

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRAULICA E SANEAMENTO

PAULA ALEJANDRA LARA ROMERO

Interferência do cobre sobre a assimilação de nutrientes pelas macrófitas
aquáticas *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia auriculata* Aubl.

São Carlos, SP

2018

PAULA ALEJANDRA LARA ROMERO

Interferência do cobre sobre a assimilação de nutrientes pelas macrófitas
aquáticas *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia auriculata* Aubl.

Monografia apresentada ao curso de
graduação em Engenharia Ambiental, da
Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha

Coorientador: Me. Fellipe Henrique Martins Moutinho

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos, SP

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Atendimento ao
Usuário do Serviço de Biblioteca
"Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes" da EESC/USP

L318i Lara Romero, Paula Alejandra
Interferência do cobre sobre a assimilação de
nutrientes pelas macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes*
L. e *Salvinia auriculata* Aubl. / Paula Alejandra Lara
Romero; orientador Davi Gasparini Fernandes Cunha;
coorientador Felipe Henrique Martins Moutinho. -- São
Carlos, SP, 2018.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São
Paulo.

1. Fitorremediação. 2. Contaminação. 3. Eutrofização.
4. Metais. I. Cunha, Davi Gasparini Fernandes.
II. Moutinho, Felipe Henrique Martins. III. Título.
II. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Paula Alejandra Lara Romero**

Data da Defesa: 09/11/2018

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha (Orientador(a))


APROVADA

Dra. Flavia Bottino

aprovada

Prof. Dr. Juliano José Corbi

APROVADO



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

*Aos meus pais, pelo apoio
incondicional e a infinita confiança.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Davi Gasparini Fernandes Cunha pelo acolhimento, orientação e imenso suporte durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao Me. Felipe Henrique Martins Moutinho por literalmente tudo! Sem seu apoio, ensinamentos, sugestões e infinita paciência este trabalho não teria sido possível. Sou eternamente grata porque, além de você ser meu coorientador você foi meu exemplo a seguir neste caminho e me incentivou a continuar e fazer o meu melhor, mesmo nos dias difíceis.

Ao pessoal do Laboratório de Biotoxicologia de Águas Continentais e Efluentes (BIOTACE) que direta ou indiretamente ajudou neste trabalho, seja pelo acompanhamento em laboratório ou pelas sugestões no trabalho. Especialmente à Ingrid Mayumi, pelo empréstimo das cubas e a colaboração nas análises de fósforo das macrófitas e à Amanda Sati, pelo apoio e colaboração no texto.

À Escola de Engenharia de São Carlos e a todos os meus professores agradeço a oportunidade e todo o aprendizado que me proporcionaram.

Ao Me. Allan Pretti Ogura (Plets) e ao professor Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espindola do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da Universidade de São Paulo (CRHEA – USP) pelo fornecimento das espécies de macrófitas.

Ao técnico do Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento, Esp. Júlio Cesar Trofino, pela colaboração referente às análises de cobre.

Ao professor Dr. Marcos Arduin do Departamento de Botânica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos pela colaboração com a análise para verificar as alterações morfológicas das macrófitas.

Aos meus pais, Carlos Arturo Lara Gracia e Johanna Rocio Romero Leal, pelo apoio e força incondicional mesmo na distância. Por sempre terem acreditado em mim e me incentivarem neste árduo e longo caminho. A pessoa que eu sou e a profissional que irei me tornar é graças a vocês.

Aos meus amigos da faculdade, por terem me acompanhado durante este processo de aprendizado e terem me brindado experiências incríveis. Saibam que vocês se tornaram praticamente minha segunda família.

À minha irmã, Julieta Lara Romero, e à minha melhor amiga, Lorena Soriano Hernandez, por todos os conselhos e por todo o apoio que vocês me brindaram durante estes anos de graduação, principalmente nas dificuldades.

A todas as pessoas que agora fazem parte da minha vida, tanto no âmbito pessoal como acadêmico, e que de alguma forma tornaram esta experiência no Brasil totalmente maravilhosa e inesquecível, meu mais sincero “muito obrigada”.

RESUMO

LARA ROMERO, P. A. **Interferência do cobre sobre assimilação de nutrientes pelas macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia auriculata* Aubl.** 2018. 79 p.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

O emprego de macrófitas aquáticas para a remediação de ambientes contaminados, seja por elevadas cargas de nutrientes ou por presença de metais, tem sido amplamente estudado. Entretanto, a maioria de estudos avalia o potencial das macrófitas para uma ou outra aplicação isoladamente, sem considerar a interferência dos efeitos tóxicos dos metais sobre a remoção de nutrientes por essas plantas. Este tipo de informação é importante quando se visa o uso desses organismos para o controle da eutrofização e a remoção de metais em conjunto. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do cobre sobre a assimilação de nutrientes pelas macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia auriculata* Aubl.. Para tanto, indivíduos de ambas as espécies foram cultivados em meio nutritivo sob duas condições: sem adição de cobre (com concentração baixa do metal, $2 \mu\text{g Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) e com adição de cobre ($1 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) durante 15 dias. A amostragem para análise de nutrientes dissolvidos foi realizada a cada 3 dias. As análises de fósforo total, clorofila-*a* e nitrogênio total Kjeldahl foram realizadas para a correção da influência do crescimento do fitoplâncton no meio. Sob a condição com cobre, a concentração de nutrientes permaneceu constante e próxima à concentração inicial ($3,2 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ e $19,4 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$) indicando que não houve assimilação significativa pelas macrófitas. Observou-se também uma perda de massa de $0,01 \pm 0,03 \text{ g M.S.}$ por indivíduo e um acúmulo de cobre maior nas raízes do que nas folhas nas duas espécies. A maior concentração de cobre foi de $19,29 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ M.S.}$ no caso da raiz de *S. auriculata*. Na condição sem cobre, as macrófitas apresentaram maiores taxas de assimilação quando em elevadas concentrações de nutrientes ($2,0 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$ e $10 \text{ mg N- NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$ em *P. stratiotes* e $1,5 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$ em *S. auriculata*), com exceção da taxa de assimilação de nitrogênio de *S. auriculata* que permaneceu constante ($3,80 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$) apesar da variação de concentração. Foi possível evidenciar que o cobre é tóxico e letal para as espécies estudadas na concentração de $1 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$ e inibe totalmente a assimilação de nutrientes e o crescimento das mesmas. Com relação à remoção de nutrientes, *P. stratiotes* foi mais eficiente em altas concentrações de nutrientes, enquanto que a *S. auriculata* apresentou melhor desempenho a menores concentrações. *S. auriculata* é mais apropriada para uso na remediação de ambientes

aquáticos contaminados com cobre, dado o maior potencial de acumulação deste metal na sua biomassa.

Palavras-chave: Fitorremediação. Contaminação. Eutrofização. Metais.

ABSTRACT

LARA ROMERO, P. A. **Copper interference in nutrient uptake for *Pistia stratiotes* L. and *Salvinia auriculata* Aubl.** 2018. 79 p. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

Use of aquatic macrophytes in polluted environment remediation, either for high nutrient load pollution or metal contamination, has been widely studied. Nevertheless, most of the studies have evaluated macrophyte's potential for one or another application, without considering the toxic effect interference of metals upon plants nutrient removal. This information is important when taking into account the use of these systems for both eutrophication control and metals removal. The objective of this study was to evaluate the copper influence on nutrient uptake for two aquatic macrophytes, *Pistia stratiotes* L. and *Salvinia auriculata* Aubl. Individuals of these species were cultivated on nutrient medium for 15 days under two conditions: without copper addition (with low metal concentration, $2 \mu\text{g Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) and with copper addition ($1 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$). Sampling for nutrients analysis was made every three days. Total phosphorus, chlorophyll-*a* and total Kjeldahl nitrogen analysis were carried out for phytoplankton growth influence correction. In the condition containing copper, nutrient concentration remained constant and similar to initial concentrations ($3,2 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$ e $19,4 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ L}^{-1}$), suggesting there was no significant nutrient macrophyte uptake. Mass loss of $0,01 \pm 0,03 \text{ g D.W.}$ per individual was also observed and copper accumulation was higher in roots than in leaves for both species. The highest copper concentration was $19,29 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ D.W.}$ in the *S. auriculata* roots. In the condition without copper, macrophytes showed higher uptake rates at high nutrients concentrations ($2,0 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ D.W. d}^{-1}$ and $10 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ D.W. d}^{-1}$ in *P. stratiotes* and $1,5 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ D.W. d}^{-1}$ in *S. auriculata*), except for *S. auriculata* nitrogen uptake which remained constant ($3,80 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ D.W. d}^{-1}$) despite concentration variations. It was possible to evidence copper's toxic and lethal effect for the two species at concentration of $1 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$, as well as a total inhibition upon macrophyte's growth and nutrient uptake. Regarding nutrient removal, *P. stratiotes* is more efficient at high concentrations while *S. auriculata* shows a better performance at lower concentrations. *S. auriculata* is more suitable for copper contaminated aquatic environment remediation due to its greater metal accumulation potential in its biomass.

Keywords: Phytoremediation. Contamination. Eutrophication. Metals.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio	28
Figura 2 – Esquema simplificado do ciclo do fósforo.....	31
Figura 3 – Mecanismos de biorremediação de contaminantes por uma planta aquática. O contaminante (circulo vermelho) pode ser estabilizado ou degradado na rizosfera, imobilizado ou degradado dentro dos tecidos vegetais ou volatilizado.	34
Figura 4 – Desenho esquemático do experimento para análise da assimilação de fósforo e nitrogênio em cubas sem cobre ($2 \mu\text{g Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) e em cubas com cobre ($1 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) (Legenda: os pontos em preto indicam adição de cobre ao meio).....	39
Figura 5 – Condições de luminosidade e temperatura ao longo do experimento. As setas indicam os dias nos quais foi realizada a amostragem.	39
Figura 6 – Concentração de fósforo solúvel reativo (PSR) no meio de cultivo com <i>P. stratiotes</i> e com <i>S. auriculata</i> , nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre. (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).	49
Figura 7 – Concentração de nitrato no meio para <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> , nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre. (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).	50
Figura 8 - Concentração de fósforo total (PT) no meio de cultivo com <i>P. stratiotes</i> e com <i>S. auriculata</i> na condição sem cobre. (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).	51
Figura 9 – Concentração de clorofila- <i>a</i> no meio de cultivo com <i>P. stratiotes</i> e com <i>S. auriculata</i> nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)	52
Figura 10 – Concentração de fósforo orgânico particulado (POP) no meio de cultivo com <i>P. stratiotes</i> e com <i>S. auriculata</i> na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).....	53
Figura 11 – Taxa de assimilação de fósforo por grama de massa seca de macrófita (M.S.) em função da concentração de fósforo solúvel reativo (PSR) no meio para <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).....	54

Figura 12 – Taxa de assimilação de nitrato por grama de massa seca de macrófita (M.S.) em função da concentração nitrato (NO_3^-) no meio para <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)	55
Figura 13 – Imagens dos indivíduos de <i>P. stratiotes</i> sob as duas condições ao longo do experimento	56
Figura 14 - Imagens dos indivíduos de <i>S. auriculata</i> sob as duas condições ao longo do experimento	57
Figura 15 - Biomassa seca no início (dia 0) e no fim (dia 15) do experimento para <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> nas duas condições (sem cobre e com cobre) (Legenda: \square = média; * = outlier; \top = máximo ; \perp = mínimo; a linha inferior da caixa representa o primeiro quartil, a do meio a mediana e a superior o terceiro quartil)	58
Figura 16 – Comprimento da raiz no início (dia 0) e no fim (dia 15) do experimento para <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> nas duas condições (sem cobre e com cobre) (Legenda: \square = média; * = outlier ; \top = máximo ; \perp = mínimo; a linha inferior da caixa representa o primeiro quartil, a do meio a mediana e a superior o terceiro quartil)	59
Figura 17 – Conteúdo de fósforo total por grama de massa seca (M.S.) no tecido das macrófitas <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)	60
Figura 18 – Conteúdo de nitrogênio total por grama de massa seca (M.S.) no tecido das macrófitas <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)	60
Figura 19 – Concentração de cobre (Cu^{2+}) no meio de cultivo com <i>P. stratiotes</i> e com <i>S. auriculata</i> na condição com cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)	62
Figura 20 – Concentração de cobre por grama de massa seca (M.S.) no tecido das macrófitas <i>P. stratiotes</i> e <i>S. auriculata</i> nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração de amônio no meio de cultivo nas diferentes condições do experimento para as duas espécies de macrófitas aquáticas (N.D. = não detectado).	51
Tabela 2 – Concentrações de nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico no meio para a condição sem cobre no último dia de experimento (N.D. = não detectado).	52
Tabela 3 – Concentração das soluções estoque e quantidades necessárias para 1 litro de meio	79
Tabela 4 - Quantidades necessárias para o preparo de 1 L de solução estoque de metais traço	79

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1	Contaminação dos corpos hídricos	25
3.2	Os ciclos biogeoquímicos e os efeitos dos macropoluentes	26
3.2.1	Ciclo do nitrogênio	27
3.2.2	Ciclo do fósforo	30
3.3	Fitorremediação	33
4	MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1	Macrófitas aquáticas	37
4.2	Meio de cultivo	37
4.3	Delineamento experimental	38
4.4	Análise de nutrientes no meio.....	40
4.4.1	Nutrientes dissolvidos.....	40
4.4.2	Nutrientes totais	41
4.5	Correção dos nutrientes assimilados.....	43
4.5.1	Fósforo orgânico particulado (POP) e fósforo assimilado (P_{ass})	43
4.5.2	Nitrogênio orgânico (N_{org}) e nitrogênio assimilado (N_{ass}).....	44
4.6	Determinação de Clorofila- <i>a</i>	44
4.7	Análises das macrófitas	45
4.7.1	Determinação da massa fresca e das características morfológicas das macrófitas.....	45
4.7.2	Determinação da massa seca	45
4.7.3	Análise de nutrientes na biomassa	46
4.8	Determinação da concentração de cobre	47
4.9	Taxas de assimilação de nutrientes	47
4.10	Expressão dos resultados	48

5 RESULTADOS	49
5.1 Nutrientes dissolvidos.....	49
5.2 Nutrientes totais	51
5.3 Clorofila- <i>a</i> e fósforo particulado	52
5.4 Taxas de assimilação	53
5.5 Características morfológicas das macrófitas	55
5.6 Nutrientes na biomassa	60
5.7 Efeitos do cobre	61
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

A crescente poluição dos ecossistemas aquáticos com diversas substâncias químicas sintéticas e naturais é um dos principais problemas ambientais que tem comprometido os aspectos qualitativos dos recursos hídricos em escala global (SCHWARZENBACH et al., 2006). A poluição, tanto de origem pontual como difusa, implica em diversos efeitos adversos tanto nos ecossistemas aquáticos como na qualidade da água para consumo humano, além de afetar os serviços ambientais desenvolvidos por tais cursos de água (COSTANZA et al., 1997).

A presença em excesso de macronutrientes como o nitrogênio e o fósforo, que são nutrientes limitantes da produção primária, pode causar desde eutrofização, com consequentes florações de algas e cianobactérias, até a acidificação dos sistemas aquáticos (FILIPPELLI, 2008; GRUBER; GALLOWAY, 2008). Já o incremento de elementos traço tais como os metais (*e.g.* cobre, chumbo, arsênio) advindos do uso de pesticidas, fertilizantes, algicidas, entre outros, apresentam risco ambiental mesmo em baixas concentrações (SCHWARZENBACH et al., 2010). Como estes elementos não podem ser degradados naturalmente, apenas sofrem transformações químicas (*e.g.* complexação, mudança no estado de oxidação), eles tendem a se acumular nos ecossistemas e nos seres vivos, provocando alterações nas comunidades biológicas e possíveis danos à saúde humana (BEGHELLI et al., 2015; KHAN et al., 2000; MIRETZKY; SARALEGUI; CIRELLI, 2004; RAI et al., 2002).

Atualmente, vários ecossistemas aquáticos apresentam concentrações de metais que excedem os padrões estabelecidos para a proteção do ambiente, animais e seres humanos; entre eles o rio Ganga contaminado com cádmio, cromo e selênio, na Índia (PAUL, 2017), partes do rio Nilo e alguns lagos do Delta do Nilo no Egito contaminados por cádmio, cobre, chumbo níquel e zinco (NAGGAR; KHALIL; GHORAB, 2018), aquíferos contaminados com arsênio em Bangladesh (ALAM; SNOW; TANAKA, 2003), o rio Pilcomayo na Bolívia contaminado com arsênio, cádmio, chumbo e zinco por drenagem de mina (MILLER et al., 2004), reservatórios para abastecimento humano em Berlin contaminados com cobre (ZIETZ et al., 2003), entre outros.

Os danos causados pela exposição a metais são diversos. Por exemplo, o chumbo é extremamente tóxico e pode afetar o sistema nervoso, os rins e o sistema reprodutivo, o cádmio pode causar disfunção renal, degeneração óssea e danos ao fígado, o cobre pode causar danos renais e é tóxico para vários organismos aquáticos inclusive em concentrações

baixas (GAUTAM et al., 2014). Estes impactos se intensificam ao longo do tempo, dada a tendência dos metais a serem transportados nos sedimentos, serem persistentes no ambiente e bioacumuláveis na cadeia trófica (GAUTAM et al., 2014). Sendo assim, existe uma grande pressão para a remediação dos ambientes contaminados e a purificação dos recursos hídricos.

Existem várias tecnologias para a remediação de metais em água e efluentes, sejam elas de caráter físico, químico ou biológico. A precipitação, redução, filtração por membranas e a troca iônica são comumente utilizadas para a remoção de metais, porém são métodos de alto custo e geram grandes quantidades de resíduos (RAI, 2008). Assim, a fitorremediação se apresenta como uma alternativa versátil e de baixo custo para o tratamento de ecossistemas aquáticos contaminados, já que permite o uso de plantas e da comunidade microbiana aderida às suas raízes, para estabilizar, remover, sequestrar e/ou degradar os contaminantes orgânicos e inorgânicos, incluídos entre eles os nutrientes como o nitrogênio e fósforo e os metais (CHAMPAGNE, 2007; PILON-SMITS, 2005).

Dentro da área de fitorremediação, os *wetlands* construídos têm sido utilizados para o tratamento de efluentes, principalmente em pequenas áreas urbanas, e para o controle de eutrofização em lagos (HORNE, 2000; RAI, 2008). Espécies de macrófitas aquáticas como *Typha* sp., *Myriophyllum* sp., *Azolla* sp., *Lemna* sp., *Eichhornia crassipes*, são comumente empregadas nestes processos (PILON-SMITS, 2005). Por sua vez, espécies do gênero *Eichhornia*, *Pistia* e *Salvinia* exibem um grande potencial para serem utilizadas tanto na remoção de nutrientes em ambientes eutrofizados, como na remoção de metais (GEORGE; GABRIEL, 2017; LU et al., 2010; POLOMSKI et al., 2009; VICTOR et al., 2016).

Porém, para a remediação de metais, as macrófitas precisam ter uma capacidade elevada de bioacumulação e uma boa tolerância a altas concentrações do metal por longos períodos (RAI et al., 2002). Caso contrário, os metais podem causar mudanças fisiológicas e morfológicas na planta, danos na função celular e diminuição das taxas de fotossíntese, levando a clorose, descoloração, deficiência de nutrientes e estresse oxidativo (GAUTAM et al., 2014).

Estes sintomas de toxicidade podem prejudicar a eficiência de remoção de nutrientes das macrófitas quando utilizadas no controle da eutrofização. Assim, o estudo do crescimento e da eficiência da remoção de nutrientes sob condições de estresse por metais em macrófitas aquáticas é importante quando se visa o uso destas para ambos os propósitos.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a influência do cobre sobre a assimilação de nutrientes pelas macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia auriculata* Aubl.. Assim, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- i) Comparar a influência do cobre na capacidade de absorção de nitrogênio e fósforo pelas duas espécies de macrófitas.
- ii) Determinar as taxas de assimilação de nitrogênio e de fósforo e a sua diferença entre a condição normal e a condição com exposição cobre.
- iii) Identificar as possíveis alterações morfológicas em ambas as espécies ocasionadas pela exposição ao cobre.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Contaminação dos corpos hídricos

A constante pressão sobre os recursos hídricos causada pelas atividades humanas, principalmente relacionadas ao crescimento populacional e ao desenvolvimento econômico, tem provocado impactos negativos tanto na qualidade como na disponibilidade de água, levando à perturbação do equilíbrio natural e à degradação dos sistemas aquáticos (UNESCO, 2009).

Os efeitos da contaminação hídrica sobre a saúde humana são bem conhecidos, especialmente quando se trata de doenças ocasionadas pela falta de saneamento básico e do acesso à água potável. Assim, mais de um terço da população mundial é afetada e entre 5 a 10 milhões de mortes anuais são causadas por doenças de veiculação hídrica, sendo estas em sua maioria crianças (AHUJA, 2009; SCHWARZENBACH et al., 2010). Além das doenças de veiculação hídrica, a crescente poluição das águas também tem se tornado uma preocupação em destaque em diversos países. Hoje em dia, estima-se que aproximadamente 69% da água doce acessível é utilizada para fins agrícolas, principalmente irrigação, 22% para propósitos industriais, 8% para uso doméstico e 1% para uso recreativo (DU PLESSIS, 2017). Tanto estas atividades humanas como a disposição inadequada de efluentes, acabam por contaminar os recursos hídricos com diversos compostos sintéticos e de origem natural (SCHWARZENBACH et al., 2006).

As fontes dos contaminantes químicos são diversas, destacando-se entre elas os efluentes de águas residuais com diversas substâncias orgânicas (KOLPIN et al., 2004) e a poluição difusa advinda de atividades agrícolas, a qual contribui com aproximadamente 40 milhões de toneladas apenas de nitrogênio aos oceanos por ano, através da deposição atmosférica e o transporte por rios (FAO; IWMI, 2018; PEÑUELAS et al., 2013).

Os poluentes químicos presentes nas águas podem ser classificados em dois grandes grupos. Os macropoluentes, que ocorrem usualmente a níveis de concentração de miligramas por litro e incluem nutrientes como o nitrogênio e fósforo, assim como compostos orgânicos naturais (*e.g.* fibra de celulose, amido, hemicelulose e carboidratos) (FILIPPELLI, 2008; GRUBER; GALLOWAY, 2008; JORGENSEN, 2009). Os micropoluentes ou elementos traço, que ocorrem a níveis de concentração de nanograma a micrograma por litro, os quais podem exibir efeitos tóxicos inclusive em baixas concentrações (SCHWARZENBACH et al., 2010; TSUCHIYA, 2010).

A introdução antrópica de nitrogênio e fósforo tem levado à perturbação dos ciclos biogeoquímicos e a diversos problemas ambientais, que vão desde a eutrofização e acidificação dos sistemas aquáticos até florações tóxicas de cianobactérias (FILIPPELLI, 2008; GRUBER; GALLOWAY, 2008). Por outro lado, os efeitos dos micropoluentes sobre os ecossistemas e a saúde humana são diversos e dependem da natureza e origem do contaminante. Alguns destes são persistentes no ambiente e altamente tóxicos (por exemplo, contaminantes orgânicos como o diclorodifeniltricloroetano - DDT), outros podem ser biotransformados a compostos mais nocivos (como o caso do nonilfenol derivado dos detergentes) ou bioacumulados ao longo da cadeia trófica (como as bifenilas policloradas – PCB e os metais) (SCHWARZENBACH et al., 2006).

Dado o crescimento excessivo de fitoplâncton causado pela eutrofização artificial, a aplicação de sulfato de cobre como algicida em reservatórios paulistas (*e.g.* reservatórios Guarapiranga, Billings, Barra Bonita) tem se tornado uma prática recorrente (BEGHELLI et al., 2015). Isto apresenta potenciais efeitos adversos, pois, os metais (neste caso o cobre), diferente dos compostos orgânicos, não podem ser degradados, motivo pelo qual se acumulam e contaminam os corpos hídricos, os sedimentos e a biota, além de produzir alterações na estrutura e composição das comunidades zooplancônica e fitoplanctônica (BEGHELLI et al., 2015; MIRETZKY; SARALEGUI; CIRELLI, 2004). A presença de metais na água de lagos, reservatórios e rios pode causar graves danos à saúde da população que faz uso deste recurso como água de abastecimento/irrigação e/ou que consomem produtos alimentícios advindos ecossistemas contaminados (*e.g.* peixes, plantas) (KHAN et al., 2000; RAI et al., 2002).

3.2 Os ciclos biogeoquímicos e os efeitos dos macropoluentes

Os ciclos biogeoquímicos são sistemas nos quais os elementos químicos circulam por meio de processos biológicos, físicos, químicos e geológicos na biosfera. Neles, a matéria sempre se conserva e os elementos se deslocam entre grandes reservatórios através de fluxos bidirecionais, sendo estocados em locais ou formas com diferentes disponibilidades aos seres vivos (GALLOWAY et al., 2014). As atividades humanas têm afetado praticamente todos os maiores ciclos biogeoquímicos (carbono, nitrogênio e fósforo). Nos últimos 100 anos, a intervenção humana tem aumentado o fluxo, do seu reservatório para o ambiente, dos elementos carbono, nitrogênio e fósforo em 13%, 108% e 400%, respectivamente (FALKOWSKI et al., 2012).

3.2.1 Ciclo do nitrogênio

O nitrogênio é um elemento essencial para os seres vivos, sendo um constituinte fundamental de moléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos (MARKOV, 2012). Porém, sua disponibilidade em formas assimiláveis por plantas tanto em ecossistemas aquáticos como terrestres é baixa, tornando-o um elemento limitante da produção primária na biosfera (GRUBER; GALLOWAY, 2008).

O principal reservatório de nitrogênio é a atmosfera, aproximadamente, 78% de sua composição é nitrogênio molecular (N_2) ou não reativo, sendo esta uma forma inacessível à maioria dos seres vivos, dada a força da ligação tripla da molécula e sua estabilidade (GALLOWAY et al., 2004; MARTINS et al., 2003). Apenas um número limitado de microrganismos procariontes detém a capacidade de captar e converter o nitrogênio molecular presente na atmosfera em nitrogênio reativo, ou seja, uma forma disponível para os seres vivos (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013; GALLOWAY et al., 2004).

Existem quatro processos principais no ciclo do nitrogênio: fixação, amonificação, nitrificação e desnitrificação (MARKOV, 2012). A captação e transformação de nitrogênio gasoso em amônia (NH_3) ou íons amônio (NH_4^+) por determinados microrganismos (bactérias e cianobactérias) presentes no solo, nas raízes de plantas leguminosas ou na água, é conhecida como fixação biológica e é responsável por 90% da fixação de origem natural (

Figura 1) (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013; MARTINS et al., 2003). As descargas de relâmpagos também podem fixar nitrogênio gasoso a amônia ou outras formas oxidadas, sendo este um processo físico conhecido como fixação atmosférica de nitrogênio (MARKOV, 2012; MARTINS et al., 2003).

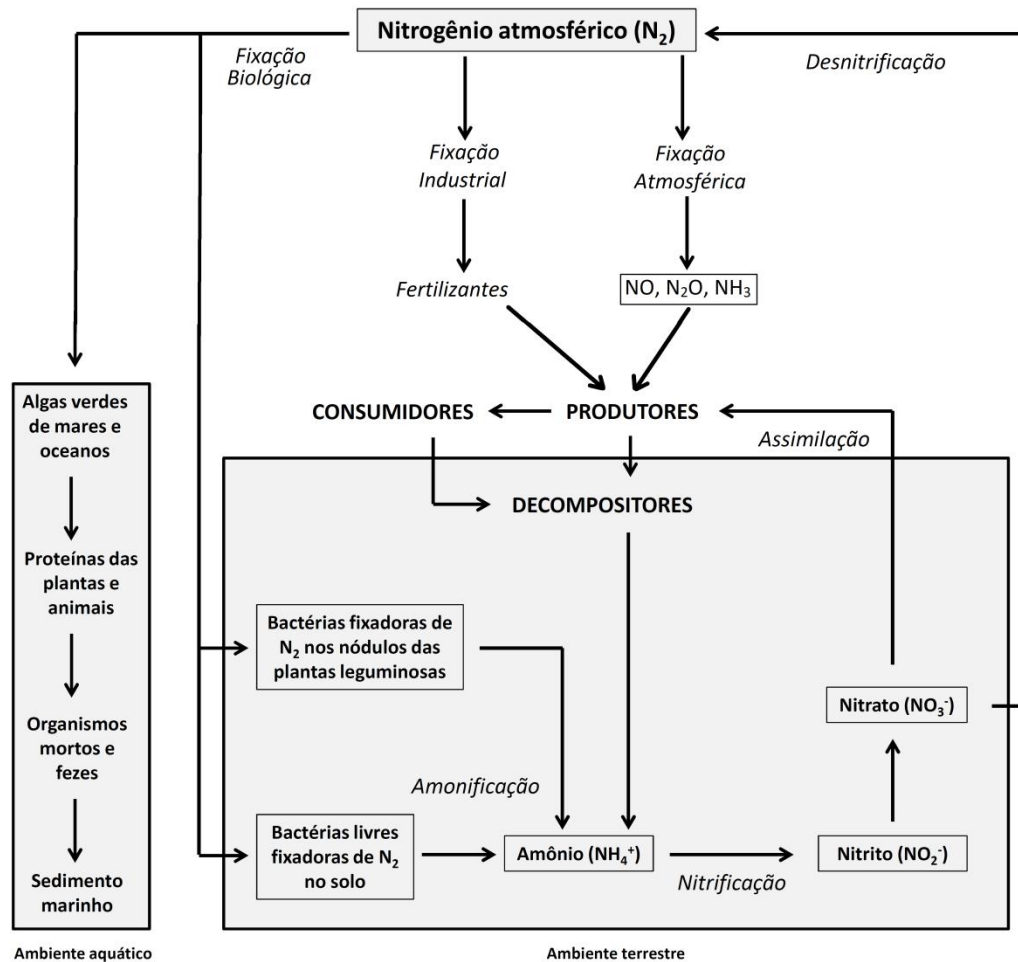
Além da fixação natural de nitrogênio, existe a fixação industrial (

Figura 1) a partir do processo Haber-Bosch, no qual o nitrogênio gasoso é convertido em amônia por reação química com o hidrogênio a elevada temperatura e pressão (VIEIRA, 2017). Os fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura são feitos com base neste processo (MARKOV, 2012).

Após ser incorporado às moléculas orgânicas, o nitrogênio passa por vários processos de oxidação, começando pela amonificação. Neste, amônia ou íons amônio são produzidos por seres vivos através de suas excretas ou quando o material orgânico morto presente no solo

é decomposto por microrganismos (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013; MARKOV, 2012).

Figura 1 – Esquema simplificado do ciclo do nitrogênio



Fonte: Adaptado de Calijuri, Cunha e Moccellini (2013).

Posteriormente, a amônia é oxidada a nitrito e nitrato no processo de nitrificação, o qual ocorre em duas etapas sequenciais por parte de dois grupos de bactérias: as oxidadoras de amônia, que transformam a amônia em nitrito (nitrosação), e as oxidadoras de nitrito, que convertem o nitrito em nitrato (nitratação) (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013; MARKOV, 2012). Em seguida, o nitrato é assimilado pelas plantas para a composição de proteínas e ácidos nucleicos, incorporando o nitrogênio na biomassa das plantas e possibilitando sua passagem a níveis tróficos superiores via cadeia alimentar (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013).

Finalmente, o nitrato é reduzido a espécies de nitrogênio na forma gasosa (*e.g.* N₂, N₂O, NO) por parte de bactérias no solo, através do processo de desnitrificação. Assim, o nitrogênio é liberado à atmosfera nas suas formas gasosas, fechando o ciclo (MARKOV, 2012).

Atualmente, as atividades antrópicas tem alterado o ciclo do nitrogênio, transformando o nitrogênio gasoso (N₂) em formas reativas. Existem três atividades principais que interferem no ciclo, a produção de fertilizantes nitrogenados, a produção de energia e o cultivo intensivo de leguminosas (GALLOWAY et al., 1995; VITOUSEK et al., 1997). A adição de nitrogênio ao ambiente por parte do uso de fertilizantes e a queima de combustíveis tem somado um total de 160 Tg de N por ano, superando a fixação biológica de nitrogênio tanto na esfera terrestre (110 Tg) como na oceânica (140 Tg), e a tendência é continuar aumentando dado o crescimento populacional e sua crescente demanda por alimentos e energia (GRUBER; GALLOWAY, 2008).

Porém, existem fatores preocupantes em relação ao aumento do nitrogênio reativo que levam a diversos impactos no ambiente. Primeiro, ele é facilmente disperso através de processos de transporte atmosférico e hidrológico; segundo, as taxas de formação de nitrogênio reativo são maiores que as de remoção, resultando no acúmulo do mesmo nos ecossistemas (GALLOWAY et al., 2003). Alguns dos principais impactos no meio ambiente causados pelo aumento de nitrogênio reativo nos ecossistemas são:

- Produção de ozônio troposférico e formação de *smog* fotoquímico a partir de precursores como NO e NO₂ na atmosfera, associado a doenças respiratórias (WOLFE; PATZ, 2002).
- O nitrogênio reativo junto com o enxofre contribui para a acidificação de solos, rios e lagos e para o aumento da transferência de nitrogênio dos rios aos estuários e zonas costeiras (VITOUSEK et al., 1997).
- O enriquecimento de lagos, rios e águas costeiras com nutrientes como o nitrogênio e fósforo aumenta a produtividade primária destes sistemas causando eutrofização e os consequentes problemas associados, como depleção do oxigênio dissolvido (hipóxia e anóxia), mudança na estrutura das comunidades aquáticas e perda de biodiversidade (HOWARTH et al., 2000).

- As espécies reativas de nitrogênio contribuem para a mudança climática global e a redução da camada de ozônio estratosférico (GALLOWAY et al., 2003).

3.2.2 Ciclo do fósforo

Assim como o nitrogênio, o fósforo é um participante fundamental das reações biológicas e um nutriente limitante da produtividade primária dos ecossistemas; ele compõe os ácidos desoxirribonucleico (ADN) e ribonucleico (ARN), participa da transferência de energia (adenosina trifosfato - ATP) e cumpre a função de suporte estrutural nas membranas celulares (fosfolipídios) e nos ossos dos organismos (hidroxiapatita) (RUTTENBERG, 2003). Porém, diferentemente do nitrogênio, que se encontra disponível em um grande reservatório atmosférico, a disponibilidade de fósforo nos ecossistemas depende da sua taxa de liberação durante o intemperismo dos solos, rochas e minerais (FILIPPELLI, 2002).

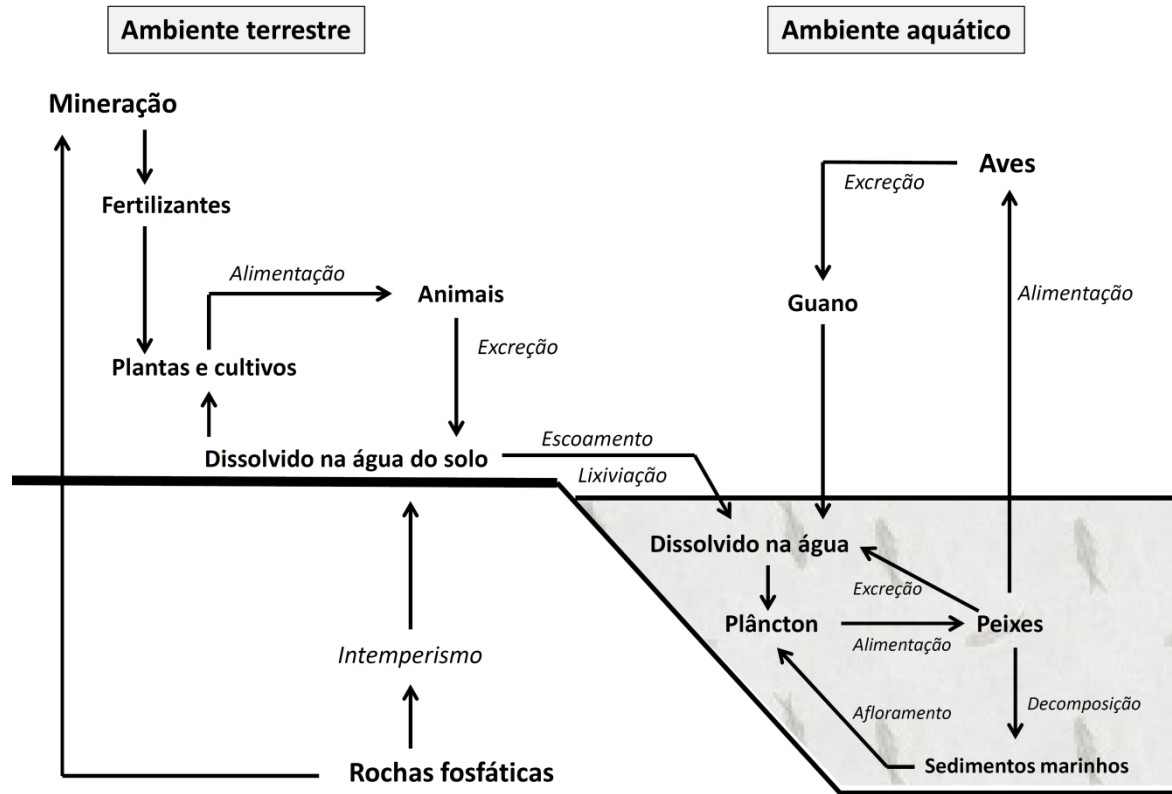
O ciclo do fósforo é um ciclo sedimentar e seus principais reservatórios são a litosfera (rochas fosfatadas) e os sedimentos marinhos (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013). O ciclo é composto por quatro fases principais: i) elevação da crosta terrestre e exposição das rochas ricas em fósforo ao intemperismo, ii) erosão e intemperismo químico das rochas produzindo fósforo particulado e dissolvido nos solos e possibilitando seu deslocamento até os rios, iii) transporte do fósforo até lagos e oceanos através de rios, iv) sedimentação do fósforo por deposição de matéria orgânica e mineral e incorporação às camadas sedimentares (RUTTENBERG, 2003).

Inicialmente, o fósforo é liberado das rochas ou sedimentos na forma de minerais de apatita por meio do intemperismo e, posteriormente, é convertido a ortofosfatos solúveis através de reações biogeoquímicas, ficando disponível aos seres vivos (FILIPPELLI, 2002; RUTTENBERG, 2003). Na sua forma biodisponível, o ortofosfato é assimilado pelos produtores, convertido em uma forma orgânica e incorporado ao tecido das plantas, entrando assim na cadeia alimentar terrestre (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013; FILIPPELLI, 2008). Posteriormente, a biomassa produzida é depositada no solo e sedimentos e serve como fonte de nutrientes e energia para os microrganismos, os quais oxidam a matéria orgânica liberando fosfato ao meio (FILIPPELLI, 2008; RUTTENBERG, 2003).

O excesso de fósforo não assimilado no meio terrestre é transportado pelos rios até os oceanos, onde é captado por fitoplâncton, entrando na cadeia alimentar, ou é estocado em reservatórios profundos (CALIJURI; CUNHA; MOCCELLIN, 2013). Já nos reservatórios oceânicos, o fósforo contido nos sedimentos marinhos é incorporado à crosta terrestre através

da subducção das placas oceânicas, voltando assim ao seu reservatório principal (RUTTENBERG, 2003). Na Figura 2 encontra-se um desenho esquemático simplificado do ciclo do fósforo.

Figura 2 – Esquema simplificado do ciclo do fósforo



Fonte: Calijuri, Cunha e Moccellin (2013).

O ciclo atual do fósforo é totalmente influenciado pela agricultura e as atividades humanas. Desde que se tem conhecimento da importância do fósforo para o crescimento das plantas, a mineração de rochas com minerais fosfatados para seu uso em fertilizantes agrícolas tem aumentado e vem se intensificando nos últimos 50 anos (RUTTENBERG, 2003). A aplicação destes fertilizantes nos solos implica a liberação de fósforo solúvel ao ambiente terrestre.

Outras atividades que contribuem para o aumento da liberação de fósforo solúvel são o desmatamento (e conseqüente perda de solo) e a disposição inadequada de efluentes domésticos e industriais (FILIPPELLI, 2008). Os processos erosivos posteriores ao desmatamento provocam a perda das camadas superficiais do solo, as quais são ricas em fósforo orgânico passível de solubilização. Os dejetos humanos e os efluentes de indústrias alimentícias e de detergentes também são fontes antropogênicas de fósforo reativo (FILIPPELLI, 2002).

A liberação de fósforo solúvel ao ambiente por atividades humanas tem contribuído significativamente no ciclo deste elemento, resultando em elevadas concentrações de fósforo particulado e dissolvido nos rios, o que aumentou a contribuição da fração dissolvida dos continentes para os oceanos significativamente em relação às contribuições naturais (FILIPPELLI, 2008). Da mesma forma que o nitrogênio, a elevada concentração de fósforo na água leva à eutrofização dos ecossistemas aquáticos continentais e das áreas costeiras. Altas concentrações de fósforo também podem levar ao aumento da produtividade biológica nos oceanos, assim como estimular florações de algas e o desenvolvimento de condições de anóxia e hipóxia, as quais são nocivas ou inclusive letais aos organismos aquáticos aeróbios (FILIPPELLI, 2008; RUTTENBERG, 2003).

Dados os impactos ambientais produzidos pelo aumento nos fluxos de nutrientes dos seus respectivos reservatórios (atmosfera e litosfera) para os ecossistemas, a procura por alternativas de tratamento e remediação tem se tornado uma necessidade. Com relação à restauração de ambientes eutrofizados, principalmente lagos e reservatórios, diversas práticas tem sido aplicadas, sendo algumas delas:

- Remoção da água de estratos inferiores (hipolímnio) em lagos ou reservatórios estratificados e dragagem de sedimentos. Estas técnicas apresentam um custo elevado dada a necessidade de tratamento e disposição de grandes volumes de resíduos e podem gerar problemas como liberação de contaminantes do sedimento à coluna da água, como no caso da dragagem, ou contaminação das águas à jusante, no caso da remoção da água do hipolímnio sem tratamento posterior (ZAMPARAS; ZACHARIAS, 2014).
- Tratamento químico utilizando materiais adsorventes como óxidos de ferro e alumínio, lama vermelha, cinzas de carvão, carbonatos, zeólitas, entre outros (ZAMPARAS et al., 2012; ZAMPARAS; ZACHARIAS, 2014). Porém, alguns destes compostos possuem desvantagens, tais como suscetibilidade ao pH do meio ou possível formação de espécies nocivas ou complexos orgânicos de baixo peso molecular mais biodisponíveis (ZAMPARAS et al., 2012; ZAMPARAS; ZACHARIAS, 2014).

Sendo necessárias alternativas de baixo custo e sem efeitos indesejados, o uso da biotecnologia se apresenta como uma opção prática e economicamente vantajosa para resolver problemas de contaminação. Entre as técnicas utilizadas encontram-se a biorremediação e a fitorremediação. A biorremediação é o conjunto de processos ou técnicas (controladas ou espontâneas) nas quais a atividade microbiana age sobre os poluentes, remediando ou

eliminando a contaminação presente na água, nos efluentes, nos solos, etc. (ALVAREZ; ILLMAN, 2006). Já a fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas para a remediação de água e solos contaminados por poluentes orgânicos ou inorgânicos (SOUZA et al., 2011).

3.3 Fitorremediação

A fitorremediação se define como o uso especializado de plantas, tanto *in-situ* como *ex-situ*, para a remoção ou controle de contaminantes, ou para posterior degradação dos contaminantes por microrganismos presentes nas mesmas (CHAMPAGNE, 2007). Foi formalmente proposta e definida cientificamente no final da década de 1970 e desde então, a sua pesquisa, desenvolvimento e aplicação como método de remediação de solos, sedimentos, lodos, efluentes e águas superficiais e subterrâneas tem aumentado significativamente dado seu baixo custo e versatilidade (CARMAN; CROSSMAN, 2001).

Esta tecnologia utiliza os processos naturais pelos quais as plantas e os microrganismos presentes na rizosfera estabilizam, removem, sequestram e/ou degradam os contaminantes orgânicos e inorgânicos (CHAMPAGNE, 2007; PILON-SMITS, 2005). Existem cinco tipos principais de fitorremediação (PILON-SMITS, 2005):

a) Fitoestabilização: nesta, as plantas estabilizam o poluente no solo reduzindo sua biodisponibilidade ou limitando seus meios de transporte. No solo e na água subterrânea, as plantas podem imobilizar os contaminantes através da absorção e acumulação dentro das raízes, da adsorção na superfície radicular ou da precipitação na rizosfera (Figura 3) ou simplesmente pela estabilização física do solo, evitando seu transporte por erosão (CHAMPAGNE, 2007).

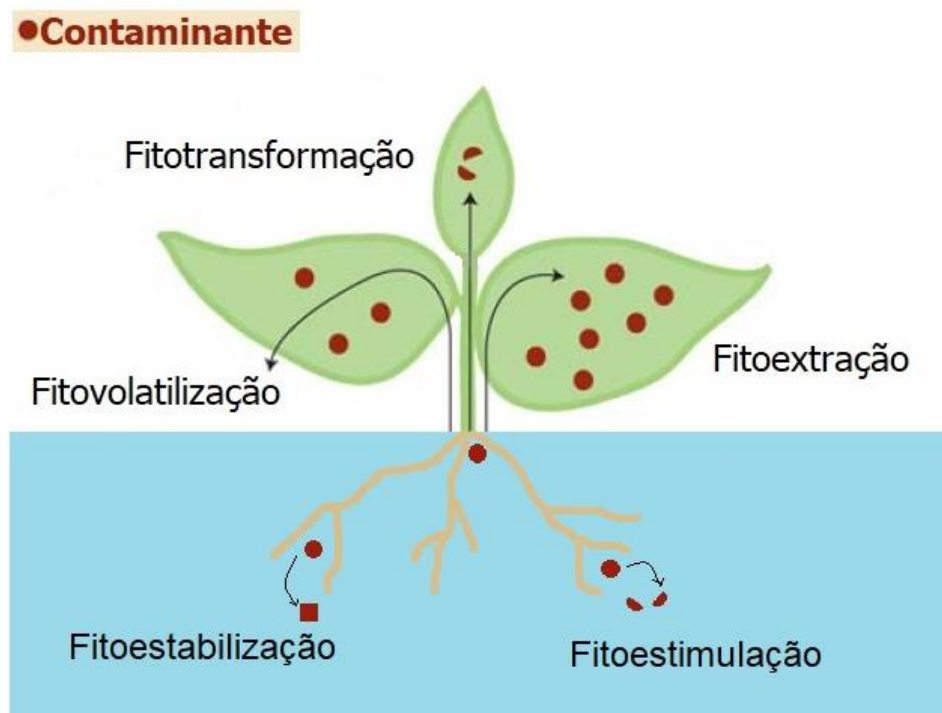
b) Fitoextração: na qual os poluentes são removidos do meio e acumulados nos tecidos da planta. Neste processo, as plantas assimilam, translocam e acumulam os contaminantes nas suas raízes, caule e folhas (Figura 3).

c) Fitoestimulação ou rizodegradação: nesta as plantas facilitam a biodegradação dos contaminantes orgânicos graças à atividade microbiana na rizosfera (Figura 3). Os microrganismos consomem e degradam ou transformam os contaminantes utilizando-os como fonte de nutrientes.

d) Fitotransformação: consiste na decomposição dos poluentes orgânicos assimilados pela planta por meio de processos metabólicos da mesma (Figura 3). Neste caso, os contaminantes podem ser degradados, utilizados como nutrientes e incorporados aos tecidos vegetais ou transformados em subprodutos que são liberados novamente ao ambiente.

e) Fitovolatilização: consiste na assimilação e liberação do contaminante (ou alguma forma modificada do mesmo) para a atmosfera por meio da transpiração vegetal (Figura 3).

Figura 3 – Mecanismos de biorremediação de contaminantes por uma planta aquática. O contaminante (circulo vermelho) pode ser estabilizado ou degradado na rizosfera, imobilizado ou degradado dentro dos tecidos vegetais ou volatilizado.



Fonte: Adaptado de Pilon-Smits (2005).

Entre os contaminantes que podem ser mitigados utilizando a fitorremediação, encontram-se os metais, metaloides, radionuclídeos, sais, nutrientes, compostos orgânicos xenobióticos, entre outros (CHAMPAGNE, 2007).

Por exemplo, *wetlands* construídos têm sido utilizados para a remediação de diversos contaminantes inorgânicos, tais como metais, selênio, perclorato, cianeto, nitrato e fosfato, sendo aplicados satisfatoriamente para o controle de eutrofização em lagos (*e.g.* Prado Constructed Wetland na Califórnia) (HORNE, 2000). Por outro lado, *wetlands* também têm sido usados na remoção de metais, com um foco mais próximo à fitoestabilização do que à fitoextração. Na fitoestabilização, as plantas são utilizadas para imobilizar os metais e estocá-los sob a superfície nas suas raízes e/ou no solo. Em contraste, na fitoextração são utilizadas plantas hiperacumuladoras para remover os metais do solo e concentrá-los nos tecidos que se encontram acima do solo (folhas e caule); estas plantas devem ser colhidas e dispostas adequadamente para evitar a reciclagem do metal acumulado durante a posterior decomposição das mesmas (WEIS; WEIS, 2004).

Para serem empregadas em processos de fitorremediação, as plantas devem possuir características específicas como boa capacidade de absorção, raízes longas, taxa de crescimento acelerada, elevada biomassa, serem fáceis de coletar e ter grande resistência ao poluente (COUTINHO; BARBOSA, 2007). Em *wetlands* construídos para fitorremediação, uma grande variedade de espécies de macrófitas aquáticas é utilizada, sejam elas emersas, submersas ou flutuantes. Entre as espécies mais comuns se encontram a *Typha* sp., *Myriophyllum* sp., *Azolla* sp., *Lemna* sp., *Eichhornia crassipes*, entre outros (PILON-SMITS, 2005).

No Brasil, o emprego de técnicas de fitorremediação é recente e seu uso é mais difundido em países de Estados Unidos e Europa, principalmente na remediação de ambientes contaminados com metais, onde já foram identificadas espécies com boa eficiência de remoção (SANTOS et al., 2004). Alguns estudos apontam que espécies como *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes* exibem altas taxas de assimilação de nitrogênio e fósforo (e.g. 190–329 kg N ha⁻¹ ano⁻¹ e 25– 34 kg P ha⁻¹ ano⁻¹ no caso da *Pistia stratiotes*), apresentando assim um grande potencial para a remoção destes nutrientes em ambientes eutrofizados (LU et al., 2010; POLOMSKI et al., 2009). Por outro lado, as espécies anteriormente mencionadas junto com *Salvinia molesta* também apresentam potencial para remoção de metais (GEORGE; GABRIEL, 2017; VICTOR et al., 2016).

Lu et al. (2010) realizaram experimentos com *P. stratiotes* para a remediação da qualidade da água em bacias de detenção de drenagem pluvial. Como resultado, os autores obtiveram uma melhoria geral na qualidade da água, reduzindo a turbidez, os sólidos suspensos e a concentração de nutrientes. A remoção de nitrogênio inorgânico (NH₄⁺ e NO₃⁻) foi de 50% e a de fósforo solúvel reativo (PO₄³⁻) e fósforo total esteve entre 14 – 31%.

Petrucio e Esteves (2000) testaram a capacidade de remoção de nitrogênio e fósforo da *Eichhornia crassipes* e da *Salvinia auriculata*, onde *Eichhornia crassipes* apresentou as maiores taxas de redução de nutrientes. Os autores também observaram que a concentração de nutrientes influencia na assimilação, pois, em maiores concentrações, a porcentagem de absorção de nutrientes diminuiu. Os autores explicam que a absorção diminuiu dado que se atinge a capacidade de saturação de assimilação de nutrientes.

Polomski et al. (2009) testaram *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Myriophyllum aquaticum* em *wetlands* construídos em escala de laboratório, a fim de avaliar seu potencial para o tratamento de água de escoamento de viveiros e estufas utilizados no cultivo de plantas. Os autores obtiveram uma remoção de 96% de nitrogênio e de 93% de fósforo. As maiores taxas de assimilação de nitrogênio no tecido vegetal foram obtidas por *E. crassipes* e

P. stratiotes, enquanto que as taxas de assimilação de fósforo foram similares nas três espécies.

George e Gabriel (2017) estudaram o potencial remediador de metais da *Salvinia molesta* usando efluentes industriais com baixas concentrações de metais (e.g. 0,005 – 0,01 mg Cu⁺² L⁻¹ e 0,009-0,775 mg Fe⁺² L⁻¹). Os resultados mostraram uma redução significativa na concentração de metais, principalmente cobre e ferro, cujos valores de concentração ficaram abaixo do limite de detecção (0,001 mg L⁻¹).

Victor et al. (2016) testaram *Eichhornia crassipes* e *Pistia stratiotes* no tratamento de efluentes industriais com baixas concentrações de metais (e.g. 0,21 mg Zn⁺² L⁻¹, 0,16 mg Cu⁺² L⁻¹ e 0,12 mg Cu⁺² L⁻¹) em um experimento de 20 dias. Neste caso foi obtida uma remoção de mais de 50% de zinco, cobre, cromo e chumbo. Os autores relataram que a remoção de metais foi mais rápida nos primeiros 10 dias. Após esse tempo, a raiz atinge a saturação e, dado os baixos valores do fator de translocação das duas espécies, a assimilação se torna mais lenta.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Macrófitas aquáticas

Para o desenvolvimento do projeto foram escolhidas duas espécies de macrófitas aquáticas: *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia auriculata* Aubl. (SISGEN: A913E9D). Ambas as espécies são flutuantes de vida livre e nativas dos ecossistemas aquáticos continentais brasileiros (BRASIL, 2018).

A *Pistia stratiotes* (Magnoliophyta), popularmente conhecida como alface-d'água, é uma angiosperma da família Araceae que possui distribuição pantropical e subtropical (EPPO, 2017). É muito utilizada para ornamentação e na piscicultura, além de possuir grande potencial para ser utilizada na fitorremediação de nutrientes e de metais em corpos hídricos (FONKOU et al., 2002; VICTOR et al., 2016).

Pertencente à família Salviniaceae, a espécie *Salvinia auriculata* (Pteridophyta), conhecida popularmente como orelha-de-onça, encontra-se amplamente distribuída na América tropical (FORNO, 1983). Da mesma forma que a *P. stratiotes*, esta macrófita aquática também tem sido utilizada para fins ornamentais em aquários, lagos, parques e jardins, e seu uso para a remediação da poluição hídrica também tem sido estudado (KISSMANN, 1997; VIEIRA et al., 2015). *S. auriculata* é composta por frondes, os quais consistem em nós formados por 2 folhas e 1 folha modificada semelhante a uma raiz (JULIEN; BOURNE, 1986). No presente trabalho, esta folha modificada foi denominada como raiz.

Os indivíduos das duas espécies foram obtidos do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada da Universidade de São Paulo (CRHEA – USP). As macrófitas se encontravam inicialmente em mesocosmos e foram isoladas para cultivo em caixas da água com 5 kg de adubo orgânico, 100 g de fertilizante NPK e solo do local como sedimento.

4.2 Meio de cultivo

O meio de cultivo utilizado para o crescimento das macrófitas em laboratório foi a Solução 2 de Arnon e Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950) modificada (Anexo I). Esta solução é composta por elementos minerais essenciais para o crescimento de plantas e utilizada, principalmente, em sistemas hidropônicos e no cultivo de plantas aquáticas

(TREJO-TÉLLEZ; GÓMEZ-MERINO, 2012). Como a concentração de sais nesta solução é muito elevada (e.g. 820 mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \text{ L}^{-1}$), alguns autores recomendam utilizar diluições da solução original para o cultivo, sendo algumas destas: 10%, 25%, 30% e 50% (CANCIAN; CAMARGO; SILVA, 2009; COMETTI et al., 2008; SASSAKI; FELIPPE, 1998). No caso do presente experimento, foi utilizada uma diluição de 10% da solução original.

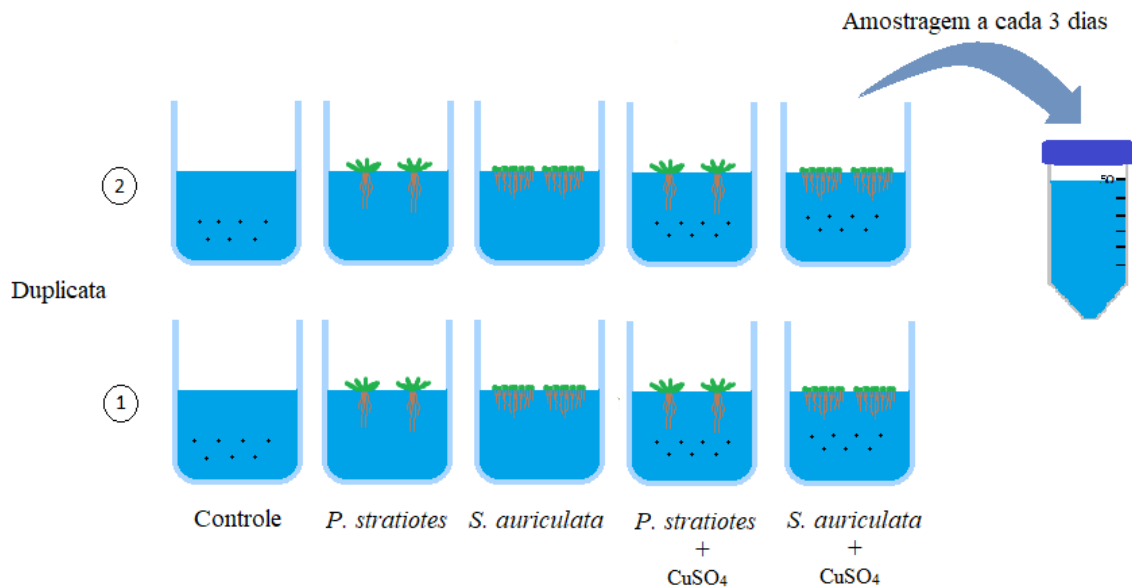
4.3 Delineamento experimental

O experimento consistiu no cultivo das macrófitas *P. stratiotes* e *S. auriculata* em cubas de vidro (25 cm de altura x 20 cm diâmetro), cada uma contendo 4 L de meio Arnon e Hoagland modificado (HOAGLAND; ARNON, 1950), sob duas condições: (1) sem a adição de cobre (Cu^{2+}), tendo aproximadamente $2 \mu\text{g Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ provenientes da solução de metais traço do próprio meio; (2) com a adição de sulfato de cobre (CuSO_4) ao meio de cultivo (Figura 4). A concentração de sulfato de cobre aplicada ao meio foi calculada a partir da concentração máxima de cobre recomendada para o controle aquático de algas e cianobactérias em ecossistemas aquáticos, sendo esta de 1 mg L^{-1} de Cu^{2+} (USEPA, 2009).

Todos os indivíduos de *P. stratiotes* e *S. auriculata* a serem utilizados no experimento foram lavados com água corrente e água deionizada para a remoção do material residual aderido às raízes e folhas, tanto no início do experimento como no final (para a análise de nutrientes na biomassa) e aclimatados nas condições do experimento durante 1 semana. Cada cuba continha 6 indivíduos da mesma espécie, todos com aproximadamente o mesmo tamanho, no caso da *P. stratiotes* todas possuíam 4 folhas e no da *S. auriculata* todos possuíam 6 frondes, de modo que o total de indivíduos ocupasse a mesma área superficial nas cubas de cada espécie. Cada experimento foi realizado em duplicata e as cubas controle do experimento continham apenas o mesmo meio de cultivo com a adição de CuSO_4 , porém, sem as macrófitas.

A amostragem de meio para análise de nutrientes e de clorofila-*a* foi realizada a cada 3 dias. O volume máximo retirado das cubas na amostragem, ao final do experimento, não ultrapassou 15% do volume total do meio, inclusive nas cubas nas quais foi analisado fósforo total. O experimento teve uma duração de 15 dias, totalizando 6 dias amostrais (Figura 4).

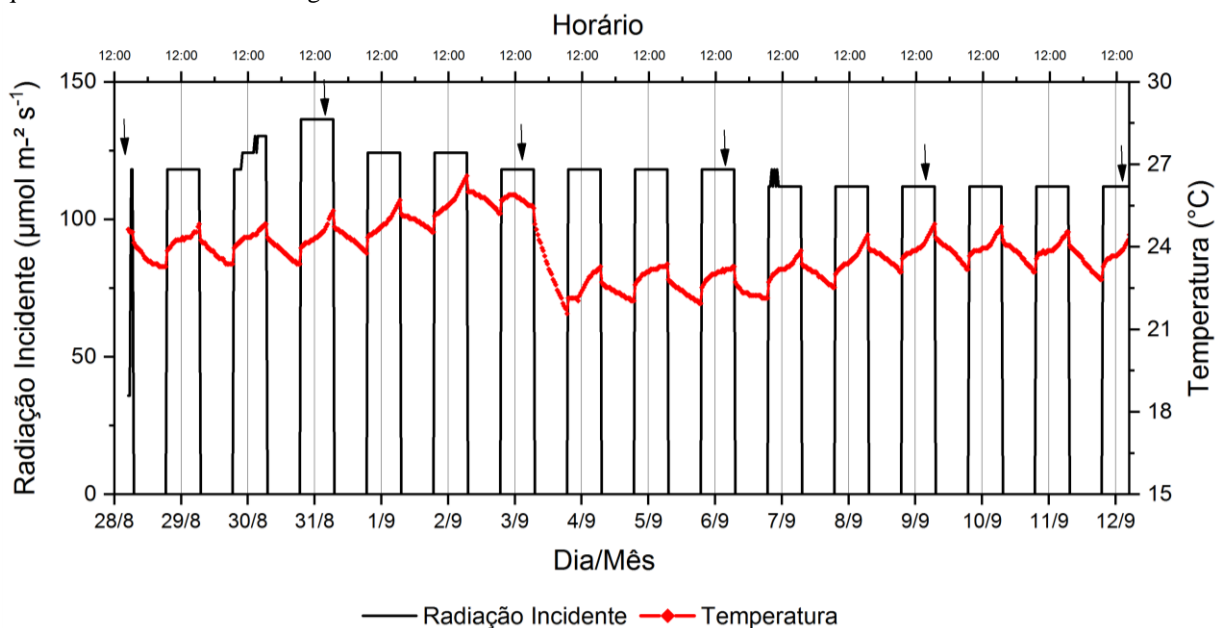
Figura 4 – Desenho esquemático do experimento para análise da assimilação de fósforo e nitrogênio em cubas sem cobre ($2 \mu\text{g Cu}^{2+} \text{L}^{-1}$) e em cubas com cobre ($1 \text{mg Cu}^{2+} \text{L}^{-1}$) (Legenda: os pontos em preto indicam adição de cobre ao meio).



Fonte: Autoria própria.

As condições de temperatura ($23,8 \pm 1,0 \text{ }^\circ\text{C}$) e luminosidade ($118,3 \pm 6,8 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) foram controladas e monitoradas (Figura 5) utilizando um sensor (UA-002-64/Onset-HOBO®) que ficou disposto na superfície da água de uma cuba aleatória. O fotoperíodo do experimento foi de 12 horas (claro:escuro).

Figura 5 – Condições de luminosidade e temperatura ao longo do experimento. As setas indicam os dias nos quais foi realizada a amostragem.



4.4 Análise de nutrientes no meio

4.4.1 Nutrientes dissolvidos

Para a análise de nutrientes dissolvidos, 50 mL de meio foram retirados de cada cuba em cada dia amostral, sendo imediatamente filtrados a vácuo (membranas com 0,6 µm de porosidade, GF-3/M&N®) e armazenados em tubos Falcon (a -20°C). Para atender os valores máximos admitidos nas curvas-padrão calibradas no espectrofotômetro (DR4000/Hach®), foram realizadas as seguintes diluições: 5:100 para a análise de fósforo solúvel reativo (P-PO₄³⁻), 25:100 para a análise do nitrato (N-NO₃⁻) e 50:100 para análise do amônio (N-NH₄⁺).

Os resultados obtidos foram corrigidos dada a influência da evaporação da água na concentração de nutrientes no meio. Para isto, foi necessário medir o volume final de cada cuba e considerar que a taxa de evaporação foi constante ao longo do experimento. Após obter o volume das cubas por dia, foi utilizada a fórmula da diluição mostrada na equação (1) para a correção da concentração.

$$C_t = \frac{C_d * V_d}{V_t} \quad (1)$$

Em que:

C_t = Concentração teórica do nutriente (mg L⁻¹)

C_d = Concentração medida no dia (mg L⁻¹)

V_d = Volume real no dia (considerando a evaporação) (L)

V_t = Volume teórico esperado no dia (desconsiderando a evaporação) (L)

- Fósforo Solúvel Reativo (PO₄³⁻)

A determinação da concentração de fósforo solúvel reativo (PSR) na forma de ortofosfato (P-PO₄³⁻) no meio foi realizada a partir do método do ácido ascórbico do Standard Methods (APHA; AWWA; WEF, 2005a). O método consiste na reação do molibdato de amônio e do tartarato de antimônio e potássio com o ortofosfato em meio ácido. Após a reação, forma-se o ácido fosfomolibdico que é posteriormente reduzido a azul de molibdênio (composto de coloração azul intensa) pelo ácido ascórbico. A absorbância lida a 880 nm em espectrofotômetro é proporcional à concentração de fosfato (APHA; AWWA; WEF, 2005a). O limite de detecção calculado em laboratório para esse método é de 1,0 µg L⁻¹.

- Nitrato (NO_3^-)

A quantificação da concentração de nitrato (N-NO_3^-) no meio foi feita a partir do método da leitura espectrofotométrica em comprimento de onda ultravioleta do Standard Methods. Este método é recomendado para amostras com baixas concentrações de matéria orgânica, pois se baseia na absorvância de luz ultravioleta pelo nitrato a 220 nm. A acidificação com HCl (1N) é necessária para evitar a interferência dos íons hidróxido ou dos carbonatos (APHA; AWWA; WEF, 2005b). O limite de detecção calculado em laboratório para esse método é de $35,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

- Amônio (NH_4^+)

A determinação da concentração de amônio no meio foi feita a partir do método colorimétrico do azul de indofenol. O amônio reage com o hipoclorito em solução ligeiramente alcalina ($8,0 \leq \text{pH} \leq 11,5$, em valores superiores o amônio é completamente oxidado a nitrato) formando monocloramina, que, em presença de fenol, nitroprussiato de sódio (catalizador) e hipoclorito em excesso, forma o indofenol, um composto de coloração azul. A absorvância lida a 630 nm em espectrofotômetro é proporcional à concentração de amônio (N-NH_4^+) na água (KOROLEFF, 1976). O limite de detecção calculado em laboratório para esse método é de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.4.2 Nutrientes totais

A análise de nutrientes totais foi realizada para corrigir os valores de fósforo e nitrogênio assimilado pelas macrófitas dado o crescimento de fitoplâncton no meio (ver mais detalhes no item 4.5 adiante). Para a análise de fósforo total (PT), uma amostra bruta (sem filtrar) de 25 mL foi coletada a partir do dia no qual começou a se evidenciar o crescimento de fitoplâncton, sendo este o dia amostral 6 para as cubas com *P. stratiotes* e o dia 9 para as cubas com *S. auriculata*. No caso do nitrogênio total Kjeldahl (NTK), amostras brutas de 200 mL foram coletadas no último dia do experimento. Da mesma forma que nos nutrientes dissolvidos, foi necessário realizar uma diluição da amostra de 5:100 para a análise de PT.

Da mesma forma que nos nutrientes dissolvidos, os resultados de concentração dos nutrientes totais também foram corrigidos utilizando a equação (1).

- Fosforo total (PT)

O método para determinação da concentração de PT no meio foi o mesmo utilizado para o PSR, o método do ácido ascórbico do Standard Methods (APHA; AWWA; WEF, 2005a). Porém, previamente foi realizada a digestão da amostra bruta, já que o fósforo pode estar presente na matéria orgânica. Assim, a digestão oxida toda a matéria orgânica na amostra liberando o fósforo orgânico e transformando-o em ortofosfato. Neste caso foi realizada uma digestão em meio ácido com persulfato de potássio e autoclave (APHA; AWWA; WEF, 2005c). O limite de detecção calculado em laboratório para esse método é de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$.

- Nitrogênio total Kjeldahl (NTK)

A determinação de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (nitrogênio orgânico mais o amoniacal) foi feita por titulação da amostra com ácido sulfúrico após digestão e destilação (APHA; AWWA; WEF, 2005d). Este procedimento foi realizado automaticamente no equipamento AutoKjeldahl Unit K-370/BÜCHI®. Neste método, a matéria orgânica presente na amostra é completamente oxidada através da digestão com ácido sulfúrico a 380°C e sulfato de cobre como catalisador. O nitrogênio presente na solução ácida resultante é separado na forma de amônia por arraste de vapor, e determinado por titulação com ácido sulfúrico padronizado (NOGUEIRA; SOUZA, 2005). O limite de detecção calculado em laboratório para esse método é de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

- Nitrogênio Amoniacal

O nitrogênio amoniacal foi determinado a partir do método de titulação com ácido sulfúrico após destilação da amostra. Neste método, a destilação ocorre em meio básico com a finalidade de transformar o íon amônio presente na amostra em gás amoníaco, para posteriormente fixá-lo em ácido bórico, formando o sal borato de amônio. Finalmente, este sal é titulado com ácido sulfúrico padronizado (APHA; AWWA; WEF, 2005d). Este procedimento foi realizado automaticamente no equipamento AutoKjeldahl Unit K-370/BÜCHI®.

4.5 Correção dos nutrientes assimilados

4.5.1 Fósforo orgânico particulado (POP) e fósforo assimilado (P_{ass})

Ao longo do experimento, observou-se que a assimilação do fósforo solúvel reativo (PSR) não foi somente por parte das macrófitas, mas também pelo fitoplâncton. Para tanto, foi necessário aplicar uma correção dos valores de fósforo efetivamente assimilado pelas macrófitas.

Ao ser assimilado pelas algas, o fósforo solúvel reativo é transformado em fósforo orgânico particulado (POP). Sabendo que o fósforo total (PT) é a concentração total de fósforo presente no meio, tanto na sua fração orgânica (POP) como dissolvida (PSR), é possível obter a concentração de POP calculando a diferença entre a concentração de PT e a concentração de PSR. Assim, foi utilizada a equação (2).

$$POP = PT - PSR \quad (2)$$

Em que:

POP = Concentração de fósforo orgânico particulado no meio (mg P L^{-1})

PT = Concentração de fósforo total no meio ($\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)

PSR = Concentração de fósforo solúvel reativo no meio ($\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)

Nos dias em que não foi realizada análise da concentração de PT, foi considerado que esta era igual à concentração de PSR, dada a ausência de fitoplâncton no meio.

Com isto, foi possível corrigir a quantidade de fósforo que foi efetivamente assimilada pelas macrófitas, pois o fósforo que não estivesse nem na forma dissolvida (PSR) nem na forma orgânica (POP), teria sido incorporado à biomassa das plantas. Para isto, foi utilizada a equação (3).

$$m_{P_{ass}} = (PSR_i - PSR - P_{org}) * V \quad (3)$$

Em que:

$m_{P_{ass}}$ = massa de fósforo assimilada pelas macrófitas (mg P)

PSR_i = concentração de fósforo solúvel reativo inicial no meio ($\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)

PSR = concentração de fósforo solúvel reativo no meio ($\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)

P_{org} = concentração de fósforo orgânico no meio ($\text{mg P-PO}_4^{3-} \text{ L}^{-1}$)

V = volume da cuba no dia (L)

4.5.2 Nitrogênio orgânico (N_{org}) e nitrogênio assimilado (N_{ass})

Assim como no caso do fósforo, também foi necessário calcular o nitrogênio assimilado pelo fitoplâncton e transformado em nitrogênio orgânico. A concentração de nitrogênio orgânico presente no material particulado seria a diferença entre o nitrogênio total Kjeldahl (fração orgânica e amoniacal de nitrogênio no meio) e o nitrogênio amoniacal. Assim, foi utilizada a equação (4).

$$N_{org} = NTK - N_{amoniacal} \quad (4)$$

Em que:

N_{org} = Concentração de nitrogênio orgânico no meio (mg N L^{-1})

NTK = Concentração de nitrogênio total Kjeldahl no meio (mg N L^{-1})

$N_{amoniacal}$ = Concentração de nitrogênio amoniacal no meio ($\text{mg N-NH}_3/\text{NH}_4^+ \text{ L}^{-1}$)

Assim, foi possível corrigir a massa de nitrogênio que foi efetivamente assimilada pelas macrófitas, pois o nitrogênio que não estivesse nem na forma de nitrato (NO_3^-), nem na forma orgânica (N_{org}) e nem na forma de amoniacal ($\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$), teria sido incorporado à biomassa das plantas. Para isto, foi utilizada a equação (5).

$$m_{N_{ass}} = (\text{NO}_3^-_i - \text{NO}_3^- - \text{NTK}) * V \quad (5)$$

Em que:

$m_{N_{ass}}$ = massa de nitrogênio assimilada pelas macrófitas (mg N)

$\text{NO}_3^-_i$ = concentração de nitrato inicial no meio ($\text{mg N- NO}_3^- \text{ L}^{-1}$)

NO_3^- = concentração de nitrato no meio ($\text{mg N- NO}_3^- \text{ L}^{-1}$)

NTK = concentração de nitrogênio total Kjeldahl no meio (mg N L^{-1})

V = volume da cuba no dia (L)

4.6 Determinação de Clorofila-a

A quantificação de clorofila-a nas amostras foi realizada a partir do método da extração indicado por Nusch (1980) modificado por NEN 6520 (2006), com base na leitura em dois comprimentos de onda (665 e 750 nm). A clorofila é solúvel em etanol e absorve luz a 665 nm, pelo qual sua leitura pode ser realizada em espectrofotômetro (WINTERMANS; DEMOTS, 1965). Os valores de clorofila-a podem ser superestimados na presença de feofitina-a, pois esta última absorve luz no mesmo comprimento de onda que a clorofila-a, o

que torna necessária uma leitura adicional após acidificação da amostra para correção dos valores. A adição de HCl faz com que a clorofila-*a* perca o átomo de magnésio transformando-a em feofitina-*a* (APHA; AWWA; WEF, 2005e).

Da mesma forma que no caso dos nutrientes, os resultados de concentração de clorofila foram corrigidos com a equação (1).

4.7 Análises das macrófitas

4.7.1 Determinação da massa fresca e das características morfológicas das macrófitas

Após remoção do excesso de água nas raízes por secagem ao ar livre sobre papel absorvente por 15 min, foi realizada a pesagem individual de todas as plantas em balança analítica (AY220/Shimadzu®) para a obtenção da massa fresca (M.F.) (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003), e a medição do comprimento das raízes, utilizando uma régua milimetrada. Estas medições foram feitas no início e no fim do experimento para determinar a variação da biomassa e das características morfológicas das macrófitas após serem submetidas às diferentes condições.

4.7.2 Determinação da massa seca

Ao final do experimento e após as medições de M.F., as plantas foram secas em estufa com circulação forçada a 55°C por 96 h (MEYER, 1996; POI DE NEIFF; CARIGNAN, 1997). Após secagem, os indivíduos foram transferidos a dessecadores, esfriados a temperatura ambiente por 30 minutos e pesados em balança analítica, obtendo assim a massa seca (M.S.) (POMPÊO; MOSCHINI-CARLOS, 2003).

Com os dados de massa fresca e seca para o último dia, foi possível determinar a porcentagem de água nos indivíduos (equação (6)) e com isto estimar a massa seca das macrófitas no início do experimento (equação (7)).

$$R_{\text{agua}} = \frac{M.F._f - M.S._f}{M.F._f} \quad (6)$$

Em que:

R_{agua} = razão de água na biomassa fresca (%)

M.F._f = massa fresca no final do experimento (g)

$M.S._f$ = massa seca no final do experimento (g)

$$M.S._i = M.F._i * (1 - R_{agua}) \quad (7)$$

Em que:

$M.F._i$ = massa fresca no final do experimento (g)

$M.S._i$ = massa seca no final do experimento (g)

4.7.3 Análise de nutrientes na biomassa

Após secagem e pesagem, as plantas foram trituradas em moinho e armazenadas em recipientes fechados dentro de dessecador para posterior análise dos teores de PT, N_{org} e cobre, como sugerido por Pompêo e Moschini-Carlos (2003). Para a análise de cobre, a biomassa das macrófitas foi separada entre folhas e raízes a fim de avaliar a diferença de concentração de cobre entre esses dois órgãos.

- Determinação do teor de fósforo total

A determinação da concentração de PT no tecido vegetal foi feita como sugerido por Pompêo e Moschini-Carlos (2003). Para quantificar o PT na biomassa das macrófitas foi necessário liberar o fósforo que se encontra retido no material particulado, por meio de calcinação e aquecimento em meio ácido para a solubilização do fósforo. A determinação da concentração de PT foi feita por método colorimétrico em espectrofotômetro (ANDERSEN, 1976; APHA; AWWA; WEF, 2005f).

- Determinação do teor de nitrogênio orgânico

Para a quantificação da concentração de nitrogênio orgânico nos tecidos das macrófitas foi utilizado o método Semi-Micro-Kjeldahl modificado do Standard Methods para amostras sólidas. Na presença de ácido sulfúrico, sulfato de potássio e sulfato de cobre como catalisador, o nitrogênio em forma de amina do material orgânico e a amônia livre são convertidos em amônio. Após adição da base, a amônia é destilada do meio alcalino e é absorvida em ácido bórico e titulada com ácido sulfúrico padronizado (APHA; AWWA; WEF, 2005g). Este procedimento foi realizado automaticamente no equipamento AutoKjeldahl Unit K-370/BÜCHI®.

4.8 Determinação da concentração de cobre

O método utilizado para a quantificação da concentração de cobre (Cu^{2+}) nas amostras de água (mg L^{-1}) e na biomassa (mg kg^{-1}) foi o da chama direta de ar-acetileno do Standard Methods, baseado na espectrometria de absorção atômica de chama. A amostra é aspirada para dentro de uma chama, fazendo o líquido evaporar e os sólidos restantes serem atomizados. Enquanto isso, um feixe de luz passa através da amostra atomizada e é direcionado para um monocromador, onde um detector mede a quantidade de luz absorvida pelo metal atomizado (APHA; AWWA; WEF, 2005h). Esta análise foi realizada pelo Laboratório de Saneamento do Departamento de Hidráulica e Saneamento da EESC – USP em São Carlos.

4.9 Taxas de assimilação de nutrientes

Para o fósforo e o nitrogênio, foram calculadas as taxas de assimilação por parte das macrófitas utilizando a equação (8).

$$T_{P/N\text{ ass}} = \frac{m_{P/N\text{ ass}}}{M.S.d * d} \quad (8)$$

Em que:

T_{ass} = taxa de assimilação do nutriente ($\text{mg g}^{-1} \text{M.S. d}^{-1}$)

$m_{P/N\text{ ass}}$ = massa do nutriente (fósforo ou nitrogênio) assimilada no dia (mg)

$M.S.d$ = massa seca de macrófita no dia (g)

d = dia

A massa seca de macrófitas no dia foi estimada a partir de uma correlação entre o número de folhas/ frondes iniciais e a massa fresca inicial, aplicando a equação (9).

$$M.S.d = Nf_d * \frac{M.F.i}{Nf_i} * (1 - R_{\text{agua}}) \quad (9)$$

Em que:

$M.S.d$ = massa seca de macrófita no dia (g)

$Nf.d$ = número de folhas/frondes no dia

$Nf.i$ = número de folhas/frondes no início do experimento

$M.F.i$ = massa fresca no início do experimento (g)

R_{agua} = razão de água na biomassa fresca (%)

As taxas de assimilação foram ajustadas a uma linha de tendência linear ou exponencial, dependendo valor de R^2 mais próximo de 1,000.

4.10 Expressão dos resultados

Todos os cálculos foram realizados no software Excel/Microsoft® e os gráficos no software Origin®. Os gráficos de concentração de nutrientes, clorofila e cobre no meio e as taxas de assimilação foram apresentados em formato de ponto e linha, por terem valores para cada dia do experimento. Já os gráficos de biomassa e comprimento de raiz se encontram no formato *boxplot* para mostrar a distribuição dos valores no início e fim do experimento. Os dados de nutrientes e cobre obtidos do tecido das macrófitas foram representados em coluna, com a finalidade de mostrar a diferença entre o valor obtido no início e no fim do experimento.

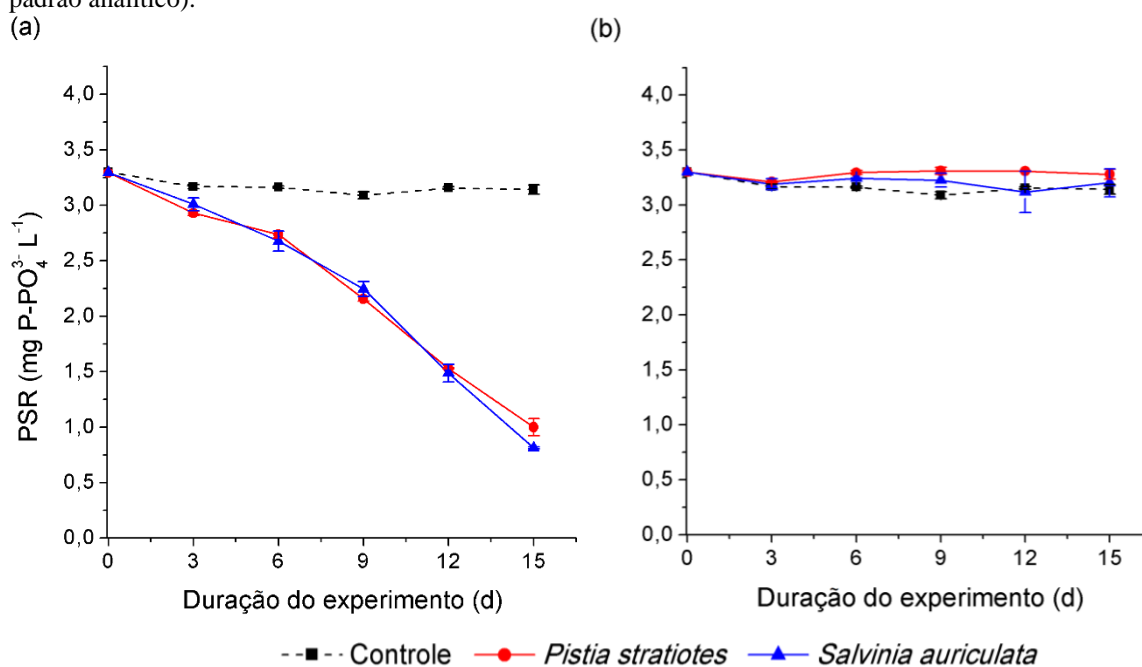
5 RESULTADOS

5.1 Nutrientes dissolvidos

A concentração de fósforo solúvel reativo (PSR) na condição sem cobre apresentou diminuição ao longo do tempo para as duas espécies, atingindo o valor de $1,00 \pm 0,08$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$ nas cubas com *Pistia stratiotes* e de $0,81 \pm 0,01$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$ nas cubas com *Salvinia auriculata* (Figura 6a). Com isto, observou-se uma redução da concentração de aproximadamente 70% ($2,29 \pm 0,08$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$) e de 75% ($2,48 \pm 0,01$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$), respectivamente, com relação à concentração inicial ($3,30 \pm 0,04$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$). A concentração de PSR permaneceu constante ao longo do tempo na cuba controle, sendo esta de $3,17 \pm 0,07$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$ (Figura 6).

Na condição com cobre, a concentração de PSR nas cubas com macrófitas não apresentou variação aparente com relação à cuba controle (Figura 6b). A média das concentrações ao longo do experimento foi de $3,28 \pm 0,04$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$ para *P. stratiotes* e de $3,21 \pm 0,04$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$ para *S. auriculata*, sendo valores muito próximos à concentração inicial de $3,30$ mg P- PO_4^{3-} L $^{-1}$ e indicando que a concentração se manteve praticamente constante.

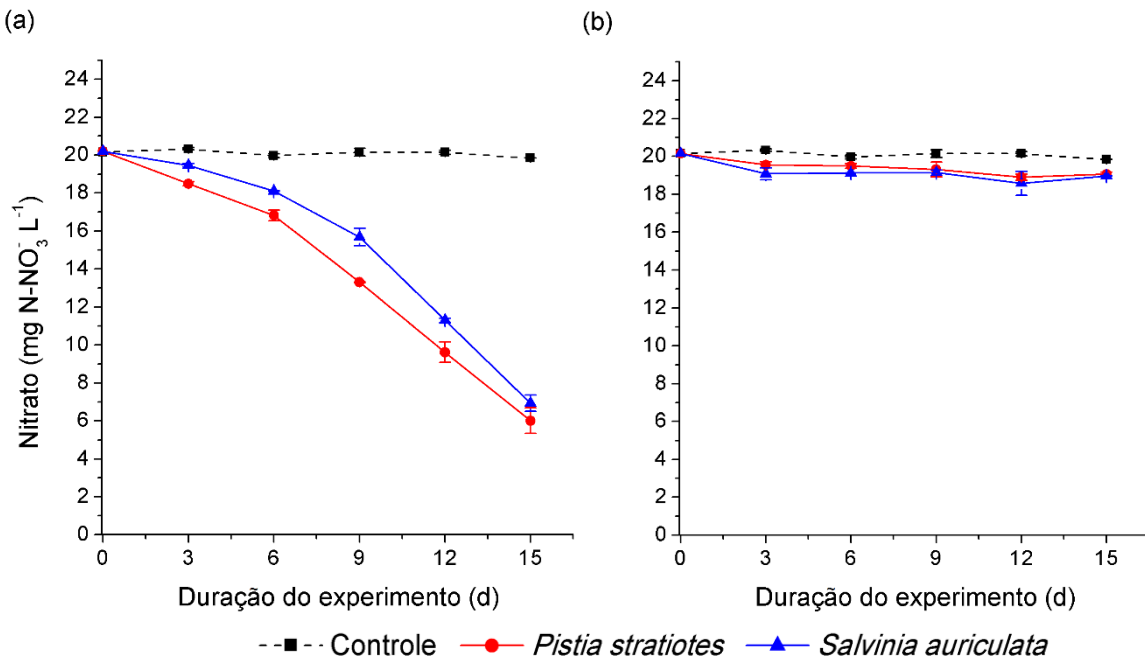
Figura 6 – Concentração de fósforo solúvel reativo (PSR) no meio de cultivo com *P. stratiotes* e com *S. auriculata*, nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre. (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).



O comportamento da concentração de nitrato foi similar à do PSR nas duas condições. Na condição sem cobre, a concentração de nitrato diminuiu ao longo do tempo, atingindo os valores de $6,01 \pm 0,67$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹ na cuba com *P. stratiotes* e de $6,94 \pm 0,43$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹ para *S. auriculata* (Figura 7a). Com isto, observou-se uma redução da concentração de aproximadamente 70% e 66%, respectivamente, com relação à concentração inicial ($20,20 \pm 0,28$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹). Na cuba controle, a concentração de nitrato permaneceu constante ao longo do tempo, sendo esta de $20,10 \pm 0,17$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹ (Figura 7a).

A concentração de nitrato não apresentou variação aparente nas cubas com macrófitas sob a condição com cobre (Figura 7b). Observou-se uma aparente diminuição da concentração nos dois casos, porém, a concentração média ao longo do experimento foi de $19,42 \pm 0,44$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹ para *P. stratiotes* e de $19,18 \pm 0,52$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹ para *S. auriculata*, valores próximos à concentração inicial de $20,20$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹. A máxima redução de concentração para as duas espécies foi evidenciada no dia 12 ($18,91 \pm 0,16$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹ para *P. stratiotes* e $18,59 \pm 0,64$ mg N-NO₃⁻ L⁻¹ para *S. auriculata*), representando aproximadamente 6% e 8% de redução da concentração inicial, respectivamente.

Figura 7 – Concentração de nitrato no meio para *P. stratiotes* e *S. auriculata*, nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre. (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).



A concentração de amônio foi detectada somente no controle sendo esta constante ao longo do experimento como mostrado na Tabela 1.

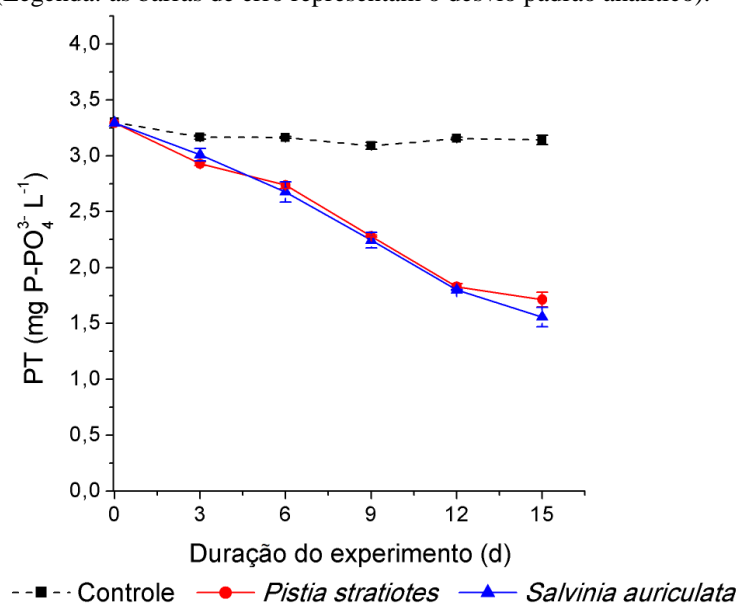
Tabela 1 – Concentração de amônio no meio de cultivo nas diferentes condições do experimento para as duas espécies de macrófitas aquáticas (N.D. = não detectado).

Condição	Espécie	Concentração de amônio (mg N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹)
Controle	-	0,10 ± 0,01
Sem cobre	<i>Pistia stratiotes</i>	N. D.
	<i>Salvinia auriculata</i>	N. D.
Com cobre	<i>Pistia stratiotes</i>	N. D.
	<i>Salvinia auriculata</i>	N. D.

5.2 Nutrientes totais

A concentração de PT diminuiu no decorrer do experimento, apresentando o valor mínimo de $1,71 \pm 0,07$ mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ para a *P. stratiotes* e de $1,56 \pm 0,09$ mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ para a *S. auriculata* (Figura 8).

Figura 8 - Concentração de fósforo total (PT) no meio de cultivo com *P. stratiotes* e com *S. auriculata* na condição sem cobre. (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico).



As concentrações de nitrogênio total Kjeldahl (NTK) e de nitrogênio orgânico no último dia do experimento foram baixas no meio contendo as duas espécies (Tabela 2), não ultrapassando $0,55$ mg N L⁻¹ no caso do NTK e $0,23$ mg N L⁻¹ no caso do nitrogênio orgânico. Como estes valores representaram no máximo 1,7% da remoção total de nitrato até o último dia do experimento, não foi considerado necessário realizar a correção da assimilação do nitrato como nitrogênio orgânico por parte do fitoplâncton para o cálculo da taxa de assimilação de nitrato pelas macrófitas.

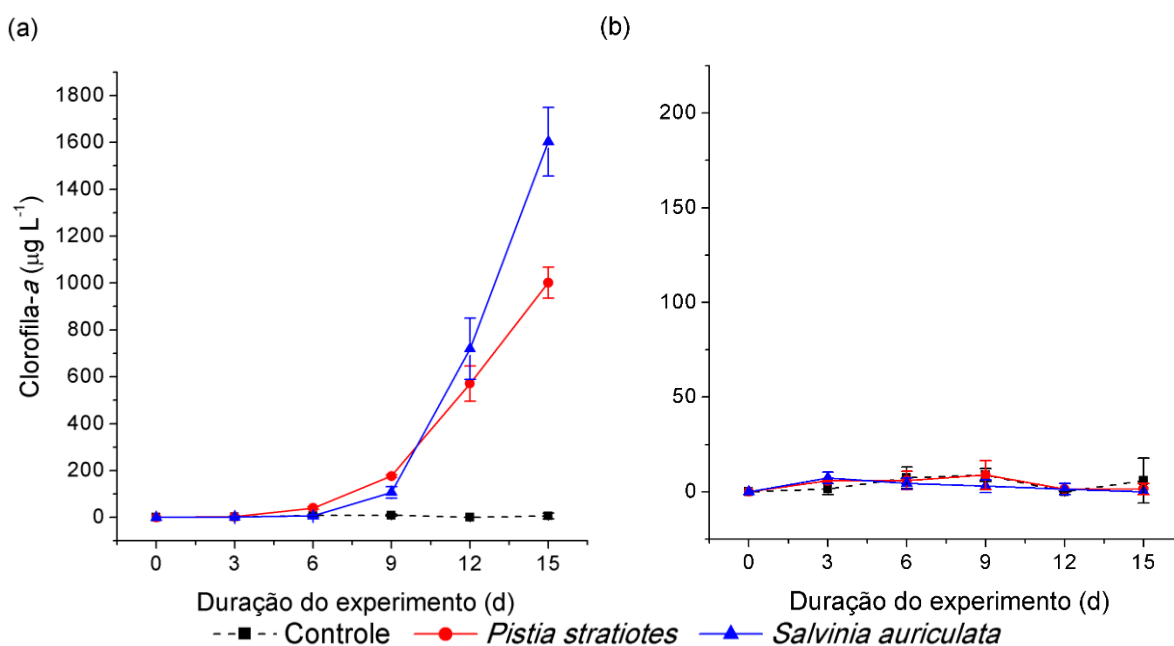
Tabela 2 – Concentrações de nitrogênio total Kjeldahl (NTK), nitrogênio amoniacal e nitrogênio orgânico no meio para a condição sem cobre no último dia de experimento (N.D. = não detectado).

Espécie	Cuba	NTK (mg N L ⁻¹)	N-amoniacal (mg N-NH ₃ /NH ₄ ⁺ L ⁻¹)	N-orgânico (mg N L ⁻¹)
<i>P. stratiotes</i>	1	0,20	0,18	0,02
	2	0,43	0,17	0,26
<i>S. auriculata</i>	1	0,15	0,18	N.D.
	2	0,55	0,31	0,23

5.3 Clorofila-*a* e fósforo particulado

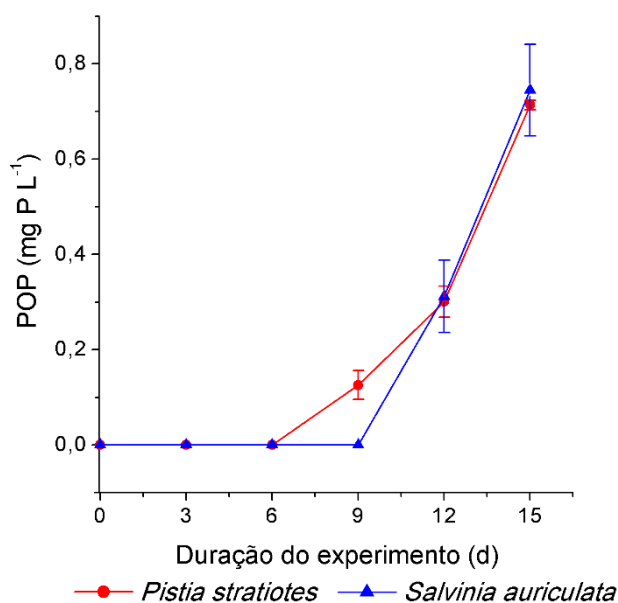
A concentração de clorofila-*a* na condição sem cobre aumentou exponencialmente a partir do dia 6 para a *P. stratiotes*, chegando a $1001,96 \pm 66,34 \mu\text{g L}^{-1}$ no último dia, e a partir do dia 9 para a *S. auriculata*, chegando a $1602,84 \pm 145,84 \mu\text{g L}^{-1}$ no final do experimento (Figura 9a). O aumento da concentração de clorofila-*a* na cuba com *S. auriculata* foi 1,6 vezes maior que a com *P. stratiotes* no final do experimento. Na condição com cobre, a clorofila não apresentou variação em relação ao controle, permanecendo constante ao longo do experimento (Figura 9b). A média dos valores de clorofila nas cubas controle, com *P. stratiotes* e com *S. auriculata*, foram de $3,95 \pm 3,93 \mu\text{g L}^{-1}$, $3,95 \pm 3,46 \mu\text{g L}^{-1}$ e $2,71 \pm 2,87 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 9 – Concentração de clorofila-*a* no meio de cultivo com *P. stratiotes* e com *S. auriculata* nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)



Da mesma forma que a clorofila-*a*, a concentração de POP no meio, aumentou a partir do dia 6 para a *P. stratiotes*, atingindo o valor de $0,71 \pm 0,01$ mg P-PO₄³⁻ L⁻¹ no último dia, e a partir do dia 9 para a *S. auriculata*, chegando a $0,74 \pm 0,10$ mg L⁻¹ no final do experimento (Figura 10). Os valores anteriormente mencionados representaram 30% e 32%, respectivamente, da redução total de concentração de PSR.

Figura 10 – Concentração de fósforo orgânico particulado (POP) no meio de cultivo com *P. stratiotes* e com *S. auriculata* na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)



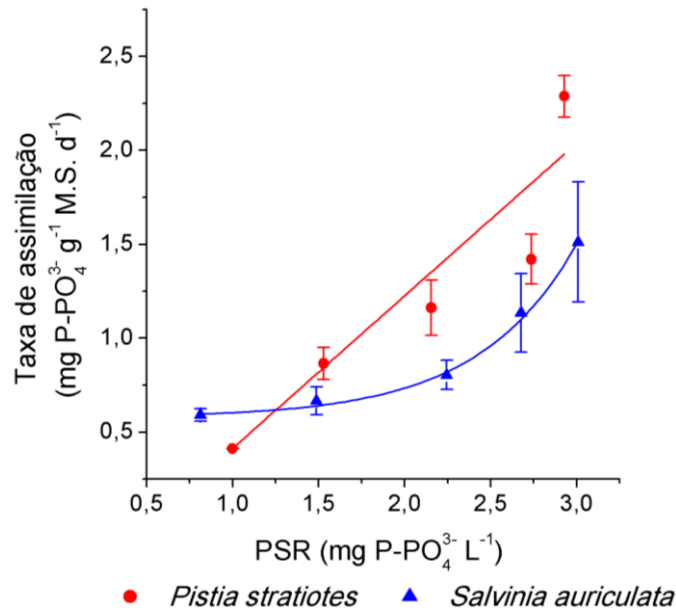
5.4 Taxas de assimilação

Após a correção dos valores de PSR efetivamente assimilado pelas macrófitas, foi possível construir um gráfico de taxa de assimilação de fósforo em função da concentração de fósforo no meio na condição sem cobre. Pode-se observar que a correlação entre as duas variáveis é linear positiva para *P. stratiotes* (equação (10)) e exponencial para *S. auriculata* (equação (11)) (Figura 11). Para a *P. stratiotes*, o comportamento linear mostra que quanto maior a disponibilidade de PSR no meio, maior é a taxa de assimilação de fósforo. Já para *S. auriculata*, a taxa de assimilação apresenta crescimento exponencial, com maiores valores a partir da concentração de 2 mg P L⁻¹ (Figura 11).

$$T_{Pass-P.stratiotes} = 0,813 * PSR - 0,399 \quad R^2 = 0,94 \quad (10)$$

$$T_{Pass-S.auriculata} = 0,005 * e^{1,766*PSR} + 0,576 \quad R^2 = 0,98 \quad (11)$$

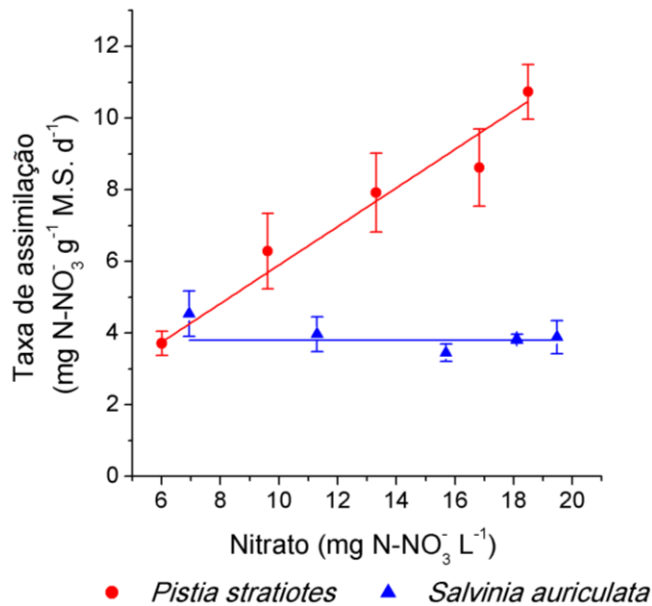
Figura 11 – Taxa de assimilação de fósforo por grama de massa seca de macrófita (M.S.) em função da concentração de fósforo solúvel reativo (PSR) no meio para *P. stratiotes* e *S. auriculata* na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)



Por outro lado, a taxa de assimilação de nitrato apresenta uma correlação linear positiva com a concentração de nitrato no meio na *P.stratiotes* (em maiores concentrações de nitrato no meio, maior é a taxa de assimilação) (equação (12)), já na *S. auriculata* a taxa de assimilação tende a ser constante mesmo sob variação de concentração NO_3^- no meio, sendo este um valor de aproximadamente $3,80 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$ (Figura 12).

$$T_{Nass-P.stratiotes} = 0,538 * \text{NO}_3^- + 0,522 \quad R^2 = 0,98 \quad (12)$$

Figura 12 – Taxa de assimilação de nitrato por grama de massa seca de macrófita (M.S.) em função da concentração nitrato (NO_3^-) no meio para *P. stratiotes* e *S. auriculata* na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)



5.5 Características morfológicas das macrófitas

As variações nas características morfológicas dos indivíduos nas duas condições começaram a ser observáveis a partir do primeiro dia do experimento, principalmente na condição com cobre, na qual os indivíduos apresentaram deformação (murchamento), manchas nas folhas e perda das raízes, principalmente na *P. stratiotes*. A partir do dia 6, os indivíduos de *P. stratiotes* começaram a perder folhas além das raízes. Já na condição sem cobre, as duas espécies de macrófitas aumentaram de tamanho e em número de indivíduos ao longo do experimento, como mostrado nas imagens das Figura 13 e Figura 14.

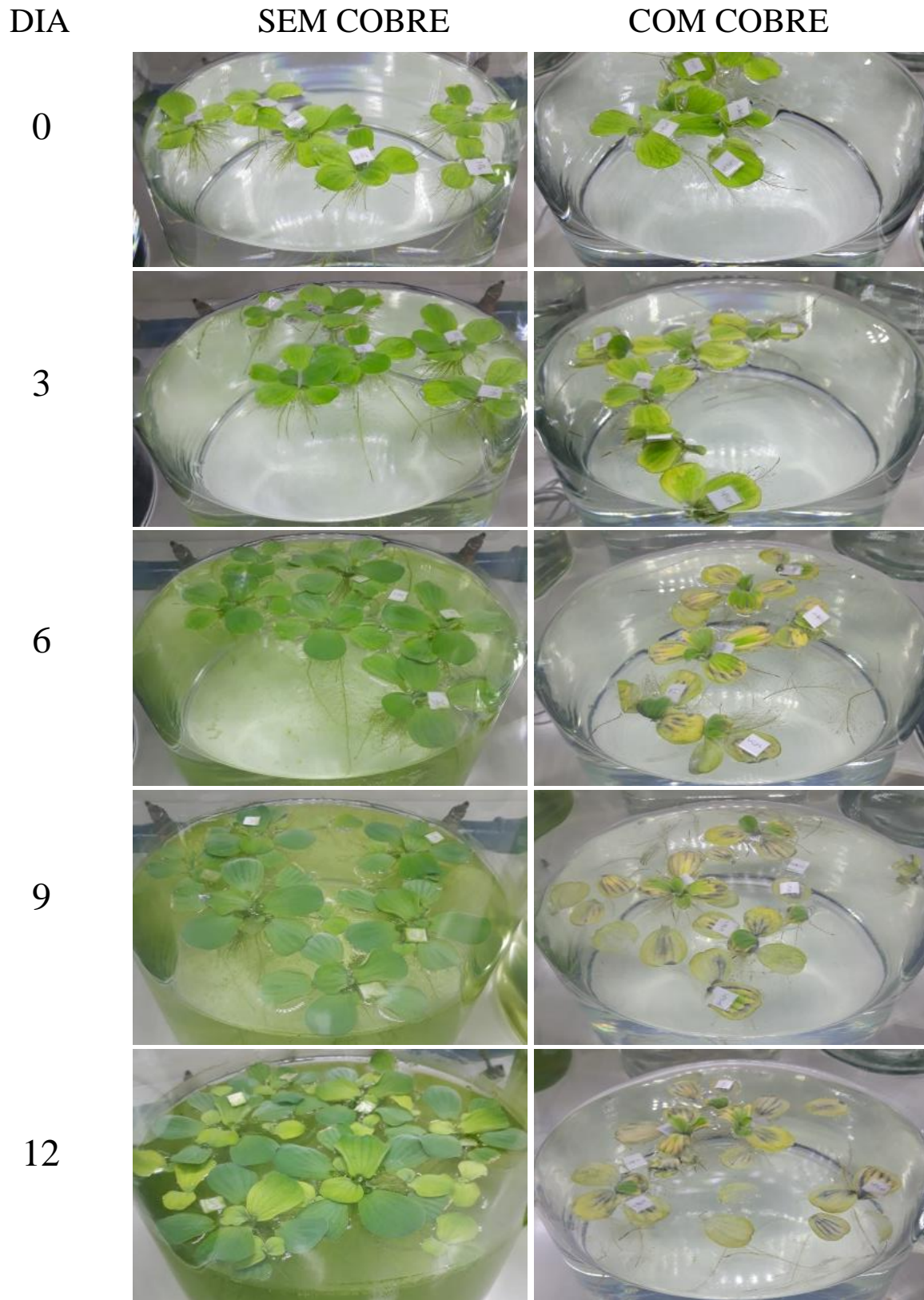
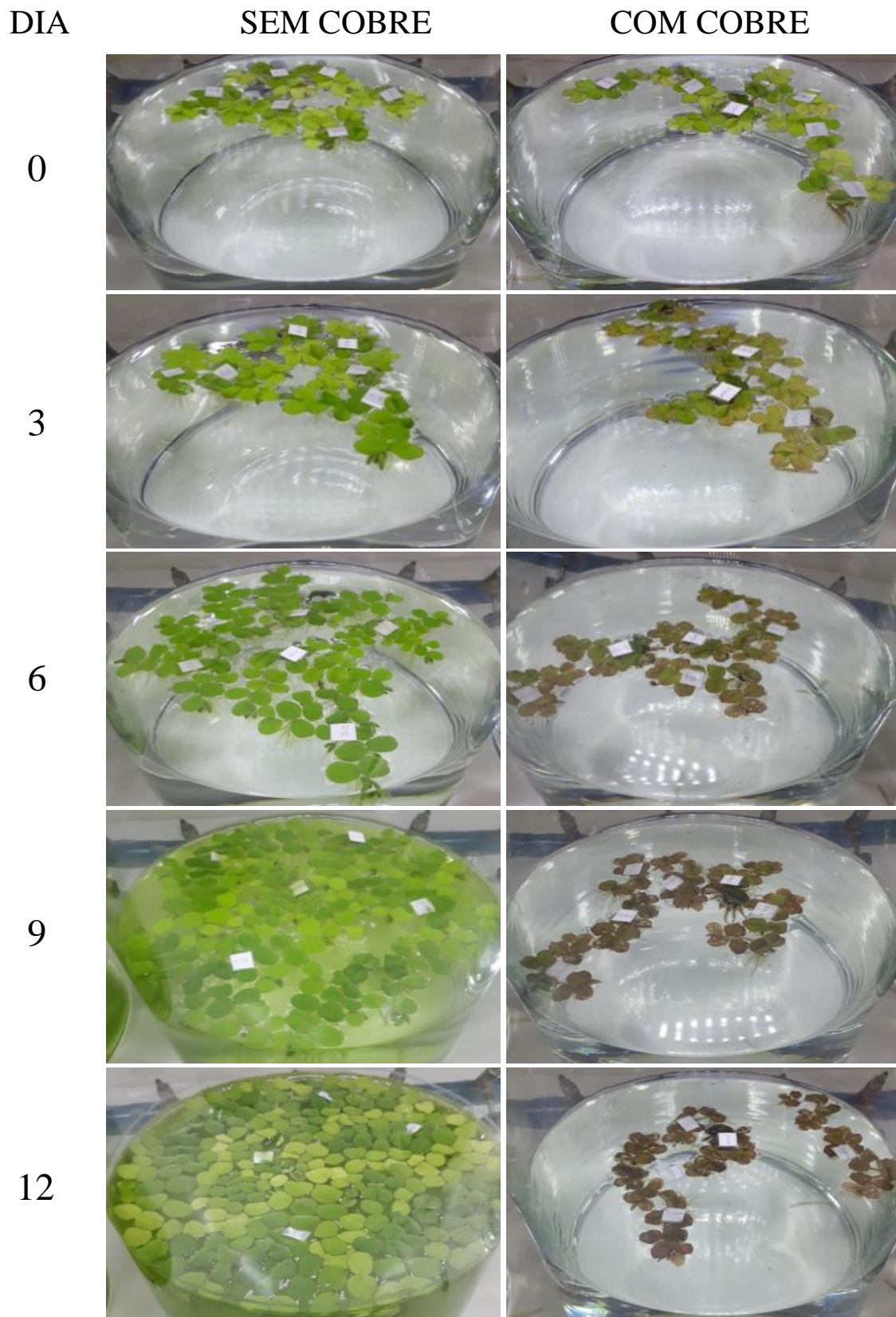
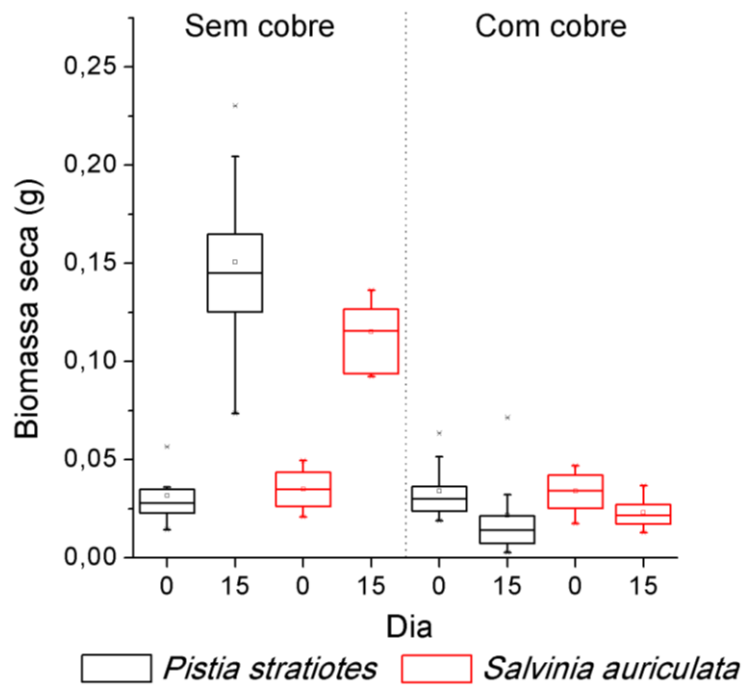
Figura 13 – Imagens dos indivíduos de *P. stratiotes* sob as duas condições ao longo do experimento

Figura 14 - Imagens dos indivíduos de *S. auriculata* sob as duas condições ao longo do experimento

Com relação à biomassa, na condição sem cobre foi observado um ganho médio de $0,12 \pm 0,05$ g M.S. por indivíduo de *P. stratiotes* e de $0,08 \pm 0,03$ g M.S. por indivíduo de *S. auriculata* (Figura 15). Já na condição com cobre, observou-se uma perda média de biomassa de $0,01 \pm 0,03$ g M.S. por indivíduo nas duas espécies de macrófitas (Figura 15).

Figura 15 - Biomassa seca no início (dia 0) e no fim (dia 15) do experimento para *P. stratiotes* e *S. auriculata* nas duas condições (sem cobre e com cobre) (Legenda: \square = média; * = outlier; \top = máximo; \perp = mínimo; a linha inferior da caixa representa o primeiro quartil, a do meio a mediana e a superior o terceiro quartil)

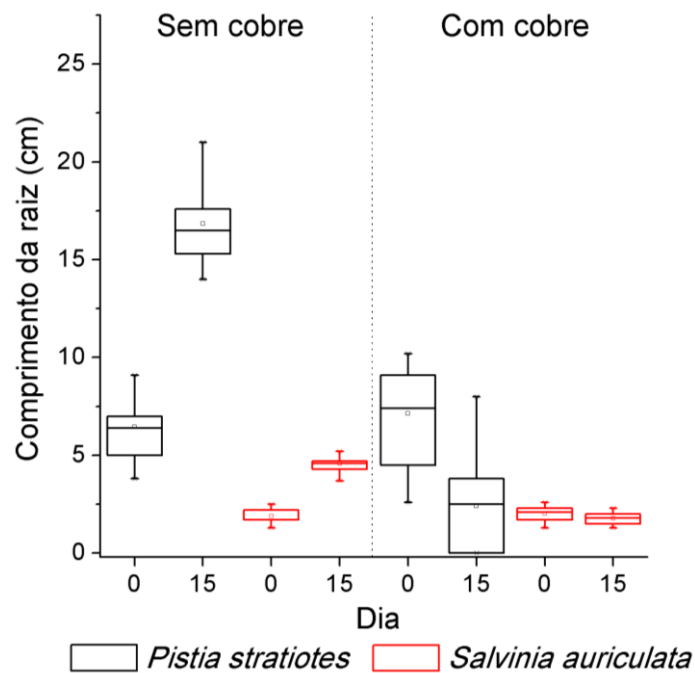


O comprimento das raízes na condição sem cobre teve um aumento médio de $10,4 \pm 3,6$ cm por indivíduo de *P. stratiotes* e de $2,7 \pm 0,7$ cm dos de *S. auriculata* (

Figura 16). Já na condição com cobre, houve uma perda maior das raízes, restando só as raízes menores, ou até mesmo nenhuma raiz, principalmente no caso da *P. stratiotes*. O comprimento máximo diminuiu em média $4,7 \pm$ diminuiu em média $4,7 \pm 5,0$ cm por indivíduo de *P. stratiotes* e $0,3 \pm 0,7$ cm por indivíduo de *S. auriculata* (de *S. auriculata* (

Figura 16).

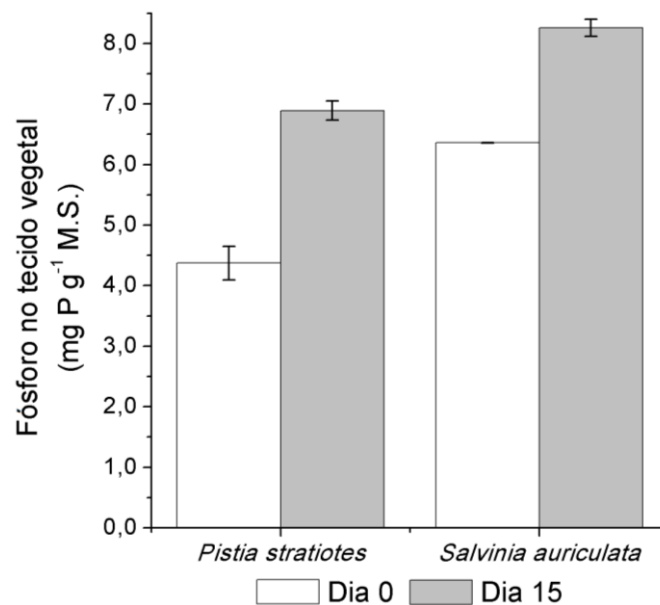
Figura 16 – Comprimento da raiz no início (dia 0) e no fim (dia 15) do experimento para *P. stratiotes* e *S. auriculata* nas duas condições (sem cobre e com cobre) (Legenda: \square = média; * = outlier ; \top = máximo ; \perp = mínimo; a linha inferior da caixa representa o primeiro quartil, a do meio a mediana e a superior o terceiro quartil)



5.6 Nutrientes na biomassa

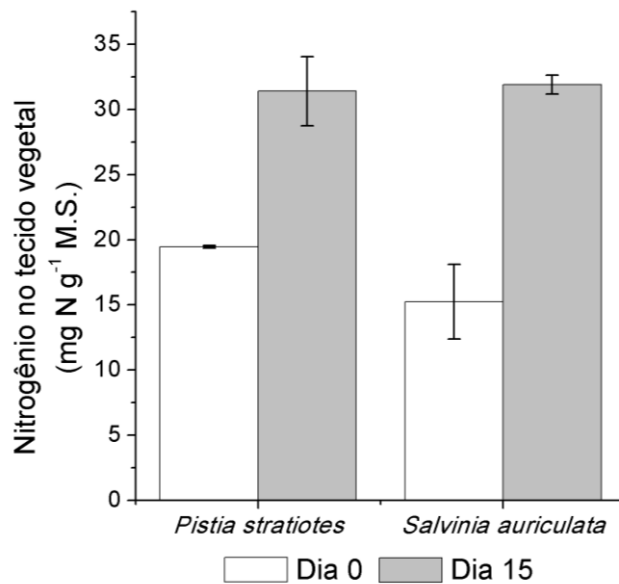
Na condição sem cobre, observou-se um acúmulo de fósforo no tecido vegetal das duas espécies, sendo este de $2,52 \pm 0,43 \text{ mg P g}^{-1} \text{ M.S.}$ para a *P. stratiotes* e de $1,90 \pm 0,14 \text{ mg P g}^{-1} \text{ M.S.}$ para a *S. auriculata* (Figura 17). Assim, o acúmulo relativo de fósforo por unidade de massa foi maior na macrófita *P. stratiotes*.

Figura 17 – Conteúdo de fósforo total por grama de massa seca (M.S.) no tecido das macrófitas *P. stratiotes* e *S. auriculata* na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)



Na condição sem cobre também houve um acúmulo de nitrogênio no tecido vegetal nas duas espécies, sendo este acréscimo de $11,95 \pm 2,74 \text{ mg N g}^{-1} \text{ M.S.}$ para a *P. stratiotes* e de $16,68 \pm 3,58 \text{ mg N g}^{-1} \text{ M.S.}$ para a *S. auriculata*. Desta forma, ao contrário do fósforo, o acúmulo relativo de nitrogênio por unidade de massa foi maior na *S. auriculata* (Figura 18).

Figura 18 – Conteúdo de nitrogênio total por grama de massa seca (M.S.) no tecido das macrófitas *P. stratiotes* e *S. auriculata* na condição sem cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)

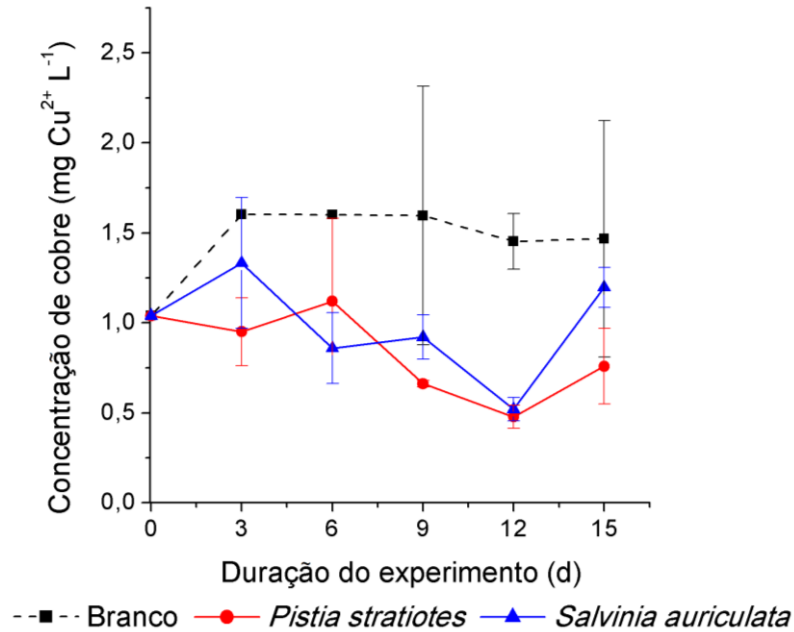


5.7 Efeitos do cobre

A concentração de cobre no meio de cultivo nas cubas com macrófitas diminuiu até o dia 12 do experimento, atingindo o valor de $0,50 \pm 0,07 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$ para as duas espécies. Porém, a partir do dia 12 a concentração aumentou, chegando a $0,76 \pm 0,21 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$ para *P. stratiotes* e $1,20 \pm 0,11 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$ para *S. auriculata* (Figura 19).

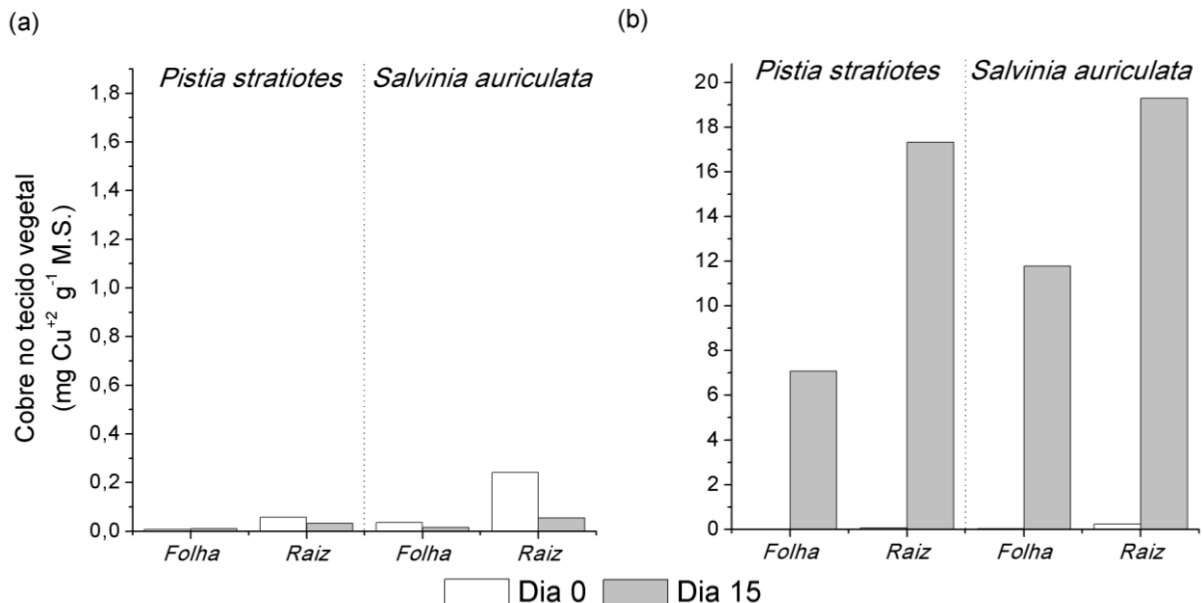
Na condição sem cobre, todos os valores de conteúdo de cobre nos tecidos das macrófitas foram muito baixos ($<0,24 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ M.S.}$). Observou-se uma diminuição discreta na concentração de cobre nos tecidos no final do experimento (Figura 20a). Tanto no início como no fim do experimento, a concentração de cobre na raiz foi mais alta que a concentração nas folhas para as duas espécies (Figura 20a).

Figura 19 – Concentração de cobre (Cu^{2+}) no meio de cultivo com *P. stratiotes* e com *S. auriculata* na condição com cobre (Legenda: as barras de erro representam o desvio padrão analítico)



Já na condição com cobre, observou-se um aumento da concentração deste metal no tecido das macrofitas no fim do experimento (Figura 20b). Nesta condição, a concentração de cobre nas raízes também foi maior que a concentração nas folhas. *S. auriculata* teve uma maior concentração de cobre, tanto nas folhas como na raiz, do que *P. stratiotes*. O maior valor de concentração de cobre foi de $19,29 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ g}^{-1} \text{ M.S.}$ no caso da raiz de *S. auriculata* no final do experimento (Figura 20a).

Figura 20 – Concentração de cobre por grama de massa seca (M.S.) no tecido das macrofitas *P. stratiotes* e *S. auriculata* nas condições (a) sem cobre e (b) com cobre



6 DISCUSSÃO

As macrófitas na condição sem cobre assimilaram os nutrientes do meio (Figura 6a) e aumentaram seu tamanho e biomassa (Figura 15). Já na condição com cobre, as macrófitas não assimilaram nutrientes (Figura 6b) e entraram em processo de senescência e abscisão nos primeiros dias. Algumas das alterações mostradas pelas macrófitas na condição com cobre foram clorose, dada a variação da pigmentação das folhas (manchas amareladas), e perda de raízes e de biomassa. Isto se deve pelo fato de que o cobre é tóxico em elevadas concentrações e pode causar clorose, necrose, descoloração foliar, atrofia e inibição do crescimento (VAN ASSCHE; CLIJSTERS, 1990).

Outros estudos também observaram sintomas como clorose e necrose, biomassa reduzida, redução do crescimento foliar e radicular, escurecimento de raízes, baixa concentração de clorofila e alterações nos cloroplastos sob altas concentrações de cobre (entre 10 e 50 μM ou 0,63 a 3,17 mg L^{-1}) (CISCATO et al., 1997; PATSIKKA; ARO; TYYSTJARVI, 1998; QUARTACCI et al., 2000).

Estes sintomas se devem à toxicidade do cobre a nível celular, uma vez que este metal se liga aos grupos sulfidrilas das proteínas, inibindo a ação enzimática e a função proteica, induz a deficiência de outros íons essenciais, prejudica os processos de transporte celular e produz danos oxidativos nas células (seu potencial redox catalisa a produção de radicais hidroxila altamente tóxicos). Isto inibe a atividade metabólica e, conseqüentemente, o crescimento e desenvolvimento vegetal e interfere em processos celulares importantes como a fotossíntese e a respiração (PATSIKKA; ARO; TYYSTJARVI, 1998; YRUELA, 2005).

O cobre inibe a fotossíntese pela substituição do íon Mg^{2+} na molécula de clorofila, o que leva à perda da eficiência fotossintética uma vez que a clorofila modificada perde a capacidade de absorção e transferência de energia. Após a interferência na reação de fotossíntese, outros processos metabólicos, tais como a respiração, também são afetados (KÜPPER; KÜPPER; SPILLER, 1996).

O cobre tende a se acumular no tecido radicular e sua translocação para outras partes da planta é lenta pelo qual este órgão é o mais afetado (LIAO et al., 2000; LOW; LEE; TAN, 1995). Quando a tolerância radicular é ultrapassada, os íons de Cu^{+2} são transportados pelo xilema e floema para a parte aérea, onde podem afetar as proteínas, lipídeos e cloroplastos (PATSIKKA; ARO; TYYSTJARVI, 1998).

Neste estudo, dada a variação morfológica (Figura 13 e Figura 14) e a perda radicular (

Figura 16), a espécie mais afetada foi *P. stratiotes*. *S. auriculata* apresentou maior resistência e menor perda de raízes, isto pode ser dado a que as raízes desta são, na verdade, folhas modificadas e esta característica pode ter influenciado na resistência ao cobre da mesma. Visto que *P. stratiotes* apresentou maior sensibilidade ao cobre nos primeiros dias do experimento, esta espécie possui um maior potencial para ser utilizada como bioindicador de toxicidade em ecossistemas naturais do que a *Salvinia auriculata*.

Além de ser tóxica, a concentração de cobre utilizada no experimento ($1 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$) foi letal para as duas espécies e inibiu a assimilação de nutrientes, pois não se verificou uma diminuição significativa na concentração de nitrogênio e fósforo ao longo do experimento.

Outros estudos também observaram efeitos tóxicos e/ou letais em concentrações próximas a $1 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ ou inclusive menores. Masutti et al. (2006) encontraram que o valor de CE_{50} (concentração efetiva na qual o agente tóxico causa um efeito agudo em 50% dos organismos de teste) de cobre para a *P. stratiotes* varia entre 0,2 a 0,5 $\text{mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$. Bizzo et al. (2014) encontraram que para concentrações maiores que 0,63 $\text{mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ em experimentos de curta duração (48h), *S. auriculata* apresenta danos observáveis tais como redução de massa, perda de água, clorofila, carotenóides, entre outros, e a partir de 6,3 $\text{mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ não sobrevive a 48h de experimentação.

O cobre também apresenta efeitos tóxicos e letais para outras espécies em concentrações menores que $1 \text{ mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$. Por exemplo, em experimentos com *Potamogeton pectinatus*, COSTA et al. (2018) observaram que a concentração de 0,06 $\text{mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ inibe a fotossíntese e a partir de 0,6 $\text{mg Cu}^{2+} \text{ L}^{-1}$ os indivíduos apresentaram diminuição do tamanho e número de folhas, morrendo após 10 dias de experimento.

Por ser letal em altas concentrações para as macrófitas aquáticas, o uso de cobre como algicida em ecossistemas aquáticos, tais como lagos e reservatórios, pode ser prejudicial para o estado trófico dos mesmos. A posterior degradação do material vegetal liberara nutrientes para o ambiente e causaria um aumento na velocidade do processo de fertilização das águas, mantendo o estado eutrófico e possibilitando assim novas florações de algas, entre outros efeitos indesejados (BIANCHINI JUNIOR, 2003).

Na condição com cobre, as macrófitas conseguiram remover o cobre do meio nos primeiros dias, pois a concentração no meio diminuiu até $0,50 \pm 0,07 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$, porém, a causa da degradação dos tecidos vegetais, o cobre foi liberado novamente ao meio após o dia 12. Em reservatórios isto provavelmente implicaria em um acúmulo de cobre nos sedimentos.

Com relação à concentração de cobre na biomassa das macrófitas, na condição sem cobre foi observada uma diminuição da concentração nos tecidos vegetais nas duas espécies no fim do experimento (Figura 20a). Quando cultivadas em um meio com baixa concentração de cobre, o aumento da biomassa sem um aumento na concentração de cobre nos seus tecidos pode ter produzido esta diminuição.

Na condição com cobre, houve acúmulo de cobre nos tecidos das duas macrófitas, sendo este maior nas raízes (Figura 20b). Como mencionado anteriormente, o cobre tende a se acumular principalmente no tecido radicular das plantas (LIAO et al., 2000; LOW; LEE; TAN, 1995). Brankovic et al. (2015) observaram o mesmo comportamento em macrófitas aquáticas enraizadas, como *Typha angustifolia* e *Iris pseudacorus*, onde a concentração e acúmulo de metais foi maior nas raízes. *S. auriculata* apresentou um maior acúmulo de cobre do que *P. stratiotes*, mostrando-se mais apropriada para a remediação de sistemas contaminados por cobre.

Da mesma forma que nas plantas, o cobre também afeta a fotossíntese, o crescimento, a atividade enzimática e a respiração das algas (YAN; PAN, 2002). Na concentração utilizada, o cobre é extremamente tóxico e usado como algicida (USEPA, 2009), razão pela qual não foi evidenciado crescimento de algas na condição com cobre.

Já na condição sem cobre, houve crescimento exponencial de algas a partir do dia 6 nas cubas com *Pistia stratiotes* e do dia 9 nas com *Salvinia auriculata*, como indicado pela concentração de clorofila-*a*, a qual é um indicador da biomassa fitoplânctônica (KASPRZAK et al., 2008). A competição por nutrientes, principalmente o fósforo, entre algas e macrófitas, foi evidenciada no resultado da concentração de fósforo total (PT) no meio, a qual tende a estabilizar após o dia 12. Isto porque o PSR, ao ser absorvido pelas algas, é transformado em fósforo orgânico e fica indisponível para as plantas, sem poder ser removido do meio.

A assimilação de PSR por parte do fitoplâncton se confirmou com o aumento da concentração de fósforo orgânico particulado a partir do mesmo dia de aumento da clorofila-*a*. Desta forma, as algas foram responsáveis pela remoção de aproximadamente 30% do fósforo solúvel reativo no meio na condição sem cobre. No caso do nitrogênio, não foi verificada uma influência significativa de remoção pelas algas (menor a 1,7%), devido à baixa concentração de nitrogênio orgânico até o final do experimento.

Com relação às taxas de remoção de nutrientes, *P. stratiotes* possui as maiores taxas de remoção a altas concentrações, principalmente no caso do nitrogênio ($2,0 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$ e $10 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$, ver mais detalhes nas Figura 11 e Figura 12). As taxas de remoção de nutrientes de *S. auriculata* em altas concentrações são menores do que as da *P. stratiotes* ($1,5 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$ e $3,8 \text{ mg N-NO}_3^- \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$). Porém, *S. auriculata* parece apresentar maior competitividade a baixas concentrações, pois suas taxas permanecem constantes à diferença de *P. stratiotes*, cujas taxas diminuem com a concentração de nutrientes (Figura 11 e Figura 12). Por exemplo, no caso do fósforo, a menor taxa observada para *P. stratiotes* foi de $0,4 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$, enquanto que na *S. auriculata* foi de $0,6 \text{ mg P-PO}_4^{3-} \text{ g}^{-1} \text{ M.S. d}^{-1}$. Com isto, o uso de *Pistia stratiotes* seria recomendável para a remediação de ambientes eutrofizados ou com altas concentrações de nutrientes. Já a *Salvinia auriculata* poderia ser utilizada em ambientes com baixas concentrações de nutrientes ou em sem sistemas com concentração variável, sem prejudicar a eficiência de remoção, pois sua taxa é relativamente constante apesar da variação da concentração.

Com relação ao acúmulo de nutrientes na biomassa, *S. auriculata* acumulou mais nitrogênio nos tecidos, enquanto que *P. stratiotes* acumulou mais fósforo. Shardendu et al. (2012) estudaram quatro tipos de macrófitas aquáticas, *Eleocharis plantaginea*, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* e *Hydrilla verticillata*, e constataram que *P. stratiotes* acumulou a maior quantidade de fósforo, atingindo a concentração de $6,12 \pm 0,95 \text{ mg P g}^{-1} \text{ M.S.}$ em um meio com 50 mg P L^{-1} . Neste caso, *P. stratiotes* acumulou $2,52 \pm 0,43 \text{ mg P g}^{-1} \text{ M.S.}$ em um meio de 3 mg P L^{-1} . Isto sugere que o acúmulo de nutrientes na biomassa das macrófitas é maior quanto maior for a disponibilidade de nutrientes no meio. Dado o potencial de acúmulo de nutrientes pelas duas espécies de macrófitas, o seu uso é adequado para a remoção e sequestro de nutrientes em ecossistemas eutrofizados.

7 CONCLUSÕES

Evidenciou-se toxicidade do cobre sobre as espécies *P. stratiotes* e *S. auriculata*, pois este inibiu o crescimento e a assimilação de nutrientes, sendo letal na concentração de $1 \text{ mg Cu}^{+2} \text{ L}^{-1}$.

Dada a variação morfológica e a abscisão radicular e foliar, *P. stratiotes* foi a espécie mais afetada e que apresentou maior sensibilidade ao cobre em um menor tempo, com isto, esta espécie possui um maior potencial para ser utilizada como bioindicador de toxicidade por cobre em ecossistemas naturais do que a *S. auriculata*.

Para as duas espécies de macrófitas, foi observado um acúmulo de cobre tanto nas raízes como nas folhas, sendo este maior nas raízes. Neste caso, *S. auriculata* apresentou maior capacidade de acumulação de cobre na biomassa, sendo mais indicada para ser utilizada na remediação de ambientes aquáticos contaminados com este metal.

P. stratiotes apresentou maior eficiência de remoção de nutrientes em altas concentrações, enquanto que a *S. auriculata* apresentou melhor desempenho em menores concentrações.

Ambas as espécies tem alto potencial para serem utilizadas no acúmulo e sequestro de nutrientes na biomassa em processos de remediação de ecossistemas eutrofizados.

REFERÊNCIAS

AHUJA, S. **Handbook of Water Purity and Quality**. New York: Academic Press, 2009.

ALAM, M. G. M.; SNOW, E. T.; TANAKA, A. Arsenic and heavy metal contamination of vegetables grown in Samta village, Bangladesh. **The Science of the Total Environment**, v. 308, p. 83–96, 2003.

ALVAREZ, P.; ILLMAN, W. **Bioremediation and Natural Attenuation**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

ANDERSEN, J. M. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediment. **Water Research**, v. 10, p. 329–331, 1976.

APHA; AWWA; WEF. 4500 - Phosphorous - Acid Ascorbic Method. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005a. p. 153–155.

APHA; AWWA; WEF. 4500 - Nitrate - Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005b. p. 120–121.

APHA; AWWA; WEF. 4500-P B (5) – Persulfate Digestion Method. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005c.

APHA; AWWA; WEF. 4500-NH₃ Nitrogen (Ammonia). In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005d. p. 108–117.

APHA; AWWA; WEF. 10200 H. Chlorophyll. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005e. p. 18–26.

APHA; AWWA; WEF. 4500-P E – Ascorbic Acid Method. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005f.

APHA; AWWA; WEF. 4500-Norg C. Semi-Micro-Kjeldahl Method. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005g. p. 132–133.

APHA; AWWA; WEF. 3111 B. Direct Air-Acetylene Flame Method. In: **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. Baltimore: Port City Press, 2005h. p. 17–19.

BEGHELLI, F. G. DE S. et al. Aplicações de sulfato de cobre no reservatório guarapiranga, sp: distribuição no meio e efeitos sobre a comunidade planctônica. In: POMPEO, M. et al. (Eds.). . **Ecologia de reservatórios e interfaces**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015. p. 294–308.

BIANCHINI JUNIOR, I. Modelos de crescimento e decomposição de macrófitas aquáticas. In: THOMAZ, S. M.; BINI, L. M. (Eds.). . **Ecologia e manejo de macrófitas aquáticas**. Maringá: EDUEM, 2003. p. 2–43.

BIZZO, A. L. T. et al. Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl . **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 3, p. 268–277, 2014.

BRANKOVIĆ, S. et al. Uptake of seven metals by two macrophytes species: potential for phytoaccumulation and phytoremediation. **Chemistry and Ecology**, v. 31, n. 7, p. 583–593, 2015.

BRASIL. **Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do?lingua=pt#CondicaoTaxonCP>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

CALIJURI, M. DO C.; CUNHA, D. G. F.; MOCCELLIN, J. Fundamentos Ecológicos e Ciclos Naturais. In: CALIJURI, M. DO C.; CUNHA, D. G. F. (Eds.). . **Engenharia Ambiental: conceitos, tecnologia e gestão**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2013. p. 131–159.

CANCIAN, L. F.; CAMARGO, A. F. M.; SILVA, G. H. G. Crescimento de *Pistia stratiotes* em diferentes condições de temperatura e fotoperíodo. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 552–557, 2009.

CARMAN, E. P.; CROSSMAN, T. L. Phytoremediation. In: NYER, E. K. (Ed.). . **In Situ Treatment Technology**. New York: CRC Press, 2001. p. 536.

CHAMPAGNE, P. Phytoremediation. In: BHANDARI, A. et al. (Eds.). . **Remediation Technologies for Soils and Groundwater**. Reston: ASCE, 2007. p. 290–352.

CISCATO, M. et al. Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. n. Marschner 1995, p. 901–908, 1997.

COMETTI, N. N. et al. Efeito da concentração da solução nutritiva no crescimento da alface em cultivo hidropônico-sistema NFT. **Horticultura Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 262–267, 2008.

COSTA, M. B. et al. Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 155, n. June 2017, p. 117–124, 2018.

COSTANZA, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253–260, 15 maio 1997.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações gerais e características de utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, n. 1, p. 103–117, 2007.

DU PLESSIS, A. Global Water Availability, Distribution and Use. In: **Freshwater challenges of South Africa and its Upper Vaal River**. Springer Water. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 3–11.

EPPO. *Pistia stratiotes* L. **EPPO Bulletin**, v. 47, n. 3, p. 537–543, dez. 2017.

FALKOWSKI, P. et al. The Global Carbon Cycle : A Test of Our Knowledge of Earth as a System. **October**, v. 291, n. 2000, p. 290–296, 2012.

FAO; IWMI. **More people, more food , worse water? A global review of water pollution from agricultur**. Rome: FAO, 2018.

FILIPPELLI, G. M. The Global Phosphorus Cycle. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 48, n. 1, p. 391–425, 1 jan. 2002.

FILIPPELLI, G. M. The Global Phosphorus Cycle : Past , Present , and Future. p. 89–95, 2008.

FONKOU, T. et al. **Potentials of water lettuce (*Pistia stratiotes*) in domestic sewage treatment with macrophytic lagoon systems in Cameroon**. International Symposium on Environmental Pollution Control and Waste Management. **Anais...**2002

FORNO, I. W. Native distribution of the *Salvinia auriculata* complex and keys to species identification. **Aquatic Botany**, v. 17, n. 1, p. 71–83, set. 1983.

GALLOWAY, J. N. et al. Nitrogen fixation: Anthropogenic enhancement-environmental response. **Global Biogeochemical Cycles**, v. 9, n. 2, p. 235–252, 1995.

GALLOWAY, J. N. et al. The Nitrogen Cascade. **BioScience**, v. 53, n. 4, p. 341–356, 2003.

GALLOWAY, J. N. et al. Nitrogen cycles: Past, present, and future. **Biogeochemistry**, v. 70, n. 2, p. 153–226, 2004.

GALLOWAY, J. N. et al. Biogeochemical cycles. In: MELILLO, J. M.; RICHMOND, T. C.; YOHE, G. W. (Eds.). . **Climate Change Impacts in the United States :The Third National Climate Assessment**. Washington, D.C.: U.S. Global Change Research Program, 2014. p. 350–368.

GAUTAM, R. K. et al. Contamination of Heavy Metals in Aquatic Media: Transport, Toxicity and Technologies for Remediation. In: SHARMA, S. K. (Ed.). . **Heavy Metals In Water: Presence, Removal and Safety**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2014. p. 1–24.

GEORGE, G. T.; GABRIEL, J. J. Phytoremediation of Heavy Metals from Municipal Waste Water by *Salvinia molesta* Mitchell. **Haya: The Saudi Journal of Life Sciences**, v. 2, n. 3, p. 108–115, 2017.

GRUBER, N.; GALLOWAY, J. N. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. **Nature**, v. 451, n. 7176, p. 293–296, 2008.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, n. 347, p. 1–32, 1950.

HORNE, A. J. Phytoremediation by Constructed Wetlands. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Eds.). . **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton: CRC Press LLC, 2000. p. 26–52.

HOWARTH, R. et al. Nutrient pollution of coastal rivers, bays, and seas. **Issues in Ecology**, v. 7, n. 7, p. 1–15, 2000.

HYDROGROSYSTEMS, I. **Nutrient Solution Formulations**. Disponível em: <http://www.hydrogrosystems.com/?page_id=436>.

JORGENSON, A. K. Political-economic integration, industrial pollution and human health: A panel study of less-developed countries, 1980-2000. **International Sociology**, v. 24, n. 1, p. 115–143, 2009.

JULIEN, M. H.; BOURNE, A. S. Compensatory branching and changes in nitrogen content in the aquatic weed *Salvinia molesta* in response to disbudding. **Oecologia**, v. 70, n. 2, p. 250–257, 1986.

KASPRZAK, P. et al. Chlorophyll a concentration across a trophic gradient of lakes: An estimator of phytoplankton biomass? **Limnologica**, v. 38, n. 3–4, p. 327–338, 2008.

KHAN, A. G. et al. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. **Chemosphere**, v. 41, n. 1–2, p. 197–207, 2000.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. 2 ed. ed. São Paulo: FASF, 1997.

KOLPIN, D. W. et al. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. **Science of the Total Environment**, v. 328, n. 1–3, p. 119–130, 2004.

KOROLEFF, F. Determination of nutrients: 2. Ammonia. In: GRASSHOFF, K. (Ed.). **Methods of Seawater Analysis**. Weinheim: Verlag Chemie, 1976. p. 126–133.

KÜPPER, H.; KÜPPER, F.; SPILLER, M. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 47, n. 2, p. 259–266, 1996.

LIAO, M. T. et al. Copper uptake and translocation in chicory (*Cichorium intybus* L. cv Grasslands Puna) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Rondy) plants grown in NFT system. II. The role of nicotianamine and histidine in xylem sap copper transport. **Plant and Soil**, v. 223, n. 1–2, p. 243–252, 2000.

LOW, K. S.; LEE, C. K.; TAN, K. K. Biosorption of basic dyes by water hyacinth roots. **Bioresource Technology**, v. 52, p. 79–83, 1995.

LU, Q. et al. Phytoremediation to remove nutrients and improve eutrophic stormwaters using water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 17, p. 84–96, 2010.

MARKOV, S. Nitrogen cycle. In: SPRADLEY, J. et al. (Eds.). . **Earth Science: Earth's weather, water, and atmosphere**. 1. ed. [s.l.] EBSCO, 2012. p. 347–350.

MARTINS, C. R. et al. Ciclos Globais de Carbono , Nitrogênio e Enxofre : a Importância na Química da Atmosfera. **Caderno Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 5, p. 28–41, 2003.

MASUTTI, M. B. et al. Sensibilidade a Cobre e Cromo por *Oreochromis niloticus* e *Pistia stratiotes*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1, p. 37–42, 2006.

MEYER, M. **Avaliação da biomassa de *Paspalum repens* Bergius submetida a flutuacao do nível de agua na represa de barra bonita (zona de desembocadura do rio capivara-sp)**. [s.l.] Escola de Engenharia de São Carlos, USP, 1996.

MILLER, J. R. et al. Heavy metal contamination of water, soil and produce within riverine communities of the Ríó Pilcomayo basin, Bolivia. **Science of the Total Environment**, v. 320, p. 189–209, 2004.

MIRETZKY, P.; SARALEGUI, A.; CIRELLI, A. F. Aquatic macrophytes potential for the simultaneous removal of heavy metals (Buenos Aires, Argentina). **Chemosphere**, v. 57, n. 8, p. 997–1005, nov. 2004.

NAGGAR, Y. AL; KHALIL, M. S.; GHORAB, M. A. Environmental pollution by heavy metals in the squatic ecosystems of Egypt. **Open Access Journal of Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2018.

NEN. **6520 Water – Spectrophotometric determination of chlorophyll-a content**. Netherlands: Nederlands Normalisatie instituut, 2006.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

NUSCH, E. A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigment determination. **Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.**, v. 14, p. 14–36, 1980.

PATSIKKA, E.; ARO, E.; TYYSTJARVI, E. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. **Plant physiology**, v. 117, n. 2, p. 619–27, 1998.

PAUL, D. Research on heavy metal pollution of river Ganga: A review. **Annals of Agrarian Science**, v. 15, n. 2, p. 278–286, 2017.

PEÑUELAS, J. et al. Human-induced nitrogen-phosphorus imbalances alter natural and managed ecosystems across the globe. **Nature Communications**, v. 4, p. 1–10, 2013.

PETRUCIO, M. M.; ESTEVES, F. A. Uptake rates of nitrogen and phosphorus in the water by *Eichornia crassipes* and *Salvinia auriculata*. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 2, p. 229–236, 2000.

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

POI DE NEIFF, A.; CARIGNAN, R. Macroinvertebrates on *Eichhornia crassipes* roots in two lakes of the a River floodplain DS. **Hydrobiologia**, v. 345, n. 1990, p. 185–196, 1997.

POLOMSKI, R. F. et al. Nitrogen and phosphorus remediation by three floating aquatic macrophytes in greenhouse-based laboratory-scale subsurface constructed wetlands. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 197, p. 223–232, 2009.

POMPÊO, M. L. M.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Macrófitas aquáticas e perifíton, aspectos ecológicos e metodológicos**. São Carlos: RiMa, 2003.

QUARTACCI, M. F. et al. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. **Physiologia Plantarum**, v. 108, n. 1, p. 87–93, 2000.

RAI, P. K. Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation using Wetland Plants: An ecosustainable approach. **International Journal of Phytoremediation**, v. 10, n. 2, p. 133–160, 3 abr. 2008.

RAI, U. N. et al. Bioaccumulation of toxic metals (Cr, Cd, Pb and Cu) by seeds of *Euryale ferox* Salisb. (*Makhana*). **Chemosphere**, v. 46, n. 2, p. 267–272, 2002.

RUTTENBERG, K. C. The Global Phosphorus Cycle: Overview. In: HOLLAND, H. D.;

TUREKIAN, K. K. (Eds.). . **Treatise on Geochemistry**. [s.l.] Elsevier Ltd, 2003. p. 585–643.

SANTOS, J. B. et al. Fitorremediação de herbicida Trifloxysulfuron Sodium. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 323–330, 2004.

SASSAKI, R. M.; FELIPPE, G. M. Response of *Dalbergia miscolobium* Benth. seedlings, a cerrado tree species, to mineral nutrient supply. **Revta brasil Bot. São Paulo**, v. 21, n. 1, p. 65–72, 1998.

SCHWARZENBACH, R. P. et al. The Challenge of Micropollutants in Aquatic Systems. **Science**, v. 313, n. August, p. 1072–1077, 2006.

SCHWARZENBACH, R. P. et al. Global Water Pollution and Human Health. **Annual Review of Environment and Resources**, v. 35, n. 1, p. 109–136, 2010.

SHARDENDU, S. et al. Luxury Uptake and Removal of Phosphorus from Water Column by Representative Aquatic Plants and Its Implication for Wetland Management. **ISRN Soil Science**, v. 2012, p. 1–9, 2012.

SOUZA, L. A. DE et al. Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, n. 4, p. 1441–1451, 2011.

TREJO-TÉLLEZ, L. I.; GÓMEZ-MERINO, F. C. Nutrient Solutions for Hydroponic Systems. In: ASAO, T. (Ed.). . **Hydroponics - A Standard Methodology for Plant Biological Researches**. [s.l.] InTech, 2012. p. 1–23.

TSUCHIYA, Y. Organical Chemicals As Contaminants of Water Bodies and Drinking Water. In: TSUCHIYA, Y.; KUBOTA, S. (Eds.). . **Water Quality and Standards**. Singapore: EOLSS Publishers Co. Ltd., 2010. v. 2p. 150–171.

UNESCO. **The United Nations World Water Development Report 3: Water in a Changing World**. Paris: UNESCO, 2009. v. 11

USEPA. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Coppers. n. May, p. 1–172, 2009.

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

VICTOR, K. K. et al. Bioaccumulation of Heavy Metals from Wastewaters (Pb , Zn , Cd , Cu and Cr) in Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*) and Water Lettuce (*Pistia stratiotes*). **International Journal of ChemTech Research**, v. 9, n. 02, p. 189–195, 2016.

VIEIRA, L. R. et al. Toxicidade de cádmio em plantas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, p. 1574–1588, 2015.

VIEIRA, R. F. **Ciclo do nitrogênio em sistemas agrícolas**. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

VITOUSEK, P. M. et al. Human alteration of the global nitrogen cycle: Source and consequences. **Ecological Applications**, v. 7, n. 3, p. 737–750, 1997.

WEIS, J. S.; WEIS, P. Metal uptake, transport and release by wetland plants: implications for phytoremediation and restoration. **Environment International**, v. 30, n. 5, p. 685–700, jul. 2004.

WINTERMANS, J. F. G. M.; DEMOTS, A. Spectrophotometric characteristics of chlorophyll “a” and “b” and their phenophytins in ethanol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 109, p. 448–453, 1965.

WOLFE, A. H.; PATZ, J. A. Reactive nitrogen and human health: acute and long-term implications. **Ambio**, v. 31, n. 2, p. 120–125, 2002.

YAN, H.; PAN, G. Toxicity and bioaccumulation of copper in three green microalgal species. **Chemosphere**, v. 49, n. 5, p. 471–476, 2002.

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

ZAMPARAS, M. et al. Removal of phosphate from natural waters using innovative modified bentonites. **Applied Clay Science**, v. 63, p. 101–106, 2012.

ZAMPARAS, M.; ZACHARIAS, I. Restoration of eutrophic freshwater by managing internal nutrient loads. A review. **Science of the Total Environment**, v. 496, p. 551–562, 2014.

ZIETZ, B. et al. Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply. **The Science of The Total Environment**, v. 302, n. 1–3, p. 127–144, 20 jan. 2003.

ANEXOS

ANEXO 1 – Meio Arnon e Hoagland modificado (HOAGLAND; ARNON, 1950)

Preparam-se as soluções estoque e são adicionadas as quantidades indicadas na tabela 1 para 1 litro de meio. Após preparo, todas as soluções estoque devem ser armazenadas em geladeira a 4°C.

Tabela 3 – Concentração das soluções estoque e quantidades necessárias para 1 litro de meio

Composto	Concentração na solução estoque		Quantidade a ser adicionada em 1 L de meio
	(M)	(g/L de H ₂ O)	(mL)
KH₂PO₄	1	136,09	1
KNO₃*	1	101,10	5
Ca(NO₃)₂	1	164,09	5
MgSO₄.7H₂O	1	246,47	2
Solução A	-	-	1
Solução B	-	-	1
EDTA**	-	0,10	10
TRIS**	-	-	500 mg

*Dada a falta de fonte de amônio (NH₄⁺), poderão ser dissolvidos 4g de NH₄Cl em 1 L da solução estoque de KNO₃ como indicado por HYDROGROSYSTEMS (2018).

** Adição opcional.

A. Solução estoque de metais traço

Tabela 4 - Quantidades necessárias para o preparo de 1 L de solução estoque de metais traço

Composto	Quantidade a ser dissolvida em 1 L de água (g)
H₃BO₃	2,86
MnCl₂.4H₂O	1,81
ZnSO₄.7H₂O	0,22
CuSO₄.5H₂O	0,08
Na₂MoO₄*	0,02

*O molibdato de amônio (Na₂MoO₄) substitui a fonte original de molibdênio, sendo esta ácido molibdico (H₂MoO₄.H₂O).

B. Solução estoque de Ferro

Prepara-se uma solução de sulfato de ferro (FeSO₄.7H₂O) a 0,5% (0,5 g em 99,5 ml de H₂O)

Para o cultivo de macrófitas, o meio Arnon e Hoagland foi diluído a 10%, resultando em concentrações finais de N e P como indicadas na tabela 3.