomentosa</i> | BEN BAHRI; LARIBI; BETTAIEB (2013) |
| Chumbo | Células em suspensão | <i>Prosopis laevigata</i> | MALDONADO- MAGAÑA <i>et al.</i> (2013) |
| Cromo e Chumbo | Folhas, Raiz, Segmentos nodais e internodais | <i>Trapaeolum majus</i> | KHAN <i>et al.</i> (2014) |
| Alumínio, Cobre e Cobalto | Segmentos nodais | <i>Melastoma malabathricum</i> | YONG <i>et al.</i> (2014) |
| Cromo | Meristemas apicais e segmentos nodais | <i>Datura innoxia</i> | WAOO; KHARE; GANGULY (2014a) |
| Não avaliado | Segmentos nodais | <i>Datura innoxia</i> | WAOO; KHARE; GANGULY (2014b) |
| Chumbo | Plântulas | <i>Datura innoxia</i> | WAOO; KHARE; GANGULY (2014c) |
| Cádmio, Níquel, Cromo e Chumbo | Meristemas apicais e segmentos nodais | <i>Datura innoxia</i> e <i>Lantana camara</i> | WAOO; KHARE; GANGULY (2014d) |

(continuação)

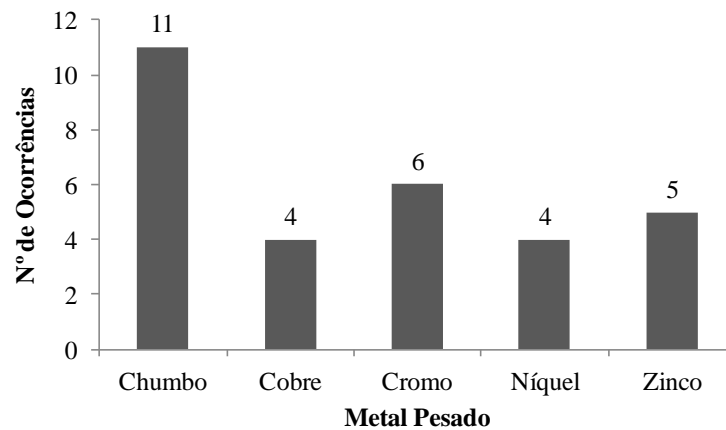
| Metal Pesado | Forma de cultivo - Explante | Espécie Vegetal | Referências |
|---------------------|--|---|--|
| Selênio | Embriões somáticos | <i>Arundo donax</i> | DOMOKOS-SZABOLCSY <i>et al.</i> (2014) |
| Chumbo | Meristemas apicais | <i>Daphne jasminea</i> e <i>Daphne tangutica</i> | WISZNIEWSKA <i>et al.</i> (2015) |
| Chumbo | Meristemas apicais e Segmentos nodais | <i>Lantana camara</i> | WAOO; KHARE; GANGULY (2015a) |
| Cromo | Plântulas | <i>Lantana camara</i> | WAOO; KHARE; GANGULY (2015b) |
| Chumbo | Sementes | <i>Cynodon dactylon</i> | TAGHIZADEH; KAFI; MOGHADAM (2015) |
| Níquel | Meristemas apicais | <i>Populus alba</i> | KATANIC <i>et al.</i> (2015) |

Observa-se um predomínio na utilização de plantas herbáceas, o que reforça a afirmação de Alves (2008) de que as gramíneas e as plantas herbáceas apresentam mecanismos fisiológicos e bioquímicos mais eficientes para reduzir a toxidez dos metais pesados em seus tecidos. Outro fato que dificulta a manipulação de espécies lenhosas em estudos *in vitro* é a dificuldade de seu estabelecimento, visto que é comum a ocorrência de contaminação e oxidação em função da liberação de compostos fenólicos no meio de cultura (SATO *et al.*, 2001).

Em relação à forma de iniciação do cultivo *in vitro*, nota-se o emprego de uma diversidade de explantes. Todavia, a escolha do explante deve levar em consideração o nível de diferenciação do tecido e a finalidade da micropropagação (SILVA *et al.*, 2005).

O Gráfico 2 apresenta os metais pesados priorizados pelas publicações selecionadas, no período pesquisado (1990 a 2015), que utilizaram a técnica de cultivo *in vitro* como ferramenta para avaliar a habilidade fitorremediadora das espécies vegetais de interesse. Os principais metais pesados avaliados nas pesquisas foram chumbo, cromo, zinco, cobre e níquel, corroborando com os estudos de Lasat (2002). Para o autor, os metais pesados mais comumente encontrados como poluentes ambientais, resultantes de atividades antrópicas, são cádmio, chumbo, cobre, cromo, mercúrio, níquel e zinco.

Gráfico 2 – Principais metais pesados avaliados nos estudos selecionados pela Revisão Sistemática.



Fonte: Os autores (2016).

Portanto, pesquisas avaliando a resposta *in vitro* de diversas plantas a concentrações tóxicas de metais pesados, tais como zinco, níquel, cromo, cobre e chumbo, têm se mostrado promissoras para determinação do potencial hiperacumulador de várias espécies vegetais. Esses estudos são importantes, pois permitem desenvolver protocolos eficientes para estabelecimento *in vitro* das espécies vegetais estudadas, identificar linhagens/clones mais tolerantes a metais pesados e obter transgênicos com características desejáveis. Além disso, essas pesquisas também são indispensáveis para se elucidar as respostas fisiológicas e metabólicas desencadeadas, na planta, em resposta à presença de contaminantes ambientais (BABAOĞLU AYDAŞ, 2013; BEN GHNAYA *et al.*, 2007; BUENDÍA-GONZÁLEZ *et al.*, 2010, 2012; SANTOS, 2012; SANTOS-DÍAZ *et al.*, 2007; WAOO *et al.* 2014a, 2014b, 2015a, 2015b; YEH-JIN & PARK, 2007).

Acredita-se que as plantas utilizem uma série de processos regulatórios para impedir a toxicidade induzida pela presença de metais, quando em concentrações elevadas. Dentre eles, destacam-se estratégias de inibição da absorção de íons metálicos e de sequestro e exclusão de metaloides (BITTSÁNSZKY *et al.*, 2005). Ademais, processos de absorção, adsorção, transformação, translocação, sequestro em vacúolos e hiperacumulação também representam mecanismos de tolerância e resistência a contaminantes ambientais que podem ser melhor compreendidos através de pesquisas *in vitro* (CAPUANA, 2011).

Contudo, a extrapolação dos resultados obtidos a partir de ensaios *in vitro* como sendo análogos àqueles que seriam alcançados com plantas inteiras em condições de campo deve ser feita com cuidado. Babaoglu Aydas *et al.* (2013) afirmam que é necessário uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na habilidade das plantas em acumular metais tóxicos, a fim de que se possa facilitar não somente estudos de fitorremediação, mas também

estudos de fisiologia vegetal relacionados ao metabolismo de metais pesados por determinadas espécies vegetais.

Dessa forma, as interpretações e inferências obtidas com base nos resultados desses estudos devem ser feitas com cautela, visto que a taxa e a extensão da absorção medida *in vitro* não representam necessariamente a capacidade intrínseca da planta inteira. Soma-se o fato de que os mecanismos pelos quais os metais pesados são transportados dentro da planta, sob condições de campo, estão relacionados também aos fenômenos de transpiração, difusão e transporte facilitado por microrganismos (DORAN, 2009).

Apesar disso, acredita-se que a cultura de tecidos vegetais – associada a programas de melhoramento genético e outras ferramentas biotecnológicas - represente um método útil para estudos de fitorremediação. Essa técnica não substitui os experimentos com plantas cultivadas diretamente em solo, porém tem auxiliado bastante na elucidação do metabolismo de metais pesados em plantas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas biotecnológicas representam uma ferramenta valiosa para investigação e avaliação do potencial fitorremediador das plantas. A cultura de tecidos vegetais, por sua vez, viabiliza a construção de sistemas experimentais modelos que reduzem a interferência de fatores externos, como interações com microrganismos, e permite explorar a capacidade intrínseca de tecidos e células vegetais para detoxificar metais pesados e outros poluentes ambientais.

A pesquisa revelou que, dada a sua relativa facilidade de estabelecimento e maior habilidade de metabolização de contaminantes, houve um predomínio na utilização de plantas herbáceas nos estudos selecionados pela presente revisão. No que diz respeito à forma de iniciação de cultivo *in vitro*, observou-se o emprego de uma diversidade de tipos de explantes.

Os principais metais pesados avaliados pelos artigos selecionados foram chumbo, cromo, zinco, cobre e níquel. Todavia, outros elementos, tais como mercúrio, cobalto, cádmio, magnésio, manganês, ferro, alumínio e selênio, também foram objetos de estudos.

Uma vez que existem particularidades em relação às respostas vegetais obtidas em pesquisas *in vitro* e naquelas em que se utilizam os tradicionais sistemas de plantio, a técnica de cultura de tecidos vegetais não exclui a necessidade de realização de testes baseados em cultivo de plantas no solo. Entretanto, ela pode ser considerada uma ferramenta confiável para auxiliar estudos de toxicidade e tolerância de espécies vegetais a metais pesados.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. H. F. *et al.* Como construir conhecimento sobre o tema de pesquisa? Aplicação do processo Proknow-C na busca de literatura sobre avaliação do desenvolvimento sustentável. **Revista de Gestão Social e Ambiental**, v. 5, n. 2, p. 47–62, 2011.
- ALVES, J. C.; SOUZA, A. P.; PÔRTO, M. L.; ARRUDA, J. A.; JÚNIOR, U. A. T.; SILVA, G. B.; ARAÚJO, R. C. SANTOS, D. Absorção e distribuição de chumbo em plantas de vetiver, jureminha e algaroba. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.1329-1336, 2008.
- ARTHUR, E. L. *et al.* Phytoremediation — An Overview. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, p. 109–122, 2005.
- BEN BAHRI, N.; LARIBI, B.; BETTAIEB, T. Morphological effects of zinc and its accumulation in micropropagated plants of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud . **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 40–46, 2013.
- BABAOĞLU AYDAŞ, S. S. *et al.* Localization and distribution of nickel and other elements in in-vitro grown *Alyssum corsicum* exhibiting morphological changes in trichomes: Initial insights into molecular mechanisms of nickel hyperaccumulation. **Turkish Journal of Botany**, v. 37, n.6, p.1115–1124, 2013.
- BEN GHNAYA, A. *et al.* Morphological and physiological characteristics of rapeseed plants regenerated *in vitro* from thin cell layers in the presence of zinc. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 330, n. 10, p. 728–734, 2007.
- BEN GHNAYA, A. *et al.* Physiological behaviour of four rapeseed cultivar (*Brassica napus* L.) submitted to metal stress. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 332, p. 363–370, 2009.
- BITTSÁNSZKY, A. *et al.* Stress tolerance and in vitro phytoremediation of poplar (*Populus* sp.). **Hungarian Agricultural Research**, v. 1, p. 13–15, 2005.
- BUENDÍA-GONZÁLEZ, L. *et al.* *In vitro* lead and nickel accumulation in mesquite (*Prosopis laevigata*) seedlings. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2010.
- BUENDÍA-GONZÁLEZ, L. *et al.* Somatic embryogenesis of the heavy metal accumulator *Prosopis laevigata*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 108, n. 2, p. 287–296, 2012.
- CAPUANA, M. Heavy metals and woody plants - Biotechnologies for phytoremediation. **iForest - Biogeosciences and Forestry**, v. 4, p. 7–15, 2011.
- CORDEIRO, A. M. *et al.* Revisão Sistemática : Uma Revisão Narrativa. **Revisão sistemática**, v. 34, n. 6, p. 428–431, 2007.
- DE LA TORRE-UGARTE-GUANILO, M. C.; TAKAHASHI, R. F.; BERTOLOZZI, M. R. Revisão sistemática: noções gerais. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 45, n. 5, p. 1260–1266, 2011.

- DOMOKOS-SZABOLCSY, E. *et al.* *In vitro* comparative study of two *Arundo donax* L. ecotypes' selenium tolerance. **International Journal of Horticultural Science**, v. 20, n. 3–4, p. 119–122, 2014.
- DORAN, P. M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 60–76, 2009.
- GALVÃO, C. M.; SAWADA, N. O.; TREVIZAN, M. A. Revisão Sistemática: Recurso que proporciona a incorporação das evidências na prática da enfermagem. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 12, n. 3, p. 549–556, 2004.
- GOLAN-GOLDHIRSH, A. *et al.* Plant response to heavy metals and organic pollutants in cell culture and at whole plant level. **Journal of Soils and Sediments**, v. 4, n. 2, p. 133–140, 2004.
- GYULAI, G. *et al.* Clonal propagation and improved phytoextraction activity of gshI poplar clones (*Populus canescens*) *in vitro*. **Genetic variation for plant breeding**, p. 279–283, 2004.
- GYULAI, G. *et al.* AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic gshI-poplar clones (*Populus x canescens* L.) for copper *in vitro*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 60, n. 3–4, p. 300–306, 2005.
- HUANG, J. W.; CUNNINGHAM, S. D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. **New Phytologist**, v. 134, p. 75–84, 1996.
- KATANIC, M. *et al.* The influence of lead on the *in vitro* growth and concentration of photosynthetic pigments in shoots of the white poplar (*Populus alba*) clones. **Forestry Journal**, v. 54, n. 1, p. 29–36, 2008.
- KATANIC, M. *et al.* Nickel phytoremediation potential of white poplar clones grown *in vitro*. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 20, n. 1, p. 10085–10096, 2015.
- KHAN, F. *et al.* Comparative evaluation of copper, cobalt, cadmium and iron scavenging efficiency by *in vivo* and *in vitro* grown *Momordica charantia* using atomic absorption spectroscopy. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 17, p. 3301–3305, 2012.
- KHAN, F. *et al.* Phytoremediative potential of *in vitro* grown *Tropaeolum majus* L. for heavy metal uptake from the tanneries contaminated soils of Kasur. **Pakistan Journal of Science**, v. 66, n. 4, p. 306–310, 2014.
- KIDD, P. S. *et al.* Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural: el género *Alyssum* L. **Ecosistemas**, v. 16, n. 2, p. 26–43, 2007.
- KOVACEVIC, B. *et al.* Lead tolerance and accumulation in white poplar cultivated *in vitro*. **South-East European Forestry**, v. 4, n. 1, p. 3–12, 2013.
- LAMEGO, F. P.; VIDAL, R. A. Fitorremediação: Plantas como agentes de despoluição? **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, n. jan/dez, p. 9–18, 2007.

LASAT, M. M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazardous Substance Research**, v. 2, p. 5–25, 2000.

LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal of environmental quality**, v. 31, n. 1, p. 109–120, 2002.

LIMA, M. S.; SOARES, B. G. O.; BACALTCHUK, J. Psiquiatria baseada em evidências. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 22, n. 3, p. 142–146, 2000.

MALDONADO-MAGAÑA, A. *et al.* Establishment of cell suspension cultures os *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. Ex Willd) M. C. Johnst to determine the effect of zinc on the uptake and accumulation of lead. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 12, n. 3, p. 489–498, 2013.

ORTEGA-ORTEGA, R. E.; BELTRÁN-HERRERA, J. D.; MARRUGO-NEGRETE, J. L. Acumulación de mercurio (Hg) por caña flecha (*Gynerium sagittatum*) (Aubl) Beauv. *in vitro*. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 13, n. 1, p. 33–41, 2011.

PEER, W. A. *et al.* Phytoremediation and hiperaccumulator plants. **Topics in Current Genetics**, v. 14, p. 299–340, 2005.

PIRES, F. R. *et al.* Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 335–341, 2003.

ROSA, I. O.; ENSSLIN, L.; ENSSLIN, S. R. Processo para seleção do referencial teórico para o gerenciamento de riscos afins à segurança empresarial. **P&D em Engenharia de Produção**, v. 9, n. 2, p. 67–80, 2011.

ROUT, G. R.; SAHOO, S. *In vitro* selection and plant regeneration of copper-tolerant plants from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. cv. “Xanthi”. **Plant Breeding**, v. 126, n. 4, p. 403–409, 2007.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* selection and biochemical characterisation of zinc and manganese adapted callus lines in *Brassica* spp. **Plant Science**, v. 146, n. 2, p. 89–100, 1999.

RUGH, C. L. *et al.* Development of transgenic yellow poplar for mercury phytoremediation. **Nature Biotechnology**, v. 16, n. 10, p. 925–928, 1998.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R.; DAS, P. Induction, selection and characterization of Cr and Ni-tolerant cell lines of *Echinochloa colona* (L.) Link *in vitro*. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1281–1290, 2001.

SAMPAIO, R. F.; MANCINI, M. C. Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica. **Revista Brasileira de Fisioterapia**, v. 11, n. 1, p. 83–89, 2007.

- SANTOS-DÍAZ, M. S.; BARRÓN-CRUZ, M. C.; ALFARO-DE LA TORRE, M. C. Induction of *in vitro* roots cultures of *Thypha latifolia* and *Scirpus americanus* and study of their capacity to remove heavy metals. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 417–424, 2007.
- SANTOS, F. H. S. **Crescimento, nutrição e produção “in vitro” de *Gomphrena claussenii* exposta a zinco e cádmio.** 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.
- SATO, A. Y. *et al.* Micropropagação de *Celtis* sp: Controle da contaminação e oxidação. **Cerne**, v. 7, n. 2, p. 117–123, 2001.
- SILVA, K. R. G. *et al.* Explante, citocinina e luz: fatores que afetam a organogênese de porta enxerto de macieira cultivar M-9. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 3, p. 365–367, 2005.
- TAGHIZADEH, M.; KAFI, M.; MOGHADAM, M. R. F. Breeding by *in vitro* culture to improve tolerance and accumulation of lead in *Cynodon dactylon* L. **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 17, p. 1851–1860, 2015.
- TÓTH, G. *et al.* Heavy metals in agricultural soils of the European Union with implications for food safety. **Environment International**, v. 88, p. 299–309, 2016.
- WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. Effect of Increasing concentrations of chromium on *in vitro* culture of *Datura innoxia*. **International Journal of Applied Science-Research and Review**, v. 1, n. 3, p. 82–87, 2014a.
- WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. Micro-propagation of *Datura innoxia* as a Heavy Metal Accumulator Plant. **Global Journal of advanced Research**, v. 1, n. 2, p. 104–109, 2014b.
- WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. Toxic effect of different lead concentrations on in-vitro culture of *Datura innoxia*. v. 3, n. 5, p. 532–535, 2014c.
- WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. Toxic effect of lead concentrations on *Lantana camara* tissue cultured plantlets. **International Journal of Scientific Research in Science, Engineering and Technology**, v. 1, n. 1, p. 70–74, 2015a.
- WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. *In vitro* studies on effect of chromium on *Lantana camara*. **Climate change**, v. 1, n. 1, p. 45–48, 2015b.
- WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. Comparative *in vitro* studies on native plant species at heavy metal polluted soil having phytoremediation potential. **International Journal of Scientific Research in Environmental Sciences**, v. 2, n. 2, p. 49–55, 2014d.
- WISZNIEWSKA, A. *et al.* *In vitro* selection for lead tolerance in shoot culture of *Daphne* species. **Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus**, v. 14, n. 1, p. 129–142, 2015.

YEH-JIN, A.; PARK, J. M. Pre-adaptation to Cu during plant tissue culture enhances Cu tolerance and accumulation in Begonia (*Begonia evansiana* Andr.). **Journal of Ecology and Field Biology**, v. 30, n. 3, p. 271–276, 2007.

YONG, W. T. L. *et al.* Uptake and Accumulation of Aluminium , Copper and Cobalt in tissue cultured *Melastoma malabathricum* Linn. plantlets. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 3, n. 8, p. 1018–1030, 2014.

**CAPÍTULO 3 – BIOACUMULAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO TECIDUAL DE ZN E CU
EM *Vetiveria zizanioides*, CULTIVADA *IN VITRO***

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar as alterações morfoanatômicas e fisiológicas de *Vetiveria zizanioides* (capim vetiver) cultivada *in vitro*, sob diferentes concentrações de cobre (Cu) e zinco (Zn), bem como avaliar sua tolerância e potencial bioacumulador quando exposta a doses crescentes dos metais supracitados. Para tanto, após 30 dias de cultivo em meio MS suplementado com doses crescentes de Cu e Zn, foram avaliadas variáveis biométricas de crescimento, biomassa, teores de pigmentos fotossintéticos e dos metais avaliados na planta, além de modificações na anatomia radicular e foliar de *V. zizanioides*. Observou-se que o crescimento da espécie não foi comprometido pela presença de Cu no meio de cultivo, embora doses superiores a 0,3 μM tenham causado efeito deletério no comprimento radicular e, conseqüentemente, no índice de tolerância da planta ao metal. Por outro lado, o aumento nas doses de Zn provocou um decréscimo na altura da planta, sendo que concentrações superiores a 930 μM levaram à redução no índice de tolerância da espécie ao metal. Os valores de biomassa seca total, taxa de crescimento e produção de pigmentos fotossintéticos não foram prejudicados pela presença de Cu ou de Zn em excesso no meio. Os fatores de bioacumulação obtidos demonstraram que *V. zizanioides* apresentou um comportamento acumulador, mesmo quando exposta a doses 27 vezes superiores às aquelas estabelecidas como ideais para cobre e zinco no meio MS. As modificações anatômicas observadas nas raízes e folhas da planta sugerem estratégias para restrição da absorção e translocação dos metais do meio de cultivo para o interior da plântula. Nas condições do experimento, *V. zizanioides* apresentou ampla plasticidade fisiológica e anatômica em presença de estresse provocado pelo excesso de Cu e Zn, o que lhe confere potencial para utilização na recuperação de áreas contaminadas por esses metais.

Palavras-chave: Potencial bioacumulador. Metais pesados. Contaminação de solos. Fitorremediação. Capim Vetiver.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the morpho-anatomical and physiological alterations of *Vetiveria zizanioides* (vetiver grass) grown *in vitro* under different concentrations of copper (Cu) and zinc (Zn), as well as to evaluate its tolerance and bioaccumulator potential when exposed to increasing doses of the metals mentioned. After 30 days of cultivation through Murashige Skoog (MS) medium supplemented with doses of Cu and Zn, variables as biometric growth, biomass, photosynthetic pigment content and metals assessed in the plant were evaluated, as well as changes in the root and leaf anatomy of *C. Zizanioides*. It was observed that the growth of the species was not compromised by the presence of Cu in the culture medium, although doses higher than 0.3 μM had a deleterious effect on the root length and, consequently, the tolerance index of the plant to the metal. On the other hand, the increase in the doses of Zn caused a decrease in the height of the plant, and concentrations higher than 930 μM resulted in a reduction in the index of tolerance of the species to the metal. The values of total dry biomass, growth rate and photosynthetic pigment production were not affected by the excessive presence of Cu or Zn in the medium. The bioaccumulation factors obtained demonstrated that *V. zizanioides* presented accumulating behavior, even when exposed to doses 27 times higher than those established as ideals for copper and zinc in the MS medium. The anatomical modifications observed in the roots and leaves of the plant suggest strategies to restrict the absorption and translocation of the metals from the culture medium into the seedling. Under the conditions of the experiment, *V. zizanioides* presented a great physiological and anatomical plasticity in the presence of stress caused by excess Cu and Zn, which supply potential for using it in the recovery of areas contaminated by these metals.

Keywords: Bioaccumulator potential. Heavy metals. Soil contamination. Phytoremediation. Vetiver grass.

1 INTRODUÇÃO

A exploração exaustiva dos recursos naturais tem comprometido a sua sustentabilidade, devido à degradação e poluição severa à qual se encontram expostos. Fontes antropogênicas pontuais e não pontuais, tais como rejeitos/emissões originados da intensificação de atividades de mineração e fundição, disposição inadequada de efluentes industriais e urbanos, aplicação indiscriminada de agrotóxicos e fertilizantes agrícolas, utilização de biossólidos e adubos animais representam fontes potenciais de contaminação, que prejudicam a manutenção das funções biológicas e as propriedades de solos e águas (KNOX *et al.*, 1999; LONE *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2011; WUANA; OKIEIMEN, 2011).

Todos os tipos de poluentes refletem na qualidade de ambientes naturais, no desenvolvimento de plantas e na saúde de seres humanos e demais animais. Entretanto, os efeitos e as consequências nos ecossistemas estão diretamente relacionados com a fonte de contaminação, sendo que aquelas capazes de provocar a liberação de metais pesados constituem sério problema ambiental (LONE *et al.*, 2008).

Embora alguns metais pesados sejam considerados micronutrientes essenciais para diversas atividades fisiológicas dos seres vivos, sua presença em excesso no solo pode comprometer a produtividade agrícola, além de afetar a sustentabilidade de ecossistemas (LASAT, 2000; MELO *et al.*, 2009).

Dentro desse contexto, estudos têm revelado que solos próximos a áreas industriais de produção de cimento podem estar sendo enriquecidos e/ou poluídos por metais pesados, sendo que elementos-traço, como zinco (Zn) e cobre (Cu), apresentam grande relevância do ponto de vista ambiental (ABDUL RAHEEM; INYINBOR; ADEKOLA, 2012; ESTIFANOS, 2014; ESTIFANOS; DEGEFA, 2012; OGEDENGBE; OKE, 2011; OLOWOYO; MUGIVHISA; BUSA, 2015; PRINCEWILL; ADANMA, 2011; WANG, 2013).

O zinco (Zn) representa um metal de transição comumente encontrado no meio ambiente, sendo que as concentrações naturais do metal no solo são originárias do intemperismo físico e químico da rocha matriz, que apresenta o elemento naturalmente em sua constituição (BROADLEY *et al.*, 2007; CHANEY, 1993).

Esse metal participa das funções fisiológicas de diversos organismos, uma vez que representa um componente estrutural importante de muitas moléculas biológicas. Nos vegetais, várias enzimas necessitam da presença do zinco para o seu funcionamento normal. Além disso, acredita-se que o Zn seja fundamental durante a síntese de clorofila em

determinadas espécies vegetais. Dessa forma, a sua deficiência pode causar a redução do crescimento internodal, má formação foliar, comprometimento da produção de hormônios vegetais, clorose e necrose (TAIZ; ZEIGER, 2013). Por outro lado, em concentrações elevadas, o Zn é potencialmente fitotóxico para a maioria das plantas, podendo provocar sintomas como crescimento atrofiado, clorose, baixa produção de matéria seca na parte aérea, interferência na biossíntese de clorofila e comprometimento na absorção de outros minerais (BROADLEY *et al.*, 2007; CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002).

O cobre (Cu), por sua vez, também constitui um micronutriente essencial, visto que está envolvido em diversos processos metabólicos indispensáveis ao funcionamento e desenvolvimento saudável de microrganismos, vegetais e animais. Nas plantas, ele representa um componente estrutural importante para proteínas regulatórias e enzimas envolvidas em reações de oxidação e redução. Além disso, atua no processo fotossintético e faz parte do complexo final da cadeia transportadora de elétrons na respiração mitocondrial. A carência na disponibilidade desse íon para as plantas pode levar a sintomas específicos de deficiência que incluem comprometimento nos órgãos reprodutores, danos e alterações em folhas jovens, manchas necróticas e senescência foliar prematura (SARGENTELLI; MAURO; MASSABNI, 1996; TAIZ; ZEIGER, 2013; WYSZKOWSKA *et al.*, 2013; YRUELA, 2005).

Em contrapartida, o excesso de cobre pode causar efeitos extremamente tóxicos, dado que, em altas concentrações, o elemento interfere em inúmeros processos bioquímicos, dentre eles, fotossíntese, respiração celular, biossíntese de pigmentos e aqueles relacionados com a manutenção da integridade de membranas celulares. Inibição do crescimento radicular, além de indícios de clorose, necrose, atrofia, redução de biomassa e despigmentação foliar, também podem ser observados (FERNANDES; HENRIQUES, 1991; YRUELA, 2005).

Dessa forma, o gerenciamento de áreas expostas à contaminação por metais pesados merece atenção particular, uma vez que, após atingirem o solo, esses elementos acumulam-se em suas camadas superficiais e se tornam disponíveis para absorção pelas raízes das plantas.

Métodos físico-químicos, como lavagem do solo, injeção de ar e dessortação em reator, têm sido propostos para recuperação de solos poluídos por metais pesados. Todavia, o emprego de grande parte dessas tecnologias limita-se a pequenas áreas contaminadas, posto que são onerosas e acabam causando distúrbios e perturbações secundárias no ambiente já impactado (DORAN, 2009; HENRY, 2000; LONE *et al.*, 2008). Portanto, o emprego de espécies vegetais e sua microbiota associada, para extrair, degradar e estabilizar poluentes orgânicos/inorgânicos do solo – conhecido como fitorremediação – representa uma alternativa com custos relativamente menores, aplicabilidade *in situ*, esteticamente agradável, além de

causar baixo impacto na estrutura e ecologia edáficas (LINDBLOM *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2009; WUANA; OKIEIMEN, 2011).

Muitos estudos têm avaliado a capacidade de inúmeras espécies vegetais em tolerar, absorver e acumular metais pesados (ASMAR *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2011; GYULAI *et al.*, 2004, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2015; YONG *et al.*, 2014). Segundo Lone e colaboradores (2008), essa habilidade pode variar significativamente não só entre espécies, mas também entre cultivares da mesma espécie, uma vez que características morfológicas, anatômicas, fisiológicas e genéticas podem influenciar nos distintos mecanismos de absorção utilizados pelas espécies tolerantes. Portanto, entender os processos envolvidos na resistência que determinadas plantas apresentam à toxicidade dos metais pesados constitui um passo importante para a seleção de espécies vegetais com potencial fitorremediador.

À vista disso, a técnica de cultivo *in vitro* pode ser empregada como uma ferramenta auxiliar importante em estudos que buscam avaliar as respostas metabólicas desencadeadas e os mecanismos de biotransformação utilizados pelas plantas em resposta a concentrações tóxicas de metais pesados, já que permite o estabelecimento de sistemas modelos, sob condições controladas e sem a interferência de fatores externos, tais como a atividade de microrganismos associados (DORAN, 2009; WAOO; KHARE; GANGULY, 2015).

Vetiveria zizanioides L. Nash – também conhecido como capim vetiver – é uma planta herbácea perene, típica de regiões tropicais e subtropicais, que pertence à família Poaceae. Apresenta perfilhagem abundante e sistema radicular bem desenvolvido, com raízes numerosas e longas, que podem alcançar até 5 metros de profundidade em condições adequadas. Fisiologicamente, o capim vetiver caracteriza-se por apresentar considerável tolerância e/ou adaptabilidade a alterações ambientais extremas, tais como períodos seco ou chuvoso prolongados, oscilações bruscas de temperatura, alta resiliência – quando exposto a condições adversas, além de adaptabilidade a diversas condições edáficas (AKSORN; CHITSOMBOON, 2013; SANTOS; ARRIGONI-BLANK; BLANK, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2015; TRUONG; LOCH, 2004).

Desse modo, o objetivo do presente trabalho foi investigar as modificações morfoanatômicas e fisiológicas de *Vetiveria zizanioides* cultivada, *in vitro*, sob efeito dos metais Cu e Zn, assim como avaliar sua tolerância e potencial de bioacumulação quando submetida a concentrações crescentes desses elementos. Os resultados obtidos a partir deste estudo poderão indicar o estabelecimento de novos métodos de recuperação de solos contaminados por esses metais pesados, baseados em práticas de fitorremediação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios experimentais foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais do Departamento de Ciências Agrárias, IFMG – *campus* Bambuí.

2.1 Obtenção do material vegetal e estabelecimento *in vitro*

O material vegetal utilizado foi obtido a partir de plantas de *V. zizanioides* (capim vetiver) adquiridas no Viveiro de Produção de Mudanças do IFMG – *campus* Bambuí. As plantas matrizes foram estabelecidas por meio da seleção das mudas com melhor qualidade fitossanitária e uniformidade de tamanho. Em seguida, elas foram replantadas em vasos plásticos, com capacidade de 3L, contendo substrato comercial e transferidas para a estufa agrícola do Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais (IFMG – *campus* Bambuí). A frequência de irrigação dos vasos foi diária, sendo que outros tratamentos culturais, como adubação, controle de pragas, doenças e plantas daninhas, também foram realizados periodicamente ao longo de todo o experimento. Com o objetivo de reduzir a contaminação durante a etapa de manipulação *in vitro*, as plantas matrizes foram pulverizadas semanalmente com fungicida sistêmico composto por 64% (p/p) mancozebe e 4% (p/p) metalaxil-M ($3\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

As plantas propagadas nos vasos foram utilizadas como matrizes para a obtenção de novos rebentos, que, quinzenalmente, foram utilizados como explantes para o estabelecimento da espécie *in vitro*. Os brotos foram seccionados bem próximos ao rizoma e, após limpeza superficial, deixados em água corrente com quatro gotas de Tween 20 por um período de quatro horas. Posteriormente, os explantes foram desinfestados por meio do contato sucessivo em solução de álcool 70% por cinco minutos, hipoclorito de sódio 1,40 – 1,75% (70% do produto comercial – água sanitária) por 15 minutos e tríplice lavagem em água destilada e autoclavada.

Após o procedimento de desinfestação e ainda sob condições assépticas, explantes excisados, com tamanhos de aproximadamente 2,5 cm, foram inoculados em tubos de ensaio contendo 2 mL de meio MS líquido Murashige e Skoog (1962), acrescido de $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose, $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de 6-benzilaminopurina (BAP) – fitorregulador que induz a brotação lateral e a formação de gemas adventícias – e pH ajustado para $5,7\pm 0,1$. Todo o material e meio de cultura utilizados foram devidamente esterilizados em autoclave (temperatura de 120°C , durante 20 minutos), garantindo a sanidade do procedimento como um todo.

Em seguida, os tubos foram transferidos para a sala de crescimento vegetal, com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, irradiância em torno de $32 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz / 8 horas de escuro. As plântulas estabelecidas *in vitro* foram repicadas até a obtenção de número suficiente para a montagem dos ensaios com exposição a concentrações crescentes de metais pesados.

2.2 Desenho experimental – bioensaio com metais pesados

Para os experimentos com metais pesados, cinco concentrações diferentes de cobre (Cu) e zinco (Zn) foram avaliadas individualmente. A escolha das doses para teste foi feita levando-se em consideração a formulação empregada no meio MS, uma vez que, nele, ambos os metais são adicionados em concentração adequada para garantir o crescimento da maioria das espécies vegetais cultivadas *in vitro*. Os valores das concentrações de Cu e Zn, testadas em cada um dos tratamentos, estão descritos na Tabela 1, sendo que MS representa a concentração em que ambos os elementos estão presentes no meio proposto por Murashige e Skoog (1962). Dessa forma, o delineamento experimental, para cada metal pesado, foi em DIC (Delineamento Inteiramente Casualizado), sendo 5 tratamentos, 4 repetições por tratamento, 4 tubos por repetição e um explante por tubo de ensaio.

TABELA 1 – Concentrações de Cu e Zn utilizadas nos tratamentos.

| Tratamento | Concentração de Cu (μM) | Concentração de Zn (μM) |
|---------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| MS/2 | 0,05 | 15 |
| MS (Controle) | 0,1 | 30 |
| 3MS | 0,3 | 90 |
| 9MS | 0,9 | 270 |
| 27MS | 2,7 | 810 |

Para o ensaio com cobre, inicialmente preparou-se uma solução-estoque contendo $5,4 \mu\text{M}$ de Cu, a partir de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, pureza $\geq 98\%$). Tal solução foi empregada para suplementação dos tratamentos, com diferentes concentrações do elemento. O meio de cultura utilizado foi o de Murashige e Skoog (1962), com concentrações originais de macro e micronutrientes (com exceção do cobre), suplementado com $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de sacarose e pH ajustado para $5,7\pm 0,1$. Em cada tratamento, adicionou-se ao meio volume de

solução-estoque de Cu necessária para garantir as doses predefinidas para os ensaios. Os meios foram transferidos em volume aproximado de 2 mL, para tubos de ensaio e, posteriormente, autoclavados em temperatura de 120°, durante 20 minutos.

O mesmo procedimento foi utilizado para a montagem do experimento com zinco; todavia, a concentração da solução-estoque de zinco utilizada foi de 1620 µM de Zn, obtida a partir de sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pureza $\geq 99\%$).

Após o preparo e a esterilização de todo o material necessário, explantes de capim vetiver – estabelecidos na etapa anterior – tiveram seus tamanhos padronizados em aproximadamente 2,5 cm e foram transferidos para tubos de ensaio contendo os tratamentos, preparados como descrito acima. O procedimento de inoculação foi realizado em capela de fluxo laminar e, quando finalizado, o material foi mantido em sala de crescimento vegetal, com temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, irradiância em torno de $32 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz / 8 horas de escuro.

Os experimentos de exposição aos metais pesados tiveram duração de 30 dias. Findado esse período, foram coletados dados para análise de características morfológicas, bem como material para análises anatômicas, teores de clorofila e análise foliar.

2.3 Parâmetros avaliados

2.3.1 Caracterização biométrica

Na análise biométrica, todas as plantas estabelecidas nos experimentos *in vitro* foram avaliadas em relação ao número de folhas (NF), número de perfilhos (NP), altura da planta (AP) e comprimento da maior raiz (CMR), sendo os dois últimos parâmetros medidos com o auxílio de uma régua milimétrica. Nessa etapa obteve-se também o índice de tolerância (IT) de *V. zizanioides* quando exposto a concentrações sucessivas de Cu e Zn. Para o cálculo do IT, a fórmula utilizada foi adaptada de Baker (1987):

$$\text{IT} = \frac{\text{CMR c/ metal pesado}}{\text{CMR no meio MS (controle)}}$$

2. 3. 2 *Determinação de biomassa*

Para determinação de biomassa seca total (BST), todas as plantas foram retiradas dos tubos de cultivo e lavadas com água destilada para a remoção de resíduos de metais pesados que pudessem comprometer e/ou superestimar os resultados obtidos pelas análises posteriores. Em seguida, as plantas foram transferidas para a estufa de circulação forçada de ar, em temperatura de 65°C, até a obtenção de peso constante (TEIXEIRA *et al.*, 2015). As medidas de peso foram realizadas em balança analítica de precisão, e os dados utilizados para avaliação da taxa de crescimento (TC) de *V. zizanioides*, em presença dos metais pesados, segundo a equação descrita abaixo (BAKER, 1987):

$$TC = \frac{\text{BST c/ metal pesado}}{\text{BST no Meio MS (Controle)}}$$

2. 3. 3 *Teores de clorofila e carotenoides*

Para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram selecionadas quatro plantas, escolhidas ao acaso, de cada tratamento. Visando a padronização do procedimento, todas as leituras foram feitas utilizando-se o segundo par de folhas desenvolvidas a partir do explante.

Os teores dos pigmentos foram obtidos por meio de espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta. Para tanto, 0,15 g de folhas frescas foram pesadas, envolvidas em papel-alumínio e mantidas em caixa de isopor com gelo para a determinação tanto de clorofila ('a', 'b' e total) quanto de carotenoides, segundo metodologia descrita por Lichtenthaler (1987). A extração dos pigmentos foi realizada utilizando-se como solvente acetona 80% e em ambiente com baixa luminosidade, uma vez que são passíveis de degradação em presença de luz. As leituras de absorbância dos extratos foram feitas nos comprimentos de onda 470nm, 647 nm e 663nm para carotenoides, clorofila 'a' e 'b', respectivamente. O conteúdo de cada pigmento foi calculado conforme Lichtenthaler e Buschmann (2001) e expressos em mg.g⁻¹ de matéria fresca.

2. 3. 4 *Análise dos teores de Cu e Zn nas plantas*

A avaliação das concentrações de metais pesados na parte aérea da planta (CMPA) expostas aos distintos tratamentos foi feita a partir do material seco obtido na etapa de

determinação de biomassa, utilizando-se metodologia segundo o Boletim de Análises Químicas de Solo, Tecido Vegetal e Água da Epamig (EPAMIG, 2006).

Para a digestão nítrico-perclórica, 0,4167 g de material seco e moído foram transferidos para tubos apropriados, aos quais foram adicionados a alíquota de 5mL de uma mistura contendo ácido nítrico (HNO₃) e ácido perclórico (HClO₄) na proporção de 2:1 (v/v). A digestão foi feita em bloco digestor, sendo a temperatura aumentada gradativamente até atingir 210°C. Ao final desse procedimento, o extrato obtido apresentou-se incolor. Após o resfriamento dos tubos de digestão, adicionou-se 40 mL de água destilada e procedeu-se à agitação manual dos tubos.

As concentrações de Cu e Zn foram determinadas em espectrofotômetro de absorção atômica. As curvas padrão para calibração do aparelho, assim como uma amostra em branco (contendo apenas HNO₃ e HClO₄ na proporção de 2:1), também foram preparadas segundo o mesmo Boletim de Análises citado acima.

Os teores obtidos foram utilizados também para o cálculo do fator de bioacumulação (FB) de ambos os metais pesados nas plantas de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*, sendo este definido pela relação entre a concentração do metal na parte aérea da planta (CMPA) e a concentração do metal adicionada no meio de cultura (CMC). A fórmula utilizada foi adaptada de Yoon e outros (2006) e encontra-se descrita abaixo:

$$FB = \frac{[CMPA]}{[CMC]}$$

2. 3. 5 Avaliações anatômicas

Ao final dos 30 dias de experimentação, foram coletados – de quatro plantas por tratamento – fragmentos da região mediana de raiz e do segundo par de folhas desenvolvidas a partir do explante. As amostras foram fixadas por 72h em solução F.A.A_{70%} – que consiste na mistura de formaldeído, ácido acético e álcool etílico 70%, na proporção 0,5:0,5:9,0 (v/v) – e, posteriormente, transferidas para solução de álcool etílico 70%, na qual permaneceram conservadas até o início das análises (KRAUS; ARDUIN, 1997).

As análises anatômicas foram realizadas no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Botânica, ICB/UFMG. Inicialmente, as amostras previamente fixadas foram desidratadas em concentrações sucessivas de álcool etílico 70%, 80% e 95%, segundo Johansen (1940). O meio de inclusão utilizado foi o Kit *Histo-resin* Leica[®], no qual o material

foi submetido às etapas de pré-infiltração – com etanol 95% e resina pura, na proporção 1:1 (v/v) – e infiltração em resina pura, segundo instruções do fabricante. Após o emblocamento, secções transversais com espessura de 7 μ m foram obtidas em micrótomo rotativo, que, em seguida, foram dispostas em lâminas e coradas com Azul de Toluidina 0,1% em tampão acetato de sódio 0,1 M e pH 4,7 (O'BRIEN; FEDER; MCCULLY, 1964, modificado por OLIVEIRA, 2008). As fotomicrografias foram obtidas por meio da visualização das lâminas em microscópio óptico Leica[®] acoplado à câmera digital e *software* de imagem. Já as análises de micromorfometria foram feitas com o auxílio do programa Axion Vision 4.9.1 (Carl Zeiss, Alemanha).

Para cada tratamento, realizaram-se três repetições, selecionadas ao acaso dentre as quatro amostras que foram previamente fixadas. Uma vez emblocado o material, foram confeccionadas três lâminas por repetição, contendo cada uma delas quatorze cortes, dos quais dez foram fotografados aleatoriamente, por lâmina. Os componentes anatômicos observados nos cortes transversais de folhas foram divididos em limbo foliar e nervura central. No limbo foliar, foram avaliadas as espessuras do mesofilo, da face adaxial e abaxial da epiderme; e, para a nervura central, a área do floema, a área do xilema, a área total do feixe vascular e a área do parênquima clorofiliano. Já as estruturas avaliadas nas raízes foram a espessura da epiderme, do córtex, da endoderme e a área do cilindro vascular.

2.4 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade e homogeneidade de variância, e, em seguida, realizou-se a análise de variância (ANOVA), utilizando-se os softwares estatísticos ASSISTAT 7.7 (SILVA, 2007), SISVAR 5.6 (FERREIRA, 2011) e o programa estatístico R (R CORE TEAM, 2017).

2.5 Manejo do resíduo gerado

A fim de evitar danos ao meio ambiente e riscos à saúde humana, após finalizado o período experimental, todo o meio de cultura utilizado nos tratamentos, bem como soluções-estoques preparadas com Cu e Zn, foram acondicionados em recipientes adequados e devidamente identificados, para posterior coleta e destinação final adequada.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização biométrica

O aumento das concentrações de Cu no meio de cultura não influenciou estatisticamente os valores médios de variáveis como altura de planta (AP), número de folhas (NF) e número de perfilhos (NP), uma vez que se apresentaram semelhantes ($p < 0,05$) (TABELA 2). Isso indica que, para essas variáveis, tanto a deficiência (T1 – 0,05 μM) quanto as concentrações contaminantes (T3 – 0,3 μM ; T4 – 0,9 μM ; T5 – 2,7 μM) de cobre testadas não alteraram o crescimento da parte aérea na espécie. Giampaoli (2010), também não observou diferenças significativas em relação às variáveis biométricas de *Aechmea blanchetiana* (Bromeliaceae) expostas, *in vitro*, a concentrações de Cu entre 0 e 14,5 μM . Além disso, estudos demonstram que espécies como *Zea mays* (Poaceae) podem tolerar e acumular altas concentrações de cobre sem exibirem alterações morfológicas visíveis (BENIMELI *et al.*, 2010).

TABELA 2 – Médias das variáveis biométricas – altura da planta (AP), número de folhas (NF) e número de perfilhos (NP) – para *V. zizanioides*, cultivada *in vitro*, em presença de Cu.

| Doses de Cu (μM) | AP (cm) | NF | NP |
|-------------------------------|---------|-------|-------|
| 0,05 | 18,66a* | 7,31a | 0,63a |
| 0,1 | 18,86a | 7,37a | 0,38a |
| 0,3 | 17,40a | 7,12a | 0,38a |
| 0,9 | 16,59a | 7,06a | 0,50a |
| 2,7 | 16,44a | 7,62a | 0,75a |
| CV (%) | 13,93 | 11,08 | 26,08 |

* Médias seguidas de mesma letra, dentro das colunas, não diferem entre si pelo teste F.

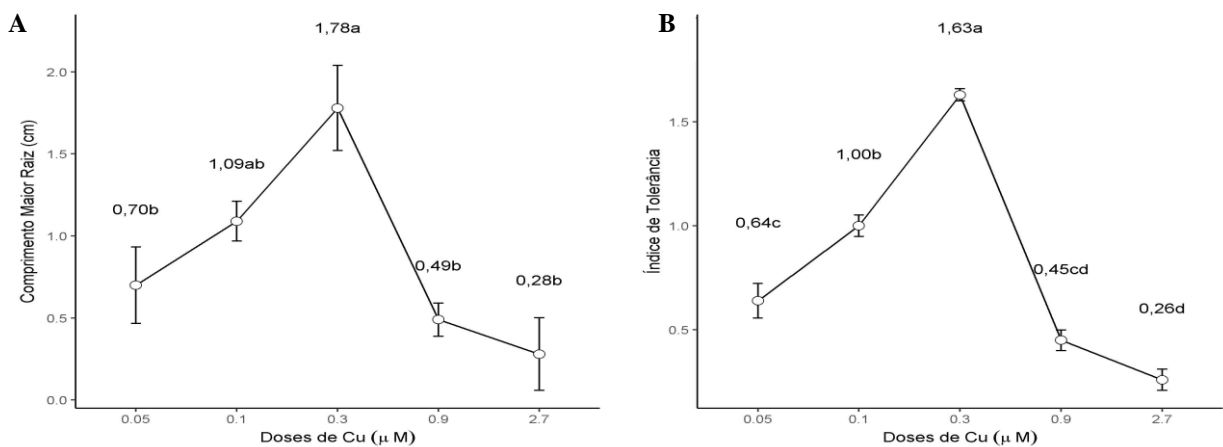
Todavia, a dose de Cu influenciou significativamente o comprimento da maior raiz (CMR) e, conseqüentemente, o índice de tolerância do *V. zizanioides* ao metal. Uma vez que se observou uma falta de ajuste da curva de regressão para essas duas variáveis, o teste de médias Tukey foi utilizado (R CORE TEAM, 2017) (Figura 1).

De acordo com a Figura 1A, nota-se que apesar das doses 0,10 e 0,30 μM de Cu apresentarem valores médios de CMR estatisticamente iguais, a concentração de 0,30 μM induziu um maior desenvolvimento da raiz principal quando comparada às demais dosagens de cobre avaliadas. Observa-se também que, em concentrações superiores a 0,30 μM , o comprimento da maior raiz tende à redução. De acordo com Jiang, Liu e Liu (2001), um dos

sintomas de toxicidade exibidos pelas raízes de plantas frente ao excesso de Cu seria a redução do seu comprimento, possivelmente devido a alterações na taxa de divisão celular no ápice radicular.

Uma vez que o índice de tolerância (IT) foi calculado pela relação entre o CMR no tratamento avaliado e o CMR no tratamento-controle, a mesma tendência foi observada em relação a essa variável, sendo que *V. zizanioides* apresentou comportamento crescente de tolerância até a exposição a 0,30 μM de Cu. A partir dessa concentração houve um decréscimo gradativo no índice de tolerância da planta ao metal, o que pode sinalizar uma possível sensibilidade em concentrações três vezes superiores à dose referida como ideal (0,1 μM) (Figura 1B). Segundo Baker (1987), a sobrevivência da planta a partir daí estaria condicionada à existência de uma série de mecanismos fisiológicos específicos capazes de garantir a sua sobrevivência, mesmo na presença de concentrações internas elevadas de compostos potencialmente tóxicos.

Figura 1 – Efeito da concentração de Cu no comprimento da maior raiz – CMR (A) e no índice de tolerância – IT (B) de *V. zizanioides* cultivada *in vitro*.



*Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

Na Figura 2, pode-se observar o aspecto morfológico das plântulas de *V. zizanioides* cultivadas em diferentes concentrações de Cu.

Figura 2 – Plântulas de *V. zizanioides* cultivadas em meio MS, durante 30 dias, sob concentrações crescentes de Cu.



T1 = 0,05 µM ; T2 = 0,1 µM; T3 = 0,3 µM; T4 = 0,9 µM; T5 = 2,7 µM

Fonte: Os autores (2017).

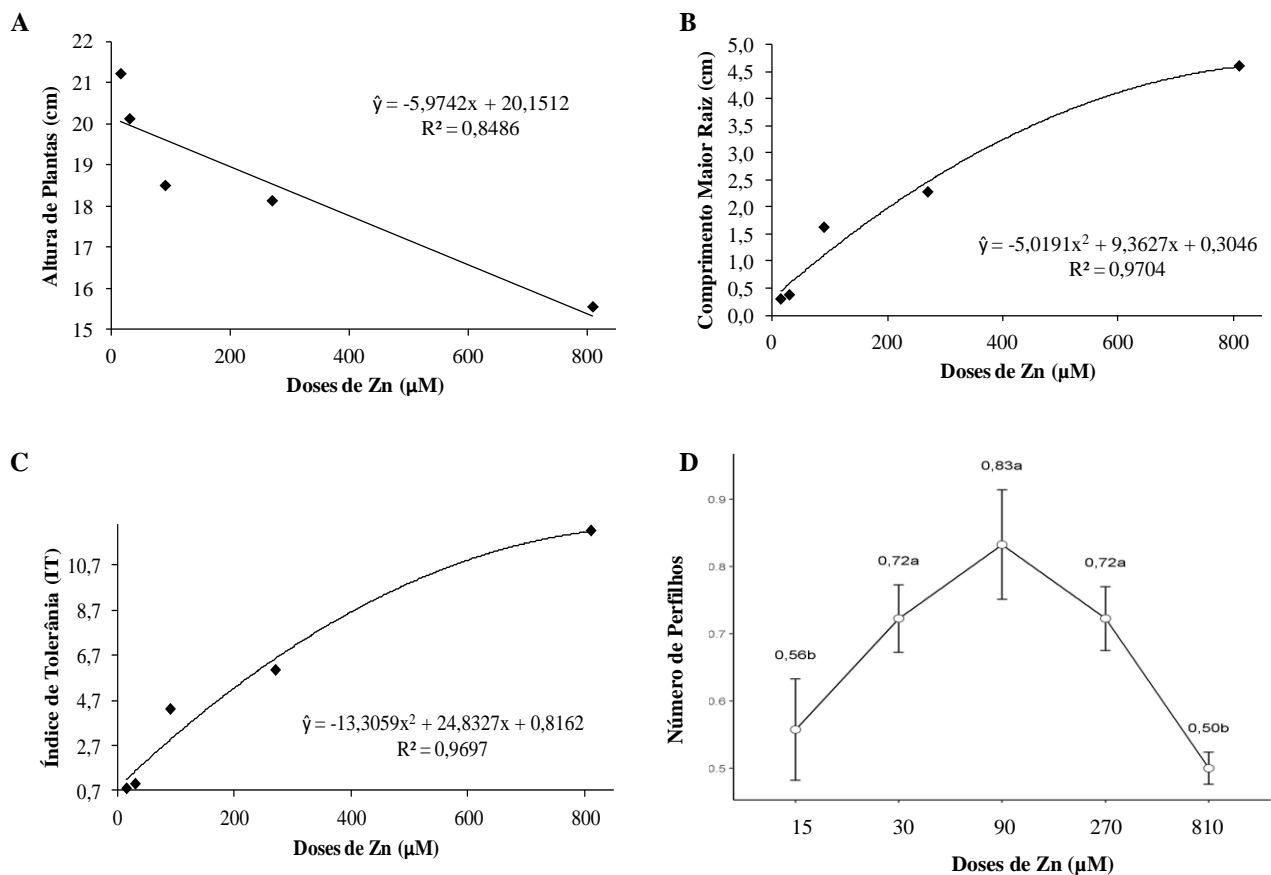
Por outro lado, o aumento da concentração de Zn no meio de cultivo provocou uma redução linear na altura média de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*. Dessa forma, observou-se que, a cada 100 µM de zinco adicionado ao meio, a altura média das plantas reduziu em 0,60 cm (Figura 3A). Observações em estereomicroscópio evidenciaram também o aparecimento gradativo de pontos de clorose, ao longo de folhas jovens, e necrose no ápice foliar à medida que a concentração de Zn no meio se elevou. Ben Bahri, Laribi e Bettaieb (2013), avaliando os efeitos morfológicos do zinco em *Paulownia tomentosa* (Paulowniaceae), também constataram que a presença do metal no meio de cultivo causou um declínio no crescimento da parte aérea das plântulas. De acordo com Roongtanakiat, Osotsapar e Yindirarn (2009), esse comprometimento no desenvolvimento da planta pode ser consequência da toxicidade do zinco, quando presente em concentrações mais elevadas.

O CMR também foi influenciado pelo aumento na dosagem de Zn, sendo crescente até que a concentração desse metal no meio atingisse 930 µM. Após essa dose, estimou-se um decréscimo nessa variável (Figura 3B). O mesmo comportamento foi observado para a variável IT, que apresentou comportamento preditivo crescente com a elevação da dose de Zn até 930 µM. A partir dessa concentração, o índice de tolerância de *V. zizanioides* à presença de Zn no meio tendeu a diminuir (Figura 3C). Ben Bahri, Laribi e Bettaieb (2013) demonstraram que, apesar de a variável ter sofrido um efeito decrescente, a exposição de *P.*

tomentosa a concentrações de até 1000 μM de Zn também não inibiu a formação de raízes em plântulas cultivadas *in vitro*.

Além disso, observou-se que as doses de Zn 30 μM , 90 μM e 270 μM apresentaram valores médios similares em relação à variável NP. Todavia, em concentração de Zn igual a 90 μM houve uma indução 13% maior na produção de perfilhos. Concentrações superiores a essa última tendem a exercer uma influência negativa no estímulo ao brotamento de novos rebentos em *V. zizanioides* (Figura 3D). Ben Bahri, Laribi e Bettaieb (2013) também observaram comportamento decrescente similar no número de brotos de *P. tomentosa*, cultivadas *in vitro*, em concentrações de zinco superiores a 200 μM .

Figura 3 – Efeito da concentração de Zn na altura da planta – AP (A), comprimento da maior raiz – CMR (B), no índice de tolerância – IT (C) e no número de perfilhos – NP (D) de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*.



Já o parâmetro biométrico número de folhas (NF) não apresentou diferença significativa entre as médias dos tratamentos para *V. zizanioides* cultivada *in vitro* em presença de Zn (TABELA 3).

TABELA 3 – Variáveis biométricas que não apresentaram efeito estatisticamente significativo para *V. zizanioides* cultivada *in vitro*, em presença de Zn.

| Doses de Zn (μM) | NF |
|-------------------------------|--------------|
| 15 | 7,69a* |
| 30 | 7,75a |
| 90 | 7,50a |
| 270 | 7,35a |
| 810 | 6,13a |
| CV (%) | 16,21 |

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste F.

Na Figura 4, observa-se o aspecto morfológico de plântulas de *V. zizanioides* cultivadas em diferentes doses de Zn.

Figura 4 – Plântulas de *V. zizanioides* cultivadas em meio MS, durante 30 dias, sob concentrações crescentes de Zn.



T1 = 15 μM ; T2 = 30 μM ; T3 = 90 μM ; T4 = 270 μM ; T5 = 810 μM

Fonte: Os autores (2017).

3.2 Determinação de biomassa

A Tabela 4 mostra que, em ambos os experimentos, as variáveis – biomassa seca total (BST) e taxa de crescimento (TC) – não foram influenciadas pela concentração dos dois metais pesados testados, no meio de cultura, segundo o teste F da análise de variância. Esses resultados corroboram com o estudo de Giampaoli (2010), que também não constatou diferenças estatisticamente significativas na biomassa seca radicular e foliar de *A.*

blanchetiana exposta *in vitro* a concentrações de Cu que variaram entre 0 e 14,5 μM , no meio de cultivo. Com relação ao cultivo da bromélia em presença de zinco, a autora revela que somente doses acima de 27,5 μM foram capazes de provocar um decréscimo significativo na matéria seca da parte aérea e do sistema radicular.

Por outro lado, os resultados diferem do que foi obtido por Roongtanakiat, Osotsapar e Yindiram (2009), em estudos realizados em vasos para avaliar o crescimento de *V. zizanioides* em solos enriquecidos pela atividade de mineração de zinco. Nesse trabalho, os autores concluíram que a presença de concentrações seis vezes superiores de Zn no solo compromete a produção de biomassa pela espécie. Mateos-Naranjo e outros (2008) também concluíram, em seu trabalho, que a taxa relativa de crescimento de *Spartina densiflora* (Poaceae) foi inibida gradativamente quando cultivada em solo, apresentando doses de Cu que variaram entre 0 e 64 mM do metal.

Todavia, cabe ressaltar que existem particularidades entre estudos envolvendo experimentos *in vitro* e aqueles realizados em vasos, visto que a biodisponibilidade de contaminantes, processos de absorção e manipulação das condições de cultivo são substancialmente diferentes nos dois sistemas (DORAN, 2009).

TABELA 4 – Médias das variáveis biomassa seca total (BST) e taxa de crescimento (TC) para *V. zizanioides* cultivada *in vitro*, em presença de Cu e Zn.

| Doses de Cu (μM) | BST (g) | TC |
|-------------------------------|---------|-------|
| 0,05 | 0,021a* | 0,70a |
| 0,1 | 0,030a | 1,00a |
| 0,3 | 0,025a | 0,82a |
| 0,9 | 0,024a | 0,80a |
| 2,7 | 0,022a | 0,71a |
| CV (%) | 18,62 | 4,71 |
| Doses de Zn (μM) | | |
| 15 | 0,035a* | 1,01a |
| 30 | 0,035a | 1,00a |
| 90 | 0,035a | 1,00a |
| 270 | 0,034a | 0,97a |
| 810 | 0,030a | 0,86a |
| CV (%) | 18,58 | 6,84 |

* Médias seguidas de mesma letra, dentro das colunas, não diferem entre si pelo teste F.

Dessa forma, a sobrevivência das plântulas, assim como a ausência de alterações significativas nas variáveis BST e TC, podem ser indicativos de que *V. zizanioides* estaria imobilizando ou compartimentalizando o excesso de cobre e zinco em seus tecidos. Nesse caso, tais estratégias estariam envolvidas na tolerância da espécie ao estresse provocado pelos metais, mesmo em doses 27 vezes superiores às concentrações estabelecidas como ideais, por Murashige e Skoog (1962), para o cultivo *in vitro* de espécies vegetais.

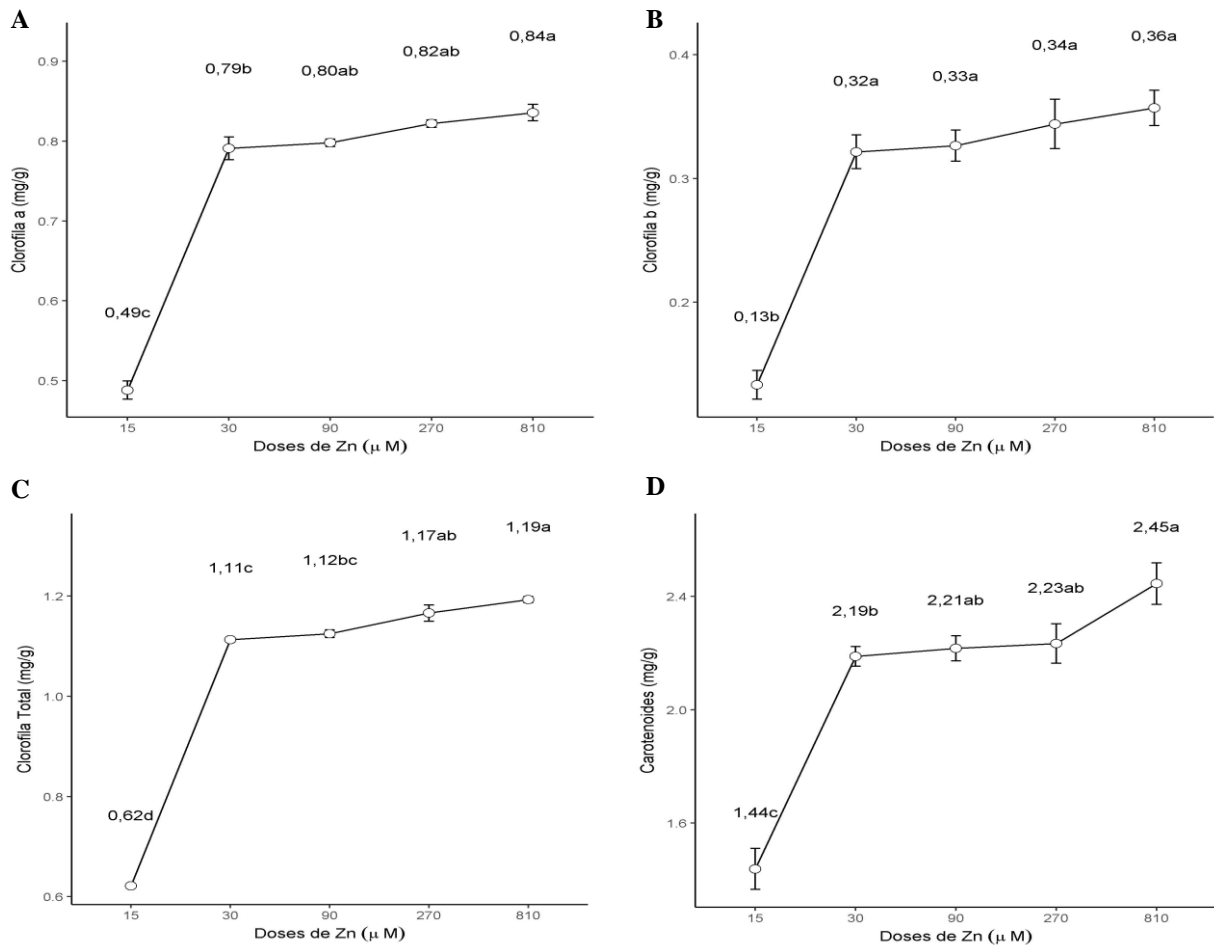
3.3 Teores de clorofila e carotenoides

A determinação quantitativa de pigmentos fotossintéticos nos vegetais pode ser obtida através de extração pelo uso de solventes orgânicos, seguida de análise espectrofotométrica (ARNON, 1949; LICHTENTHALER, 1987; LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001).

Os teores de pigmentos fotossintéticos em *V. zizanioides* foram influenciados significativamente pela presença de Zn no meio de cultivo, quando analisados pelo método usual, proposto por Lichtenthaler (1987). Uma vez que se observou uma falta de ajuste da curva de regressão para essas variáveis, o teste de médias Tukey foi utilizado (R CORE TEAM, 2017) (Figura 5).

A produção de clorofila 'a' foi menor no tratamento com 15 μM de Zn, ou seja, no tratamento em que se utilizou dose de zinco correspondente à metade daquela sugerida pela composição do meio MS. Em contrapartida, os teores desse pigmento mostraram um aumento nas plantas cultivadas em concentrações mais elevadas de zinco, sendo que as doses 90 μM , 270 μM e 810 μM de Zn testadas apresentaram valores médios de clorofila 'a' similares (Figura 5A). O mesmo comportamento foi observado para o teor de clorofila 'b', que diferiu significativamente somente para a concentração de Zn igual a 15 μM . As demais concentrações equipararam-se ao tratamento-controle (30 μM), não causando, portanto, efeito sobre esse parâmetro (Figura 5B). De acordo com a Figura 5C, observa-se que as doses de zinco 270 μM e 810 μM apresentaram valores médios de clorofila total semelhantes. Entretanto, a produção de pigmentos fotossintéticos em dose de Zn de 810 μM é superior às demais doses de zinco avaliadas. Nota-se também que concentrações de Zn de 90 μM , 270 μM e 810 μM apresentaram médias estatisticamente semelhantes em relação à produção de carotenoides em *V. zizanioides*. Porém, na maior concentração de Zn (810 μM), a produção desse pigmento é superior quando comparada às demais doses testadas (Figura 5D).

Figura 5 – Pigmentos fotossintéticos de *V. zizanioides* cultivada *in vitro*, sob diferentes concentrações de Zn, segundo método de espectrofotometria.



(A) Clorofila a. (B) Clorofila b. (C) Clorofila Total. (D) Carotenoides.

Dessa forma, observa-se que a produção de todos os pigmentos fotossintéticos foi comprometida pela deficiência de zinco. De acordo com Taiz e Zeiger (2013), esse metal é fundamental para a síntese de clorofila em determinadas espécies vegetais. Ademais, os resultados também demonstram que nenhuma das concentrações testadas do metal foi capaz de causar efeito deletério na produção de clorofilas e carotenoides. Autores têm demonstrado resultados similares em calos e brotos de *Brassica* spp. cultivadas *in vitro* (BEN GHNAYA *et al.*, 2007; ROUT; SAMANTARAY; DAS, 1999).

Em relação à presença de Cu no meio, os teores de carotenoides, clorofila 'a' e clorofila total, mensurados pelo método espectrofotométrico usual, apresentaram valores médios semelhantes, segundo o teste F da análise de variância (TABELA 5).

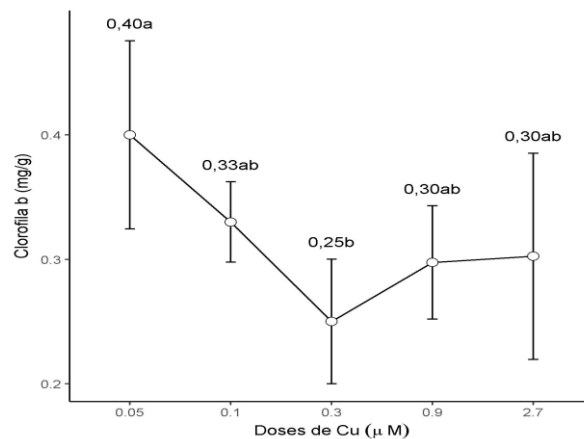
TABELA 5 – Teores de carotenoides, clorofila a e clorofila total em *V. zizanioides* expostas a concentrações crescentes de Cu, segundo método de espectrofotometria.

| Doses de Cu (μM) | Carotenoides (mg/g de matéria fresca) | Clorofila a (mg/g de matéria fresca) | Clorofila Total (mg/g de matéria fresca) |
|------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|--|
| 0,05 | 2,50a* | 0,87a | 1,27a |
| 0,1 | 2,05a | 0,73a | 1,07a |
| 0,3 | 1,73a | 0,62a | 0,87a |
| 0,9 | 2,01a | 0,69a | 0,99a |
| 2,7 | 2,02a | 0,73a | 1,03a |
| CV (%) | 18,93 | 19,37 | 18,67 |

* Médias seguidas de mesma letra, dentro das colunas, não diferem entre si pelo teste F.

Apenas a concentração de clorofila b foi influenciada pela presença de Cu no meio de cultura, quando analisada pelo método de Lichtenthaler (1987). Todavia, observou-se que quando adicionadas doses superiores a 0,1μMol de cobre ao meio, as médias para produção de clorofila b foram semelhantes (Figura 6).

Figura 6 – Teor de clorofila b de plantas *V. zizanioides* expostas a concentrações crescentes de Cu, segundo método de espectrofotometria.



O conteúdo de clorofila é frequentemente usado para avaliar o impacto de estresses ambientais em plantas. Em geral, os teores de carotenoides tendem a ser menos afetados pela presença de metais pesados do que os teores de clorofila, resultando na queda da razão entre os pigmentos (clorofila/carotenoides) (SHARMA; AGRAWAL, 2005). Todavia, no presente estudo, as concentrações de cobre e zinco avaliadas em *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*, pelo período de 30 dias, não foram suficientes para provocar esse comportamento.

Cabe salientar que Ribeiro e colaboradores (2015), avaliando a tolerância de *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae) à presença de chumbo (Pb), afirmaram que as alterações e modificações induzidas pelo poluente na estrutura radicular da espécie podem ser consideradas mecanismos importantes capazes de provocar o acúmulo do metal no sistema radicular e impedir danos aos tecidos fotossintéticos das folhas.

3.4 Análise dos teores de Cu e Zn nas plantas

A absorção de metais pesados pelas plantas pode ocorrer passivamente, associada ao fluxo de massa de água, através da raiz ou por transporte ativo, por meio de canais localizados na membrana plasmática das células da epiderme radicular (YOON *et al.*, 2006).

Em ambos os experimentos, as variáveis – concentração de metal pesado na planta (CMP) e fator de bioacumulação (FB) – foram influenciadas significativamente pela presença dos metais testados, no meio de cultura (Figura 7).

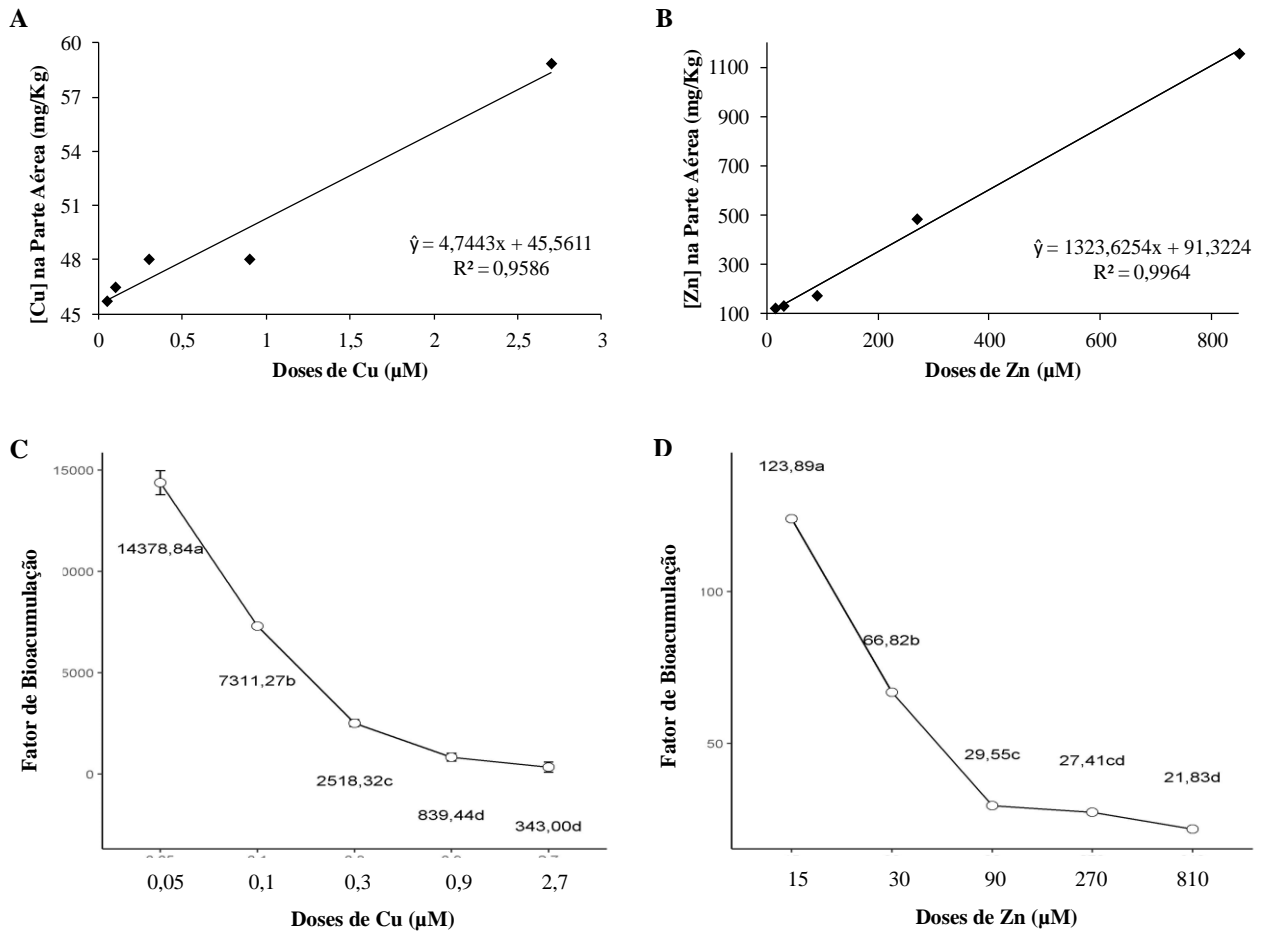
As plântulas de *V. zizanioides* absorveram tanto Cu quanto Zn, proporcionalmente ao aumento desses elementos no meio. Sendo assim, observou-se que, para cada 1 μM de Cu adicionado ao meio, a concentração desse metal na parte aérea de *V. zizanioides*, cultivadas *in vitro*, aumenta 4,74 mg/Kg (Figura 7A). Yong e colaboradores (2014) constataram comportamento semelhante em plântulas de *M. malabathricum*, nas quais as concentrações de Cu na espécie aumentaram linearmente durante sua exposição a doses elevadas do metal.

Em contrapartida, o aumento em 100 μM na concentração de Zn no meio de cultivo provoca uma elevação em 132,36 mg/Kg de Zn na parte aérea (Figura 7B). Esse resultado corrobora com os estudos de Ben Ghnaya e outros (2007), que observaram uma grande capacidade de *Brassica napus* (Brassicaceae) de acumular zinco quando regenerada em presença de até 500 μM desse metal. Para os autores, essa observação pode ser particularmente importante para aplicações práticas em fitorremediação. Rout, Samantaray e Das (1999) também constataram que o acúmulo do metal em calos de *Brassica* spp., cultivados *in vitro*, durante 4 semanas, aumentou significativamente com o incremento da concentração do metal no meio.

Já os fatores de bioacumulação (FB) tenderam à redução, sendo que, em concentrações mais elevadas de Cu (0,9 μM e 0,27 μM) e de Zn (270 μM e 810 μM), a planta apresentou valores médios bem inferiores para essa característica, porém, ainda assim, sugestivos de que

V. zizanioides seja capaz de hiperacumular ambos os metais pesados em seus tecidos (FB>1) (Figuras 7C e 7D).

Figura 7 – Teores de Cu e Zn na biomassa seca de *V. zizanioides* cultivada *in vitro*, sob concentrações crescentes desses elementos.



(A) Concentração de Cobre na parte aérea. (B) Concentração de Zinco na parte aérea. (C) Fator de Bioacumulação de Cobre em *V. zizanioides*. (D) Fator de Bioacumulação de Zinco em *V. zizanioides*.

Segundo Kidd e outros (2007), o fator de bioacumulação mede a capacidade que a planta tem de absorver ativamente o metal do solo e acumulá-lo em formas não tóxicas em sua biomassa aérea. Dessa forma, dada a capacidade das plantas hiperacumuladores de absorver e translocar ativamente o metal, o fator de bioacumulação dessas espécies resulta em uma relação maior do que um. Por outro lado, as espécies tolerantes apresentam fator de bioacumulação menor do que um, ou seja, elas tendem a desenvolver estratégias que restrinjam a translocação do metal do solo para a planta (ARAÚJO *et al.*, 2011).

Embora os fatores de bioacumulação de *V. zizanioides* tenham decrescido com o aumento da concentração dos metais no meio de cultura, mesmo em doses elevadas, a planta apresentou médias muito superiores a uma unidade, principalmente para cobre. Isso indica que a espécie tenha maior capacidade de translocação de Cu, do meio para a planta, em relação ao Zn.

3.5 Avaliações anatômicas em *V. zizanioides* em presença dos metais pesados Cu e Zn

Observou-se também, por meio de microscopia, o efeito da concentração de Cu e Zn nas estruturas anatômicas radiculares e foliares de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*.

3.5.1 Respostas anatômicas radiculares

Anatomicamente, as raízes de *V. zizanioides* visualizadas em ambos os experimentos apresentaram forma cilíndrica, epiderme uniestratificada – constituída por células de parede delgada – e formato variando entre arredondado e irregular. No córtex, subjacente à epiderme, notou-se a presença de células, em sua maioria, arredondadas e com espessamento e lignificação da parede celular conhecido, em monocotiledôneas, como anel esclerenquimático (seta vermelha). Na região mediana do córtex, observa-se a presença de um aerênquima formado por células colapsadas que, segundo Filho (2014), resultam de processo esquizolígeno (seta azul). Observou-se também a presença de gotículas de óleo dentro, principalmente, das células do parênquima cortical, o que corrobora com os achados de Delistoianov e Toledo (1960) em estudos envolvendo a determinação da localização do óleo essencial produzido por *V. zizanioides*. Mais internamente, pôde-se identificar uma endoderme unisseriada, além da presença de estrias de Caspary (seta marron). De acordo com Cunha e outros (2008), essas últimas são estruturas presentes na endoderme de grande importância para a limitação do movimento apoplástico de metais, restringindo sua absorção seletiva à via simplástica. O cilindro vascular mostrou-se formado pelo periciclo e pelos feixes condutores floema e xilema (Figura 8 e 9).

Figura 8: Anatomia radicular de *V. zizanioides* exposta a concentrações crescentes de Cu – 0,05 μM (A); 0,1 μM (B); 0,3 μM (C); 0,9 μM (D); 2,7 μM (E). ep – epiderme; ctx – córtex; ed – endoderme; cv – cilindro vascular; pr – periciclo; xl – xilema; fl – floema; ec – estria de Caspary. Aerênquima – seta verde. Anel esclerenquimático – seta vermelha. Barra de escala: 100 μm

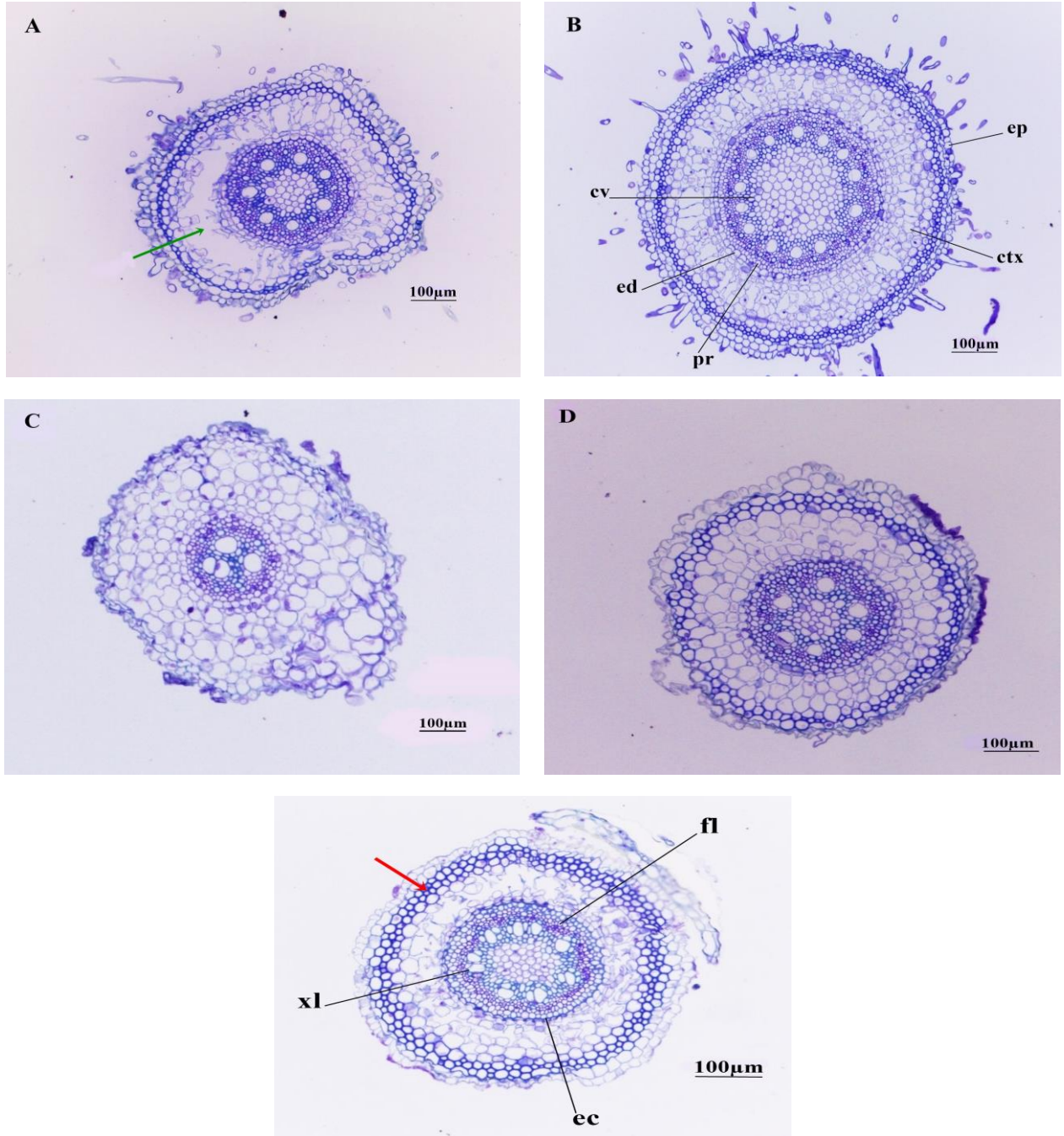
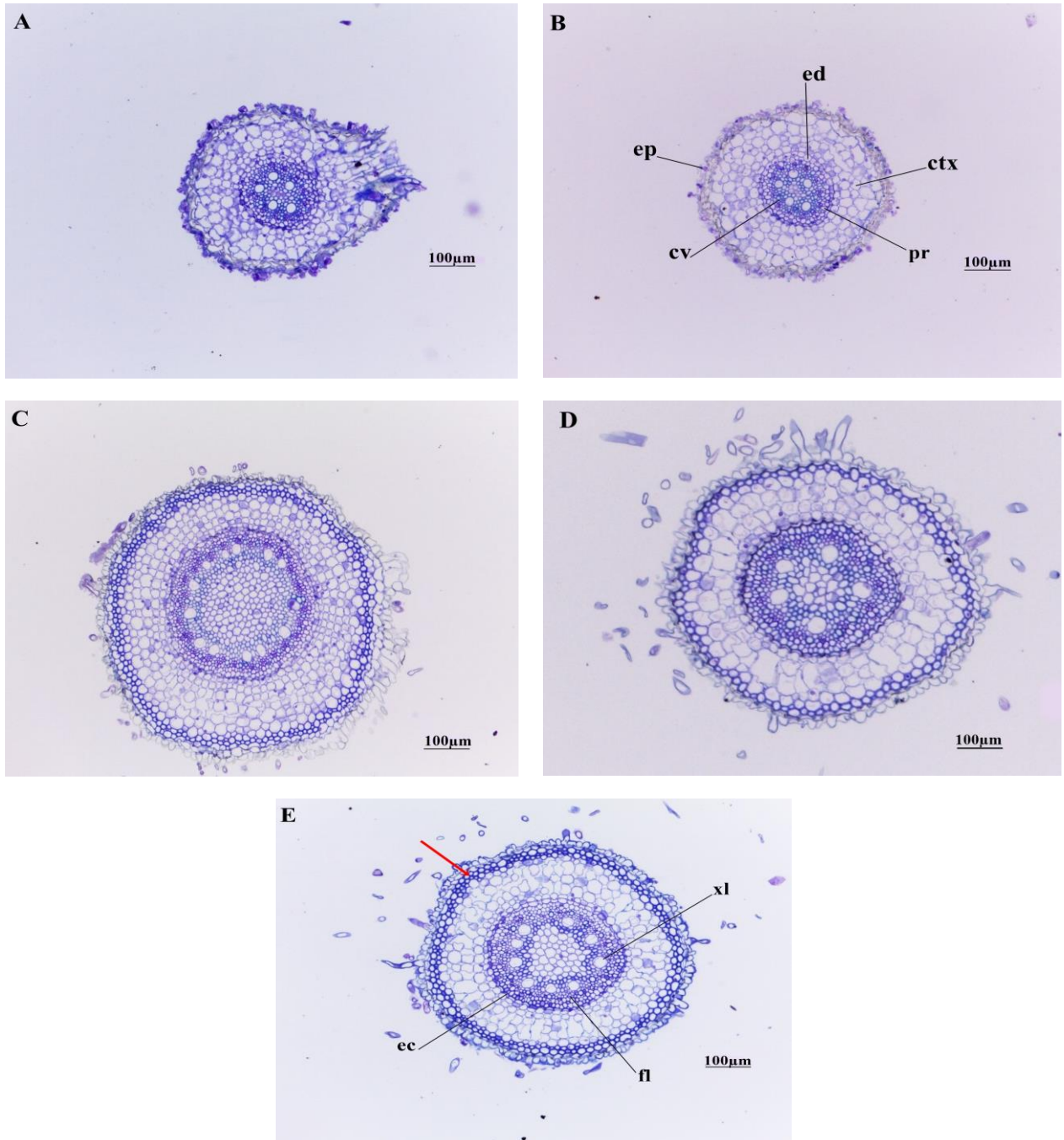


Figura 9: Anatomia radicular de *V. zizanioides* exposta a concentrações crescentes de Zn – 15 μM (A); 30 μM (B); 90 μM (C); 270 μM (D); 810 μM (E). ep – epiderme; ctx – córtex; ed – endoderme; cv – cilindro vascular; pr – periciclo; xl – xilema; fl – floema; ec – estria de Caspary. Anel esclerenquimático – seta vermelha. Barra de escala: 100 μm



O aumento na concentração de Cu no meio de cultivo não influenciou as espessuras do córtex, da endoderme e da epiderme radiculares (TABELA 6). Entretanto, observou-se que, tanto na menor concentração de cobre avaliada (deficiência) quanto na maior concentração do metal testada (excesso), *V. zizanioides* apresentou visivelmente aerênquima mais desenvolvido. Notou-se também que, em concentrações elevadas, houve um acúmulo acentuado de lignina na parede celular das células de camadas mais externas do córtex e, conseqüente, espessamento do anel esclerenquimático. Pereira e colaboradores (2008), avaliando as modificações anatômicas em raízes de *Zea mays* relacionadas à hipóxia, relataram que o córtex é uma das estruturas radiculares mais sensíveis a alterações nas condições ambientais.

Além disso, estruturas presentes na endoderme, como a estria de Caspary, revelaram-se nitidamente mais evidentes. Melo e outros (2011) também evidenciaram a presença de estria de Caspary com maior quantidade de lignina em plantas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) submetidas a estresse salino. Segundo os autores, essa estrutura forma uma barreira apoplástica que dificulta o fluxo de íons e de água para dentro do cilindro vascular, forçando a sua passagem por dentro das células e, conseqüentemente, sujeitos à ação de proteínas de transporte presentes na membrana plasmática.

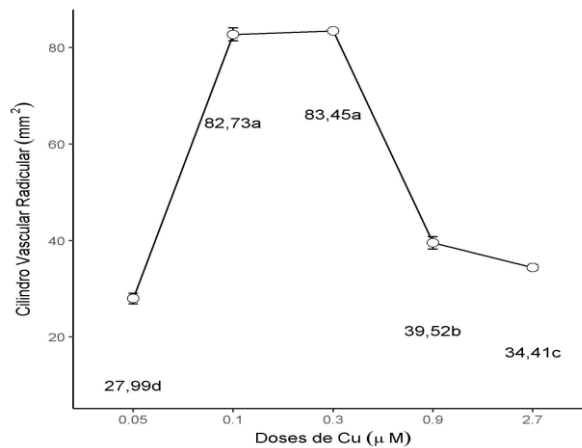
TABELA 6 - Variáveis da anatomia radicular de que não apresentaram efeito estatisticamente significativo para *V. zizanioides* cultivada *in vitro*, em presença de Cu.

| Doses de Cu (μM) | Córtex (μm) | Endoderme (μm) | Epiderme (μm) |
|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 0,05 | 155,26a* | 16,29a | 20,09a |
| 0,1 | 168,85a | 14,66a | 17,80a |
| 0,3 | 149,92a | 15,82a | 17,52a |
| 0,9 | 145,76a | 15,76a | 17,26a |
| 2,7 | 141,94a | 15,25a | 17,62a |
| CV (%) | 9,78 | 10,22 | 6,32 |

* Médias seguidas de mesma letra, dentro das colunas, não diferem entre si pelo teste F.

Para doses de Cu superiores a $0,3\mu\text{M}$, houve uma tendência à redução dos valores médios para a área do cilindro vascular (Figura 10). Marcondes e Garcia (2009) relataram diferenças no cilindro vascular de *Oryza sativa* L. (Poaceae) submetidas a estresse salino, em cultivo hidropônico. Os autores destacaram que as células do cilindro vascular apresentaram dimensões menores e parede celular mais espessa. Entretanto, alterações no diâmetro total do cilindro vascular não foram aparentemente identificadas.

Figura 10 – Efeito das concentrações de Cu no cilindro vascular de raízes de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*.



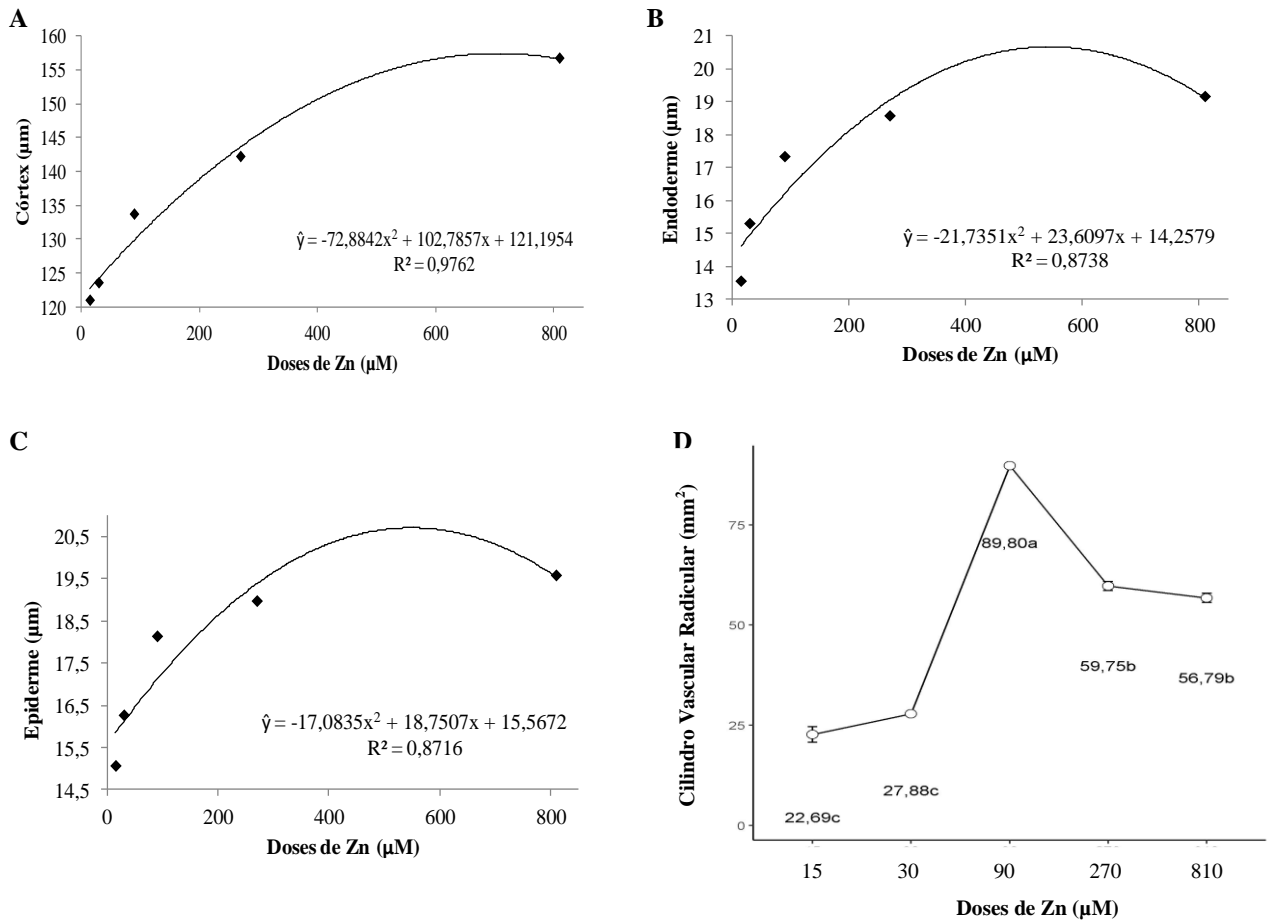
Por outro lado, as análises de microscopia revelaram que o aumento da concentração de Zn no meio induziu alterações significativas em todas as quatro variáveis radiculares avaliadas para *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*. Em relação ao córtex, sua espessura aumentou até a dosagem de 710 μM . Após essa concentração, observou-se um comportamento inverso na variável (Figura 11A). Já a maior espessura da endoderme radicular foi observada na concentração de 540 μM de Zn adicionado ao meio, ou seja, dezoito vezes maior do que a dosagem do metal no meio MS, considerado como a dose-controle (Figura 11B). A epiderme radicular apresentou um comportamento semelhante ao da endoderme, sendo que o aumento nas concentrações de Zn provocou um espessamento da epiderme até a dosagem de 550 μM , a partir da qual ocorreu um decréscimo nessa variável (Figura 11C). Visualmente, notou-se um espessamento do anel esclerenquimático, maior formação de aerênquima e lignificação acentuada da estria de Caspary em raízes de *V. zizanioides* expostas a concentrações mais elevadas de zinco. Para Enstone, Peterson e Ma (2003), a endoderme e a exoderme representam as duas principais barreiras fisiológicas na proteção da raiz contra diferentes tipos de estresse.

Com relação à área do cilindro vascular, o teste de médias Tukey demonstrou que a adição de até 90 μM de Zn ao meio de cultivo induziu o aumento significativo na variável, enquanto doses de zinco superiores a esse valor tendem a provocar uma queda nesta (Figura 11D).

Estudos conduzidos por Gomes e colaboradores (2011) para avaliar alterações anatômicas em *Brachiaria decumbens* (Poaceae) cultivadas em solo contaminado por metais pesados, dentre eles Zn, revelaram um espessamento da endoderme e da epiderme radicular.

Todavia, a exposição da gramínea a níveis mais elevados de contaminação provocou a degradação dessas estruturas. Os autores também discutiram que as alterações observadas no córtex de *B. decumbens* – que apresentou maior degeneração das células corticais – pudessem ser reflexo da interferência dos metais pesados na maturação radicular.

Figura 11 – Efeito das concentrações de Zn sobre a espessura do córtex (A), da endoderme (B), da epiderme (C) e sobre a área do cilindro vascular (D) de raízes de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*.



As estruturas radiculares de *V. zizanioides* foram mais sensíveis ao excesso de zinco do que à presença de doses elevadas de cobre no meio de cultivo. Tal comportamento sugere que as modificações observadas na anatomia de sua raiz atuem como barreira fisiológica restringindo a absorção – via apoplástica – do metal e, por conseguinte, resultando em um menor fator de bioacumulação, quando comparado ao do cobre (conforme descrito no item 3.4).

Por outro lado, tendo o excesso de cobre induzido poucas alterações significativas nas estruturas radiculares, a translocação do poluente – do meio de cultivo para o cilindro vascular

das raízes – seria menos comprometida, possibilitando, assim, um maior fator de bioacumulação em comparação ao zinco.

Contudo, todas as alterações anatômicas identificadas podem representar mecanismos e/ou estratégias de *V. zizanioides* para inibir, em maior ou em menor grau, a translocação dos metais cobre e zinco e, conseqüentemente, sua fitotoxicidade.

3. 5. 2 Respostas anatômicas foliares

Assim como outras espécies da família Poaceae, *V. zizanioides* possui via fotossintética C4, associada à anatomia Kranz. Essa anatomia caracteriza-se pela presença de uma bainha perivascular bem desenvolvida e células do mesofilo dispostas radialmente ao redor do feixe vascular (DENGLER *et al.*, 1994; OLIVEIRA *et al.*, 1973). Além disso, observaram-se a presença de epiderme unisseriada e células buliformes, dispostas junto à nervura central, na face adaxial da epiderme. Acredita-se que essas células, também conhecidas como células motoras, estariam envolvidas com o mecanismo de enrolamento e desenrolamento das folhas (APPEZZATO-DA-GLÓRIA & CARMELLO-GUERREIRO, 2006). Já os feixes vasculares mostraram-se situados em posição aproximadamente equidistante em relação a ambas as faces da lâmina foliar (Figura 12 e 13).

Figura 12 - Anatomia foliar de *V. zizanioides* exposta a concentrações crescentes de Cu – 0,05 μ M (A); 0,1 μ M (B); 0,3 μ M (C); 0,9 μ M (D); 2,7 μ M (E). cb – célula buliforme; adx – face adaxial da epiderme; abx – face abaxial da epiderme; est – estômato; xl – xilema; fl – floema; mf – mesofilo; bp – bainha perivascular; pcl – parênquima clorofiliano. Barra de escala: 50 μ m

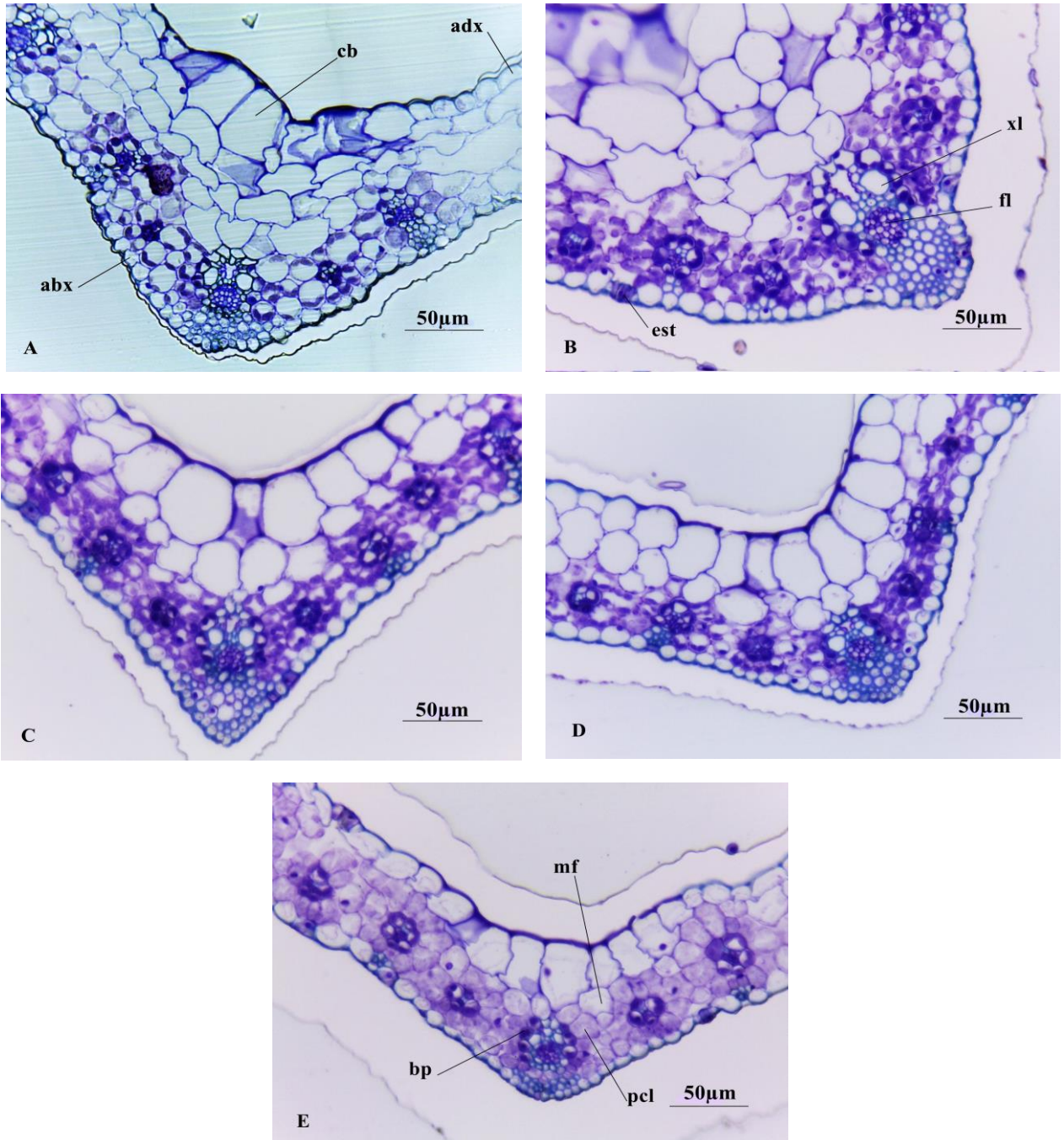
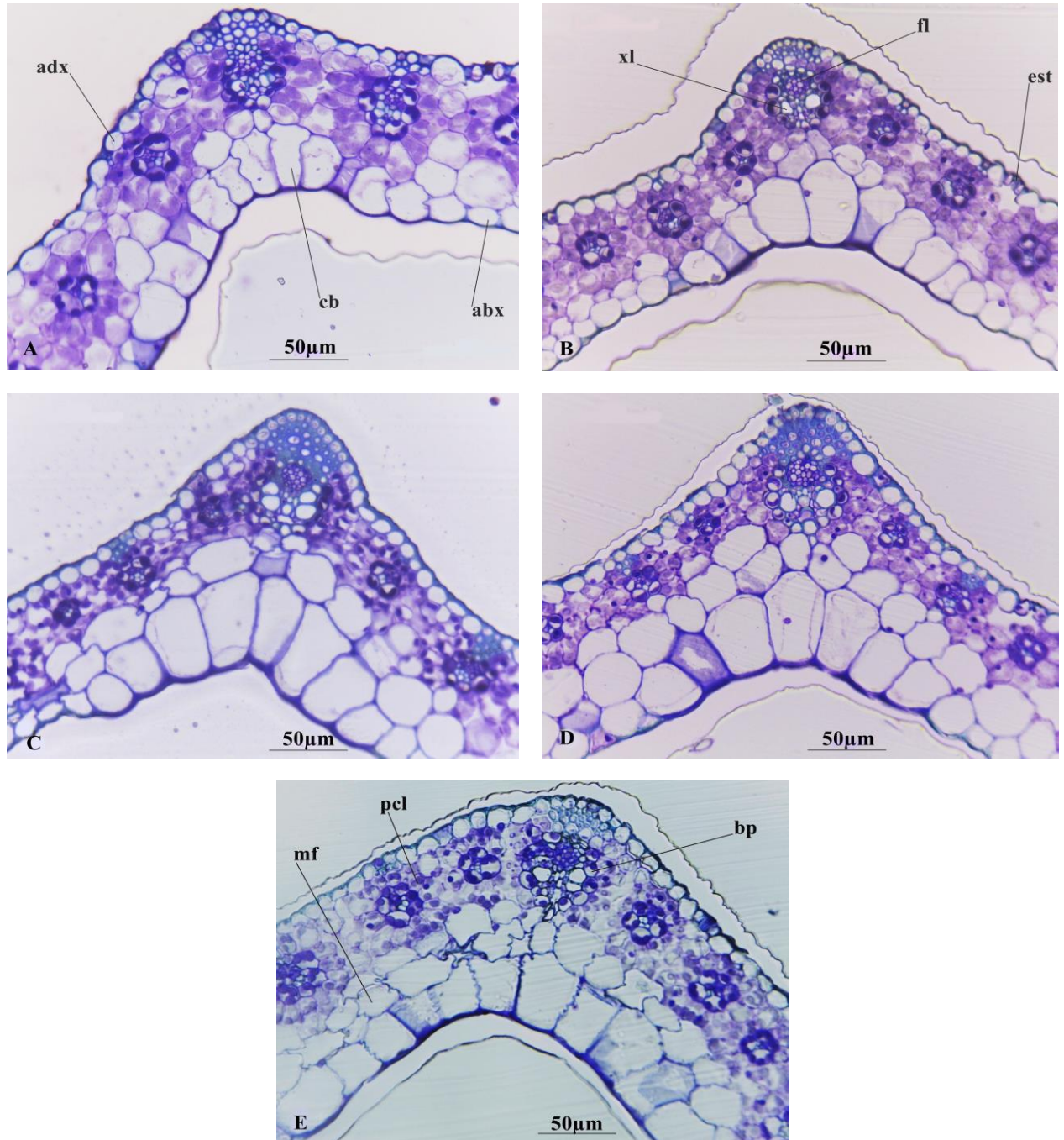


Figura 13 - Anatomia foliar de *V. zizanioides* exposta a concentrações crescentes de Zn – 15 μM (A); 30 μM (B); 90 μM (C); 270 μM (D); 810 μM (E). cb – célula buliforme; adx – face adaxial da epiderme; abx – face abaxial da epiderme; est – estômato; xl – xilema; fl – floema; mf – mesofilo; bp – bainha perivasculare; pcl – parênquima clorofiliano. Barra de escala: 50 μm



Na Tabela 7, estão discriminadas as médias das variáveis foliares – área do floema, área do parênquima clorofiliano, espessura da face abaxial e da face adaxial – quando em presença de diferentes concentrações de Cu. Para as cinco doses avaliadas, os valores médios dessas variáveis apresentaram-se semelhantes, de acordo com o teste F da análise de variância.

TABELA 7 – Variáveis da anatomia foliar que não apresentaram efeito estatisticamente significativo para *V. zizanioides* cultivada *in vitro*, em presença de Cu.

| Doses de Cu (µM) | Floema (µm ²) | Parênquima Clorofiliano (µm ²) | Epiderme abaxial (µm) | Epiderme adaxial (µm) |
|------------------|---------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| 0,05 | 253,22a* | 1082,69a | 11,29a | 12,28a |
| 0,1 | 373,32a | 1433,86a | 12,49a | 16,35a |
| 0,3 | 270,77a | 1421,19a | 11,57a | 15,52a |
| 0,9 | 265,39a | 1313,24a | 11,23a | 14,93a |
| 2,7 | 221,73a | 1119,76a | 10,07a | 12,71a |
| CV (%) | 18,02 | 24,83 | 14,82 | 15,17 |

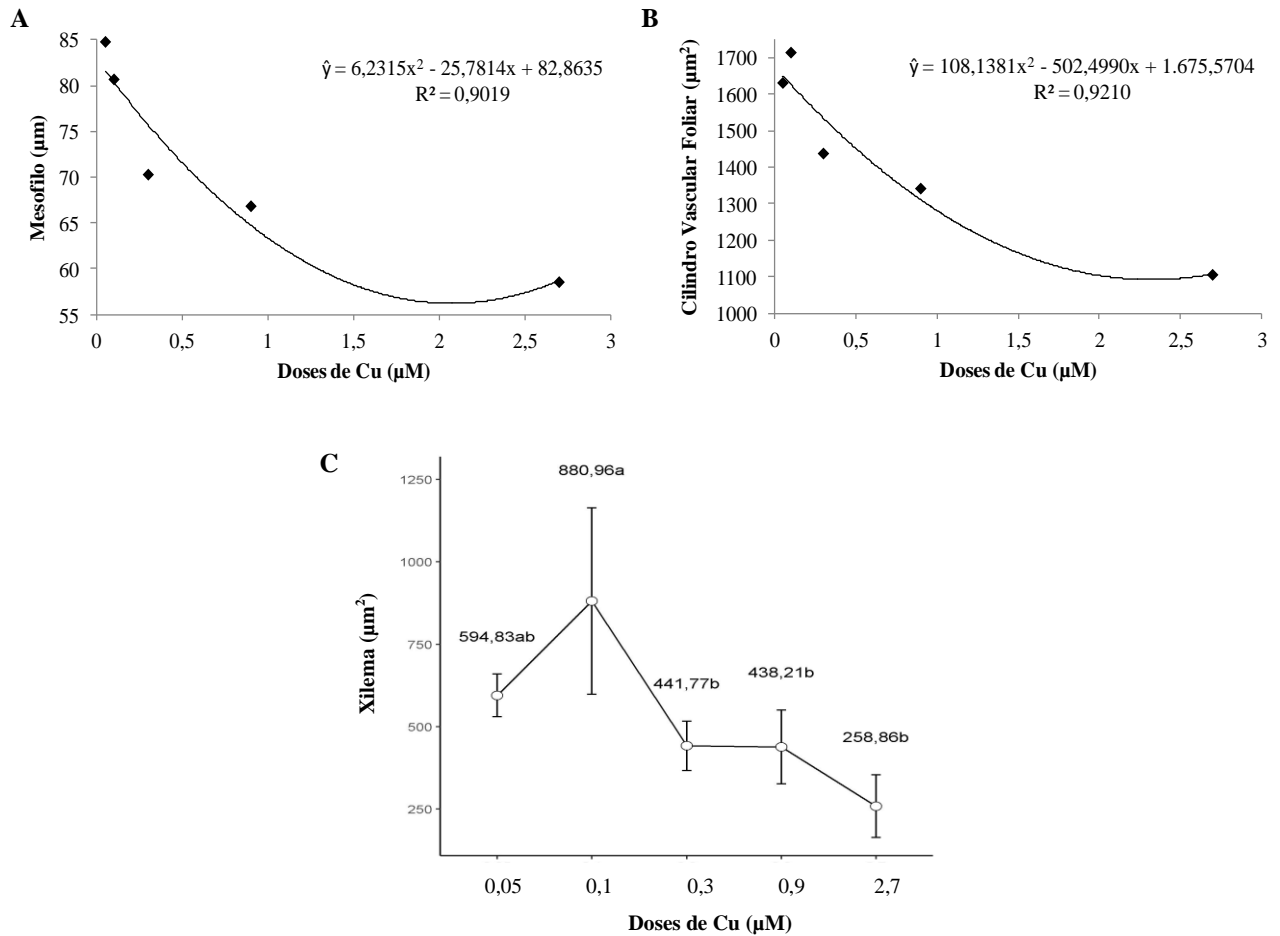
* Médias seguidas de mesma letra, dentro das colunas, não diferem entre si pelo teste F.

Para as variáveis foliares – espessura do mesofilo, área do cilindro vascular e área do xilema – observou-se que o aumento nas concentrações de Cu no meio de cultivo afetou significativamente seus valores médios por tratamento ($P < 0,05$) (Figura 14).

A espessura do mesofilo de *V. zizanioides* reduziu até a dose de 2,07 µM de Cu. Após essa concentração, essa variável tendeu a sofrer um ligeiro aumento (Figura 14A). Outros estudos também demonstraram que a exposição de espécies vegetais a metais pesados pode provocar a contração das células do mesofilo e a redução da espessura da lâmina foliar (GOMES *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2000)

O mesmo comportamento foi observado em relação à área do cilindro vascular foliar, sendo que esse parâmetro sofreu uma redução até que a dose de Cu no meio atingisse o valor de 2,32 µM (Figura 14B). O teste de médias de Tukey revelou que a área do xilema foi significativamente maior quando *V. zizanioides*, cultivadas *in vitro*, foram expostas à concentração de 0,1 µM de Cu. Apesar das demais concentrações testadas não diferirem estatisticamente entre si, a maior retração do xilema foi percebida em dose de Cu igual a 2,7 µM (Figura 14C). Gomes e colaboradores (2011) demonstraram que *B. decumbens* também apresentou retração da área dos elementos de metaxilema quando cultivadas em solo contaminado por metais pesados e coletado em área de despejo de uma indústria de mineração.

Figura 14 – Efeito das concentrações de Cu sobre a espessura do mesofilo (A), área do cilindro vascular foliar (B) e área do xilema (C) de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*.



Por outro lado, quando expostas a concentrações crescentes de zinco, folhas de *V. zizanioides* não sofreram alterações significativas em relação à área do xilema, área do cilindro vascular, face abaxial e face adaxial (Tabela 8).

TABELA 8 – Variáveis da anatomia foliar que não apresentaram efeito estatisticamente significativo para *V. zizanioides* cultivadas *in vitro* e expostas a concentrações crescentes de Zn.

| Doses de Zn (μM) | Xilema (μm^2) | Cilindro Vascular (μm^2) | Epiderme abaxial (μm) | Epiderme adaxial (μm) |
|-------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 15 | 411,63a* | 1409,80a | 10,13a | 14,50a |
| 30 | 430,12a | 1553,94a | 11,43a | 14,80a |
| 90 | 494,09a | 1319,83a | 9,09a | 12,73a |
| 270 | 457,62a | 1473,74a | 8,86a | 12,49a |
| 810 | 423,77a | 1438,54a | 7,74a | 12,47a |
| CV (%) | 14,15 | 4,69 | 14,45 | 10,37 |

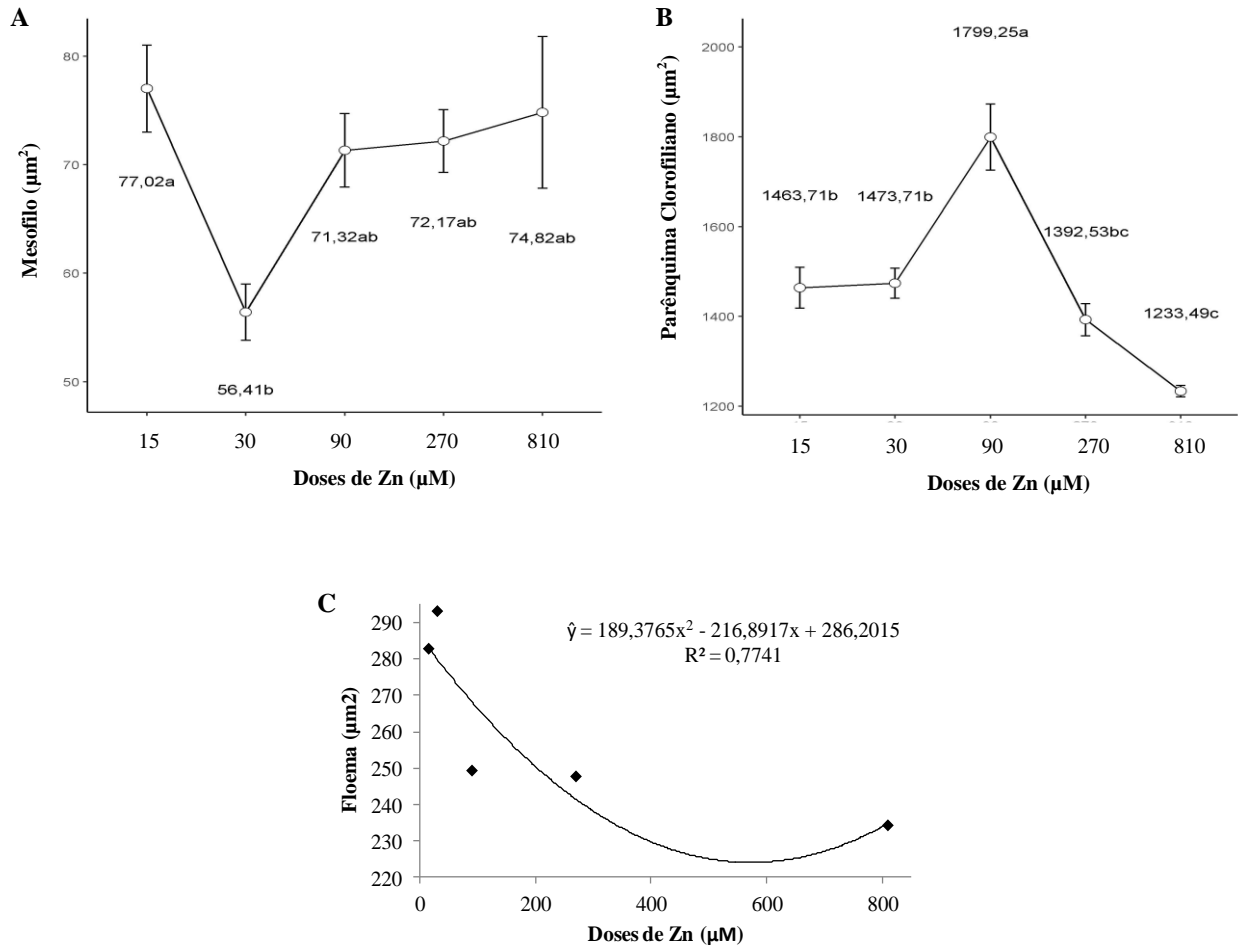
* Médias seguidas de mesma letra, dentro das colunas, não diferem entre si pelo teste F.

Entretanto, as variáveis – área do floema, área do parênquima clorofiliano e espessura do mesofilo – foram afetadas significativamente pela presença de Zn no meio de cultivo (Figura 15).

De acordo com o teste de média de Tukey, apesar de possuírem valores médios semelhantes, os tratamentos nos quais as plantas estavam sujeitas ao estresse (deficiência ou excesso de Zn) apresentaram uma maior espessura de mesofilo, quando comparados ao tratamento-controle (30 μM) (Figura 15A). Além disso, um maior desarranjo foi observado nas células do mesofilo de *V. zizanioides* expostas à concentração de 810 μM de Zn. Na planta aquática *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) também se notou, em cultivos hidropônicos, um aumento da espessura do mesofilo em resposta ao aumento da concentração de chumbo (Pb) na solução nutritiva (PEREIRA *et al.*, 2014).

Para a área do parênquima clorofiliano, o teste de médias revelou que, em concentração de Zn igual a 90 μM , obteve-se média superior para essa característica. A partir dessa concentração, a variável tende ao declínio (Figura 15B). Nota-se também que, à medida que se eleva a dose de Zn no meio de cultivo ocorre um decréscimo na área do floema até que a dose de 570 μM desse elemento seja atingida no meio, ponto em que se observa a sua maior retração (Figura 15C). Na espécie *J. curcas* L., também foi observada redução no número de vasos do floema em plantas submetidas a estresse salino (MELO *et al.*, 2011).

Figura 15 – Efeito das concentrações de Zn sobre a espessura do mesofilo (A), área do parênquima clorofiliano (B) e área do floema (C) de *V. zizanioides* cultivadas *in vitro*.



Gomes *et al.* (2011), em estudos realizados em casa de vegetação, demonstraram que a exposição de *B. decumbens* a concentrações elevadas de metais pesados, tais como Cu e Zn, tende a provocar um espessamento das faces abaxial e adaxial da epiderme como forma de minimizar a perda de água pela transpiração e, conseqüentemente, a absorção de metais pesados junto à água pela raiz. No presente trabalho, não foram observadas alterações significativas em nenhuma das faces da epiderme foliar de *V. zizanioides* cultivada *in vitro* sob as diferentes concentrações de Cu e Zn testadas. Uma provável explicação é que, nessa última condição os explantes crescem em taxas de umidade relativamente elevadas e com alta disponibilidade de água no meio de cultivo.

Segundo Melo *et al.* (2007), apesar dos fatores ambientais afetarem diretamente a estrutura e a organização dos elementos vasculares, raros são os estudos que relacionaram os efeitos de estresses sobre a anatomia foliar de monocotiledôneas ou sobre o seu sistema

vascular. Contudo, a redução no diâmetro do xilema e do floema parece ser uma resposta comum em plantas submetidas a condições de estresse (MELO *et al.*, 2011).

4 CONCLUSÕES

As concentrações de cobre avaliadas não afetam o crescimento *in vitro* de *Vetiveria zizanioides*, embora doses superiores a 0,3µM causam efeito deletério no comprimento da raiz e, conseqüentemente, no índice de tolerância da planta ao metal. Já a aplicação de concentrações crescentes de zinco influencia o crescimento da espécie, provocando decréscimo linear na altura da planta. Todavia, somente concentrações superiores a 930 µM provocam reduções no índice de tolerância da espécie ao metal.

Os valores de biomassa seca total e a taxa de crescimento para *V. zizanioides*, cultivadas *in vitro*, não são influenciados pelas concentrações de Cu ou Zn adicionadas ao meio de cultivo.

A produção de pigmentos fotossintéticos (clorofila a, clorofila b, clorofila total e carotenoides) em *V. zizanioides* não é prejudicada em nenhuma das doses de Cu ou de Zn avaliadas.

Os fatores de bioacumulação encontrados para *V. zizanioides*, mesmo nas concentrações mais elevadas de Cu e de Zn aplicadas, sugerem um comportamento acumulador para a planta.

As raízes de *V. zizanioides* são tolerantes aos efeitos do cobre e do zinco, *in vitro*, exibindo modificações estruturais, principalmente quando em presença de doses elevadas de Zn. Tais alterações visam restringir a absorção e a translocação dos poluentes do meio de cultivo para o interior da plântula.

V. zizanioides modifica a sua anatomia foliar de maneira distinta, quando exposta *in vitro* a concentrações elevadas de Cu e Zn. Doses elevadas de Cu induzem a redução da espessura do mesofilo, além da retração do cilindro vascular e do xilema. Por outro lado, o aumento na concentração de Zn provoca o espessamento do mesofilo, associado ao decréscimo da área do floema e do parênquima clorofiliano.

Nas condições do experimento, *V. zizanioides* demonstrou ampla plasticidade fisiológica e anatômica em presença de estresse, *in vitro*, provocado por doses elevadas de Cu e de Zn. Portanto, a espécie possui potencial para utilização em processos de recuperação de áreas contaminadas por esses metais, o que não exclui a necessidade de estudos em nível de experimentos de campo.

REFERÊNCIAS

- ABDUL RAHEEM, A. M. O.; INYINBOR, A. A.; ADEKOLA, F. A. Heavy metal distribution and speciation in soils around a mega cement factory in north-central Nigeria. **Ethiopian Journal of Environmental Studies and Management**, v. 5, n. 1, p. 11–19, 2012.
- AKSORN, E.; CHITSOMBOON, B. Bioaccumulation of heavy metal uptake by two different Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* and *Vetiveria nemoralis*) species. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 24, p. 3166–3171, 2013.
- APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Eds.) **Anatomia vegetal**. 2ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2006. 438p.
- ARAÚJO, A. S. A. *et al.* Fitorremediação de solos contaminados com arsênio (As) utilizando braquiária. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 1, p. 84–91, 2011.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, p. 1–15, 1949.
- ASMAR, S. A. *et al.* Anatomical and structural changes in response to application of silicon (Si) *in vitro* during the acclimatization of banana cv. “Grand Naine”. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 12, p. 1236–1241, 2015.
- SILVA, F. A. S. ASSISTAT: Versão 7.7 pt. Campina Grande: DEAG/CTRN/UFCG – Atualizado em 01 de jan. de 2017. Disponível em <<http://www.assistat.com/>>. Acessado em: 03 de abr. de 2017.
- BEN BAHRI, N.; LARIBI, B.; BETTAIEB, T. Morphological effects of zinc and its accumulation in micropropagated plants of *Paulownia tomentosa* (Thunb.) Steud . **International Journal of Medicinal and Aromatic Plants**, v. 3, n. 1, p. 40–46, 2013.
- BAKER, A. J. M. Metal tolerance. **New Phytologist**, v. 106, p. 93–111, 1987.
- BEN GHNAYA, A. *et al.* Morphological and physiological characteristics of rapeseed plants regenerated *in vitro* from thin cell layers in the presence of zinc. **Comptes Rendus - Biologies**, v. 330, p. 728–734, 2007.
- BENIMELI, C. S. *et al.* Bioaccumulation of copper by zea mays: Impact on root, shoot and leaf growth. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 210, p. 365–370, 2010.
- BROADLEY, M. R. *et al.* Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, p. 677–702, 2007.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1629–1638, 2002.
- CHANEY, R. L. Zinc Phytotoxicity. In: **Zinc in Soil and Plants**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 135–150.

- CUNHA, K. P. V. *et al.* Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 1319–1328, 2008.
- DELISTOIANOV, J.; TOLEDO, A. P. Estudo anatômico para localização do óleo em raiz de *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash. **Bragantia**, v. 19, n. 55, p. 891–896, 1960.
- DENGLER, N. G. *et al.* Quantitative leaf anatomy of C3 and C4 grasses (Poaceae): bundle sheath and mesophyll surface area relationships. **Annals of Botany**, v. 73, p. 241–255, 1994.
- DORAN, P. M. Application of plant tissue cultures in phytoremediation research: Incentives and limitations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 103, n. 1, p. 60–76, 2009.
- EPAMIG - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS. **Boletim de Análises Químicas de Solo, Tecido Vegetal e Água – Metodologias**. Porteirinha-MG, 2006. 28p.
- ENSTONE, D. E.; PETERSON, C. A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 21, n. 4, p. 335–351, 2003.
- ESTIFANOS, S. Investigating the distribution of selected major and trace metals in lithogenic Environment near cement factory, Mekelle, Ethiopia. **Journal of Environmental Protection**, v. 5, p. 144–155, 2014.
- ESTIFANOS, S.; DEGEFA, A. Assessing the effect of cement dust emission on the physico-chemical nature of soils around Messebo area, Tigray, North Ethiopia. **International Journal of Economical and Environmental Geology**, v. 3, n. 2, p. 9, 2012.
- FERNANDES, J. C.; HENRIQUES, F. S. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. **The Botanical Review**, v. 57, n. 3, p. 246–273, 1991.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FILHO, F. J. C. **Características anatômicas da raiz de *Vetiveria zizanioides* (L.) Roberty submetida a esgoto sanitário**. 2014. 113f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal) - Universidade Federal de Goiás, 2014.
- GIAMPAOLI, P. **Efeito de cobre e zinco no desenvolvimento in vitro de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L . B . Smith**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente - São Paulo, 2010.
- GOMES, M. P. *et al.* Ecophysiological and anatomical changes due to uptake and accumulation of heavy metal in *Brachiaria decumbens*. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 5, p. 566–573, 2011.

GYULAI, G. *et al.* Clonal propagation and improved phytoextraction activity of gshIpoplar clones (*Populus canescens*) *in vitro*. **Genetic variation for plant breeding**, p. 279–283, 2004.

GYULAI, G. *et al.* AFLP analysis and improved phytoextraction capacity of transgenic gshIpoplar clones (*Populus x canescens* L.) for copper *in vitro*. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 60, n. 3–4, p. 300–306, 2005.

HENRY, J. R. An overview of the phytoremediation of lead and mercury. **U. S. Environmental Protection Agency - Technology Innovation office**. Washington, D. C. 2000.

JIANG, W.; LIU, D.; LIU, X. Effect of copper on root growth, cell division and nucleolus of *Zea mays*. **Biologia Plantarum**, v. 44, n. 1, p. 105–109, 2001.

JOHANSEN, D. A. **Plant Microtechnique**. 2nd. ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940.

KIDD, P. S. *et al.* Aplicación de plantas hiperacumuladoras de níquel en la fitoextracción natural : el género *Alyssum* L. **Ecosistemas**, v. 16, n. 2, p. 26–43, 2007.

KNOX, A. S. *et al.* **Sources and practices contributing to soil contamination**. No. 37. Madison: ASA, CSSA, SSSA, 1999.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal**. Seropédica: Editora da Universidade Rural do Rio de Janeiro, v. 1, 198p, 1997.

LASAT, M. M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: A review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazardous Substance Research**, v. 2, p. 5–25, 2000.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, v. 148, p. 350–382, 1987.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. In: WROLSTAD, R. E. *et al* (Ed.). **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. 1–8, 2001.

LINDBLOM, S. D. *et al.* Constitutive expression of a high-affinity sulfate transporter in indian mustard affects metal tolerance and accumulation. **Journal of Environmental Quality**, v. 35, n. may-june, p. 726–733, 2006.

LONE, M. I. *et al.* Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water : progresses and perspectives. **Journal of Zhejiang University**, v. 9, n. 3, p. 210–220, 2008.

MARCONDES, J.; GARCIA, A. B. Aspectos citomorfológicos do estresse salino em plântulas de arroz (*Oryza Sativa* L.). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, n. 2, p. 187–194, 2009.

MARTINS, C. A. S. *et al.* A dinâmica de metais-traço no solo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 17, n. 3–4, p. 383–391, 2011.

- MATEOS-NARANJO, E. *et al.* Growth and photosynthetic responses to copper stress of an invasive cordgrass, *Spartina densiflora*. **Marine Environmental Research**, v. 66, p. 459–465, 2008.
- MELO, E. E. C. *et al.* Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 1, p. 479–483, 2009.
- MELO, G. M. *et al.* Alterações anatômicas em folhas e raízes de *Jatropha curcas* L. cultivadas sob estresse salino. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 42, n. 3, p. 670–674, 2011.
- MELO, H. C. *et al.* Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, v. 34, n. 2, p. 145–153, 2007.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497, 1962.
- O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polyehromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, v. 59, p. 368–373, 1964.
- OGEDENGBE, K.; OKE, A. O. Pollution impact of cement production on air, soil and water in a production location in Nigeria. **Journal of Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 46–56, 2011.
- OLIVEIRA, B. A. D. *et al.* Identificação de gramíneas tropicais com via fotossintética “C4” pela anatomia foliar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 8, p. 267–271, 1973.
- OLIVEIRA, C. *et al.* Bioaccumulation and effects of lanthanum on growth and mitotic index in soybean plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 136–144, 2015.
- OLIVEIRA, D. M. T.. **Técnicas de preparação de material vegetal para estudos anatômicos**. UNESP, Instituto de Biociências, 2008. 26p
- OLOWOYO, J. O.; MUGIVHISA, L. L.; BUSA, N. G. Trace metals in soil and plants around a cement factory in Pretoria, South Africa. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 24, n. 5, p. 2087–2093, 2015.
- PEREIRA, F. J. *et al.* Evolução da anatomia radicular do milho “Saracura” em ciclos de seleção sucessivos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 12, p. 1649–1656, 2008.
- PEREIRA, F. J. *et al.* Lead tolerance of water hyacinth (*Eichhornia crassipes* Mart. - Pontederiaceae) as defined by anatomical and physiological traits. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1423–1433, 2014.
- PRINCEWILL, C. O.; ADANMA, N. N. Metal concentration in soil and plants in abandoned cement factory. **International Conference on Biotechnology and Environment Management**, v. 18, p. 146–150, 2011.

R CORE TEAM. **R**: A Language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2017. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 10 de mai. de 2017.

RIBEIRO, E. S. *et al.* Relações da anatomia radicular na absorção, no acúmulo e na tolerância ao chumbo em *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 6, p. 605–612, 2015.

ROONGTANAKIAT, N.; OSOTSAPAR, Y.; YINDIRAM, C. Influence of heavy metals and soil amendments on vetiver (*Vetiveria zizanioides*) grown in zinc mine soil. **Kasetsart Journal - Natural Science**, v. 49, p. 37–49, 2009.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* selection and biochemical characterisation of zinc and manganese adapted callus lines in *Brassica* spp. **Plant Science**, v. 146, n. 2, p. 89–100, 1999.

SANTOS, T. C.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; BLANK, A. F. Propagação e conservação *in vitro* de vetiver. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 3, p. 507–513, 2012.

SARGENTELLI, V.; MAURO, A. E.; MASSABNI, A. C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 290–293, 1996.

SHARMA, R. K.; AGRAWAL, M. Biological effects of heavy metals: An overview. **Journal Environmental Biology**, v. 26, n. 2 suppl., p. 301–313, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TEIXEIRA, P. C. *et al.* Resposta de vetiver à aplicação de calcário e fósforo em três classes de solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 19, n. 2, p. 99–105, 2015.

TRUONG, P. N. V.; LOCH, R. **Vetiver system for erosion and sediment control**. In: 13th International Soil Conservation Organisation Conference, 2004. Brisbane: Conserving Soil and Water for Society: Sharing Solutions, 2004. 6p.

WANG, X. S. Magnetic properties and heavy metal pollution of soils in the vicinity of a cement plant, Xuzhou (China). **Journal of Applied Geophysics**, v. 98, p. 73–78, 2013.

WAOO, A. A.; KHARE, S.; GANGULY, S. Phytoremediation: An Ultimate Hope for the Planet. **AASCIT Communications**, v. 2, n. 5, p. 174–178, 2015.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **International Scholarly Research Network**, v. 2011, p. 1–20, 2011.

WYSZKOWSKA, J. *et al.* Effect of cadmium, copper and zinc on plants, soil microorganisms and soil enzymes. **Journal of Elementology**, p. 769–796, 2013.

YONG, W. T. L. *et al.* Uptake and accumulation of aluminium , copper and cobalt in tissue cultured *Melastoma malabathricum* Linn. plantlets. **International Journal of Plant & Soil Science**, v. 3, n. 8, p. 1018–1030, 2014.

YOON, J. *et al.* Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**, v. 368, n. 2–3, p. 456–464, 2006.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 145–156, 2005.

ZHAO, F. J. *et al.* Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 5, p. 507–514, 2000.