



Universidade de Aveiro Departamento de Geociências
Ano (2016)

**Virginie Alexandra
Marinho Meira**

**O potencial da fitorremediação para a recuperação
das escombrelas das minas de Penedono e
Aljustrel**



Universidade de Aveiro Departamento de Geociências
Ano 2016

**Virginie Alexandra
Marinho Meira**

**O potencial da fitorremediação para a recuperação
das escombrelas das minas de Penedono e
Aljustrel**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Geológica (Mestrado em Georecursos), realizada sob a orientação científica do Doutor Luís Novo, Bolseiro de pós-doutoramento do Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro.

o júri

Presidente

Prof. Doutor Jorge Manuel Girão Medina
Professor auxiliar do Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro

Vogais

Doutor Luís António Balreira Novo
Bolsheiro de pós-doutoramento do Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Luís González Rodríguez
Professor titular do Departamento de Biologia Vegetal e Ciências do Solo da Universidade de Vigo

agradecimentos

Gostaria de começar por agradecer ao Professor Eduardo da Silva que me disponibilizou este projeto de dissertação, ao Doutor Nuno Durães e às Doutoras Carla Patinha, Cláudia Dias e Cristina Sequeira pela ajuda indispensável em grande parte das atividades laboratoriais.

Agradeço também à minha família pelo apoio, em particular à minha irmã Alexandra Meira e Fábio Verde, pela paciência de lerem e rerelem os meus documentos.

O meu maior agradecimento vai para o Doutor Luís Novo pela incrível disponibilidade e paciência, pelos inúmeros conhecimentos transmitidos ao longo deste projeto e pela fantástica orientação e ajudas valiosas que permitiram a realização desta dissertação.

palavras-chave

Fitorremediação; *Brassica nigra*; *Medicago sativa*; *Hirschfeldia incana*; metais pesados; poluição do solo

resumo

O solo é um recurso natural essencial que quando poluído pode degradar significativamente os ecossistemas e áreas agrícolas, colocando em risco a vida dos seres vivos, incluindo o ser humano. Com o aumento da exploração industrial (nomeadamente a exploração mineira), a poluição dos solos com metais pesados tornou-se um grave problema a nível mundial, levando à necessidade de encontrar soluções para controlar e remediar os danos causados. Nesse contexto, a fitorremediação constitui uma alternativa viável para a reabilitação de áreas contaminadas e sua reconversão para fins agrícolas, urbanos ou paisagísticos, face a outras técnicas de despoluição tradicionais, pelo seu caráter ecológico, sustentável e económico.

Para esta dissertação foram desenvolvidos dois ensaios laboratoriais distintos de modo a estudar o potencial da fitorremediação para recuperar as escombrelas de duas minas. O primeiro ensaio consistiu, numa primeira fase, na recolha de amostras da escombrela da mina de Santo António (Penedono) e respetivas plantas, de modo a estudar o potencial destas como bioindicadores. Posteriormente realizaram-se ensaios *ex situ* com o objetivo de avaliar a capacidade de duas espécies, *Brassica nigra* e *Medicago sativa*, como fitorremediadoras dessa escombrela. Neste estudo foi também comparado o efeito do húmus em 3 concentrações (0%, 15% e 25%), de modo a perceber a sua influência como corretivo da escombrela e potenciador do crescimento vegetal, e a capacidade de dois quelantes altamente degradáveis (ácido cítrico e ácido oxálico) para aumentar a biodisponibilidade dos metais. No segundo ensaio laboratorial, estudou-se o comportamento da *Hirschfeldia incana* como fitorremediadora num solo colhido na mina de Aljustrel. Neste ensaio comparou-se o efeito do húmus em duas concentrações (0% e 15%), assim como o uso de tiocianato de amónio como quelante e de ácido giberélico como fito-hormona.

Os resultados sugerem que na escombrela de Penedono as espécies *Cytisus multiflorus*, *Pteridium aquilinum* e *Graminaea sp* são úteis para a bioindicação de cobre, zinco, manganês e estrôncio, e que a espécie *Polytrichum commune* pode ser utilizada na bioindicação de zinco e manganês. Por outro lado a planta do género *Agrostis sp.* apresenta potencial para bioindicação de cobre, prata, estrôncio, e a espécie *Leontodon taraxacoides* para bioindicação de cobre, estrôncio e cádmio. Os ensaios de fitorremediação revelam que a *B. nigra* pode ser apta para a fitoestabilização de zinco, cobalto e manganês; *M. sativa* revelou ser útil na fitoestabilização de cobre, zinco e manganês, e a *H. incana* tem aptidão para fitoestabilizar prata, ouro, cádmio, e zinco (quando complementada com tratamentos específicos). Em todos os ensaios verificou-se que a presença de húmus incrementou o crescimento das plantas. O ácido cítrico funcionou como quelante de Bi (*B. nigra*) e Ag (*M. sativa*); o ácido oxálico operou como quelante de Ag e Au nos testes com *B. nigra*. O tiocianato de amónio mostrou ser eficiente como quelante de Ag nos ensaios com *H. incana*. Por último, os resultados demonstram que o ácido giberélico não teve exercido influência no desenvolvimento da *H. incana*.

keywords

phytoremediation; *Brassica nigra*; *Medicago sativa*; *Hirschfeldia incana*; heavy metals; soil pollution

abstract

Soil is an essential natural resource that when polluted, can significantly degrade ecosystems and agricultural areas, putting at risk all living beings, including humans. As industrial exploitation increased (particularly, the mining sector), metal soil pollution grew into a serious global problem. Thus, the need to find solutions to control and mitigate the damage caused by metal contamination became urgent. In this context, phytoremediation is a viable alternative for the rehabilitation of contaminated areas and their reconversion for agricultural, urban or landscape purposes, in comparison to other traditional decontamination techniques, due to its ecological, sustainable and economic character.

For this dissertation two different experiments were developed in order to study the potential of phytoremediation to recover the tailings of two mines. The first test consisted, during an initial phase, in gathering samples of the heap from the Santo António mine (Penedono) and its plants, to study their potential as bioindicators. Subsequently, ex situ trials were carried out to evaluate the capacity of two species, *Brassica nigra* and *Medicago sativa*, as phytoremediators of this heap. In this study, the humus effect in 3 concentrations (0%, 15% and 25%) was also compared in order to perceive its influence as amendment and plant growth enhancer, and the ability of two highly degradable chelants (citric acid and oxalic acid) to increase the metals bioavailability. In the second laboratory test, the behavior of *Hirschfeldia incana* as a phytoremediator in tailings from the Aljustrel mine was studied. In this assay, two humus concentrations (0% and 15%) were compared, as was the use of ammonium thiocyanate as chelant, and gibberellic acid as phytohormone. The results suggest that in the Penedono heap the species *Cytisus multiflorus*, *Pteridium aquilinum* and *Graminaea sp* are useful for the bioindication of copper, zinc, manganese and strontium, and the species *Polytrichum commune* can be used for zinc and manganese bioindication. On the other hand, plants from the *Agrostis sp.* genus can be used for bioindication of copper, silver, strontium, while the species *Leontodon taraxacoides* is apt for bioindication of copper, strontium and cadmium. The phytoremediation assays indicate that *B. nigra* has potential for zinc, cobalt and manganese phytostabilization; *M. sativa* has been found to be useful in copper, zinc and manganese phytostabilization, and *H. incana* has the ability to phytostabilize silver, cadmium, and zinc. In all the tests, the humus presence increased the plants growth. Contrarily, gibberellic acid revealed no effect on the plants development. Finally, citric acid worked as a chelator of Bi (*B. nigra*) and Ag (*M. sativa*); Oxalic acid managed to chelate Ag and Au in *B. nigra* tests; while ammonium thiocyanate showed to be efficient as a chelating agent of Ag in the *H. incana* assays.

Índice

I.	INTRODUÇÃO	1
I.1	FONTES DE METAIS PESADOS	2
I.1.1	Fontes Naturais	2
I.1.2	Fontes Agrícolas	3
I.1.3	Fontes Industriais e Mineração	3
I.1.4	Efluentes Domésticos	4
I.1.5	Fontes Atmosféricas	4
I.1.6	Emissão de metais pesados	4
I.2	ECOTOXICOLOGIA DOS METAIS PESADOS	5
I.2.1	Metais pesados essenciais	5
I.2.2	Efeitos nas plantas	5
I.2.2.1	Zinco	6
I.2.2.2	Cádmio	6
I.2.2.3	Cobre	7
I.2.2.4	Mercúrio	7
I.2.2.5	Crómio	7
I.2.2.6	Chumbo	7
I.2.2.7	Arsénio	8
I.2.2.8	Níquel	8
I.2.3	Efeitos no ser humano	8
I.2.3.1	Alumínio	9
I.2.3.2	Arsénio	9
I.2.3.3	Cádmio	10
I.2.3.4	Crómio	10
I.2.3.5	Chumbo	10
I.2.3.6	Manganês	10
I.2.3.7	Mercúrio	11
I.2.3.8	Zinco	11
I.3	FITORREMEDIACÃO E BIOINDICAÇÃO	11
I.3.1	Bioacumulação de metais em plantas	11
I.3.1.1	Hiperacumulação	12
I.3.1.2	Fatores de translocação e bioacumulação	12
I.3.2	Bioindicação	13
I.3.3	Fitorremediação	14
I.3.3.1	Fitoestabilização	15
I.3.3.2	Fitoextração	16
I.3.3.3	Fitovolatilização	17
I.3.3.4	Fitoestimulação	17
I.3.3.5	Fitoestabilização	18
I.3.3.5	Fitodegradação	18
I.4	QUELANTES	18
I.4.1	APCAs	20
I.4.1.1	APCAs sintéticos	20
I.4.1.2	APCAs naturais	21
I.4.2	LMWOAs	22
I.4.3	Quelantes específicos para o Au	23
I.5	ESTADO DA ARTE EM PORTUGAL	24
II.	OBJETIVOS	29
II.1	CIENTÍFICOS	29
II.2	AQUISIÇÃO DE CONHECIMENTO E COMPETÊNCIAS	29
III.	BIOINDICAÇÃO	31

III.1 OBJETIVOS	31
III.2 ENQUADRAMENTO DA ÁREA EM ESTUDO.....	31
III.2.1 <i>Enquadramento Geográfico</i>	31
III.2.2 <i>Enquadramento Geológico</i>	32
III.3 METODOLOGIA	32
III.3.1 <i>Amostragem</i>	32
III.3.2 <i>Caracterização das espécies recolhidas</i>	32
III.3.2.1 <i>Cytisus multiflorus</i>	32
III.3.2.2 <i>Pteridium aquilinum</i>	33
III.3.2.3 <i>Polytrichum commune</i>	34
III.3.2.4 <i>Gramineae sp.</i>	34
III.3.2.5 <i>Agrostis sp.</i>	35
III.3.2.6 <i>Leontodon taraxacoides</i>	35
III.3.3 <i>Processamento das amostras</i>	36
III.3.3.1 <i>Secagem da escombreira</i>	36
III.3.3.2 <i>Lavagem e secagem das plantas</i>	36
III.3.3.3 <i>Moagem das plantas</i>	37
III.3.3.4 <i>Peneiração da escombreira</i>	37
III.3.3.5 <i>Moagem da escombreira</i>	38
III.3.3.6 <i>Medição do pH e da condutividade da escombreira</i>	38
III.3.4 <i>Determinação das concentrações de metais</i>	39
III.3.5 <i>Fator de Bioacumulação (FBC) e Fator de Translocação (FT)</i>	39
III.4 RESULTADOS	41
IV. FITORREMEDIAÇÃO	45
IV.1 OBJETIVOS.....	45
IV.2 METODOLOGIA (AMOSTRAS DE PENEDONO)	45
IV.2.1 <i>Desenho experimental</i>	45
IV.2.2 <i>Caracterização físico-química</i>	46
IV.2.2.1 pH.....	46
IV.2.2.2 <i>Matéria orgânica</i>	46
IV.2.2.3 <i>Metais pesados</i>	47
IV.2.2.3.1 <i>Escombreira</i>	47
IV.2.2.3.2 <i>Escombreira – Fração biodisponível</i>	47
IV.2.3 <i>Ensaio de Fitorremediação</i>	48
IV.2.4 <i>Análise estatística</i>	52
IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO (PENEDONO)	53
IV.4 METODOLOGIA (AMOSTRAS DE ALJUSTREL)	67
IV.4.1 <i>Enquadramento Geográfico</i>	67
IV.4.2 <i>Enquadramento Geológico</i>	67
IV.4.3 <i>Desenho experimental</i>	68
IV.4.4 <i>Caracterização físico-química</i>	69
IV.4.4.1 pH.....	69
IV.4.4.2 <i>Matéria orgânica</i>	69
IV.4.4.3 <i>Metais pesados</i>	69
IV.4.4.3.1 <i>Escombreira</i>	69
IV.4.4.3.2 <i>Escombreira – Fração Disponível</i>	70
IV.4.4.4 <i>Área Foliar</i>	70
IV.4.5 <i>Ensaio de fitorremediação</i>	70
IV.4.6 <i>Análise estatística</i>	73
IV.5 <i>Resultados e Discussão (Aljustrel)</i>	74
V. CONCLUSÃO	83
VI. TRABALHOS FUTUROS	85
VII. BIBLIOGRAFIA	87

Índice de figuras

Figura 1- Representação da acumulação de metais e metaloides pelas plantas	13
Figura 2- Mecanismos da fitorremediação.....	15
Figura 3- Fitoextração induzida com uso de quelante	16
Figura 4- Fitoextração contínua.....	17
Figura 5- Esquema dos processos de captação de metais na planta	20
Figura 6- Enquadramento geográfico da área em estudo.....	31
Figura 7- <i>C. multiflorus</i>	33
Figura 8- <i>P. aquilinum</i>	33
Figura 9- <i>P. commune</i>	34
Figura 10- <i>Gramineae sp</i>	34
Figura 11- <i>Agrostis sp</i>	35
Figura 12- <i>L. taraxacoides</i>	35
Figura 13- Amostras de escombreira na estufa.....	36
Figura 14- Lavagem de uma raiz.....	37
Figura 15- Moagem das plantas colhidas na antiga mina de Penedono.	37
Figura 16- Baldes de peneiração grosseira.....	38
Figura 17- Moinho mecânico de discos de aço com uma amostra de escombreira.	38
Figura 18- Agitador dos tubos para a medição do pH.	39
Figura 19- Cadinhos e respetivas amostras	46
Figura 20- Amostras no shaker.....	48
Figura 21- Filtragem das amostras.	48
Figura 22- Germinação de <i>M. sativa</i> e <i>B. nigra</i>	49
Figura 23- <i>B. nigra</i> e <i>M. sativa</i> ao fim de 4 semanas.....	49
Figura 24- <i>B. nigra</i> e <i>M. sativa</i> após a sua transplantação nos vasos com os diferentes tratamentos.	50
Figura 25- <i>M. sativa</i> e <i>B. nigra</i> um mês após a transplantação.....	50
Figura 26- <i>B. nigra</i> e <i>M. sativa</i> após a aplicação do quelante.	51
Figura 27- <i>B. nigra</i> após lavagem e <i>B. nigra</i> dividida em raiz e parte aérea.	51
Figura 28- <i>B. nigra</i> em tubos de digestão.....	52
Figura 29- Matéria Orgânica (% p:p) nos diferentes tratamentos	53
Figura 30- Peso fresco (g) da raiz e parte aérea das <i>B. nigra</i>	54
Figura 31- Peso seco (g) da raiz e parte aérea das <i>B. nigra</i>	55
Figura 32- Peso fresco (g) da raiz e parte aérea das <i>M. sativa</i>	55
Figura 33- Peso seco (g) da raiz e parte aérea das <i>M. sativa</i>	56
Figura 34- Concentração de Cu (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	56
Figura 35- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	57
Figura 36- Concentração de As (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	57
Figura 37- Concentração de Ag (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	57
Figura 38- Concentração de Co (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	58
Figura 39- Concentração de Au (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	58
Figura 40- Concentração de Pb (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	59
Figura 41- Concentração de Bi (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	59
Figura 42- Concentração de Mn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	60
Figura 43- Concentração de Cu (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	61
Figura 44- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	62
Figura 45- Concentração de As (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	62
Figura 46- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	63
Figura 47- Concentração de Co (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	63
Figura 48- Concentração de Au (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	64
Figura 49- Concentração de Pb (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	64
Figura 50- Concentração de Bi (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	65

Figura 51- Concentração de Mn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	65
Figura 52- Enquadramento geográfico da área em estudo	67
Figura 53- Germinação da <i>H. incana</i> no primeiro e sétimo dia	70
Figura 54- Germinação da <i>H. incana</i>	71
Figura 55- Primeiro e 24º dia após a transplantação	71
Figura 56- Aplicação de ácido giberélico	72
Figura 57- Plantas no dia da aplicação do quelante	72
Figura 58- Matéria Orgânica (% p:p) dos diferentes tratamentos.	74
Figura 59- Peso fresco (g) da raiz e parte aérea das <i>H. incana</i>	75
Figura 60- Peso seco (g) da raiz e parte aérea das <i>H. incana</i>	75
Figura 61- Área foliar das <i>H. incana</i> nos diferentes tratamentos.....	76
Figura 62- Relação peso/área foliar com a presença de húmus.....	76
Figura 63- Concentração de As (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	77
Figura 64- Concentração de Ag (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	77
Figura 65- Concentração de Cd (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	78
Figura 66- Concentração de Au (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	78
Figura 67- Concentração de Pb (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	78
Figura 68- Concentração de Bi (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	79
Figura 69- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B)	79
Figura 70- Concentração de Ba (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B).....	80

Índice de tabelas

Tabela 1- Efeitos tóxicos dos metais nas plantas	6
Tabela 2- Efeito tóxicos dos metais no Homem	9
Tabela 3- pH e condutividade da escombreira	41
Tabela 4- Concentração de metais na escombreira de Penedono (ponto A).....	41
Tabela 5- Concentração de metais na escombreira de Penedono (ponto B).....	41
Tabela 6- Concentração de metais nas plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto A)	41
Tabela 7- Concentração de metais nas plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto B).....	42
Tabela 8- Fator de bioacumulação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto A)	42
Tabela 9- Fator de bioacumulação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto B).....	42
Tabela 10- Fator de Translocação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto A)	43
Tabela 11- Fator de Translocação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto B)	43
Tabela 12- Desenho Experimental (<i>B. nigra</i> e <i>M. Sativa</i>).....	45
Tabela 13- pH para cada tratamento	53
Tabela 14- Fator de Biocumulação para a <i>B. nigra</i>	60
Tabela 15- Fator de Translocação para a <i>B. nigra</i>	61
Tabela 16- Fator de Biocumulação para a <i>M. sativa</i>	66
Tabela 17- Fator de Translocação para a <i>M. sativa</i>	66
Tabela 18- Desenho experimental	68
Tabela 19- Concentração de metais na escombreira de Aljustrel	74
Tabela 20- Fator de Bioacumulação parava <i>H. incana</i>	80
Tabela 21- Fator de Translocação para a <i>H. incana</i>	81

I. Introdução

A atividade industrial não parou de crescer desde o início do século 19, permitindo uma melhoria considerável das condições de vida para o ser humano. Esse crescimento deu-se essencialmente através da exploração dos recursos naturais, pelo que a degradação progressiva do meio ambiente se tornou uma ameaça premente à escala global. Uma das principais preocupações é a contaminação dos solos e águas por metais pesados, sobretudo por elementos como o cobre (Cu), chumbo (Pb), arsénio (As), cádmio (Cd), níquel (Ni), mercúrio (Hg) e crómio (Cr). Os metais pesados, quando presentes em quantidades superiores aos valores normais, podem entrar na cadeia alimentar através da sua acumulação na flora e fauna, devastando ecossistemas naturais e originando diversos tipos de patologias no homem (Abrahams, 2002; Adriano, 2001). Tornou-se assim indispensável obter um maior conhecimento sobre os efeitos destes poluentes nos seres vivos e encontrar soluções duráveis para diminuir, limitar e reverter os seus perigos.

A solução para tentar reverter o problema da contaminação inorgânica é o tratamento das áreas contaminadas, com o objetivo de retirar ou reduzir as concentrações dos metais presentes para valores que salvaguardem os ecossistemas circundantes. Apesar das escombrelas de antigas minas apresentarem um nível de toxicidade elevado, é possível na maioria dos casos, encontrar vegetação tolerante aos elevados teores de metais (plantas metalíferas). O estudo deste tipo de plantas suscita grande interesse científico pois, graças às suas capacidades para absorver, imobilizar e sequestrar metais, podem representar uma ferramenta muito útil para a recuperação de locais contaminados (Martin et al., 1996). Nessa perspectiva, a fitorremediação, é uma técnica altamente inovadora e promissora, que constitui uma alternativa verde e económica comparativamente a outras soluções baseadas em processos físico-químicos, cuja aplicação é frequentemente proibitiva em virtude do seu custo e efeitos colaterais para o meio ambiente (Novo, Covelo, & González, 2013).

I.1 Fontes de Metais Pesados

Existem diversas opiniões sobre a definição de metais pesados, mas, por consenso mais geral, os metais pesados são caracterizados pela sua massa atômica, número atômico, densidade ou propriedades químicas (Kabata-Pendias, 2011).

Considera-se, de uma forma geral, que metais pesados são elementos químicos metálicos com densidade elevada ($> 5 \text{ g/cm}^3$) (Järup, 2003) como é o caso do Pb, Cd, Hg, Ni, As, alumínio (Al), zinco (Zn), Cu bário entre outros. Estes elementos têm como principal característica o facto de terem elevados níveis de reatividade e bioacumulação, podendo facilmente dar origem a variadas reações químicas, e não são metabolizáveis, isto é, não são degradados pelos organismos vivos acumulando-se ao longo da cadeia alimentar. Alguns destes metais são, no entanto, necessários para o funcionamento do organismo humano quando absorvidos em pequenas quantidades, sendo que em excesso podem representar um risco para a saúde humana. Outros metais não são úteis para os organismos vivos podendo ser extremamente tóxicos para os mesmos. Os metais podem ser divididos em quatro grupos segundo a sua importância ou influência na saúde (Sharma & Agrawal, 2005):

- Metais essenciais: como Cu, Zn, cobalto (Co), Cr, manganês (Mn) e ferro (Fe);
- Metais não essenciais: como bário (Ba), Al, lítio (Li) e zircónio (Zr);
- Metais tóxicos: estanho (Sn) e (As);
- Metais altamente tóxicos: (Hg), (Cd) e (Pb).

Os metais pesados presentes no solo podem ser provenientes de variadas fontes, estão presentes no meio ambiente de forma natural mas as principais fontes de contaminação massiva de metais são as fontes antropogénicas resultantes da indústria (nomeadamente mineira), da agricultura, dos efluentes domésticos e das descargas atmosféricas (Ali, Khan, & Sajad, 2013).

I.1.1 Fontes Naturais

Os metais pesados encontram-se de forma natural no meio ambiente. Estes metais (também chamados de elementos de traço) são provenientes da composição dos materiais geológicos correspondentes. Uma outra fonte natural de metais pesados é a emissão de partículas, através de erupções vulcânicas e fogos florestais, que são posteriormente transportadas pelos ventos libertando-se para os solos ou atmosfera (Ali et al., 2013). Apesar de também serem uma fonte de metais pesados, as fontes naturais representam um risco menor para os seres vivos comparativamente às restantes.

I.1.2 Fontes Agrícolas

Ao longo dos anos o uso corrente de adubos (seja naturais ou químicos) e pesticidas na agricultura levaram a um aumento considerável do teor em metais nos solos circundantes, metais tais como Cd, Cr, Ni, Pb e Zn. Esses metais, absorvidos pelos solos, para além de contaminarem os solos e as suas plantas também apresentam alto risco de contaminação dos lençóis de água através da lixiviação dos solos seja por rega ou pelas chuvas, podendo chegar ao ser Humano quer por consumo de plantas e vegetais contaminados quer pelo uso e consumo de águas contaminadas.

I.1.3 Fontes Industriais e Mineração

A evolução industrial, que tem vindo a desenvolver-se a nível global desde do século XIX, deu origem a uma libertação massiva de substâncias tóxicas no meio ambiente que acabam por ter efeitos nefastos a longo prazo na saúde humana através da sua inalação, consumo de água ou indiretamente através da ingestão de plantas e animais contaminados (Chaffei et al.,2004; Godt et al., 2006; Järup e Arkesson, 2009). Embora a poluição dos solos com metais pesados esteja geralmente associada à indústria mineira, existem outras fontes industriais de metais pesados tais como a indústria automóvel (Khan, Khan, Khan, Qamar, & Waqas, 2015).

A indústria mineira é uma grande fonte de metais pesados nos solos, sendo por isso o foco deste trabalho. A poluição dos solos via atividade mineira varia consoante os métodos de extração utilizados e o tipo de minérios extraídos, apesarda evolução das técnicas de mineração, ainda não é possível remover o minério na sua totalidade sendo que os rejeitos por norma apresentam pequenas concentrações do minério extraído (Sheoran et al., 2009; Wilson-Corral et al., 2006). A extração mineira é uma atividade que data desde a pré-história, a mina mais antiga conhecida até agora, chamada “Lion Cave” na Suécia, tem cerca de 43000 anos e era usada para extrair hematite. Com o avançar dos anos o Homem começou a ter mais necessidades e a descobrir utilidades em diversos outros minérios como Cu, ouro (Au), prata (Ag) entre muitos outros. O grande problema da indústria mineira é que para além de poluir durante a extração dos minérios, o sítio mantém-se poluído mesmo após o término das atividades, devido aos rejeitos libertados no solo.

I.1.4 Efluentes Domésticos

A contaminação dos solos através dos efluentes domésticos tem vindo a aumentar com o aumento da população. Os contaminantes mais comuns neste tipo de situação são o Hg, Pb, Cd (elementos acumuláveis) e Zn, Cu, Ni, Cr e As, essencialmente provenientes de detergentes de limpeza. Estes produtos, que poluem as águas residuais, representam também um risco para as águas subterrâneas e solos uma vez que se podem infiltrar nestes (Nagajyoti et al., 2010).

I.1.5 Fontes Atmosféricas

As fontes de contaminação atmosféricas podem ser antropogénicas onde se dão essencialmente através da precipitação atmosférica próxima de uma zona industrial, mas também podem ser naturais através das erupções vulcânicas que libertam metais pesados para a atmosfera. Ainda existem poucos estudos acerca desta fonte de contaminação (Bi et al. 2006; Khan et al. 2008a; Liu et al. 2005a; Lim et al. 2008; Pruvot et al. 2006; Radwan and Salama 2006). Muitas vezes é difícil perceber se uma planta está ou não contaminada, na medida em que existem plantas hiperacumuladoras de metais pesados, como é o caso da alface (Ramos et al. 2002), cujas propriedades fazem com que não sejam visíveis quaisquer tipos de sintomas de toxicidade (Intawongse and Dean 2006).

I.1.6 Emissão de metais pesados

Como referido anteriormente, as fontes de emissão de metais pesados podem ser de cariz natural ou antropogénico. De um modo geral, a emissão para a atmosfera dá-se essencialmente através da combustão de combustíveis fósseis, incineração de lixo ou ainda na fundição metalúrgica. Processos industriais que envolvam metais, como por exemplo a indústria mineira, são os principais emissores de metais em meios aquáticos, podendo infiltrar-se em águas subterrâneas. A deposição atmosférica, em particular em zonas de fundição metalúrgica, representa uma das mais importantes fontes emissoras de metais pesados no solo (Nordberg, Fowler, Nordberg, & Friberg, 2009).

I.2 Ecotoxicologia dos metais pesados

As plantas são de um modo geral uma grande fonte de ingestão de metais pesados para o Homem (Sharma & Agrawal, 2005a), visto serem uma importante fonte de alimento para o ser humano e outros animais, podendo a sua contaminação representar um risco para a saúde através do seu consumo direto ou indireto. A ecotoxicologia é a ciência que estuda e avalia os riscos de toxicidade nos ecossistemas e tem como objetivo protegê-los dos danos que as atividades humanas possam representar (G. F. Nordberg, Fowler, Nordberg, & Friberg, 2009). Neste projeto existe uma grande ligação entre os ecossistemas (água e solo), sendo que a contaminação de um com metais pesados pode levar à contaminação do outro e vice-versa.

I.2.1 Metais pesados essenciais

Apesar dos metais pesados representarem um elevado risco para a saúde humana e de outras espécies animais e plantas, alguns deles são, em concentrações limitadas, essenciais para os seres vivos, tais como Cu, Zn, Co, Cr, Mn e Fe (Sharma & Agrawal, 2005a). Estes metais, chamados oligoelementos, são essenciais em determinados processos biológicos, como por exemplo na formação de enzimas para o funcionamento da digestão (no homem/animal) e fotossíntese (na planta) ou em reações redox.

I.2.2 Efeitos nas plantas

Assim como para os animais, alguns metais pesados, em quantidades controladas, são importantes para determinadas funções das plantas, nomeadamente o Zn e o Cd para as suas atividades metabólicas. No entanto as plantas são sensíveis tanto à falta como ao excesso dos metais, se estes metais estiverem presentes em quantidades excessivas passam a contaminar as mesmas. Visto que as plantas representam uma importante fonte de alimento para o Homem, a sua contaminação pode causar graves problemas na saúde humana (Khan et al., 2015). Alguns efeitos dos metais nas plantas estão referidos na tabela 1.

Tabela 1- Efeitos tóxicos dos metais nas plantas

Metal	Efeito do metal na planta	Referências
Al	Inibição do crescimento da raiz	(Nagajyoti, Lee, & Sreekanth, 2010; Sharma & Agrawal, 2005).
As	Diminuição da absorção de fósforo	(Meharg et Macnair, 1992; Nagajyoti et al., 2010)
Cd	Crescimento retardado; Clorose;	(Meharg et Macnair, 1992; Nagajyoti et al., 2010).
Cr	Problemas na germinação da semente e no desenvolvimento da planta;	(Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005)
Cu	Crescimento retardado; Clorose;	(Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005).
Hg	Fecho dos estomas das folhas; stresse oxidativo;	(Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005)
Ni	Clorose e necrose;	(Nagajyoti et al., 2010)
Pb	Inibição da germinação da semente e no desenvolvimento da planta;	Mukherji and Maitra, 1976; Nagajyoti et al., 2010
Zn	Crescimento retardado; Clorose; Envelhecimento precoce	(Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005)

I.2.2.1 Zinco

O Zn é considerado um micronutriente e é um elemento importante para diversos processos que ocorrem na planta, tais como, processos metabólicos e processos de oxidação da planta. Este metal costuma também aparecer em muitas enzimas, visto ser necessário para manter a qualidade do ribossoma (local responsável pela produção de enzimas).

Apesar de ser um elemento importante para as plantas, quando presente em excesso, o Zn pode causar dificuldades no desenvolvimento da planta provocando fitotoxicidade, onde ocorre um crescimento retardado da raiz e da parte aérea, podendo dar origem ao envelhecimento precoce das células (senescência). A clorose é também um possível efeito de excesso de Zn na planta, a qual deixa de produzir clorofila suficiente dando um aspeto verde pálido ou amarelado às folhas. O facto da planta absorver demasiado Zn pode também impedir a translocação de outros metais da raiz para a parte aérea, provocando uma deficiência de outros metais que possam ser necessário no seu desenvolvimento (Nagajyoti, Lee, & Sreekanth, 2010; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.2.2 Cádmio

Valores em excesso de Cd interferem essencialmente na capacidade de absorção, transporte e posterior utilização de outros metais e água pelas plantas. Deste modo podem provocar clorose, podem reduzir ou mesmo impedir o crescimento da planta, assim como levar a um défice de outros metais importantes para a planta ao impedir a sua translocação da raiz para a parte aérea, interferindo assim noutros processos de desenvolvimento da planta. O excesso de Cd afeta a

permeabilidade da membrana plasmática reduzindo a quantidade de água absorvida (Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.2.3 Cobre

Assim como o Zn, o Cu também é considerado um micronutriente sendo fundamental na composição de várias proteínas. Exerce também um papel relevante na fotossíntese, sendo responsável pela captação de CO₂. No entanto como no caso dos metais referidos anteriormente, o excesso de Cu nas plantas afeta negativamente o seu funcionamento. Pode dar origem a clorose, assim como diminuir a taxa de crescimento e desenvolvimento da planta contaminada (Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.2.4 Mercúrio

Assim como para o Homem, o Hg é extremamente tóxico para as plantas e é facilmente acumulável, tornando-o num elevado risco para as células vegetais. A fitotoxicidade do Hg nas plantas traduz-se essencialmente no fecho dos estomas das folhas obstruindo o fluxo de água nas plantas, compromete a atividade mitocondrial e causa stresse oxidativo através do desencadeamento da geração de ROS (espécies reativas de oxigénio) (Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.2.5 Crómio

O primeiro processo fisiológico a ser afetado pelo excesso de cromo é logo a germinação da semente, no entanto afeta também o crescimento e desenvolvimento da planta interferindo nas atividades enzimáticas e na fotossíntese nomeadamente na fixação de CO₂. O stresse causado por essas interferências pode representar-se em três tipos de modificações metabólicas diferentes: alteração na produção de pigmentos, aumento da produção de produtos de metabolismo e canalização de novos metabolitos com capacidade de conferir certa resistência ao excesso de Cr (Nagajyoti et al., 2010; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.2.6 Chumbo

O excesso de Pb também afeta a germinação das sementes ao interferir com enzimas importantes, podendo inclusive inibir a germinação (Mukherji and Maitra, 1976). A concentração de Pb pode inibir o crescimento da raiz e a expansão das folhas. De um modo geral o excesso de Pb no solo interfere com processos de enzimas, altera a permeabilidade da membrana e perturba

a nutrição mineral, levando a anomalias morfológicas e no crescimento da planta (Nagajyoti et al., 2010).

I.2.2.7 Arsénio

O As tem propriedades químicas semelhantes ao fósforo, sendo que na captação de metais os dois elementos competem entre si pois ambos partilham o mesmo transmissor na raiz (Meharg et Macnair, 1992). Como a captação está dividida entre o As e fósforo, o teor em As acaba por ser reduzido a um nível suficientemente tolerável de modo à planta desintoxicar facilmente. As plantas podem, no entanto, apresentar elevada concentração de As, o qual pode ser transformado, nas células vegetais, em formas de As menos citotóxicas (Nagajyoti et al., 2010).

I.2.2.8 Níquel

Tal como no caso de outros metais, o excesso de Ni tem como efeitos tóxicos a clorose, mas também leva a desordens nas funções da membrana celular e à diminuição da captação de água, podendo conduzir a um estado de necrose onde ocorre morte parcial ou total de um tecido (Nagajyoti et al., 2010).

I.2.3 Efeitos no ser humano

Alguns metais pesados, quando presentes em pequenas quantidades, são úteis para ajudar o nosso metabolismo, como é o caso do Co (ajuda na produção das hemácias), ou do Cu e Zn que ajudam na ativação de reação das enzimas (Mildvan, 1970). No entanto, existem metais pesados que não possuem qualquer utilidade para o nosso organismo sendo que esses metais e os metais anteriormente citados, quando presentes em excesso no nosso corpo, podem tornar-se extremamente tóxicos. O Cd, Hg e As são os metais pesados que mais ameaçam a saúde humana (Järup, 2003).

É difícil diagnosticar os efeitos que de uma intoxicação de metais pesados uma vez que esta varia em função do tipo de metal em causa e sobe que forma se apresenta, assim como do indivíduo (idade e género) (Khan et al., 2015). Por regra geral os sintomas mais frequentes são fadiga crónica, dores de cabeça, dores nas costas, perturbações mentais (irritabilidade, depressões, entre outras), perturbações digestivas (náuseas, vómitos e diarreia) e perturbações no sono. Na tabela 2 estão apresentados os efeitos conhecidos de determinados metais em excesso no organismo Humano.

Existem várias maneiras de diagnosticar uma intoxicação de metais, tais como, testes sanguíneos, de urina ou por análise química capilar.

Tabela 2- Efeito tóxicos dos metais no Homem

Metal	Efeitos no Homem	Referências
Al	Cólicas abdominais, náuseas, anorexia; Fadiga; Alterações neurológicas, danos nos tecidos cerebrais	(Nordberg et al., 2009; Sharma and Agrawal, 2005);
As	Interfere com processos celulares essenciais; Problemas gástricos; Cancro dos pulmões, bexiga e rins; Problemas dermatológicos;	(Tripathi et al., 2007; Järup, 2003);
Cd	Problemas gastrointestinais agudos; Anemia crónica; Falhas renais; Doenças pulmonares;	(Degraeve, 1981; Salem et al., 2000; Awofolu, 2005; Nordberg et al., 2009; Järup, 2003);
Cr	Queda de cabelo; Úlceras cutâneas e nasais; Problemas de fígado e gastrointestinais;	(Salem et al., 2000; Sharma & Agrawal, 2005a);
Cu	Danos nos rins e cérebro, cirrose e anemia crónica, problemas estomacais;	(Salem et al., 2000; Wuana & Okieimen, 2011);
Hg	Ansiedade, depressão, fadiga, insónias, irritabilidade, perda de memória; Perda de cabelo, tremores, problemas de visão; Danos cerebrais, nos rins e nos pulmões;	(Neustadt & Pieczenik, 2007; Ainza et al., 2010; Gulati et al., 2010; Järup, 2003);
Ni	Cancro dos pulmões, nariz, garganta e estomago; Perda de cabelo;	(Salem et al., 2000; Khan et al., 2007; Das et al., 2008; Duda-Chodak & Baszczyk, 2008; Mishra et al. 2010);
Pb	Problemas no desenvolvimento das crianças, limites a nível de inteligência, dificuldades de aprendizagem, dificuldades de coordenação, perdas de memória; Falhas renais, dor abdominal, aumento dos riscos de doenças cardiovasculares; Problemas no sistema nervoso;	(Salem et al., 2000; Padmavathiamma & Li, 2007; Wuana & Okieimen, 2011; Iqbal, 2012; Järup, 2003);
Zn	Tonturas e fadiga; Perda de cabelo; Diarreia; Impotência sexual;	(Hess & Schmid, 2002; Nordberg et al., 2009; Sharma & Agrawal, 2005);

I.2.3.1 Alumínio

O excesso de Al interfere com diversas funcionalidades do corpo humano, incluindo a absorção de fósforo e selénio. A toxicidade do Al pode dar origem a problemas gastrointestinais, pulmonares e neurológicos. A nível gastrointestinal os sintomas mais recorrentes são cólicas abdominais, náuseas e hipersensibilidade. Existe também risco de doenças pulmonares tais como a fibrose pulmonar, asma e a contração dos brônquios. Em termos neurológicos podem ocorrer danos cerebrais graves, perda de memória e, em alguns casos, associou-se demência e Alzheimer ao excesso de Al (G. F. Nordberg, 1990; G. F. Nordberg et al., 2009).

I.2.3.2 Arsénio

O excesso de As no corpo humano pode interferir com processos celulares importantes como a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP. Consoante o modo, tempo de exposição e quantidade absorvida, o As pode provocar diversos sintomas a nível gastrointestinal, cardiovascular, neurológico e eventualmente morte. Alguns estudos ligam, casualmente, o excesso de As através

da ingestão de água ao cancro do pulmão, rins, bexiga e pele (Järup, 2003; G. F. Nordberg et al., 2009; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.3.3 Cádmio

O Cd pode ser encontrado em diversos alimentos comuns (batata, arroz, cereais etc.), estando presente em quantidades que, por norma, não apresentam nenhum risco para a saúde humana. No entanto, a poluição dos solos e águas de zonas agrícolas tem aumentado a concentração do Cd nos alimentos. As principais fontes de Cd no Homem são a água, alimentação e tabaco. Ao longo dos anos o Cd vai-se acumulando no fígado e nos rins. Quando o Homem é exposto ao Cd a longo prazo, existe uma grande probabilidade de apresentar problemas a nível ósseo. A inalação de Cd pode dar origem a graves problemas pulmonares (Järup, 2003; G. Nordberg, Fowler, Nordberg, & Friberg, 2009; Sharma & Agrawal, 2005b; Tripathi et al., 2007).

I.2.3.4 Crómio

O Cr trivalente (estado de oxidação +3) é um elemento essencial para a manutenção da tolerância à glicose normal no Homem. Os efeitos nefastos que o Cr tem na saúde humana estão principalmente associados à sua forma hexavalente (estado de oxidação +6). O excesso de Cr pode originar problemas de fígado, irritação gastrointestinal e perda de cabelo, assim como úlceras cutâneas e da mucosa nasal através do contacto com a pele (G. F. Nordberg et al., 2009; Salem et al., 2000; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.3.5 Chumbo

O Pb é dos metais mais tóxicos para o Homem. Este elemento interfere diretamente com a atividade de diversas enzimas e pode deslocar iões metálicos essenciais das metaloenzimas. Os principais sintomas de envenenamento por Pb são dores de cabeça, dores abdominais entre outros sintomas relacionados com o sistema nervoso. Consoante o nível de exposição e quantidade de Pb presente, os rins e fígado também podem ser afetados. Alguns estudos mostram ainda que, crianças expostas por um longo período de tempo a pequenas quantidades de Pb apresentam um défice intelectual (Järup, 2003; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.3.6 Manganês

Um adulto necessita entre 2.5 a 5.0 g de Mn por dia, sendo um oligoelemento que participa em funções estruturais e enzimáticas. O Mn é um elemento relativamente pouco tóxico para o Homem, sendo necessário grandes concentrações para se tornar tóxico. No entanto, o

excesso de Mn também tem efeitos negativos baseando-se essencialmente em problemas de desordem neurológica e de pressão arterial (G. F. Nordberg et al., 2009; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.3.7 Mercúrio

O Hg, um dos metais mais tóxicos para o Homem, é responsável pela inativação de várias enzimas, proteínas e processos de transporte. Não tem nenhuma utilidade fisiológica para o ser humano. O nível de toxicidade do Hg e os seus efeitos dependem essencialmente da forma sob a qual está presente. O Hg inorgânico provoca problemas pulmonares, neurológicos, psicológicos e renais, que por norma são reversíveis após a não exposição ao metal. Por outro lado, o Hg orgânico (metilmercúrio) pode tornar-se letal ao fim de algumas semanas de exposição. Os principais sintomas afetam o sistema nervoso. Parestesia e dormência das mãos e pés costumam ser os primeiros sintomas a manifestarem-se, seguidos de falta de coordenação, problemas visuais e auditivos (Järup, 2003; G. F. Nordberg et al., 2009; Sharma & Agrawal, 2005a).

I.2.3.8 Zinco

O Zn é um metal essencial para o Homem, visto que é um estimulador da atividade de várias enzimas. A dose diária para um adulto é de cerca de 15 mg. Por ser um metal necessário para o corpo humano, a falta de Zn pode levar à perda de cabelo, diarreia e impotência sexual, sendo que no caso de crianças pode ainda provocar um atraso no crescimento. Por outro lado, o excesso de Zn pode originar sintomas tais como vômitos, desidratação, dores abdominais, problemas renais entre outros. A inalação de grandes quantidades de óxido de Zn pode ainda provocar lesões pulmonares (G. Nordberg et al., 2009; Sharma & Agrawal, 2005b).

I.3 Fitorremediação e Bioindicação

I.3.1 Bioacumulação de metais em plantas

Os metais estão presentes na natureza sob diversas formas, o que condiciona a sua biodisponibilidade, a medida da quantidade de metal presente no solo que pode ser absorvida ou metabolizada pelos seus recetores ou que possa interagir com os sistemas biológicos (Kabata-Pendias, 2004).

O aumento da biodisponibilidade influencia a capacidade que os metais têm em interagir com outros compostos presentes na água e no solo para formar complexos. A capacidade que as plantas têm em absorver os metais está em parte relacionada com a solubilidade do mesmo, isto

é, a raiz da planta absorve mais facilmente metais muito solúveis. A planta consegue também absorver e transportar metais moderadamente hidrofóbicos, no entanto, a raiz apenas pode absorver os metais hidrofóbicos não sendo possível o seu transporte através dos tecidos (Ali, Khan, & Sajad, 2013). Através de diversos estudos foi possível criar uma classificação das plantas quanto à sua tolerância aos metais, que são classificadas como sensíveis, tolerantes, acumuladoras ou hiperacumuladoras (Kabata-Pendias, 2011).

I.3.1.1 Hiperacumulação

Na fitorremediação procura-se utilizar espécies de plantas hiperacumuladoras, que são plantas bastante tolerantes à toxicidade dos metais e que conseguem acumular elevadas concentrações de metais nos seus tecidos. Segundo Brooks 1998, uma planta hiperacumuladora pode acumular metais em níveis cem vezes superiores comparativamente a uma planta comum sem reduzir o seu rendimento.

Graças aos estudos feitos ao longo dos anos, diversos autores concordaram num lote de critérios com base na concentração de metais para classificar as plantas como hiperacumuladoras: 100 mg/kg de cádmio (Cd), tálio (Tl) e selénio (Se); 300 mg/kg de Co, Cu e Cr; 1000 mg/kg de Ni, Pb e As; 3000 mg/kg de Zn; 10000 mg/kg de Mn (van der Ent, Baker, Reeves, Pollard, & Schat, 2013).

O fator de translocação (FT) é também um critério muito importante na classificação de uma planta como hiperacumuladora devendo ser maior que 1. No entanto um critério adjacente, isto é, por si só o fator de translocação não é suficiente para classificar uma planta como hiperacumuladora (Ali et al., 2013; Novo, Mahler, & González, 2015).

I.3.1.2 Fatores de translocação e bioacumulação

Como referido anteriormente, o fator de translocação e a capacidade de bioacumulação de uma planta são dois critérios utilizados para a sua classificação como hiperacumuladora, por essa razão é importante o seu cálculo.

A eficiência que determinada espécie de planta apresenta na acumulação de um metal nos seus tecidos representa o seu fator de bioacumulação, e é dado pela razão entre a concentração do metal nos tecidos da planta e a concentração do metal no solo. Por norma as plantas hiperacumuladoras apresentam um valor superior a 1, este critério também pode ser útil na quantificação da biodisponibilidade de metais pesados para as plantas (Novo et al., 2013; Sun, Zhou, & Diao, 2008).

$$\text{Fator de Bioacumulação (FBC)} = \frac{\text{Concentração do metal nos tecidos da planta}}{\text{Concentração do metal no solo}}$$

Por outro lado, o fator de translocação é calculado pela razão entre a concentração do metal presente na parte aérea da planta e da concentração do metal nas raízes, representando a capacidade que a planta tem em transportar o metal da raiz até à parte aérea. (Novo et al., 2013; Reeves, 2006)

$$\text{Fator de Translocação (TF)} = \frac{\text{Concentração do metal na parte aérea}}{\text{Concentração do metal nas raízes}}$$

I.3.2 Bioindicação

Para avaliar a qualidade ambiental de determinado local é utilizada uma técnica designada como bioindicação. Esta técnica baseia-se na avaliação do comportamento de seres vivos (bioindicadores) perante determinados estímulos ambientais. Como seres vivos são usualmente utilizadas plantas como indicadores biológicos, que têm grande utilidade na prospeção biogeoquímica de metais valiosos.

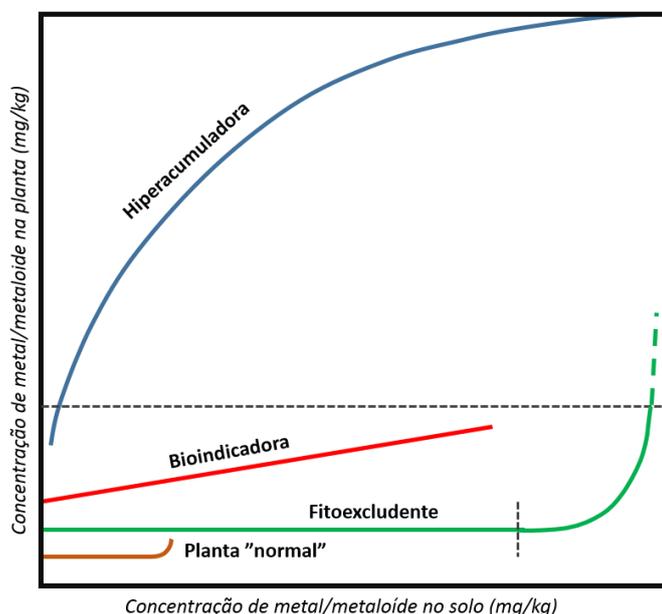


Figura 1- Representação da acumulação de metais e metalóides pelas plantas [adaptado de (van der Ent et al., 2013)]

O diagrama acima (figura 1) representa a capacidade de captação e tolerância aos metais e metalóides consoante a concentração de metais e metalóides presentes no solo. As plantas

“normais” apenas toleram baixas concentrações de metais e metaloides biodisponíveis no solo, acabando por morrer devido à elevada fitotoxicidade. Os fitoexcludentes têm capacidade de crescer e sobreviver numa ampla gama de fitotoxicidade até começarem a morrer, devido à falta de controlo na absorção dos metais. Os bioindicadores por sua vez, têm maior capacidade em absorver metais comparativamente às plantas “normais”, resultando em problemas de crescimento e possível morte da planta. As hiperacumuladoras têm a habilidade de absorver quantidades de metais e metaloides muito maiores do que as restantes plantas (normais, fitoexcludentes e bioindicadoras). A linha horizontal a tracejado indica o limiar de hiperacumulação para os diferentes metais e metaloides.

I.3.3 Fitorremediação

A fitorremediação é um método sustentável, de baixo custo e ecológico, utilizado para a remoção ou redução de poluentes orgânicos e inorgânicos do solo, ar e água a partir do uso de plantas. Este método tem como vantagem poder substituir métodos mais convencionais cujos custos são mais elevados e possam ter efeitos secundários no ambiente (Ali et al., 2013; Salt, Smith, & Raskin, 1998).

As plantas têm uma enorme capacidade em captar poluentes presentes no meio ambiente, procedendo à sua desintoxicação através de vários mecanismos como (figura 1):

- Fitoextração: uso de plantas acumuladoras para remover metais ou organismos do solo que serão posteriormente colhidas;
- Fitotransformação ou fitodegradação: uso de plantas e micro-organismos associados para a degradação dos organismos poluentes presentes no solo;
- Fitovolatilização: uso de plantas para volatilizar os poluentes;
- Fitoestimulação: as plantas libertam substâncias que ajudam no crescimento de outros seres vivos;
- Fitoestabilização: uso de plantas para reduzir a biodisponibilidade dos poluentes no meio ambiente (Ali et al., 2013; Favas, Pratas, Varun, Souza, & Paul, 2014b; Salt et al., 1998)

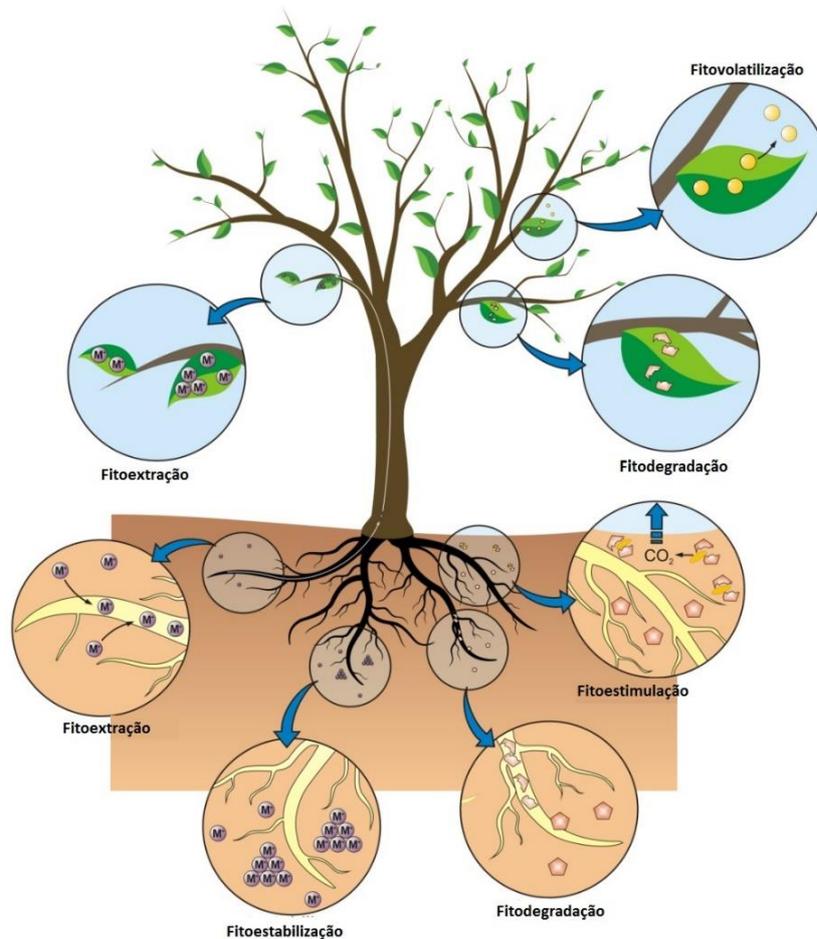


Figura 2 - Mecanismos da fitorremediação [adaptado de (Favas, Pratas, Varun, Souza, & Paul, 2014a)].

I.3.3.1 Fitoestabilização

Na fitoestabilização usam-se plantas para estabilizar os solos contaminados, onde o objetivo é reduzir a mobilidade e biodisponibilidade dos poluentes no meio ambiente de maneira a estes não migrarem para outros locais. Esta imobilização dos poluentes é feita através de fitoestabilização física, onde o solo é protegido da erosão e lixiviação impedindo o transporte dos metais. Através da fitoestabilização química ocorrem alterações químicas na zona das raízes e dos contaminantes, alterando assim a solubilidade e mobilidade dos metais (Ali et al., 2013; Favas et al., 2014b)

I.3.3.2 Fitoextração

A fitoextração baseia-se na captação de contaminantes presentes no solo ou água pelas raízes e à sua posterior translocação e acumulação na biomassa da planta sem esta se degradar (Ali et al., 2013; Favas et al., 2014b). Existem dois processos possíveis na fitoextração (Salt et al., 1998):

- Fitoextração induzida: as plantas têm por norma bastante dificuldades em absorver de forma natural determinados metais, nomeadamente os metais mais tóxicos como por exemplo Pb, Cd e As. Nessas situações são utilizados quelantes para ajudar a planta a absorver esses metais (fig. 2).

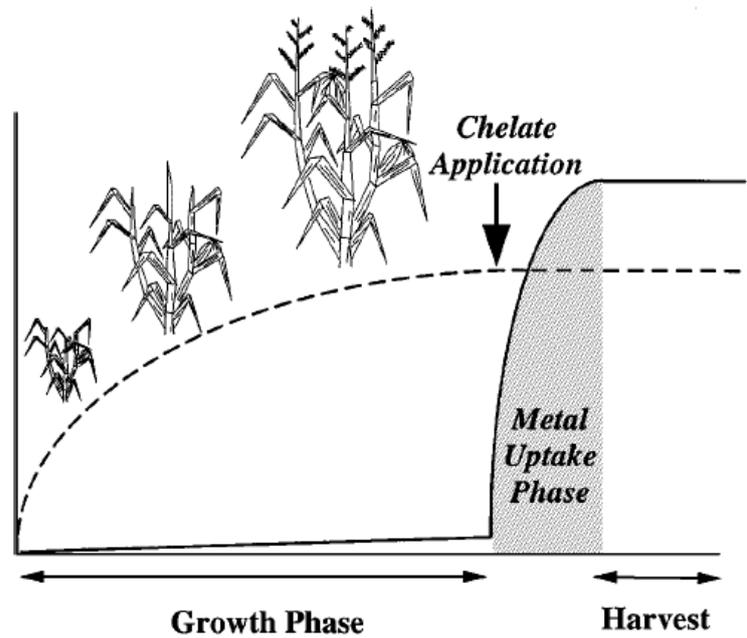


Figura 3- Fitoextração induzida com uso de quelante [adaptado de (Salt et al., 1998)]

- Fitoextração contínua: neste caso a fitoextração é feita de forma contínua sem necessidade de uso de quelantes ou outro aditivo para a absorção dos metais pela planta (Fig. 3).

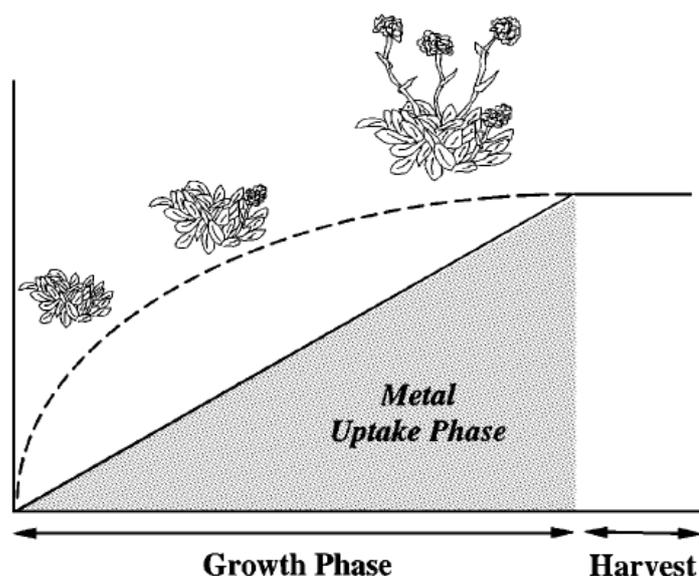


Figura 4- - Fitoextração contínua [adaptando de (Salt et al., 1998)]

A fitoextração apresenta algumas desvantagens nomeadamente para a planta cujo seu crescimento é afetado negativamente pelo excesso de metais que têm um efeito fitotóxico na planta (Seth et al., 2012).

I.3.3.3 Fitovolatilização

A fitovolatilização consiste na absorção do poluente pela planta, o qual acaba por ser convertido para uma forma volátil e posteriormente libertado para a atmosfera. Esta técnica pode ser utilizada para contaminantes orgânicos e para alguns metais pesados tais como Hg, Se e As. No entanto o poluente não é totalmente eliminado, apenas é transferido do solo para a atmosfera, havendo risco da planta libertar concentrações muito elevadas do poluente, tornando esta técnica a mais controversa da fitorremediação (Ali et al., 2013; Favas et al., 2014b).

I.3.3.4 Fitoestimulação

Os poluentes orgânicos presentes no solo são degradados pelos microrganismos na zona da rizosfera. A principal razão pela qual ocorre um aumento dessa degradação é o aumento da atividade metabólica dos micróbios. Na rizosfera as plantas podem estimular a atividade microbiana até cerca de 100 vezes mais, através da secreção de substâncias favoráveis ao crescimento de outros seres vivos, libertadas pelas raízes. Esta técnica apenas é aplicável em contaminantes orgânicos (Ali et al., 2013; Favas et al., 2014b).

I.3.3.5 Fitoestabilização

O principal objetivo da fitoestabilização é a imobilização dos poluentes presentes nos solos de modo a evitar a sua difusão para meios circundantes. A imobilização do contaminante é feita através da sua incorporação na lignina da parede celular das células das raízes ou no húmus. Os metais são precipitados numa forma insolúvel através da ação direta do exsudato da raiz, deixando os metais presos na matriz do solo, reduzindo assim a sua mobilidade e biodisponibilidade (Ali et al., 2013; Pratas, Paulo, Favas, & Venkatachalam, 2014).

I.3.3.5 Fitodegradação

A planta acumula poluentes orgânicos do ambiente, a fitodegradação ocorre quando a planta degrada esses poluentes orgânicos, através da ajuda de enzimas que ajuda na atividade metabólicas, diminuindo assim a toxicidade do poluente.

No entanto, os metais pesados não são biodegradáveis não podendo ser fitodegradados sendo que esta técnica apenas funciona em poluentes orgânicos (Ali et al., 2013; Favas et al., 2014b; Salt et al., 1998).

I.4 Quelantes

As técnicas de recuperação de solos poluídos através da fitorremediação dependem essencialmente das características das plantas, da biodisponibilidade dos metais pesados no solo e na forma em que os metais estão presentes (Chen et al., 2008). As plantas preferencialmente utilizadas para a fitorremediação são plantas hiperacumuladoras, no entanto, o número de espécies hiperacumuladoras é limitado e a sua baixa produção de biomassa e baixa habilidade de acumular diversos tipos de metais tornam o uso da maioria dessas espécies impraticável para a fitoextração comercial. Uma solução encontrada para esse problema é o uso de plantas não hiperacumuladoras combinada com o uso de agentes quelantes para aumentar a captação de metais pesados pelas plantas (Chen et al., 2008; Evangelou, Ebel, & Schaeffer, 2007).

O quelante é uma substância aplicada no solo que tem por objetivo aumentar a biodisponibilidade dos metais presentes. O quelante é combinado com os iões metálicos em solução, formando um complexo solúvel composto pelos metais pesados. Esta combinação diminui a atividade iônica na solução do solo, ajudando na libertação desses metais do solo e facilitando assim a sua captação pelas plantas (Ali et al., 2013; Dipu, Kumar, & Thanga, 2012; Zhang & Tsang, 2013).

O processo de captação e transporte de metais pela planta baseia-se em 5 etapas essenciais (Clemens, Palmgren, & Krämer, 2002) esquematizadas na figura 5 abaixo:

- 1- Mobilização dos metais: os metais precisam de estar disponíveis para serem absorvidos pela planta. Através da secreção dos quelantes e pela acidificação da rizosfera, os íons metálicos presentes no solo são mobilizados ficando disponíveis para serem absorvidos.
- 2- Sequestro e absorção: Depois da sua mobilização, a captação dos íons metálicos é mediada por vários sistemas de absorção que residem na membrana plasmática. Na célula, os metais são quelados e o seu excesso é sequestrado para os vacúolos.
- 3- Transporte no xilema: Os metais são transportados para o caule através do xilema. Presume-se que a maior porção atinge o xilema através da via simplástica. No entanto pode ocorrer passagem pela via apoplástica na ponta da raiz. No xilema os metais estão presentes sob a forma de íons hidratados ou por um complexo de quelante metálico.
- 4- Descarga distribuição: Depois de atingir a via apoplástica da folha, os metais são capturados por diferentes tipos de células da folha e movimentam-se célula a célula através do plasmodesma (canais microscópicos). A distribuição na folha ocorre através da via simplástica e apoplástica.
- 5- Armazenamento e desintoxicação: O excesso de metais essenciais e não essenciais são sequestrados nos vacúolos das células das folhas. A quantidade acumulada difere de célula para célula assim como da espécie de planta e elemento. O armazenamento parece ocorrer preferencialmente nos tricomas (são apêndices na epiderme presentes em diversos órgãos das plantas) tendo um papel importante no armazenamento e desintoxicação.

Segundo Vamerali et al. (2009), o complexo do quelante é levado pela via apoplástica passando pelas bandas de Caspari (estruturas presentes nas raízes primárias ao nível da endoderme, que participam na passagem de água nas raízes) (figura 5). Como na ponta das raízes as bandas de Caspari ainda não estão completamente formadas, alguns componentes da solução podem entrar na estela (parte central do caule e da raiz), onde se encontra o xilema, sem passar pela membrana celular.

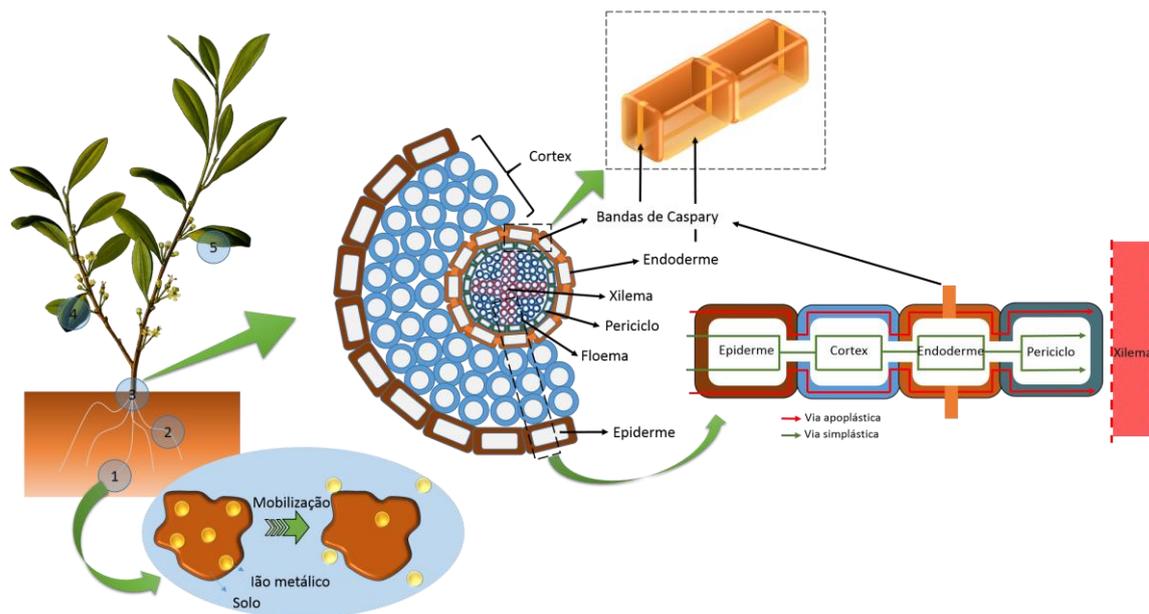


Figura 5- Esquema dos processos de captação de metais na planta

Existem diversos tipos de quelantes, que podem ser divididos em duas categorias: APCAs (ácidos aminopolicarboxílicos) e LMWOAs (ácidos orgânicos naturais de baixo peso molecular).

I.4.1 APCAs

Os APCAs são ácidos com capacidade de formar complexos estáveis e solúveis compostos por íons metálicos, controlando a solubilidade e precipitação desses mesmos íons. Estes agentes quelantes são utilizados num variado leque de produtos domésticos e aplicações indústrias, sendo que nas últimas décadas têm sido aplicados em tratamentos experimentais de fitoextração (Evangelou et al., 2007). Existem dois tipos de APCAs, os sintéticos e os naturais.

I.4.1.1 APCAs sintéticos:

Vários estudos ao longo dos anos mostraram que a adição de APCAs no solo aumenta a biodisponibilidade dos metais pesados elevando a sua concentração na parte aérea das plantas. No entanto, apesar de serem de grande eficácia, estes agentes sintéticos representam um risco para o meio ambiente, sendo recomendados para tratamentos *ex-situ*. Foram estudados diferentes APCAs sintéticos como: EDTA, HEDTA, DTPA, CDTA, EGTA, EDDHA, HEIDA e HBED. A eficiência destes agentes varia essencialmente consoante os metais presentes e a planta, estando sujeitos a várias interferências com outros catiões que possam estar presentes no solo em maior

concentração, diminuindo a captação para um determinado metal (Begum et al., 2013; Evangelou et al., 2007).

O EDTA (Ácido etilenodiaminotetraacético) é o quelante mais estudado e utilizado para aumentar a solubilidade e difusão dos metais pesados no solo, sendo de elevada eficiência e de baixo custo comparativamente a outros quelantes (Chen et al., 2008; Zhang & Tsang, 2013). Vários estudos foram feitos para tentar perceber como funciona o EDTA para ajudar na captação de metais. Um estudo feito por Huang et al. (1997) mostrou que o uso de EDTA no solo ajuda na desorção do Pb e aumenta a sua concentração na solução do solo. O autor afirma ainda que ocorre um aumento na translocação de metais proveniente da raiz através do xilema. No entanto, é um composto recalcitrante de degradação lenta e altamente móvel no subsolo, tornando-se assim um risco para o ambiente (Evangelou et al., 2007).

-Outros APCAs sintéticos:

- HEDTA (Ácido hidroxietilenodiaminotriacético)
- DPTA (Ácido dietilenotriaminopentacético)
- CDTA (Trans-1,2-ácido ciclo-hexilenodinitrilotetraacético)
- EGTA (Etileno-bis [oxietilenotrinitrilo]-tetraacético)
- EDDHA (Ácido etileno-diamina-*N,N'*bis (o-hidroxifenil) acético)
- HEIDA (Ácido N- (2-hidroxietil) iminodiacético)
- HBED (Etilenodiamina Ácido *N,N'*-diacético)

Os APCAs listados acima, homólogos do EDTA, são ácidos sintéticos que, como no caso do EDTA, têm por função facilitar a captação de metais pesados pelas plantas. Existem ainda poucos estudos feitos sobre estes últimos APCAs sintéticos, especialmente comparando com o EDTA. Huang et al. (1997) comparou diferentes APCAs sintéticos para a absorção do Pb com ervilha e milho, tendo chegando á seguinte ordem de eficiência: EDTA > HEDTA > DTPA > EGTA > EDDHA.

I.4.1.2 APCAs naturais:

Como referido anteriormente os APCAs sintéticos são produtos pouco biodegradáveis podendo, a sua utilização em meios naturais, resultar em efeitos nefastos para o ambiente. Para contornar essa limitação foram estudados e testados outros quelantes (NTA e EDDS), mais facilmente biodegradáveis, como alternativa aos APCAs sintéticos (Chen et al., 2008).

- EDDS (Disuccinato de etilenodiamina)

O EDDS é um APCA produzido de forma natural através de diversos microorganismos. Este agente tem sido testado nos últimos anos mostrando ser um quelante eficiente para o tratamento de

vários metais. Estudos comparativos entre EDDS e EDTA elaborados por diversos autores demonstraram que o EDDS apresentava maior eficiência para a captação de Cu, Ni e Zn enquanto o EDTA é mais eficiente para o Zn e Cd (Chen et al., 2008; Evangelou et al., 2007). A fitotoxicidade do EDDS varia consoante o tipo de planta utilizada nos tratamentos.

- NTA (Ácido nitrilotriacético)

Este ácido já é há muitos anos utilizado como agente quelante em produto domésticos, tendo sido só mais recentemente testado para a fitoextração. Apesar da eficiência dos quelantes não depender apenas do tipo de quelantes utilizados, vários estudos foram feitos comparando a eficiência do NTA com outros agentes no tratamento de solos. Alguns estudos mostraram que o NTA foi geralmente mais eficiente do que HEIDA, HEDTA, EDTA CDTA e DTPA na captação de As e Zn. O NTA é um ácido altamente biodegradável, no entanto a facilidade com que se degrada depende dos metais que compõem a solução, podendo ser tóxico para os mamíferos. (Anderson, Bishop, & Campbell, 1973; Evangelou et al., 2007).

I.4.2 LMWOAs:

LMWOAs são outra alternativa encontrada aos APCAs sintéticos, combinando alta eficiência com elevada biodegradabilidade e baixa fitotoxicidade. Estes ácidos têm ganho cada vez mais importância na fitoextração assistida por quelantes. São compostos orgânicos contendo uma cadeia com alguns átomos de carbono e pelo menos um grupo funcional de ácido (grupo carboxílico) (Agnello, Huguenot, Van Hullebusch, & Esposito, 2014). São ácidos orgânicos (OAs) frequentemente encontrados em organismos vivos, tendo um papel bastante importante a nível do metabolismo. As próprias plantas libertam ácidos orgânicos quando expostas a determinado stress (Evangelou et al., 2007). Os OAs atuam como ligantes formando, como no caso dos APCAs, um complexo composto pelos metais presentes no solo. Existem vários LMWOAs, no entanto os mais estudados para a fitorremediação são: ácido acético, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido gálico, ácido málico, ácido oxálico, ácido succínico, ácido tartárico e ácido vanílico. Uma vez mais, a eficiência do quelante depende não só do tipo de ácido mas também da espécie de planta e da composição do substrato. Porém diversos estudos e ensaios comparativos demonstraram que alguns ácidos têm maior eficiência na dessorção de determinados metais. De um modo geral os autores concluíram que os LMWOAs, combinados com a espécie de planta certa, podem ser utilizados como alternativa aos APCAs mostrando elevada eficácia na fitoextração de Cd, Zn, Cu, Ni, Cr e Pb. Os ácidos cítrico (eficaz em Cd, Zn, Cu, Ni, Cr e Pb), gálico (eficaz em Cd, Zn, Cu e Ni) e acético (eficaz

em Cd, Cr, Cu e Pb) mostram ser eficientes num maior número de metais, sendo alvos de maior interesse por parte dos autores comparativamente aos outros LMWOAs (Agnello et al., 2014; Do Nascimento, Amarasiriwardena, & Xing, 2006; Duarte, Freitas, & Caçador, 2011; Evangelou et al., 2007).

I.4.3 Quelantes específicos para o Au:

Metais como Au, Ag e Pb são muito mais imóveis e insolúveis no solo comparativamente a outros metais, tornando a sua captação pelas plantas uma tarefa difícil e muitas vezes impraticável (Sheoran, Sheoran, & Poonia, 2013). A subida do preço do Au a nível mundial tem tornado a fitoextração de Au de antigas minas uma ideia economicamente apelativa. Iniciaram-se vários estudos sobre plantas hiperacumuladoras de Au e processos que poderiam aumentar a eficiência dessas mesmas plantas, como o uso de quelantes. Testaram-se diversos tipos de químicos para ajudar na mobilização e solubilidade do Au de modo a facilitar a sua absorção. Os químicos necessários para promover a solubilidade do Au dependem essencialmente da geoquímica do solo (Wilson-Corral, Anderson, & Rodriguez-Lopez, 2012). Vários estudos elaborados ao longo dos anos fornecem uma lista de vários quelantes específicos para o Au:

- Tiocianato de Amónio: Gardea – Torresdey et al. (2005) estudaram o uso de tiocianato de amónio como quelante para aumentar a eficiência da *Chilopsis Linearis* na fitoextração do Au. Os autores concluíram que, no seu experimento, a adição deste quelante aumentou a captação de Au em 595, 396 e 467% nas raízes, caule e folhas respetivamente, comparativamente aos ensaios de controlo.
- Tiosulfato de Amónio: Num estudo feito por Handayanto (2014), os autores observaram que a adição de tiosulfato de amónio em 3 espécies de plantas diferentes resultou num aumento de concentração em média de 106% na parte aérea e 30% nas raízes das plantas.
- Tioureia: Ensaios realizados por De la Rosa et al. (2009) mostraram que o uso de tioureia como quelante, resultou num aumento de captação de Au tanto nas raízes como na parte aérea de milho.
- Tiocianato de Sódio: Lamb et al. (2001), concluíram que o uso de tiocianato de sódio nas espécies *Brassica Juncea* e *Berkheya Coddii* atribui a estas duas espécies, a capacidade de hiperacumular Au.

- Iodeto de Sódio, Cianeto de Potássio e Brometo de Potássio: Estes três quelantes foram estudados por Lamb et al. (2001) e mostraram aumentar a eficiência da *B. juncea* e *Chicory* na captação e acumulação de Au.
- Cianeto de Sódio: Um estudo realizado por Wilson-Corral et al. (2014) testou o efeito da adição de cianeto de sódio na *Helianthus annuus* na captação de metais preciosos (Au, Ag e Cu). Os autores concluíram que a adição deste quelante tem um efeito positivo, aumentando a captação dos metais preciosos pela planta.

I.5 Estado da arte em Portugal

A atividade mineira tem sido uma prática exercida em Portugal há mais de 2000 anos. Os processos desta atividade produziram ao longo dos anos grandes quantidades de rejeitos com resíduos químicos e elevadas concentrações de metais pesados, contaminando o solo e água circundante. Algumas minas de Portugal tornaram-se assim objeto de estudo sobre a fitorremediação para diversos autores.

Fernandes et al., (1991) estudaram a influência da antiga mina de pirite de Lousal no solo, plantas e águas adjacentes e qual a extensão da sua poluição. O autor verificou a ocorrência abundante da *Juncus conglomeratus* nos rejeitos da mina, demonstrando tolerância face à toxicidade dos metais encontrados. Após a colheita de amostras de solo e de *J. conglomeratus*, os resultados das suas análises demonstraram níveis extremamente elevados de metais em particular Fe, Cu, Pb e Zn no solo, e que as raízes das plantas colhidas apresentavam concentrações em metais pesados significativamente maiores do que nas plantas de controlo. Os autores concluíram que a *J. conglomeratus* apresentava elevada tolerância à presença desses metais, e que a sua acumulação nos tecidos poderia ajudar a reduzir os seus teores nos solos.

Os autores de Alvarenga et al., (2004) estudaram amostras de solo e plantas colhidas na área da mina de Aljustrel com o objetivo de avaliar a competência da *Cistus ladanifer* como fitorremediadora de zonas poluídas com metais pesados. Neste estudo o principal foco foi a capacidade de *C. ladanifer* em captar, transportar e armazenar Cu, Zn, Mn e Pb na parte aérea da planta. Os resultados obtidos das análises demonstraram que a *C. ladanifer* é acumuladora de Mn (117-1399 mg/ Kg_{aérea}), indicadora de Zn (72-214 mg/Kg_{aérea}) e fitoexcludente de Cu (3,4-44,4 mg/Kg_{raiz} e 5,2- 29,7 mg/Kg_{aérea}). Os autores concluíram que a *C. ladanifer* apresenta potencial para ser aplicada na fitoestabilização de solos poluídos ajudando a reduzir a mobilidade dos metais e subsequentemente os riscos de degradação ambiental.

Numa região composta por solos ultramáficos e não ultra máficos em Trás-os-Montes, Díez Lázaro et al., (2006) avaliaram a aptidão de 9 espécies de plantas nativas para processos de fitorremediação. Das 9 espécies estudadas a *Cistus Ladanifer*, *Lavanda stoechas*, *Plantago subulata* e a *Thymus mastichina* apresentaram maior concentração de metais pesados que as restantes, com valores máximos de concentração na folha/haste/raiz de: 41/11/33 mg/Kg de Cu; 128/26/30 mg/Kg de Cr; 2200/467/350 mg/Kg de Mn; 267/50/190 mg/Kg de Ni e 300/500/240 mg/Kg de Zn. Os autores concluíram que, com exceção da *P. subulata* (devido à sua pequena biomassa), as 3 outras espécies seriam uma mais-valia para a fitorremediação, em particular para a fitoextração.

A mina de São Domingo foi alvo de um estudo realizado por Abreu et al., (2008), no qual foi avaliada a presença de metais pesados no solo e nas plantas nativas do local. Além das amostras de solo, foram colhidas amostras de duas plantas presentes no local: *Erica australis* e *Erica andevalensis*. Os autores verificaram que a *E. andevalensis* crescia em zonas de solo mais ácido com valores de pH entre 3.0 e 4.0 demonstrando ser tolerante a ambientes mais hostis. No entanto, ambas as espécies apresentam ser tolerantes a elevadas concentrações de Al e As (346.3 e 535.8 mg/Kg de Al; 4.94 e 13.13 mg/Kg de As respetivamente (*Erica australis* e *Erica andevalensis*) e acumulam cerca de 264.8 e 597.1 mg/Kg de Mn. Concluiu-se que ambas as espécies podem ser uma ferramenta importante na recuperação de áreas mineiras sulfúricas em regiões com clima e condições compatíveis com o seu crescimento.

Como em estudos anteriores não foram encontradas plantas nativas de São Domingos acumuladoras de As, Canha et al., (2010) investigaram áreas de antigas minas com características semelhantes a São Domingos de modo a encontrar espécies de plantas nativas capazes de acumular concentrações relativamente altas de As. Visto que Castromil apresentava um solo com concentrações de As semelhantes às de São Domingos os autores estudaram as suas plantas nativas avaliando a sua capacidade como bioacumuladoras desses elemento. Os resultados obtidos demonstraram que todas as plantas apresentavam concentração de As acima da média normal, em particular a *Agrostis curtisii* cujos valores máximos foram de 126.1 mg/Kg de As e coeficiente de transferência de 2.28%, indicando ter potencial para a fitorremediação de solos contaminados com As.

Em (2011) Moreira et al., estudaram os solos e suas espécies locais na zona de Estarreja (Esteiro) contaminados essencialmente com Zn. As espécies de plantas colhidas apresentavam concentrações de Zn entre 34 mg/Kg na parte aérea e 2.400 mg/Kg na raiz. As espécies *Verbascum virgatum*, *Hypochoeris radicata*, *Phalarie arundinácea*, *Conyza bilbaoana*, *Paspalum*

urvillei e *Aster squamatus* apresentam valores elevados de acumulação de Zn, um fator de bioacumulação (FBC>1) e elevado fator de translocação (FT>1), sendo estas espécies aptas para a fitoextração deste metal. Por outro lado, a *Spergularia cupillacea* apesar de não ser útil para a fitoextração, apresenta propriedades que a tornam apta para a fitoestabilização.

Abreu et al., (2012) estudaram a tolerância, acumulação e translocação de elementos de traço de 3 espécies de plantas: *Cistus populifolius*, *Cistus salviifolius* e uma híbrida de ambas. As plantas foram colhidas em áreas de minas contaminadas em As, Cu, Pb, Sb e Zn na Caveira, Chança e São Domingos. As 3 espécies mostraram ter tolerância à acidez do solo, tendo crescido em solos com valores pH entre 4.2 e 6.1. Os autores não observaram nenhuma diferença significativa na concentração total de elementos químicos entre as 3 espécies nascidas no mesmo local, à exceção do Fe e Sb, considerando todas as espécies como acumuladoras de Mn (com uma concentração máxima de 452.8 mg/Kg na raiz e 1199.5 mg/Kg na parte aérea). No entanto nenhuma planta se destacou combinando elevada acumulação de metais com alta produção de biomassa de modo a terem utilidade em processos de fitoextração com custo efetivo, podendo no entanto funcionar como fitoestabilizadoras.

Em 2012 foi avaliada a distribuição de elementos de traço nos resíduos de mina gossan e a sua biodisponibilidade para a *Cistus ladanifer*, analisando a aptidão que esta espécie tem em acumular estes elementos de traço de modo a determinar a sua utilidade ou não em métodos de fitorremediação de solos poluídos. Foram colhidas amostras de solo e de plantas nas minas de São Domingo e de Pomarão (sítio não contaminado), analisando as suas concentrações em As, Cu, Pb e Zn. Considerando os resultados obtidos neste estudo os autores concluíram que a *C. ladanifer* é uma espécie com elevada tolerância a solos ácidos (pH entre 4.53 e 5.99) com grandes concentrações de As (2643 mg/Kg), Cu (226 mg/Kg) and Pb (7343 mg/Kg), podendo ser considerada adequada para fitoestabilização de solos com condições similares (Santos, Abreu, Nabais, & Magalhães, 2012).

Pinheiro et al., (2013) estudaram o potencial da espécie *Fraxinus angustifolia* para a fitorremediação de solos contaminados pela mina de urânio de Cunha Baixa (Mangualde, Portugal). Para este ensaio foram plantadas 54 espécimes de *F. angustifolia* divididas por 3 solos diferentes: solo A (extraído a 60 km da mina e caracterizado por Caetano et al., (2012)), solo B (colhido em Cunha Baixa na mina de urânio e caracterizado por Pereira et al., (2008)) e um solo artificial (não contaminado, composto por uma mistura hidratada de vermiculite não-ácida e húmus, usado para controlo). As plantas (criadas desde a semente) foram mantidas num viveiro

em sala aclimatada (23°C, 16^h^L e 8^h^E com radiação luminosa de 160 μmol⁻²s⁻¹), durante 2 semanas. Cada plântula foi transplantada para vãos de 760 cm³ de volume preenchido com o respetivo solo, continuando nas mesmas condições durante 3 meses. Para além da rega diária, a cada 15 dias foi aplicada uma solução nutritiva em cada vaso (50ml por 450g de solo). Com este estudo concluíram que *F. angustifolia* é uma boa candidata para a fitorremediação, sendo tolerante e resistente à contaminação. As plantas do solo contaminado apenas apresentaram um crescimento mais lento comparativamente às de controlo. São particularmente boas extratoras de estrôncio (Sr) (16.65 μg/g_{raiz} 16.76 μg/g_{haste} 16.74 μg/g_{folha}) em relação a outros elementos mas ainda assim não são hiperacumuladoras.

Outros autores estudaram o solo da mina de Pb, em Barbadalhos (Centro de Portugal), e as suas espécies nativas de modo a obter uma perspetiva dos metais pesados presentes em excesso no solo e na flora avaliando o potencial das espécies para a fitorremediação. Pratas et al., (2013), colheram 49 espécies de plantas (entre árvores, arbustos, ervas, grama e fetos, representando 25 famílias) em duas linhas transectas. Apesar de ambas as linhas apresentarem uma elevada concentração de Pb, a primeira linha (LT1) apresenta condições mais hostis, com um pH entre 3.6 e 5.1 e maior concentração de metais pesados comparativamente à segunda linha (LT2) com pH entre 4.0 e 6.4. As plantas colhidas em LT1 acumularam 8 metais (Ag, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn) enquanto na LT2 apenas acumularam 5 (Ag, Cu, Fe, Pb e Zn). Foi no entanto observado uma significativa acumulação de Pb por parte da *Cistus salvifolius* (548 mg/Kg), *Conicera periclymenum* (318 mg/Kg), *Anarnhinum belidifolium*, *Phytolacca americana*, *Digitalis purpúrea* e *Mentha suaveolens* (217 a 255 mg/Kg). Os autores concluíram que as plantas tolerantes à toxicidade dos metais, baixos nutrientes e elevada capacidade de crescimento e biomassa, são espécies ideais para a remediação de solos e habitats degradados como o presente no estudo. Apesar das plantas terem facilmente acumulado Pb, Zn, Fe e Cu tiveram limitações na mobilização de Ag, Co e Cr (Pratas et al., 2013).

Pereira et al., (2015) realizaram um estudo para caracterizar bactérias tolerantes aos metais/metaloídes presentes na rizosfera de duas espécies de plantas: *Phragmites australis* e *Juncus effusus*. Estas duas espécies são nativas dos dois locais em estudo (contaminados com metais) no Esteiro de Estarreja. As bactérias foram isoladas através de um meio suplementado em (Cd, Zn e As). Para além do sítio de amostragem 1 estar mais contaminado (elevadas concentrações de Zn, Pb, Hg e As) do que no 2, também apresentava um maior número de bactérias isoladas, estando bem representado pela classe Actinobacteria (36%) e Bacilli (24%), enquanto o segundo local está essencialmente representado pela Actinobacteria (35%), γ-

Proteobacteria (35%) e β -Proteobacteria (12%). Os autores concluíram que as bactérias foram ganhando tolerância aos metais/metaloídes, estando aptas a sobreviver em ambientes degradados, e que a diferença populacional de bactérias entre os dois locais se deve às diferentes concentrações de metais e elementos de traço. No entanto, sendo estas bactérias tolerantes, os autores concordaram que podem ser úteis na remediação dos solos promovendo o crescimento das plantas (Pereira et al., 2015).

(Abreu, Santos, Anjos, & Nabais, n.d.) analisaram 2 espécies de plantas nativas das antigas minas de Braçal e São Domingos, de modo a avaliar as suas competências na fitorremediação desses locais: *Cistus inflatus* (parte aérea) e *Cistus ladanifer* (folhas). Apesar de ambos os solos apresentarem elevadas concentrações de Pb, o solo de São Domingos demonstra uma menor fração disponível desse elemento que o solo de Braçal (8.3 a 67.3 mg/kg e 276 a 6175 mg/kg). Nenhuma das plantas apresentava sinais visíveis de stress tendo-se adaptado às condições hostis do solo. A *C. inflatus* (colhida no Braçal) apresentava maior concentração de Pb na partes aéreas (49.5 a 217 mg/kg) do que nas *C. ladanifer* (40.4 a 48.6 mg/kg). Os autores concluíram que a diferença de concentrações de Pb nas plantas se deve ao facto da fração disponível do solo de São Domingos ser inferior. Apesar de na Primavera as duas *Cistus* não serem acumuladoras de Pb, são capazes de absorver parte do Pb disponível e transferí-los para a parte aérea, sendo assim consideradas pelos autores uma boa aposta para a estabilização física e química das áreas mineiras ricas em Pb, diminuído também quer a erosão hídrica quer eólica do terreno e criando condições para um possível desenvolvimentos de outras espécies.

II. Objetivos

Os objetivos deste trabalho podem ser divididos em duas categorias: 1) científicos e 2) aquisição de conhecimento e competências.

II.1 Científicos

Do ponto de vista científico os principais objetivos deste estudo foram:

- Avaliação do potencial bioindicador da flora nativa da escombreira da mina de Santo António (Penedono);
- Estudar a capacidade das espécies *Brassica nigra* (mostarda negra) e *Medicago sativa* (alfalfa) para a fitorremediação dessa escombreira;
- Estudar a capacidade da espécie *Hirschfeldia Incana* para a fitorremediação da escombreira de Aljustrel;
- Testar a influência do húmus como corretivo para aumentar o crescimento vegetal em ambas as escombreiras;
- Inferir e comparar o efeito de diversos quelantes altamente biodegradáveis (ácido cítrico, ácido oxálico e tiocianato de amónio) na disponibilidade dos metais dessas escombreiras;
- Observar o efeito do ácido giberélico, como hormona de crescimento, na *H. Incana*.

II.2 Aquisição de conhecimento e competências

Na perspectiva de aquisição de conhecimento e competências técnicas destacam-se os seguintes objetivos:

- Aprender a recolher, identificar, e geo-referenciar amostras *in situ*
- Processar amostras *ex situ*, incluindo identificar as espécies vegetais
- Realizar pesquisa bibliográfica, incluindo a utilização das bases de dados SCOPUS e WEB OF SCIENCE
 - Aprender o funcionamento dos índices bibliográficos, tais como o fator de impacto, eigenfactor, e h-index
- Aprender como fazer o desenho experimental randomizado de um ensaio
- Aprender diferentes técnicas de análise laboratorial, tais como:
 - Medição do pH
 - Medição da condutividade
 - Análise da quantidade de matéria orgânica
 - Digestão ácida das amostras para análise em Espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)
 - Determinação da fração biodisponível de metais através de extrações com CaCl₂

- Controlo das condições de crescimento vegetal, incluindo temperatura, humidade relativa do ar, humidade do solo, e luminosidade
- Utilização de *software* específico para o tratamento de resultados e elaboração do relatório
 - IBM SPSS Statistics
 - Testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene para testar a suposição de normalidade e avaliar a igualdade de variâncias
 - Análises de variância de uma via (ANOVA) + Testes Post Hoc (Tukey e Dunnett)
 - ArcGIS/ArcMAP
 - Geo-referenciação da escombreira e mapas
 - Mendeley
 - Gestão das referências bibliográficas

III. Bioindicação

III.1 Objetivos

Esta primeira parte do trabalho tem como principais objetivos avaliar o potencial bioindicador e fitorremediador da flora nativa da escombreira de Santo António em Penedono.

III.2 Enquadramento da área em estudo

III.2.1 Enquadramento Geográfico

As amostras de solo e plantas utilizadas como material de estudo foram colhidas na antiga mina de Santo António (Penedono).

Esta mina situa-se na serra da Laboreira, localizada na freguesia de Penedono e Granja do concelho de Penedono, pertencente ao distrito de Viseu. O local de recolha das amostras tinha como coordenadas $41^{\circ}01'16.0''N$ $7^{\circ}24'27,1''W$, a cerca de 3 km para noroeste da sede do concelho de Penedono.

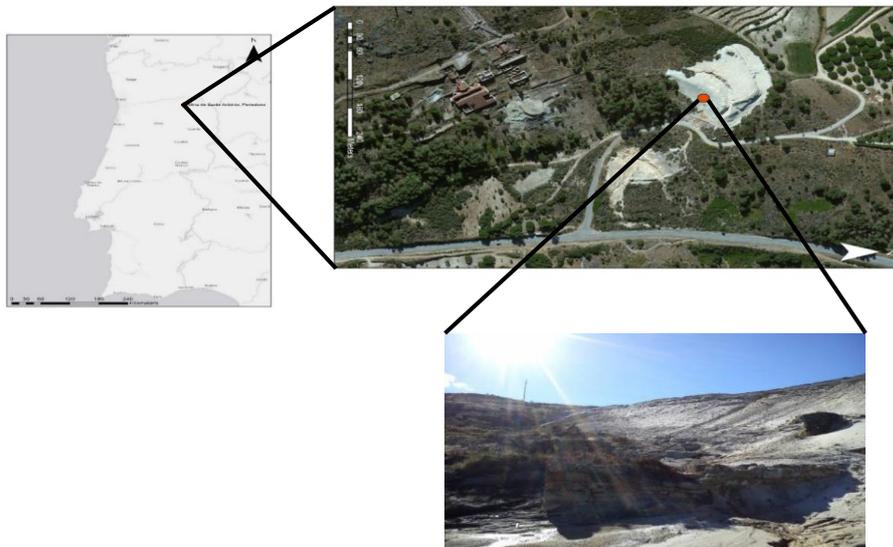


Figura 6 - Enquadramento geográfico da área em estudo.

III.2.2 Enquadramento Geológico

O local em estudo encontra-se na Zona Centro Ibérica (ZCI), limitada a Norte pela falha de Viveiro e a SW pela Zona de cisalhamento Badajoz-Córdoba e constituída essencialmente por duas grandes unidades litológicas fundamentais: metassedimentos câmbricos do Grupo do Douro e rochas granitoídes de idade hercínica. Está em contacto por falha, a sudeste, com xistos metamorfizados indiferenciados câmbricos do Complexo-Xisto-Grauváquico (CXG) composto por duas unidades principais: o Grupo do Douro, cobrindo grande parte da região do Douro e o Grupo das Beiras, abrangendo vastos sectores da zona centro do país (Bernardo De Sousa, 1984).

As mineralizações desta região estão presentes em estruturas filonianas (com orientação dominante NE-SW), subverticais, preenchidas por ganga quartosa com sulfuretos (como arsenopirite, pirite, calcopirite, galena e esfarelite).

III.3 Metodologia

III.3.1 Amostragem

No dia 11 de Março 2016 foi feita uma recolha de amostras de solo e plantas presentes na escombreira da antiga mina de Au de Santo António, em Penedono. Foram colhidas 7 amostras de solo em 3 locais distintos da mina e transportadas para o departamento de Geociências da Universidade de Aveiro em sacos de plásticos devidamente identificados.

III.3.2 Caracterização das espécies recolhidas

Na saída de campo feita a antiga mina de Santo António, foram colhidas amostras de diversas plantas que cresceram em dois pontos diferentes da escombreira (ponto A e ponto B) para uma posterior avaliação das mesmas como bioindicadoras e fitorremediadoras. Realizou-se o estudo das plantas colhidas em dois pontos distintos da escombreira.

III.3.2.1 *Cytisus multiflorus*

A *C. multiflorus* é um arbusto, que pode crescer até 2 metros de altura, pertencente à família *Fabaceana*. Esta planta, mais vulgarmente conhecida por giesta-branca, é nativa de Portugal Continental sendo muito vulgar no interior do Norte e Centro, tendo preferência para matos

secos, matagais e rupícola. Era endêmica da Península Ibérica mas foi introduzida no norte da América, Austrália e oeste da Europa (Flora-On, 2016).



Figura 7- *C. multiflorus* (Fonte: Jardim botânico UTAD)

III.3.2.2 *Pteridium aquilinum*

A *P. aquilinum* pertence à família *Dennstaedtiaceae*. Esta planta, vulgarmente conhecida por fetocomum ou feito, pode alcançar vários metros de comprimento (frondes de 1 a 3 metros). Pode ser encontrada em todas as regiões temperadas do hemisfério norte e em vastas áreas temperadas e subtropicais do hemisfério Sul. Apesar de ser uma planta extremamente resistente e de rápida colonização, prefere solos profundos e bem drenados, em particular solos arenosos em zonas frescas (Flora-On, 2016).

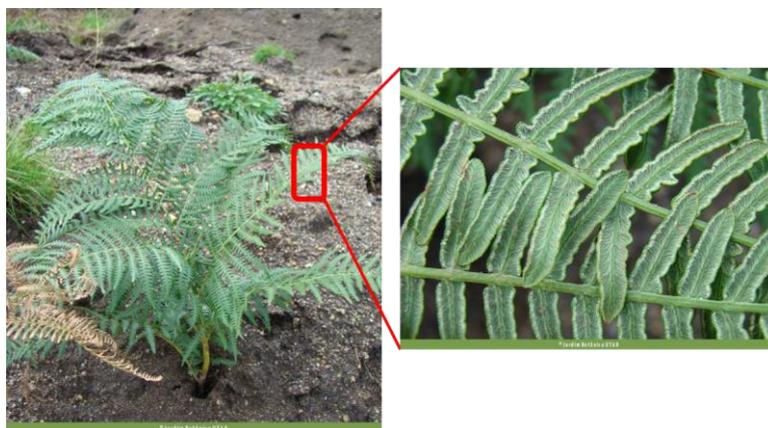


Figura 8- *P. aquilinum* (Fonte: Jardim botânico UTAD)

III.3.2.3 *Polytrichum commune*

A *P. commune* pertence à família *Polytrichaceae*. Esta planta, vulgarmente conhecida como musgo pinheirinho, apresenta geralmente cauloídes eretos com alturas entre 5 e 10 cm podendo no entanto exceder os 30 cm de comprimento raramente excedendo os 70 cm. Está alargadamente distribuída em regiões temperadas e frias tanto no hemisfério norte como no hemisfério sul, preferindo no entanto habitats muito chuvosos e húmidos (Flora-On, 2016).



Figura 9 – *P. commune*

III.3.2.4 *Gramineae sp.*

A *Gramineae sp* pertence à família *Poaceae*. Esta planta, vulgarmente conhecida como grama/relva, é uma planta florífera cujas flores são compostas por um androceu (conjunto de estames-órgãos reprodutivos masculinos que tem como função a produção de pólen) com 3 estames de antenas grandes; e por um gineceu (conjunto de órgão reprodutores femininos). Trigo, centeio, cevada, aveia, arroz, bambu, milho e cana-de-açúcar são alguns exemplos muito conhecidos de gramíneas (Flora-On, 2016).



Figura 10 - *Gramineae sp*

III.3.2.5 *Agrostis sp.*

A *Agrostis sp.* é uma espécie nativa da Europa, pertencente à família Poaceae. Existem mais de 900 subespécies e por norma todas elas possuem folhas muito finas e têm tendência em crescer verticalmente. Geralmente, esta espécie habita zonas de clima temperado, variando de habitats consoante a subespécie (Flora-On, 2016).



Figura 11- *Agrostis sp.* (Fonte: Jardim Botânico da UTAD)

III.3.2.6 *Leontodon taraxacoides*

L. taraxacoides é uma espécie da Europa e norte de África, ocupando diversos habitats desde prados, pastagens secas em pousios, pinhais e matagais a campos de cultivo olivais e pomares de sequeiro. Morfologicamente caracteriza-se por folhas verdes inteiras ou lobadas, entre 2 a 15 cm de comprimento e 0.5 a 2.5 cm de largura (Flora-On, 2016).

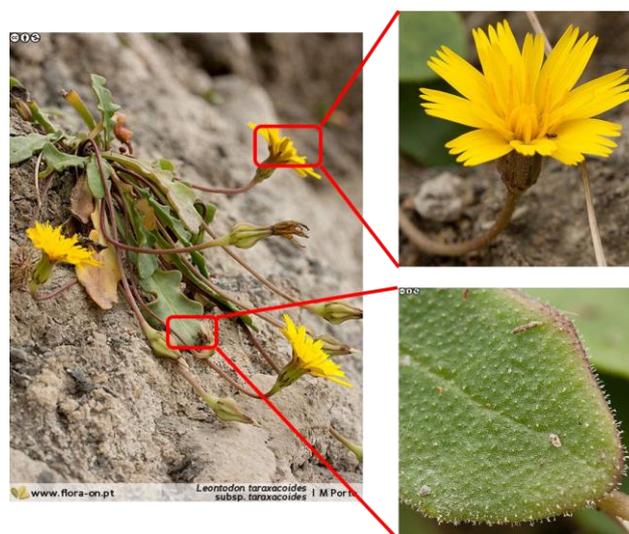


Figura 12- *L. taraxacoides* (Fonte: Flora-On, 2016)

III.3.3 Processamento das amostras

As amostras de solo e de plantas colhidas no campo foram transportadas para o Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro para processamento.

III.3.3.1 Secagem da escombreira

Numa primeira fase, as amostras de solo da escombreira foram divididas em tabuleiros, devidamente identificados, e colocadas numa estufa, a 50 °C, para secarem até atingirem um peso constante.



Figura 13- Amostras de escombreira na estufa.

III.3.3.2 Lavagem e secagem das plantas

As plantas colhidas *in-situ* foram numa primeira fase divididas em parte aérea e raiz. Numa fase inicial foram cuidadosamente lavadas com água de modo a eliminar o máximo de resíduos de solo possível, e posteriormente com água destilada. Após a lavagem, as amostras foram colocadas em tabuleiros, devidamente identificados, e levadas a secar numa estufa a 50°C até atingirem um peso constante.



Figura 14 - Lavagem de uma raiz.

III.3.3.3 Moagem das plantas

Após terem secado por completo, foi necessário proceder à moagem das plantas, de modo a obter partículas finas para uma posterior análise às concentrações de metais presentes em cada uma. As amostras moídas foram colocadas em sacos, devidamente identificados, e armazenadas para análise.



Figura 15- Moagem das plantas colhidas na antiga mina de Penedono.

III.3.3.4 Peneiração da escombreira

Após as amostras de escombreira estarem completamente secas, foram extraídas as frações mais grossas (>9.5mm) através de um balde de peneiração, como se pode verificar na figura abaixo.

Parte dessa fração mais fina foi novamente peneirada a 2mm e colocada em sacos de plástico devidamente identificados, enquanto a restante fração foi utilizada para o ensaio de fitorremediação (secção IV). Uma parte da fração <2 mm foi para a moagem no moinho de aço e outra parte utilizada para análise de fração biodisponível.



Figura 16 - Baldes de peneiração grosseira (à esquerda) e de peneiração a 2 mm (à direita).

III.3.3.5 Moagem da escombreira

Retirou-se entre 120 e 150 g de cada amostra peneirada a 2 mm para colocar num moinho mecânico com discos de aço. No moinho mecânicos cada amostra ficou a agitar cerca de 10 minutos de modo a obter um grão muito fino, de onde foram retiradas 20 g para um saco identificado com um novo código numérico específico requisitado pelo laboratório para o qual foram mandadas para análise das concentrações de metais.



Figura 17 - Moinho mecânico de discos de aço com uma amostra de escombreira.

III.3.3.6 Medição do pH e da condutividade da escombreira.

Foi medido o pH e a condutividade para cada amostra de escombreira. Para tal pesaram-se 5 g de cada amostra e transferiu-se em tubos de ensaio. Mediu-se o pH numa solução de CaCl_2

(adicionou-se 25 mL de solução de cloreto de cálcio dihidratado + água destilada à 5 g de amostra) e o pH com água destilada (foi adicionado 25 mL de água destilada às 5g de amostra). Os tubos foram colocados a agitar durante cerca de 10 minutos num agitadora e de seguida foram deixados a repousar durante 24 horas antes de serem feitas as medições.



Figura 18 - Agitador dos tubos para a medição do pH.

Após 24 horas de repouso foi feita a leitura do pH e temperatura de todas as amostras, e mediu-se a condutividade, através de um condutímetro. Os resultados obtidos estão presentes na tabela 3.

III.3.4 Determinação das concentrações de metais

As amostras de plantas e solo moídas foram enviadas para análise em laboratórios creditados ACME (ACME Anal, ISSO 9002 Accredited Lab, Vancouver, Canada), onde se determinaram as concentrações de metais em cada amostra através de ICP-MS após digestão com o método de *aqua-régia*. Os valores obtidos para os metais mais representativos da escombreira e das plantas estão listados na tabela 4 e na tabela 5, respetivamente.

III.3.5 Fator de Bioacumulação (FBC) e Fator de Translocação (FT)

O potencial de fitoextração de uma planta pode ser estimado através do cálculo do fator de bioconcentração ou bioacumulação e de translocação. Como referido anteriormente, o fator de bioacumulação é traduzido pelo rácio da concentração dos elementos presentes no tecido da planta com a concentração dos mesmos elementos no solo, enquanto o fator de translocação rege-se pelo rácio de concentração de metal na parte aérea da planta com a concentração do

metal do solo (Favas et al., 2014b). Os valores da bioacumulação e de translocação obtidos para amostras colhidas em Penedono estão representados nas tabelas 8, 9, 10 e 11.

III.4 Resultados

Tabela 3- pH e condutividade da escombreira

<i>Escombreira</i>	<i>Penedono</i>	<i>Aljustrel</i>
<i>pH (H₂O)</i>	3,37±0,00	4,24±0,02
<i>pH (CaCl₂)</i>	3,66±0,03	3,68±0,00
<i>Condutividade (μS/cm)</i>	157,00±11,00	2535,00±15,00

Tabela 4- Concentração de metais na escombreira de Penedono (ponto A)

<i>Amostra</i>	<i>Elemento (mg/kg)</i>							
	<i>Cu</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>	<i>Ag</i>	<i>Mn</i>	<i>As</i>	<i>U</i>	<i>Cd</i>
<i>Escombreira (Ponto A)</i>	10,09	27,69	27,0	1161	13	1801,9	4,3	0,20

Tabela 5- Concentração de metais na escombreira de Penedono (ponto B)

<i>Amostra</i>	<i>Elemento (mg/kg)</i>								
	<i>Cu</i>	<i>Pb</i>	<i>Ag</i>	<i>As</i>	<i>Au</i>	<i>Sr</i>	<i>Cd</i>	<i>Bi</i>	<i>Ga</i>
<i>Escombreira (Ponto B)</i>	345,89	5462,68	15615	2261	614,7	53,8	0,13	154,14	4,2

Tabela 6- Concentração de metais nas plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto A)

<i>Espécie</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Elemento (mg/kg)</i>							
		<i>Cu</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>	<i>Ag</i>	<i>Mn</i>	<i>As</i>	<i>U</i>	<i>Cd</i>
<i>C. multiflorus</i>	<i>Raíz</i>	7,72	0,14	24,2	0,055	67	15,9	0,02	<0,01
	<i>Parte aérea</i>	14,15	0,49	57,3	0,127	479	47,8	0,03	0,02
<i>P. aquilinum</i>	<i>Raíz</i>	10,99	0,68	19	0,226	139	38,8	0,04	0,06
	<i>Parte aérea</i>	8,03	3,34	37	0,484	323	229,3	0,32	0,08
<i>P. commune</i>	<i>Raíz</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Parte aérea</i>	9,15	1,55	41,8	8,312	239	57,4	0,1	0,05
<i>Gramineae sp.</i>	<i>Raíz</i>	20,42	2,06	17	4,651	22	369,3	0,29	0,15
	<i>Parte aérea</i>	6,73	3,38	38,1	0,971	110	387,8	0,12	0,04

Tabela 7- Concentração de metais nas plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto B)

Espécie	Parte da planta	Elemento (mg/kg)								
		Cu	Pb	Ag	As	Au	Sr	Cd	Bi	Ga
<i>C. multiflorus</i>	Raíz	7,98	0,37	102	41,9	7,7	4,6	0,03	0,18	<0.1
	Parte aérea	16,37	2,54	242	425,6	146	3,5	0,02	2,96	<0.1
<i>C. multiflorus</i>	Raíz	12,42	0,56	200	133	45,1	4,7	0,02	0,37	<0.1
	Parte aérea	27,07	2,12	271	460,1	100,9	2,7	0,02	2,03	<0.1
<i>Agrostis sp.</i>	Raíz	13,13	1,27	2566	376	64,4	3,4	0,08	0,90	<0.1
	Parte aérea	6,09	1,21	739	273,9	61,7	3,0	0,06	0,87	<0.1
<i>L. taraxacoides</i>	Raíz	12,53	0,39	223	69,5	16,2	22,5	0,28	0,12	<0.1
	Parte aérea	11,78	0,16	77	18,6	2,8	37,2	0,65	0,04	<0.1

Tabela 8- Fator de bioacumulação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto A)

Espécie	Fator de Bioacumulação (FBC)							
	Cu	Pb	Zn	Ag	Mn	As	U	Cd
<i>C. Multiflorus</i>	2,17	0,02	3,02	0,00	42,00	0,04	0,01	-*
<i>P. Aquilinum</i>	1,89	0,15	2,07	0,00	35,54	0,15	0,08	0,7
<i>P. Commune</i>	0,91	0,06	1,55	0,01	18,38	0,03	0,02	0,25
<i>Gramineae sp.</i>	2,69	0,20	2,04	0,00	10,15	0,42	0,10	0,95

*Não calculado pois a concentração de Cd na raiz ficou abaixo dos limites de detecção.

Tabela 9- Fator de bioacumulação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto B)

Espécie	Fator de Bioacumulação (FBC)								
	Cu	Pb	Ag	As	Au	Sr	Cd	Bi	Ga
<i>C. multiflorus</i>	1,50	0,07	0,22	0,09	0,12	3,24	0,24	0,08	-*
<i>C. multiflorus</i>	2,44	0,06	0,31	0,12	0,11	2,96	0,19	0,06	-*
<i>Agrostis sp.</i>	1,19	0,06	2,15	0,13	0,10	2,56	0,67	0,04	-*
<i>L. taraxacoides</i>	1,50	0,01	0,19	0,02	0,01	23,88	4,43	0,00	-*

*Não calculado pois a concentração ficou abaixo dos limites de detecção

Tabela 10- Fator de Translocação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto A)

<i>Espécie</i>	Fator de Translocação (FT)							
	Cu	Pb	Zn	Ag	Mn	As	U	Cd
<i>C. multiflorus</i>	1,83	3,50	2,37	2,31	7,15	3,01	1,50	-*
<i>P. aquilinum</i>	0,73	4,91	1,95	2,14	2,32	5,91	8,00	1,33
<i>P. commune</i>	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**	-**
<i>Gramineae sp.</i>	0,33	1,64	2,24	0,21	5,00	1,05	0,41	0,27

*Não calculado pois a concentração de Cd, na raiz, ficou abaixo dos limites de detecção.

**Os valores das concentrações de metais na raiz da *P. commune* não foram obtidos, logo não se pôde calcular o TF.

Tabela 11- Fator de Translocação para as plantas colhidas na escombreira de Penedono (ponto B)

<i>Espécie</i>	Fator de Translocação (FT)								
	Cu	Pb	Ag	As	Au	Sr	Cd	Bi	Ga
<i>C. multiflorus</i>	2,05	6,86	2,37	10,16	18,96	0,76	0,67	16,44	-*
<i>C. multiflorus</i>	2,18	3,79	1,36	3,46	2,24	0,57	1,00	5,49	-*
<i>Agrostis sp.</i>	0,46	0,95	0,29	0,73	0,96	0,88	0,75	0,97	-*
<i>L. taraxacoides</i>	0,94	0,41	0,35	0,27	0,17	1,65	2,32	0,33	-*

*Não calculado pois a concentração de Ga na raiz, ficou abaixo dos limites de detecção.

Analisando os resultados representados nas tabelas acima, para o ponto A da escombreira, é possível verificar que:

- A espécie *C. multiflorus*, apresenta um FT>1 para todos os metais, exceto o Cd, e um FBC>1 para o Cu, Zn e Mn, indicando que esta espécie tem potencial para a prospeção biogeoquímica, fitoestabilização e fitoextração destes 3 metais.
- A espécie *P. aquilinum*, apresenta um FT>1 para todos os metais exceto o Cu e, assim como a *C. multiflorus*, possui um FBC>1 para o Cu, Zn e Mn. Estes valores indicam que esta espécie seria uma ferramenta útil para a prospeção biogeoquímica e fitoestabilização do Cu, Zn e Mn, e para a fitoextração do Zn e do Mn.
- A espécie *P. commune*, não foi possível calcular o fator de translocação não tendo sido determinadas concentrações de metais na raiz. No entanto o seu FBC>1 para o Zn e Mn indica que esta espécies poderá ser utilizada para a prospeção biogeoquímica e fitoestabilização destes metais.
- Por último, a *Graminaea sp.* apresenta um FBC>1 Cu, Zn e Mn e um valor muito próximo para o Cd, podendo ser utilizada para a prospeção biogeoquímica e

fitoestabilização desses metais. Sendo o seu valor de $FT > 1$ para o Pb, Zn, Mn e As, esta espécie poderá ser útil para a fitoextração do Zn e Mn.

Comparando os valores obtidos para o fator de translocação e bioacumulações das espécies analisados, a *C. multifolius* apresenta uma maior eficácia para a fitoestabilização e fitoextração de metais nestes solos.

As análises feitas aos valores representados nas tabelas 9 e 11 indicam que no ponto B.

- Ambas as *C. multiflorus* colhidas no ponto B da escombreira de Penedono apresentam um $FBC > 1$ para Cu e Sr, assim como um $FT > 1$ para todos os metais excepto Sr. Estes resultados indicam que esta espécie tem potencial como fitoestabilizadora e para a prospeção biogeoquímica de Cu e Sr, e ainda poderia ser utilizada para a fitoextração de Cu.
- O FBC da *Agrostis sp.* apresenta valores superiores a 1 para Cu, Ag e Sr enquanto o FT é maior que 1 para Pb, Au, Sr e Bi. Significando assim que esta espécie apresenta ser útil para a prospeção biogeoquímica e fitoestabilização do solo para o Cu, Ag e Sr, e para a fitoextração de Sr.
- No caso da *L. taraxacoides* tanto o FBC como o FT apresentam valores superiores a 1 para Cu, Sr e Cd, tornando-se assim num potencial utensílio para a fitoestabilização, prospeção biogeoquímica e fitoextração para estes metais.

Comparando os valores obtidos para o fator de translocação e bioacumulação das espécies analisadas, a *L. taraxicoides* é a espécie que apresenta uma maior eficácia para a fitoestabilização e fitoextração de metais nestes solos, em particular o Sr.

IV. Fitorremediação

IV.1 Objetivos

Nesta fase foram realizados 2 estudos experimentais distintos. O primeiro estudo tinha como objetivo avaliar a capacidade das espécies *B. nigra* (mostarda-preta) e *M. sativa* (alfalfa) como plantas fitorremediadoras da escombreira da antiga mina de Santo António (Penedono). O segundo estudo tinha como objetivo avaliar a *H. incana* como fitorremediadora na escombreira da mina de Aljustrel. Nestes ensaios foram também avaliados os efeitos que a utilização do húmus possa ter como corretivo das escombreiras, assim como determinar a sua influência no crescimento das plantas, na fitoestabilização e na fitoextração. Foram utilizados dois quelantes diferentes, ácido cítrico e ácido oxálico para o primeiro estudo e tiocianato de amónio para o segundo, de modo a avaliar e comparar a sua capacidade no aumento da biodisponibilidade dos metais das escombreiras. Nos ensaios da escombreira de Aljustrel foi ainda testada a capacidade do ácido giberélico (fito-hormona) como potenciadora do aumento de biomassa da planta.

IV.2 Metodologia (Amostras de Penedono)

IV.2.1 Desenho experimental

Neste estudo experimental foram utilizados 9 tratamentos diferentes para ambas as espécies (*B. nigra* de modo a estudar o seu comportamento no tratamento da escombreira. Nestes tratamentos estavam presentes 4 variáveis: percentagem de húmus utilizado, utilização de 2 tipos de quelantes diferentes (ácido cítrico e ácido oxálico). Cada tratamento foi efetuado em triplicado.

Tabela 12- Desenho Experimental (*B. nigra* e *M. Sativa*)

Tratamento (Id)	Escombreira (mL)	Húmus (mL)	Ácido cítrico (mL)	Ácido oxálico (mL)
Controlo	1800 (100%)	-	-	-
Controlo (C1)	1800 (100%)	-	150	-
Controlo (C2)	1800 (100%)	-	-	150
H15	1530 (85%)	270 (15%)	-	-
H15 C1	1530 (85%)	270 (15%)	150	-
H15 C2	1530 (85%)	270 (15%)	-	150
H25	1350 (75%)	450 (25%)	-	-
H25 C1	1350 (75%)	450 (25%)	150	-
H25 C2	1350 (75%)	450 (25%)	-	150

O húmus utilizado (pH:7.5; fósforo total: 3.1% P/P; nitrogénio total: 1.13% P/P; potássio total: 0.42% P/P; matéria orgânica: 44.9% P/P; e carga bacteriana: 1.12×10^3 col/g) foi misturado com as amostras de escombreira manualmente de modo a garantir a homogeneidade dos tratamentos. Os vasos foram dispostos de modo completamente randomizado, eliminando assim variáveis que poderiam interferir com os resultados.

IV.2.2 Caracterização físico-química

IV.2.2.1 pH

Para cada tratamento foi determinado o pH seguindo a metodologia indicada na secção III.3.3.6, de modo a comparar as diferenças obtidas com os diferentes tratamentos realizados.

Após a secagem das amostras colhidas em Penedono foi medido o pH através de duas soluções. Na primeira juntou-se, a 5 g de amostra, 25 ml de água destilada e 25 ml de solução de CaCl_2 (1.47 g para 1L de água destilada). Na segunda adicionou-se 50ml de água destilada a 5g de amostra. Os resultados estão representados na tabela 14.

IV.2.2.2 Matéria orgânica

Foi determinada a matéria orgânica (MO) da escombreira no principio e no fim dos ensaios para cada tratamento. Para tal, foi estimada a perda de peso por ignição (Jones, 2001). As amostras foram colocadas, juntamente com os cadinhos correspondentes, numa estufa a 110°C durante 8h de modo a ficarem completamente secas.

Pesaram-se 5g de amostra que foram posteriormente colocadas numa mufla a 430°C durante 16h.



Figura 19 - Cadinhos e respetivas amostras.

O teor (% p/p) de matéria orgânica é calculado através da fórmula seguinte:

$$MO \left(\%, \frac{p}{p} \right) = \frac{100(\text{peso do cadinho} + \text{peso solo } 110^{\circ}\text{C}) - (\text{peso do cadinho} + \text{peso do solo } 430^{\circ}\text{C})}{(\text{peso do cadinho} + \text{peso do solo } 110^{\circ}\text{C}) - (\text{peso do cadinho})}$$

IV.2.2.3 Metais pesados

IV.2.2.3.1 Escombreira

Como referido anteriormente, as amostras de escombreira foram analisadas em laboratórios acreditados ACME (ACME Anal. ISSO 9002 Accredited Lab, Vancouver, Canada), onde se determinaram as concentrações de metais em cada amostra através de ICP-MS após digestão com o método de *aqua-régia*. Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 4 e 5 da secção III.4.

IV.2.2.3.2 Escombreira – Fração biodisponível.

Para medir a fração biodisponível dos metais das escombreiras, foram retiradas 10 g de cada amostra (peneirada a 2 mm) juntado, num balão Enlenmeyer de 250 mL, 100 mL de uma solução de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl_2). Foram feitas 3 réplicas para cada amostra de modo a obter uma maior representatividade nos resultados. As misturas (escombreira + solução CaCl_2) foram deixadas num agitador horizontal (shaker) durante cerca de 3 horas.

A solução de CaCl_2 foi preparada num balão volumétrico de 2 L, onde se colocou 2.94 g de cloreto de cálcio dihidratado adicionando água destilada até perfazer o volume total.



Figura 20 - Amostras no shaker.

De modo a obter uma solução para análise da fração disponível (Jones, 2001) foi necessário filtrar cada mistura (usando um funil e papel de filtro Whatman no. 42), para tubos.



Figura 21 - Filtragem das amostras.

Os resultados das análises às concentrações de metais nas extrações realizadas não foram obtidos por razões de ordem técnica, não tendo sido possível a sua apresentação.

IV.2.3 Ensaios de Fitorremediação

Como referido anteriormente para este ensaio foram semeadas 2 espécies de plantas diferentes (*B. nigra* e *M. sativa*) em tabuleiros de germinação preparados com uma mistura de perlite e areia (2:1, v:v). Todo o processo de germinação ocorreu em condições controladas: fotoperíodo de 16:8

h (16 horas de luz e 8 horas de escuridão); temperatura $22,5 \pm 1^\circ\text{C}$; e umidade relativa do ar $65 \pm 5 \%$. De modo a garantir umidade constante, foi mantida uma rega diária com água destilada para cada alvéolo.



Figura 22 - Germinação de *M. sativa* (A) e *B. nigra* (B).



Figura 23 – *B. nigra* (acima) e *M. sativa* (abaixo) ao fim de 34 dias.

Tendo as plantas atingido um grau de maturidade adequado (3 folhas completamente desenvolvidas), foram transplantadas para vasos de polipropileno (2197 cm^3), preenchidos com os diferentes tratamentos. Os tratamentos, preparados em triplicados, foram os mesmos para ambas as espécies.

De modo a atenuar o estresse sofrido pelas plantas devido à transplantação, no primeiro dia as mesmas foram regadas com água e fertilizante (NPK).

Assim como no processo de germinação, o desenvolvimento das plantas nesta fase foi feito sob condições controladas: fotoperíodo 14:10 h (luz/escurecimento); temperatura $23,5 \pm 1$ °C; e umidade relativa do ar 65 ± 5 %. De modo a manter a umidade do solo a 60 ± 5 % (gravimetricamente), as plantas foram regadas diariamente com água destilada.

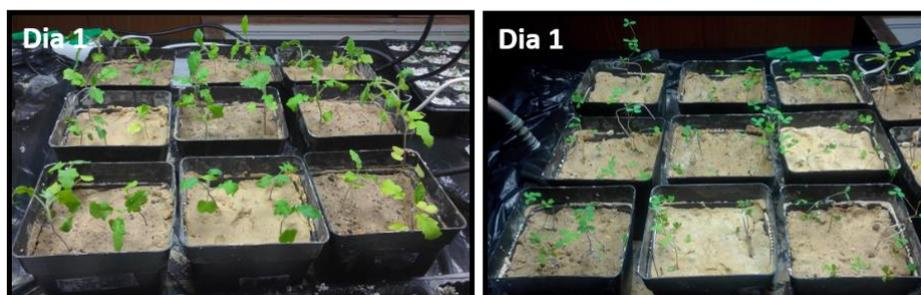


Figura 24 - *B. nigra* e *M. sativa* após a sua transplantação nos vasos com os diferentes tratamentos.



Figura 25 – *M. sativa* (esquerda) e *B. nigra* (direita) um mês após a transplantação.

Sete dias antes das plantas serem colhidas, aplicaram-se 150 mL de ácido cítrico (10 mmol/kg) nos tratamentos C1, H15 C1, H25 C1; e 150 mL de ácido oxálico (10mmol/kg) nos tratamentos C2, H15 C2, H25 C2.

- Para a solução de ácido cítrico: adicionou-se 9,20 g de ácido cítrico com 600 mL de água destilada.
- Para a solução de ácido oxálico: juntou-se 6,04 g de ácido oxálico a 600 mL de água destilada.

No dia anterior e nos dias seguintes à aplicação dos quelantes as plantas não foram regadas de modo a maximizar o efeito dos mesmos.

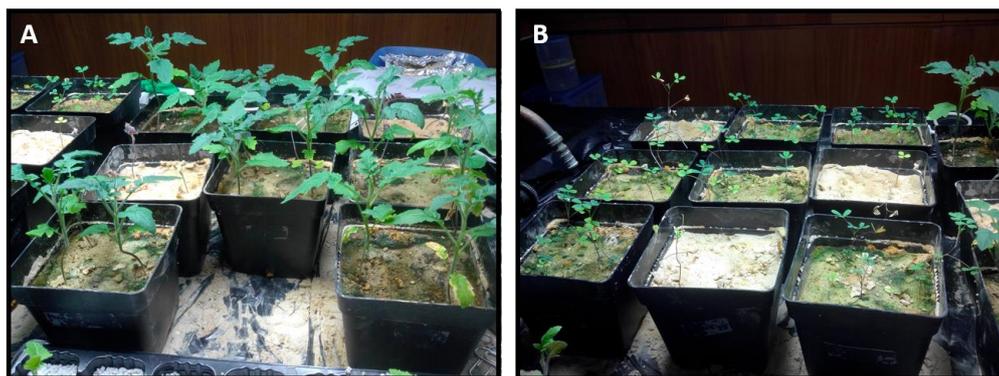


Figura 26 – *B. nigra* (A) e *M. sativa* (B) após a aplicação do quelante.

As plantas de ambas as espécies transplantadas para os vasos de controle não sobreviveram aos ensaios.

Uma semana após a aplicação dos quelantes, todas as plantas foram retiradas dos seus vasos. Cada planta foi lavada cuidadosamente com água destilada para remover os resíduos de solo. A planta foi dividida em parte aérea e raízes, determinando-se o peso fresco de ambas as partes.

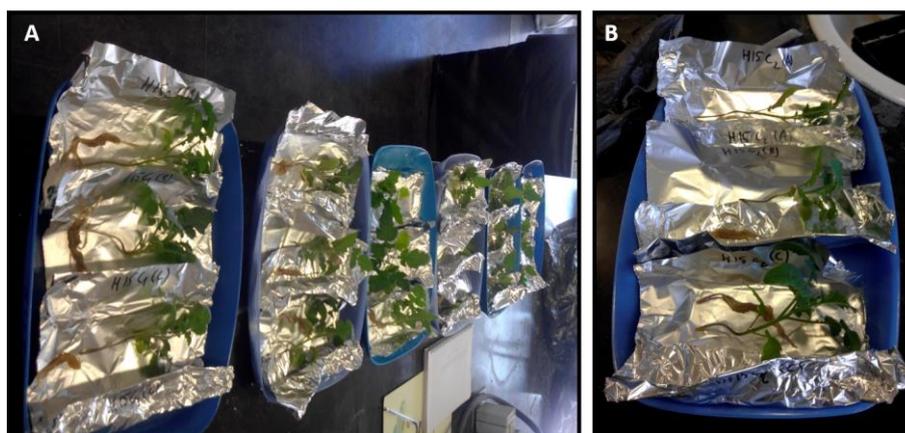


Figura 27 – *B. nigra* após lavagem (A), *B. nigra* dividida em raiz e parte aérea (B).

As amostras foram colocadas a secar em estufa, a 50°C, até atingirem um peso constante, momento em que foi determinado o seu peso seco. Posteriormente, as raízes e parte aérea das plantas foram moídas, separadamente, e colocadas em tubos de digestão.



Figura 28 – *B. nigra* em tubos de digestão.

Adicionou-se, aos tubos de digestão, 5 mL de solução concentrada de HNO_3 . Cobriu-se e deixou-se repousar. Os tubos foram então colocados numa placa quente e digeridos a 125°C . Removeram-se os tubos de digestão da placa e deixou-se arrefecer. Foram recolocados na placa quente a 125°C e adicionou-se 3 mL de H_2O_2 a 30%. Repetiu-se a adição de H_2O_2 até que a digestão fosse total. Quando a digestão ficou clara, reduziu-se a temperatura da placa para 80°C . Adicionou-se, por fim, HNO_3 (1:10) para perfazer o volume final de 10 mL.

Os teores de metais de cada amostra foram calculados através de ICP-MS após a digestão com o método de *aqua-régia*.

IV.2.4 Análise estatística

Todos os resultados analíticos foram obtidos a partir de 3 repetições. Testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene foram utilizados para confirmar a suposição de normalidade e avaliar a igualdade de variâncias, respetivamente. Análises de variância de uma via (ANOVA) foram complementadas com comparações *post hoc* entre os tratamentos através do teste de Tukey para dados homocedásticas, e do teste de Dunnett em caso de heterocedasticidade. Todas as análises estatísticas foram calculadas usando o IBM SPSS Statistics, versão 21.0 (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

IV.3 Resultados e Discussão (Penedono)

Os valores da medição do pH antes e depois da adição de húmus estão representados na tabela 13.

Tabela 13- pH para cada tratamento

Tratamento	pH (CaCl ₂)	Ph (H ₂ O)	Condutividade (μS/cm)
Escombreira	3,66±0,03	3,37±0,00	157,00±11,00
H15	6,49±0,14	7,27±0,15	332±14,18
H25	7,05±0,01	7,60±0,02	598,66±11,59

Verifica-se, comparativamente ao pH original, uma elevada subida do mesmo após a adição de húmus nos tratamentos (H15 e H25).

Quanto à determinação da percentagem de matéria orgânica, os resultados estão representados na figura 29. Como se pode observar, os tratamentos que compoos por 25% de húmus (H25) apresentam maior percentagem de matéria orgânica, seguindo-se os tratamentos compostos por 15% de húmus (H15) e por fim o Controlo, que não levou húmus. Isto ocorreu devido à composição do húmus, que apresentava 44,9% (P/P) de matéria orgânica.

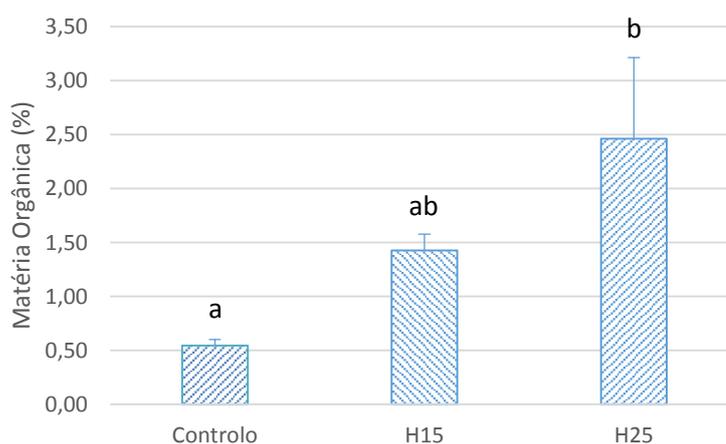


Figura 29- Matéria Orgânica (% p:p) nos diferentes tratamentos. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, p<0.05.

Fez-se a análise estatística da biomassa fresca e seca, e dos teores de metais concentrados nas plantas (raiz e parte aérea) dos diferentes tratamentos.

A figura 30 corresponde ao peso fresco observado na raiz (azul) e na parte aérea (laranja) da *B. nigra* em cada tratamento. Não se observa nenhuma diferença significativa entre o peso da raiz dos diversos tratamentos, no entanto nota-se um ligeiro aumento entre os valores do peso da parte aérea dos tratamentos aos quais foi aplicado 25% de húmus perante os tratamentos com 15% de húmus. Esta diferença não é contudo estatisticamente significativa.

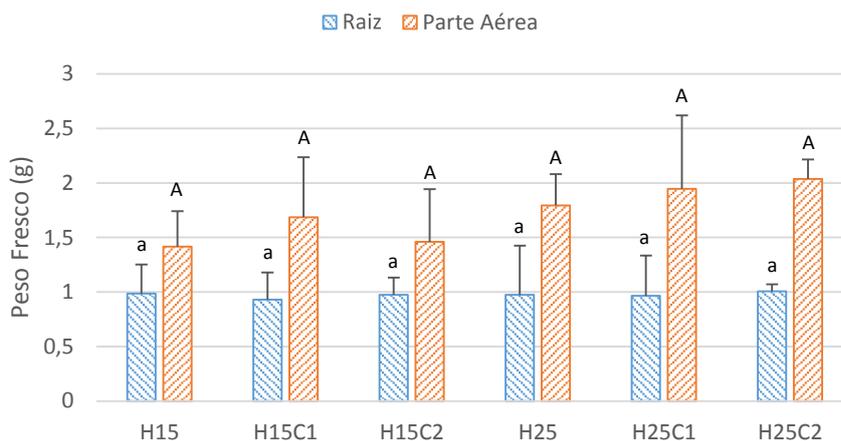


Figura 30- Peso fresco (g) da raiz e parte aérea das *B. nigra*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da raiz, $p < 0.05$.

Na figura 31 observa-se que, assim como no peso fresco, não existe nenhuma diferença significativa entre o peso seco da raiz dos diversos tratamentos. Quanto à parte aérea, mais uma vez verifica-se que as plantas dos tratamentos compostos por 25% de húmus apresentam, apesar de estatisticamente insignificante, maior biomassa do que as plantas dos tratamentos com 15% de húmus.

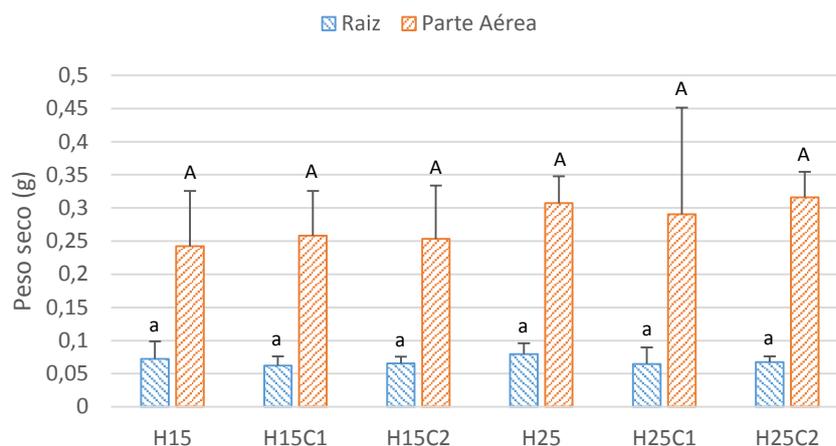


Figura 31- Peso seco (g) da raiz e parte aérea das *B. nigra*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da raiz, $p < 0.05$.

O peso fresco e seco das plantas *M. sativa* estão representados nas figuras 32 e 33, respectivamente. Não se verificaram diferenças significativas no peso fresco e seco de raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

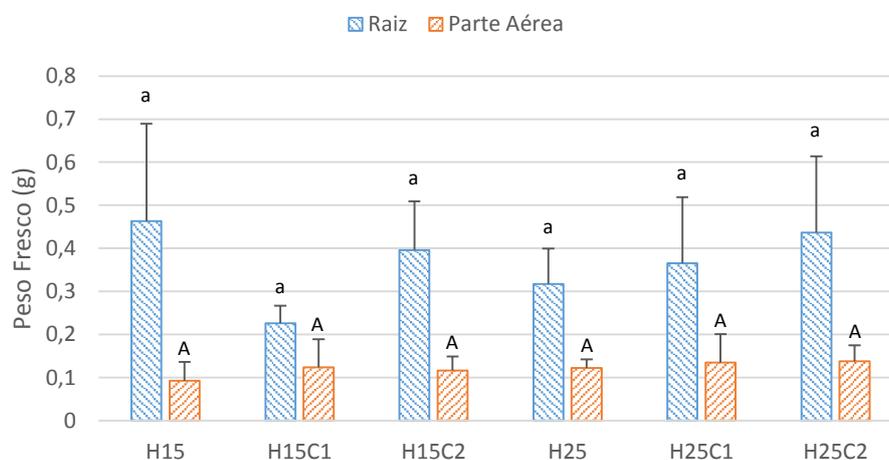


Figura 32- Peso fresco (g) da raiz e parte aérea das *M. sativa*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da raiz, $p < 0.05$.

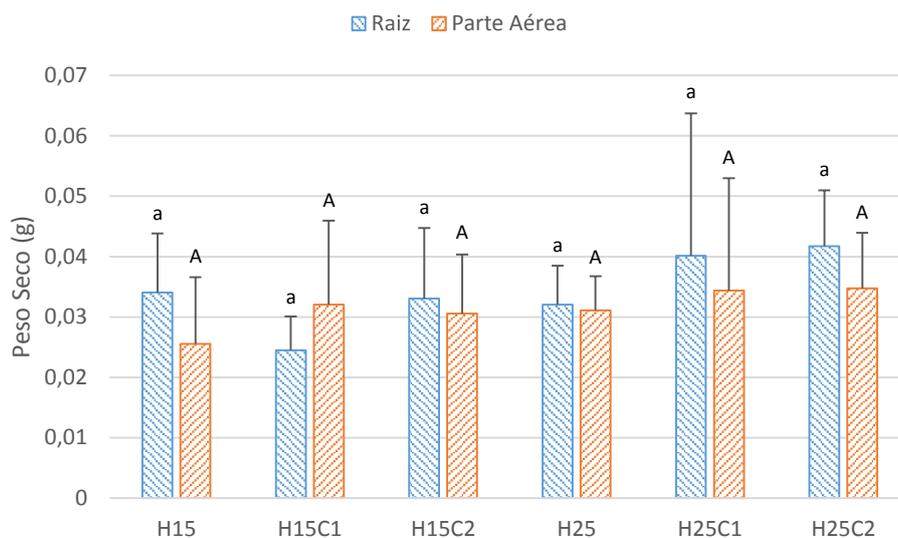


Figura 33- Peso seco (g) da raiz e parte aérea das *M. sativa*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da raiz, $p < 0.05$.

A figura 34 representa a concentração de Cu na parte aérea (A) e na raiz (B) da *B. nigra*. Não se observaram diferenças significativas na concentração de Cu na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

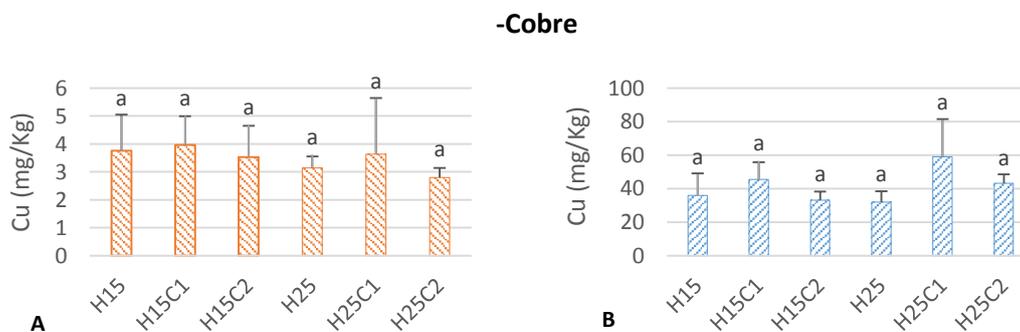


Figura 34- Concentração de Cu (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Verifica-se na figura 35 que a concentração de Zn presente na parte aérea (A) das plantas é muito semelhante à concentração de Zn na raiz (B). Não se observaram diferenças significativas na concentração de Zn na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

-Zinco

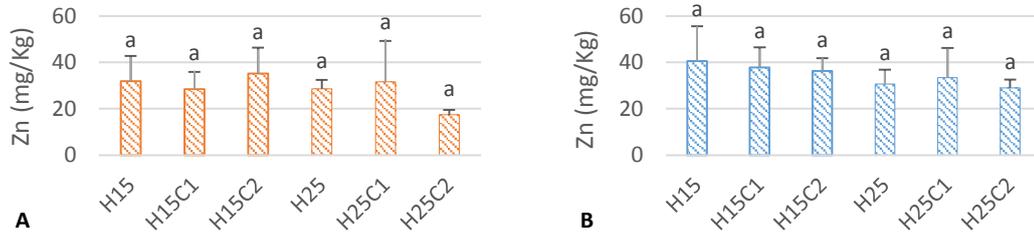


Figura 35- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Nos valores da figura 36, representativo da concentração de As, não se observaram diferenças significativas na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

-Arsênio

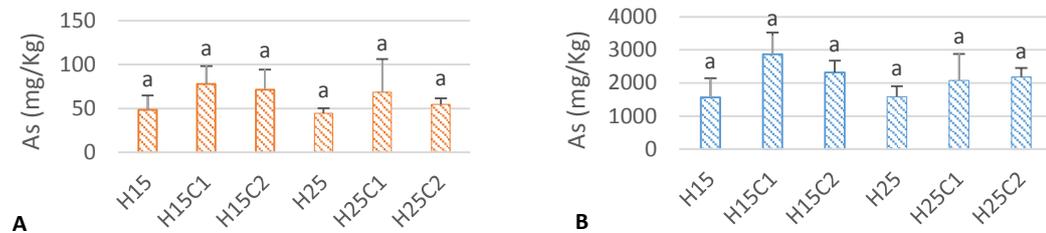


Figura 36- Concentração de As (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Como demonstra o gráfico da figura 37, a aplicação de ácido oxálico (H15C2 e H25C2) aumentou de forma significativa a acumulação de Ag na parte aérea. Embora não tão significativo estatisticamente, o mesmo efeito também é verificado na raiz. Estes resultados sugerem que o ácido oxálico apresenta capacidade para aumentar a biodisponibilidade da prata.

-Prata

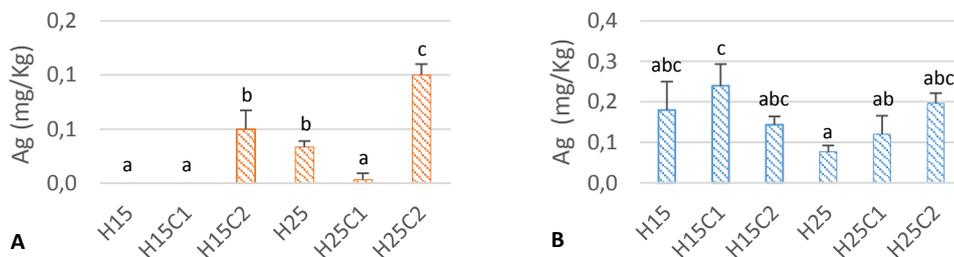


Figura 37- Concentração de Ag (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Como podemos verificar na figura 38, na concentração de Co não se observaram diferenças significativas na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

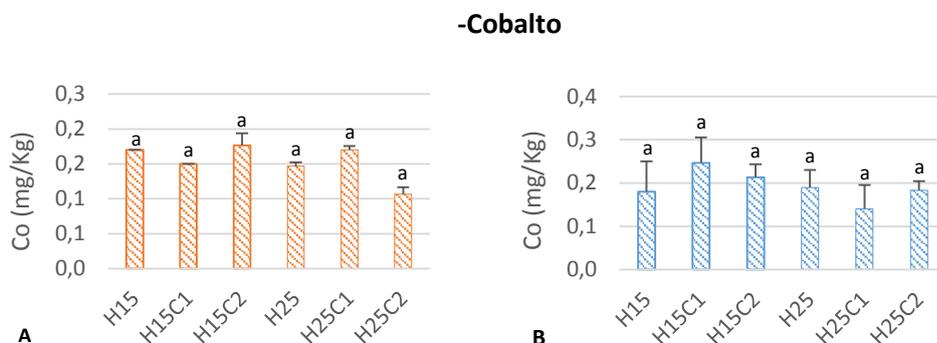


Figura 38- Concentração de Co (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$.

Na figura 39 podemos observar que as concentrações do Au na parte aérea das plantas sujeitas à aplicação de ácido oxálico são significativamente superiores, particularmente no tratamentos H25C2. Este resultado pode ser explicado quer pela eficácia do ácido oxálico como quelante de Au, quer pela aplicação de maior quantidade de húmus que favoreceu o aumento da biomassa. Na raiz não se verificaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos apesar das oscilações.

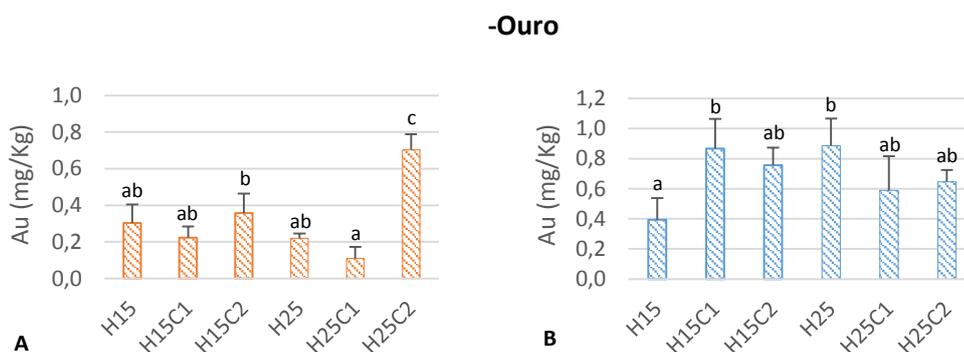


Figura 39- Concentração de Au (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$.

Verifica-se, na figura 40, que apesar de ligeiras oscilações nas concentrações não se verificam diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

-Chumbo

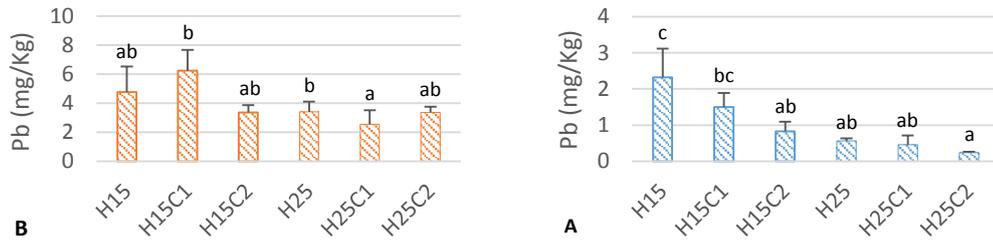


Figura 40- Concentração de Pb (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 41, verifica-se um aumento de concentração de Bi com a aplicação de ácido cítrico. Este efeito é particularmente notório no tratamento H15C1 (raiz e parte aérea). O mesmo não se verifica no tratamento H25C1, pois o aumento da quantidade de húmus poderá ter imobilizado mais quantidade de metal na rizosfera.

-Bismuto

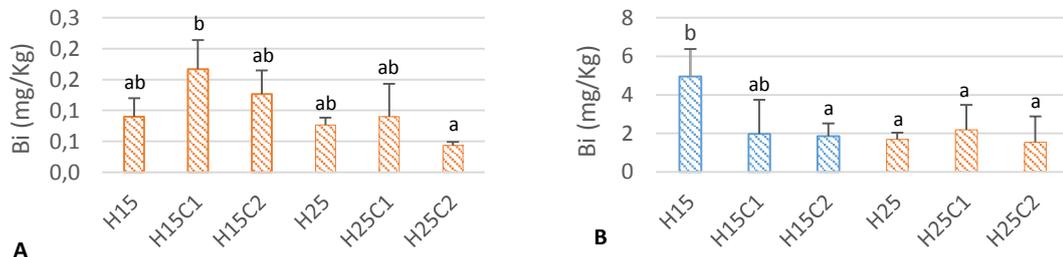


Figura 41- Concentração de Bi (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Nos valores apresentados na figura 42 mostram não se observaram diferenças significativas na concentração de Mn na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

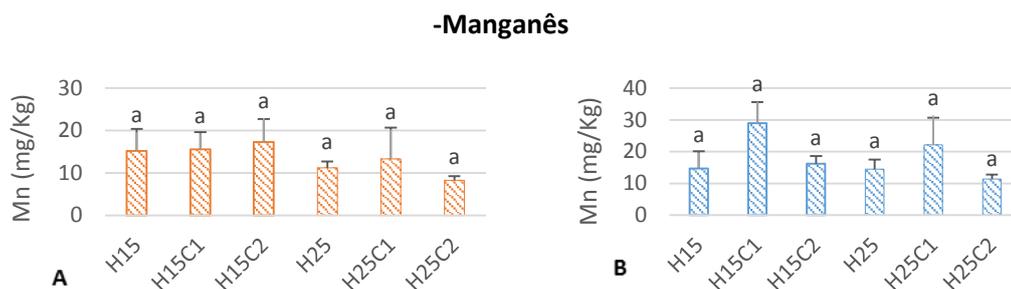


Figura 42- Concentração de Mn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Foi analisado o fator de bioacumulação e o fator de translocação, para os diferentes tratamentos com *B. nigra* nos solos de Penedono.

Analisando a tabela 14, correspondente aos valores do fator de bioacumulação, verifica-se que a *B. nigra* tem um FBC significativamente maior para o Zn comparativamente aos outros metais. Os valores de FBC dos diversos tratamentos não variam muito para o mesmo metal, tendo sido superior a 1 em todos os tratamentos para Zn, Co, Mn.

Tabela 14- Fator de Bioacumulação para a *B. nigra*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Tratamento	Fator de Bioacumulação (FBC)								
	Elemento								
	Cu	Zn	As	Ag	Co	Au	Pb	Bi	Mn
H15	0,69 \pm 0,26a	3,69 \pm 1,29a	0,08 \pm 0,03a	0,03 \pm 0,01ab	1,73 \pm 0,60a	0,25 \pm 0,09ab	0,07 \pm 0,03c	0,01 \pm 0,01a	1,68 \pm 0,58a
H15C1	0,75 \pm 0,20a	3,31 \pm 0,77a	0,13 \pm 0,04a	0,03 \pm 0,01ab	1,69 \pm 0,39a	0,27 \pm 0,06ab	0,05 \pm 0,01ab	0,02 \pm 0,01a	2,03 \pm 0,45a
H15C2	0,60 \pm 0,10a	3,88 \pm 1,05a	0,11 \pm 0,02a	0,04 \pm 0,01b	1,85 \pm 0,48a	0,34 \pm 0,08b	0,03 \pm 0,01ab	0,01 \pm 0,00a	1,90 \pm 0,53a
H25	0,57 \pm 0,15a	3,18 \pm 0,39a	0,07 \pm 0,03a	0,03 \pm 0,01ab	1,56 \pm 0,19a	0,28 \pm 0,05ab	0,03 \pm 0,01a	0,01 \pm 0,01a	1,33 \pm 0,16a
H25C1	0,86 \pm 0,28a	3,49 \pm 1,81a	0,09 \pm 0,03a	0,02 \pm 0,01a	1,65 \pm 0,88a	0,16 \pm 0,06a	0,02 \pm 0,01a	0,01 \pm 0,01a	1,66 \pm 0,82a
H25C2	0,62 \pm 0,12a	2,13 \pm 0,11a	0,09 \pm 0,02a	0,08 \pm 0,01c	1,22 \pm 0,06a	0,54 \pm 0,05c	0,02 \pm 0,00a	0,02 \pm 0,01a	0,99 \pm 0,06a

Na tabela 15, correspondente ao fator de translocação, os valores são superiores a 1 para: Zn (H15C1, H25, H25C1), Co (H15, H15C2, H25, H25C1), Au (H25C2) e Mn (H15, H15C2, H25). Os valores para o Cu, As, Ag, Pb e Bi não apresentam diferenças significativas entre os diversos tratamentos.

Tabela 15- Fator de Translocação para *B. nigra*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Tratamento	Fator de Translocação (FT)								
	Elemento								
	Cu	Zn	As	Ag	Co	Au	Pb	Bi	Mn
H15	0,10 \pm 0,01a	0,79 \pm 0,05a	0,03 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a	0,95 \pm 0,06a	0,77 \pm 0,05ab	0,49 \pm 0,03c	0,05 \pm 0,00a	1,05 \pm 0,07a
H15C1	0,09 \pm 0,02a	0,76 \pm 0,15a	0,03 \pm 0,01a	0,00 \pm 0,00a	0,62 \pm 0,12a	0,26 \pm 0,05ab	0,24 \pm 0,05ab	0,04 \pm 0,01a	0,54 \pm 0,11a
H15C2	0,11 \pm 0,03a	0,97 \pm 0,22a	0,03 \pm 0,01a	0,35 \pm 0,08b	0,82 \pm 0,19a	0,46 \pm 0,11b	0,25 \pm 0,06ab	0,07 \pm 0,02a	1,06 \pm 0,25a
H25	0,10 \pm 0,02a	0,96 \pm 0,19a	0,03 \pm 0,01a	0,43 \pm 0,09ab	0,80 \pm 0,16a	0,25 \pm 0,05ab	0,17 \pm 0,03a	0,04 \pm 0,01a	0,80 \pm 0,15a
H25C1	0,06 \pm 0,01a	0,91 \pm 0,15a	0,03 \pm 0,01a	0,04 \pm 0,01a	1,15 \pm 0,20a	0,18 \pm 0,03a	0,18 \pm 0,03a	0,08 \pm 0,01a	0,58 \pm 0,10a
H25C2	0,07 \pm 0,02a	0,61 \pm 0,15a	0,02 \pm 0,01a	0,52 \pm 0,13c	0,61 \pm 0,15a	1,11 \pm 0,28c	0,07 \pm 0,02a	0,01 \pm 0,01a	0,74 \pm 0,19a

As diferenças registradas em cada metal para ambos os fatores, concordam com as observações supracitadas sobre a acumulação na raiz e parte aérea (isto é, efeito do húmus na retenção de metais, aumento da disponibilidade por parte do quelante, competição entre metais na absorção e transporte dos mesmos, e limitação dos transportadores de metais da própria planta para determinados elementos). Estes resultados indicam que a *B. nigra* poderia ser uma ferramenta útil para a fitoestabilização do Zn, Co e Mn. Relativamente à fitoextração a *B. nigra* apresenta potencial para o Mn com aplicação de 15% de húmus e adição de ácido oxálico; e Co com aplicação de 25% de húmus e adição de ácido cítrico. Os resultados sugerem ainda que a adição de 25% de húmus e aplicação de ácido oxálico podem ser relevantes para a fitoextração de Au (apesar de que o FBC $<$ 1, pois o Au é um metal altamente indisponível).

Os resultados de concentração de metais obtidos para a *M. sativa* estão representados nas figuras seguintes.

Como se pode verificar na figura 43, não se observaram diferenças significativas na concentração de Cu na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

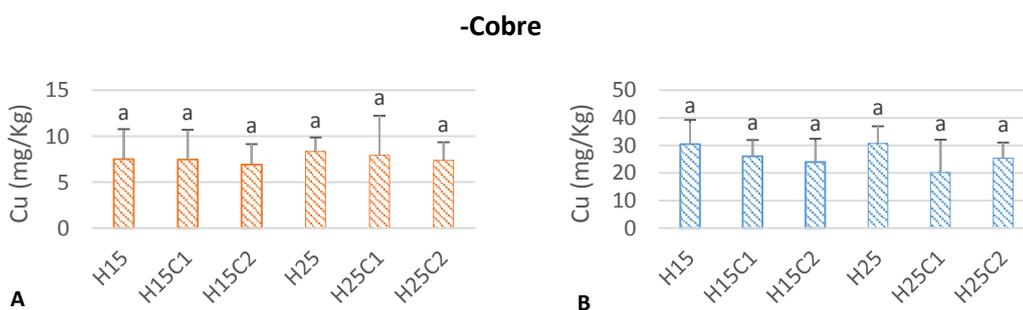


Figura 43- Concentração de Cu (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 44, não se observaram diferenças significativas na concentração de Zn na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

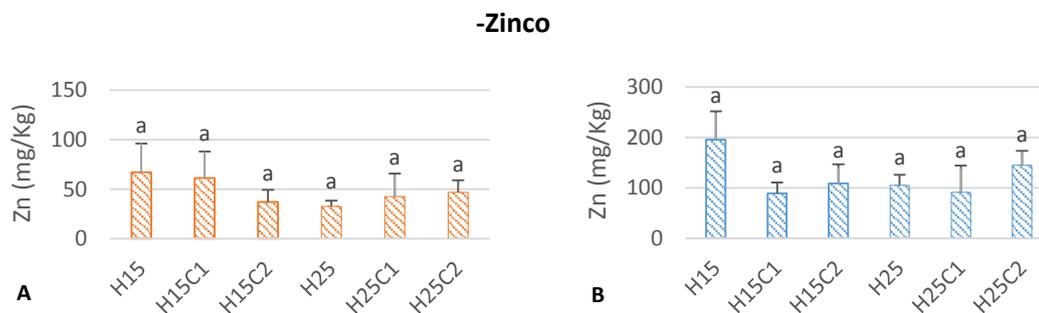


Figura 44- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 45, não se observaram diferenças significativas na concentração de As na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

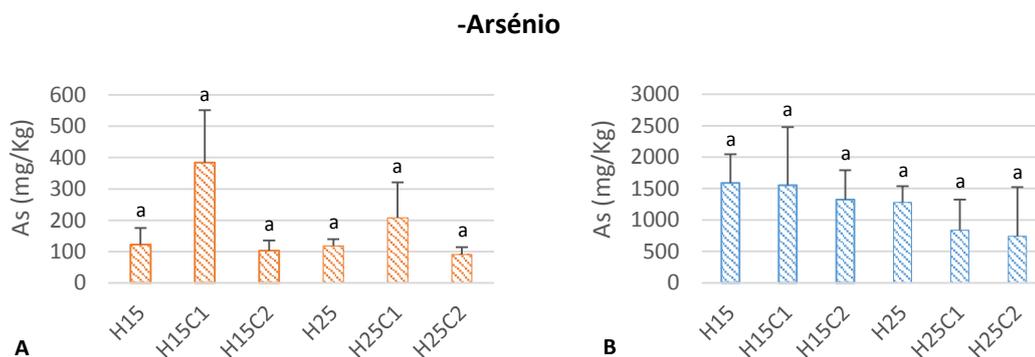


Figura 45- Concentração de As (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 46, a aplicação de ácido cítrico (H15C1 e H25C1) aumentou de forma significativa a acumulação na parte aérea da planta. Embora não tão significativo estatisticamente, o mesmo efeito também é verificado na raiz. Os valores obtidos sugerem que o ácido cítrico apresenta capacidade para aumentar a biodisponibilidade da prata. Este resultado difere do verificado na *B. nigra*, o que pode ser explicado pelo tipo de complexo formado entre a Ag e ambos os quelantes assim como na capacidade de ambas as espécies em desstoxificar e transportar para a parte aérea.

-Prata

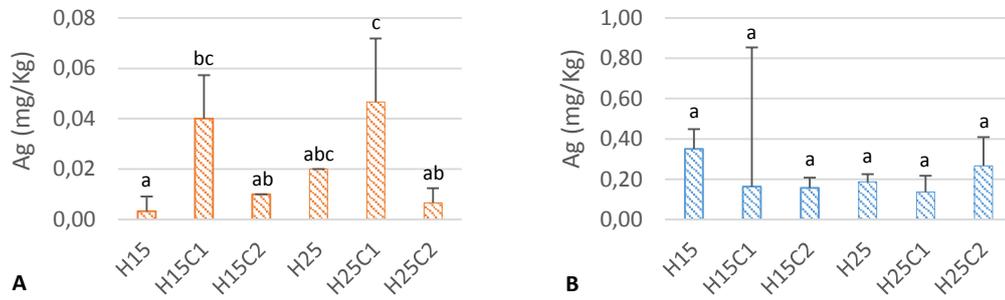


Figura 46- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 47, não se observaram diferenças significativas na concentração de Co na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

-Cobalto

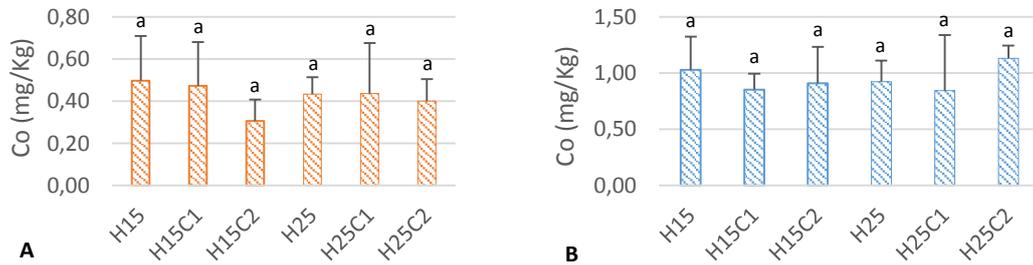


Figura 47- Concentração de Co (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Como podemos verificar na figura 48, não se observaram diferenças significativas na concentração de Au na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

-Ouro

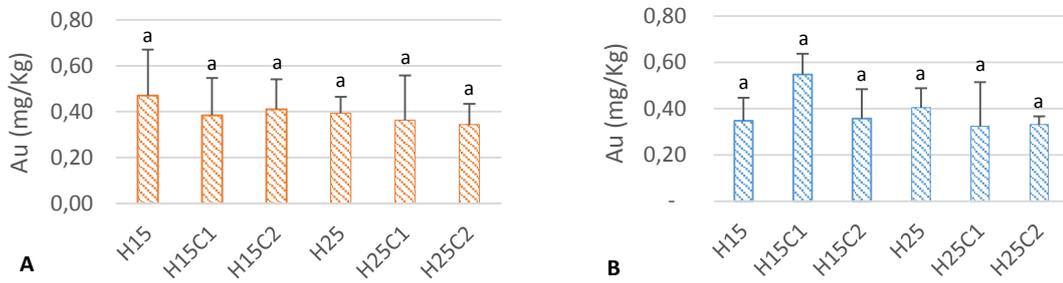


Figura 48- Concentração de Au (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$.

Na figura 49, não se observaram diferenças significativas na concentração de Pb na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

-Chumbo

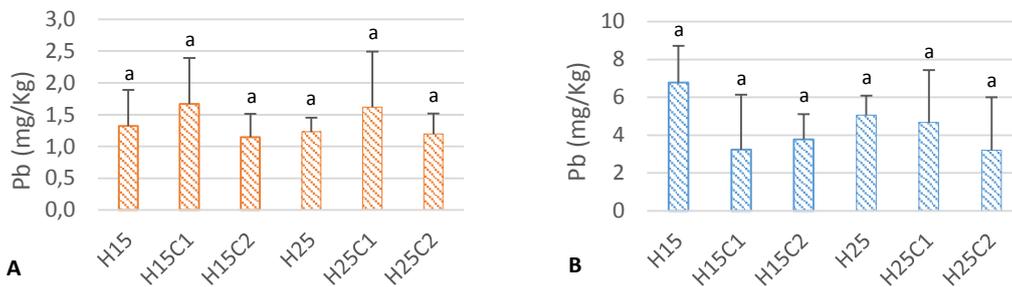


Figura 49- Concentração de Pb (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0,05$.

Na figura 50, apesar de ligeiras oscilações nas concentrações não se verificam diferenças significativas de concentração de Bi na raiz e na parte aérea entre os diferentes tratamentos.

-Bismuto

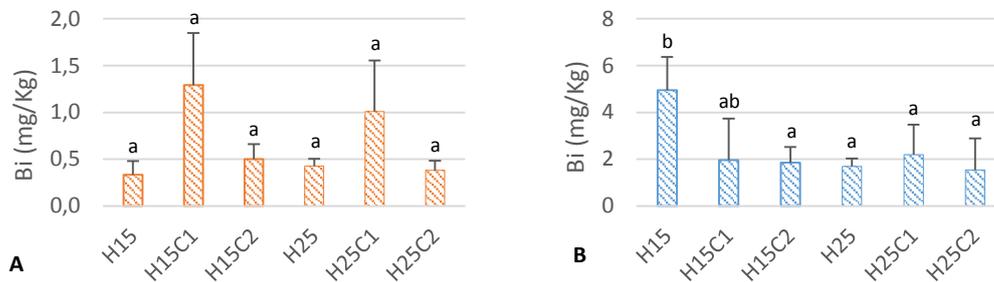


Figura 50- Concentração de Bi (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 21, não se observaram diferenças significativas na concentração de Mn na raiz e parte aérea para os diferentes tratamentos.

-Manganês

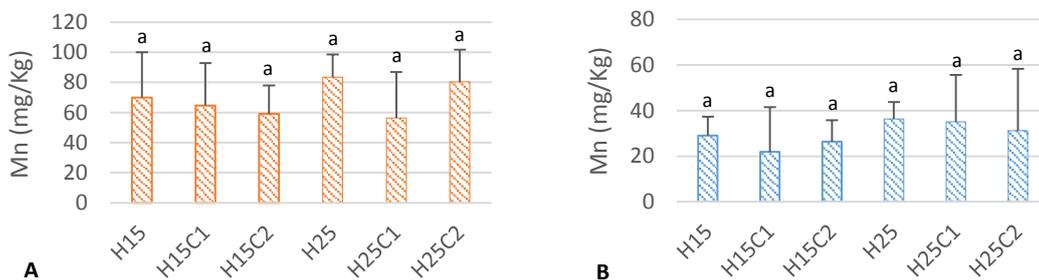


Figura 51- Concentração de Mn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Analisando a tabela 16, correspondente aos valores do fator de bioacumulação, verifica-se que a *M. sativa* tem um FBC maior para o Zn comparativamente aos outros metais. Os valores de FBC dos diversos tratamentos não apresentam diferenças significativas para o mesmo metal, tendo sido superior a 1 em todos os tratamentos para Zn, Co, Mn.

Tabela 16- Fator de Bioacumulação para a *M. sativa*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Tratamento	Fator de Bioacumulação (FBC)								
	Elemento								
	Cu	Zn	As	Ag	Co	Au	Pb	Bi	Mn
H15	1,28 \pm 0,35a	15,32 \pm 4,36a	0,19 \pm 0,05a	0,13 \pm 0,03a	8,04 \pm 2,43a	0,31 \pm 0,11a	0,11 \pm 0,03a	0,07 \pm 0,02b	5,19 \pm 2,14a
H15C1	0,97 \pm 0,22a	8,04 \pm 2,48a	0,18 \pm 0,09a	0,03 \pm 0,20a	6,43 \pm 1,59a	0,36 \pm 0,10a	0,07 \pm 0,02a	0,05 \pm 0,01ab	5,64 \pm 2,24a
H15C2	0,98 \pm 0,36a	8,15 \pm 2,92a	0,15 \pm 0,06a	0,05 \pm 0,03a	6,28 \pm 2,26a	0,30 \pm 0,10a	0,06 \pm 0,02a	0,03 \pm 0,01a	4,72 \pm 1,50a
H25	1,22 \pm 0,25a	7,53 \pm 1,52a	0,14 \pm 0,03a	0,07 \pm 0,01a	6,83 \pm 1,34a	0,31 \pm 0,06a	0,07 \pm 0,02a	0,02 \pm 0,01a	6,62 \pm 1,20a
H25C1	0,90 \pm 0,52a	7,46 \pm 4,34a	0,11 \pm 0,07a	0,06 \pm 0,04a	6,57 \pm 3,81a	0,27 \pm 0,15a	0,07 \pm 0,05a	0,04 \pm 0,02ab	4,99 \pm 2,77a
H25C2	1,06 \pm 0,23a	10,92 \pm 2,17a	0,09 \pm 0,09a	0,10 \pm 0,06a	7,98 \pm 0,98a	0,26 \pm 0,05a	0,07 \pm 0,01a	0,03 \pm 0,01a	6,77 \pm 1,40a

Na tabela 17, correspondente ao fator de translocação, os valores são superiores a 1 para o Mn (em todos os tratamentos) e para o Au (todos os tratamentos exceto H15C1 e H25). O FT do restantes metais não apresenta diferenças significativas para os diversos tratamentos.

Tabela 17- Fator de Translocação para a *M. sativa*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Tratamento	Fator de Translocação (FT)								
	Elemento								
	Cu	Zn	As	Ag	Co	Au	Pb	Bi	Mn
H15	0,24 \pm 0,03a	0,33 \pm 0,05a	0,08 \pm 0,01a	0,02 \pm 0,01a	0,47 \pm 0,06a	1,33 \pm 0,19b	0,19 \pm 0,03a	0,07 \pm 0,01a	2,35 \pm 0,32a
H15C1	0,28 \pm 0,06a	0,67 \pm 0,15b	0,32 \pm 0,22a	0,12 \pm 0,13a	0,54 \pm 0,14a	0,68 \pm 0,17a	0,34 \pm 0,09b	0,44 \pm 0,11c	1,99 \pm 0,50a
H15C2	0,30 \pm 0,06a	0,35 \pm 0,08a	0,08 \pm 0,02a	0,07 \pm 0,02a	0,35 \pm 0,07a	1,17 \pm 0,25b	0,31 \pm 0,07ab	0,28 \pm 0,06b	2,30 \pm 0,49a
H25	0,27 \pm 0,03a	0,31 \pm 0,03a	0,09 \pm 0,01a	0,11 \pm 0,01a	0,48 \pm 0,05a	0,99 \pm 0,10ab	0,25 \pm 0,02ab	0,25 \pm 0,03b	2,31 \pm 0,23a
H25C1	0,40 \pm 0,02a	0,48 \pm 0,02ab	0,25 \pm 0,01a	0,34 \pm 0,02b	0,53 \pm 0,03a	1,13 \pm 0,06ab	0,35 \pm 0,02b	0,47 \pm 0,03c	1,64 \pm 0,09a
H25C2	0,29 \pm 0,01a	0,32 \pm 0,03a	0,08 \pm 0,28a	0,03 \pm 0,02a	0,35 \pm 0,06a	1,02 \pm 0,19ab	0,25 \pm 0,05ab	0,17 \pm 0,03ab	1,78 \pm 0,31a

As diferenças registadas em cada metal para ambos os fatores, concordam com as observações supracitadas sobre a acumulação na raiz e parte aérea (isto é, efeito do húmus na retenção de metais, aumento da disponibilidade por parte do quelante, competição entre metais na absorção e transporte dos mesmos, e limitação dos transportadores de metais da própria planta para determinados elementos). Estes resultados indicam que a *M. sativa* poderia ser uma ferramenta útil para a fitoestabilização do Cu, Zn e Mn, e fitoextração de Mn.

IV.4 Metodologia (Amostras de Aljustrel)

IV.4.1 Enquadramento Geográfico

Para este estudo laboratorial, foram utilizadas como material de estudo, amostras de solo colhidas na mina de Aljustrel (Alentejo).

Esta mina situa-se na freguesia de Aljustrel e Rio de Moinhos do concelho de Aljustrel, pertencente ao distrito de Beja. Esta zona é de clima mediterrânico, apresentando períodos de seca entre 80 a 100 dias, durante o verão, cuja temperatura média varia entre os 28 °C e os 30 °C.

O local de recolha das amostras tinha como coordenadas 37°52'5.44''N 8°9'53,20''W,



Figura 52- Enquadramento geográfico da área em estudo

IV.4.2 Enquadramento Geológico

A mina de Aljustrel é um dos principais centros mineiros da Faixa Piritosa Ibérica (FPI). A FPI está localizada perto do contacto entre a Zona de Ossa Morena e a Zona Sul Portuguesa constituindo a principal fração da Zona Sul Portuguesa.

A faixa piritosa ibérica é caracterizada estratificamente por 3 grandes unidades: Grupo Filito-Quartzítico (PQ), Complexo Vulcano-sedimentar (VS) e o grupo Flysh (CULM). Graças aos mais de 90 depósitos de sulfuretos maciços polimetálicos, centenas de jazigos de Mn e filões de Cu, Pb, Ba e antimónio, esta faixa é considerada uma das principais regiões mineiras da Europa. A mina de Aljustrel está situada no complexo Vulcano-sedimentar, que assenta concordantemente sobre a faixa piritosa. Este complexo é considerado de idade carbónica sendo formado por uma associação de rochas sedimentares, vulcânicas máficas e vulcânicas félsicas estando associadas a

importantes depósitos de sulfuretos maciços e mineralizações de Mn. A mina de Aljustrel possui assim uma estrutura geológica essencialmente marcada pela presença de rochas vulcânicas e sedimentares.

IV.4.3 Desenho experimental

Para este estudo experimental utilizaram-se 8 conjuntos de tratamentos diferentes estudando o comportamento das plantas para cada qual. Os tratamentos para este estudo diferiam nas seguintes variáveis: controlo (sem nenhum aditivo), húmus (15% de húmus no estrato), quelantes (tiocianato de amónio), fito-hormona (ácido giberélico). Foram feitas três réplicas para cada tratamento.

Tabela 18- Desenho experimental

<i>Tratamento (Id)</i>	Escombreira (mL)	Húmus (mL)	Tiocianato de Amónio (mL)	Ácido giberélico (mL)
<i>Controlo (1,2,3)</i>	180 (100%)	-	-	-
<i>Q (1,2,3)</i>	180 (100%)	-	20	-
<i>Ga (1,2,3)</i>	180 (100%)	-	-	4,16
<i>HC (1,2,3)</i>	157 (85%)	27 (15%)	-	-
<i>HQ (1,2,3)</i>	157 (85%)	27 (15%)	20	-
<i>Hga (1,2,3)</i>	157 (85%)	27 (15%)	-	4,16
<i>GaQ (1,2,3)</i>	180 (100%)	-	20	4,16
<i>HGaQ (1,2,3)</i>	157 (85%)	27 (15%)	20	4,16

Ga: ácido giberélico

Q: quelantes

H: húmus

O húmus utilizado (pH:7.5; fósforo total; 3.1% P/P; nitrogénio total: 1.13% P/P; potássio total: 0.42% P/P; matéria orgânica: 44.9% P/P; e carga bacteriana: 1.12×10^3 col/g) foi misturado ao solo manualmente de modo a garantir a homogeneidade dos tratamentos.

Os vasos foram colocados de modo completamente randomizado eliminando assim variáveis que poderiam interferir com os resultados.

IV.4.4 Caracterização físico-química

Todos os processos aplicados para caracterização físico-química das amostras de solo colhidas em Aljustrel foram os mesmos usados ao longo da secção IV.2.2 para a caracterização físico-química das amostras de Aljustrel.

IV.4.4.1 pH

Após a secagem das amostras colhidas em Penedono foi medido o pH através de duas soluções. Na primeira juntou-se, a 5g de amostra, 25ml de água destilada e 25ml de solução de CaCl₂ (1.47g para 1L de água destilada). Os resultados do pH medido no solo de Aljustrel antes do seu tratamento estão representados na tabela 3. É possível observar que estamos perante um pH muito ácido, considerado hostil para o crescimento de vegetação.

IV.4.4.2 Matéria orgânica

Foi determinada a matéria orgânica (MO) da escombreira no principio e no fim dos ensaios para cada tratamento. Para tal, foi estimada a perda de peso por ignição (Jones, 2001). As amostras foram colocadas, juntamente com os cadinhos correspondentes, numa estufa a 110°C durante 8h de modo a ficarem completamente secas.

Pesaram-se 5g de amostra que foram posteriormente colocadas numa mufla a 430°C durante 16h.

O teor (% p/p) de matéria orgânica é calculado através da fórmula seguinte:

$$MO \left(\%, \frac{p}{p} \right) = \frac{100(\text{peso do cadinho} + \text{peso solo } 110^{\circ}\text{C}) - (\text{peso do cadinho} + \text{peso do solo } 430^{\circ}\text{C})}{(\text{peso do cadinho} + \text{peso do solo } 110^{\circ}\text{C}) - (\text{peso do cadinho})}$$

IV.4.4.3 Metais pesados

IV.4.4.3.1 Escombreira

As amostras colhidas em Aljustrel foram analisadas em laboratórios acreditados ACME (ACME Anal. ISSO 9002 Accredited Lab, Vancouver, Canada), onde se determinaram as concentrações de metais em cada amostra através de ICP-MS após digestão com o método de *aqua-régia*.

IV.4.4.3.2 Escombreira – Fração Disponível

Para medir a fração biodisponível dos metais das escombreiras, foram retiradas 10g de cada amostra (peneirada a 2mm) juntado, num balão Enlenmeyer de 250 mL, 100 mL de uma solução de cloreto de cálcio dihidratado (CaCl_2). Foram feitas 3 réplicas para cada amostra de modo a obter uma maior representatividade nos resultados. As misturas (escombreira + solução CaCl_2) foram deixadas num agitador horizontal (shaker) durante cerca de 3 horas.

A solução de CaCl_2 foi preparada num balão volumétrico de 2L, onde se colocou 2.94 g de cloreto de cálcio dihidratado adicionando água destilada até perfazer o volume total.

De modo a obter uma solução para análise da fração disponível (Jones, 2001) foi necessário filtrar cada mistura (usando um funil e papel de filtro Whatman no. 42), para tubos.

Os resultados das análises às concentrações de metais nas extrações realizadas não foram obtidos por razões de ordem técnica, não tendo sido possível a sua apresentação.

IV.4.4.4 Área Foliar

A área foliar de cada planta foi medida de acordo com a metodologia de Novo e Rodríguez (2014).

IV.4.5 Ensaios de fitorremediação

Para o desenvolvimento deste ensaio laboratorial as sementes de *H. incana* foram semeadas em tabuleiros de germinação preparados com uma mistura de perlite e areia (2:1, v:v). Todo o processo de germinação ocorreu em condições controladas: fotoperíodo de 16:8 h (16 horas de luz e 8 horas de escuridão); temperatura $22,5 \pm 1^\circ\text{C}$; e humidade relativa do ar $65 \pm 5\%$. De modo a garantir humidade constante, foi mantida uma rega diária com água destilada para cada alvéolo.



Figura 53- Germinação da *H. incana* no primeiro e sétimo dia



Figura 54- Germinação da *H. incana*

Tendo as plantas atingido um grau de maturidade adequado (3 folhas completamente desenvolvidas), foram transplantadas para vasos de polipropileno (252cm³). preenchidos com os diferentes tratamentos. Cada tratamento foi realizado em triplicado.

De modo a atenuar o estresse sofrido pelas plantas devido à transplantação, no primeiro dia todos os vasos foram regados com água e fertilizante (NPK). Os vasos foram posicionados de forma randomizada de modo a eliminar variáveis que possam interferir com os resultados.



Figura 55- Primeiro e 24º dia após a transplantação

Ao longo do ensaio laboratorial foram feitas 5 aplicações de ácido giberélico, nos tratamentos correspondentes, com intuito de aumentar o crescimento das plantas. As aplicações (50 mL) foram feitas com 7 dias de intervalo de forma homogênea de modo a que todas as plantas pudessem receber a mesma quantidade.

- Ácido giberélico (solução): juntou-se 1g de ácido giberélico a 50mL de água destilada para cada aplicação.



Figura 56- Aplicação de ácido giberélico

Sete dias antes da colheita das plantas aplicou-se 20mL de uma solução de tiocianato de amónio (1g por 1kg de solo) nos tratamentos Q, HQ, GaQ e HGaQ.

- Tiocianato de Amónio (solução): adicionou-se 2,364 g de tiocianato de amónio a 240mL de água destilada.

No dia anterior e nos dias seguintes à aplicação do quelante as plantas não foram regadas de modo a maximizar o efeito do mesmo.



Figura 57- Plantas no dia da aplicação do quelante

Uma semana após a aplicação dos quelantes, todas as plantas foram retiradas dos seus vasos. Cada planta foi lavada cuidadosamente com água destilada para remover os resíduos de solo. A planta foi dividida em parte aérea e raízes, determinando-se o peso fresco de ambas as partes.

As amostras foram colocadas a secar em estufa, a 50°C, até atingirem um peso constante, momento em que foi determinado o seu peso seco. Posteriormente, as raízes e parte aérea das plantas foram moídas, separadamente, e colocadas em tubos de digestão.

Adicionou-se, aos tubos de digestão, 5 mL de solução concentrada de HNO₃ e 5 mL de água destilada. Cobriu-se e deixou-se repousar. Os tubos foram então colocados numa placa quente e digeridos a 125°C. Removeram-se os tubos de digestão da placa e deixou-se arrefecer. Foram recolocados na placa quente a 125°C e adicionou-se 3 mL de H₂O₂ a 30%. Repetiu-se a adição de H₂O₂ até que a digestão fosse total. Após digestão completa, reduziu-se a temperatura da placa para 80°C. Adicionou-se, por fim, HNO₃ (1:10) para perfazer o volume final de 10 mL. (utilizar a mesma coisa que no outro). Os teores de metais foram então medidos através de ICP-MS.

IV.4.6 Análise estatística

Assim como para o ensaio de Penedono, os resultados analíticos foram obtidos a partir de 3 repetições. Testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene foram utilizados para confirmar a suposição de normalidade e avaliar a igualdade de variâncias, respetivamente. Análises de variância de uma via (ANOVA) foram complementadas com comparações *post hoc* entre os tratamentos através do teste de Tukey para dados homocedásticas, e do teste de Dunnett em caso de heterocedasticidade. Todas as análises estatísticas foram calculadas usando o IBM SPSS Statistics, versão 21.0 (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

IV.5 Resultados e Discussão (Aljustrel)

Tabela 19- Concentração de metais na escombreira de Aljustrel

Amostra	Elemento (mg/Kg)							
	As	Ag	Cd	Au	Pb	Bi	Zn	Ba
Escombreira	2261,0	15,615	0,13	0,6147	5462,68	154,14	62,9	1065,9

Como se pode observar no gráfico 58, os tratamentos com 15% de húmus apresentam maior percentagem de matéria orgânica que os de Controlo, que não levaram húmus. Isto ocorreu devido à composição do húmus que apresentava 44,9% (P/P) de matéria orgânica.

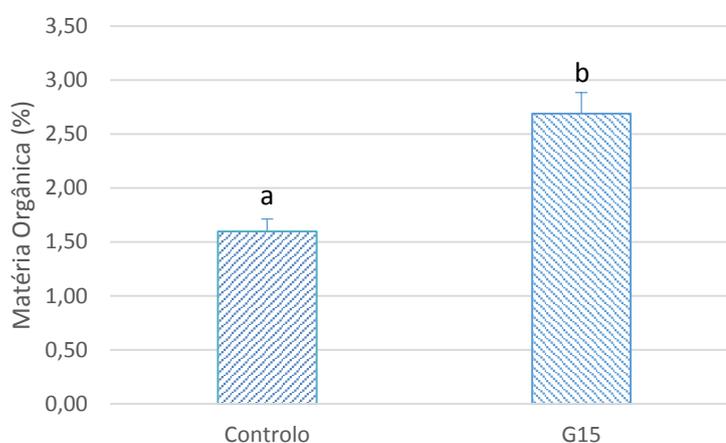


Figura 58- Matéria Orgânica (% p:p) dos diferentes tratamentos. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

O gráfico 59, corresponde ao peso fresco observado na raiz (azul) e na parte aérea (laranja) da *H. incana* em cada tratamento. Verifica-se que a biomassa é superior nos tratamentos compostos por 15% de húmus apresentam, tanto na raiz como na parte aérea. Estes resultados indicam que a presença de húmus no estrato aumenta o crescimento vegetal.

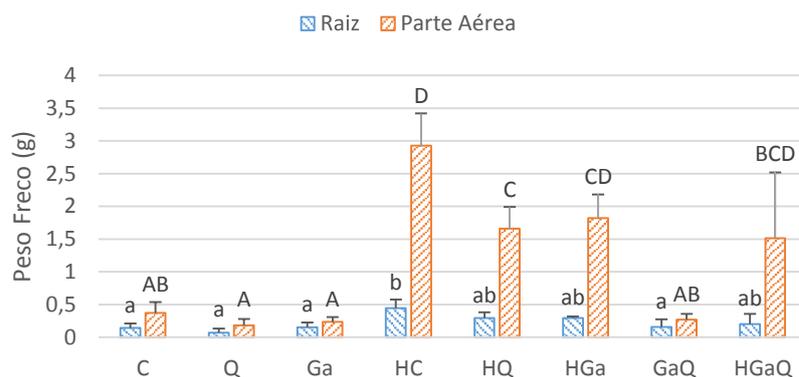


Figura 59- Peso fresco (g) das raízes e parte aérea das *H. incana*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da raiz, $p < 0.05$.

O gráfico 60 corresponde ao peso seco observado na raiz (azul) e na parte aérea (laranja) da *H. incana* em cada tratamento. Os resultados são concordantes com os do peso fresco, verificando-se que a biomassa é superior nos tratamentos compostos por 15% de húmus apresentam, tanto na raiz como na parte aérea. Estes resultados indicam que a presença de húmus no estrato aumenta o crescimento vegetal. Tanto no peso fresco como no peso seco o efeito do húmus é mais significativo na parte aérea.

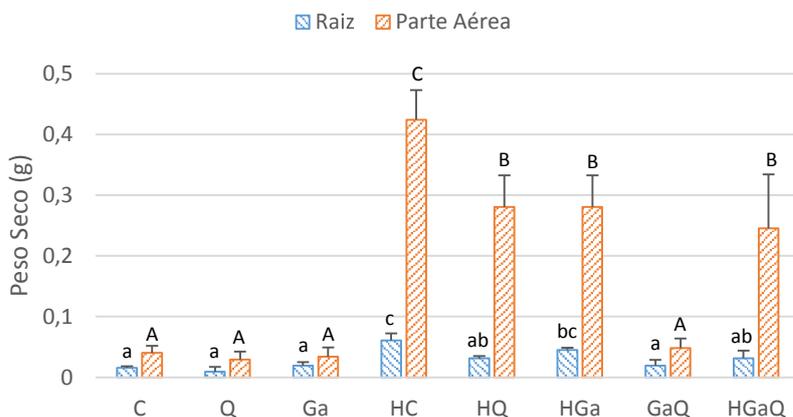


Figura 60- Peso seco (g) das raízes e parte aérea das *H. incana*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da parte aérea, letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos da raiz, $p < 0.05$.

Foi medida a área foliar da maior folha de cada planta (figura 61). Os resultados da área foliar e do peso seco foram analisados de modo a perceber o grau de relação entre ambos parâmetros.

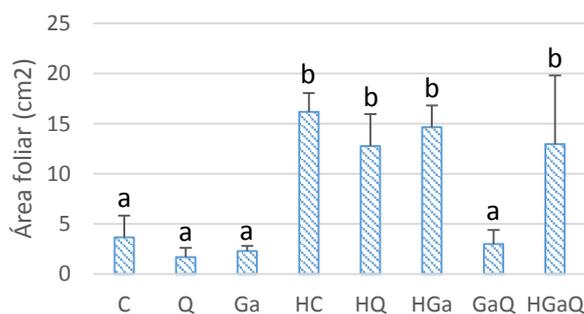


Figura 61- Área foliar das *H. incana* nos diferentes tratamentos. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Como podemos observar pela figura 62, as plantas com área foliar e peso superiores são as que cresceram num substrato composto por 15% de húmus, indicando que existe uma relação entre a presença de húmus e o aumento no crescimento vegetal. No entanto, o ácido giberélico não se mostrou eficaz no aumento do crescimento vegetal.

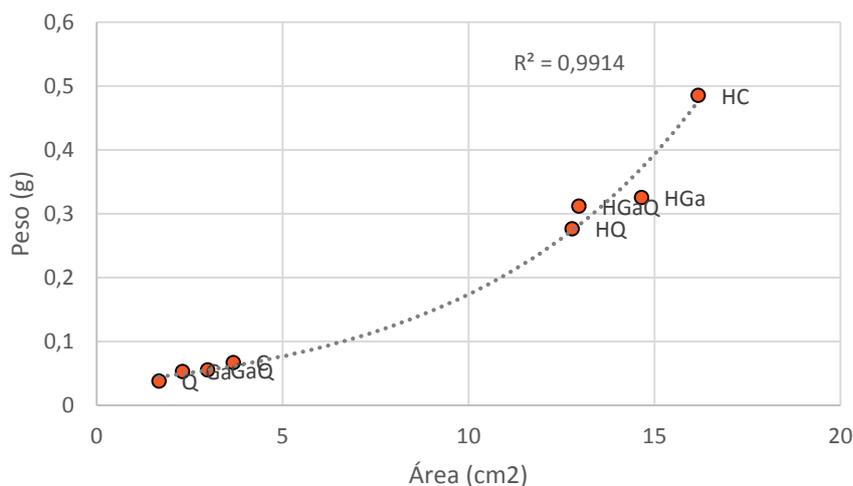


Figura 62- Relação peso/área foliar com a presença de húmus. Os valores usados foram as médias do peso e área foliar de cada tratamento

Como podemos verificar pela figura 63, a concentração de As, apesar de demonstrar ligeiras variações, não apresenta diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

-Arsénio

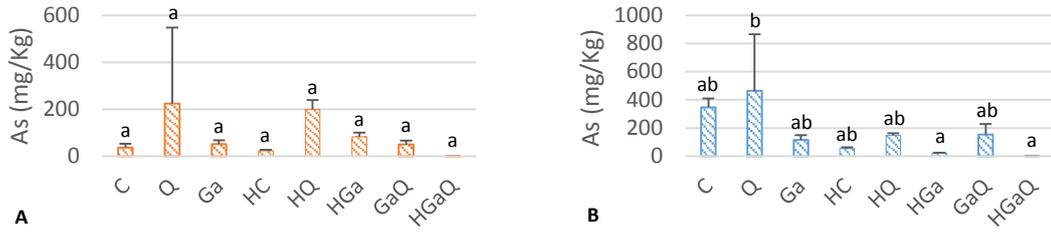


Figura 63- Concentração de As (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 64, os resultados sugerem que a aplicação de tiocianato de amônio à escombreira não corrigida (sem húmus), e na ausência de ácido giberélico pode aumentar a concentração de Ag na planta.

-Prata

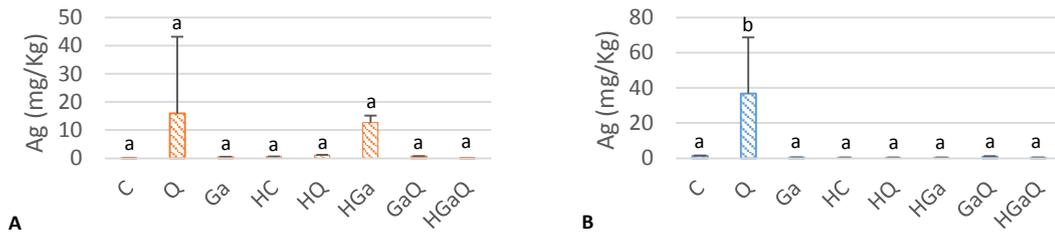


Figura 64- Concentração de Ag (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 65, os resultados sugerem que a aplicação de húmus e de ácido giberélico reduzem a acumulação de Cd. Estas diferenças podem ser explicadas pela maior retenção de Cd na rizosfera dos tratamentos com húmus e pela inibição de transporte de Cd pelo ácido giberélico.

-Cádmio

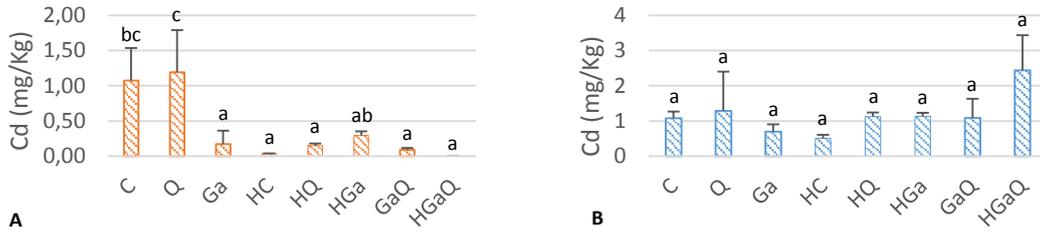


Figura 65- Concentração de Cd (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 66, os resultados sugerem que as plantas sujeitas à aplicação de húmus e ácido giberélico apresentam maior capacidade para acumular este elemento na parte aérea.

-Ouro

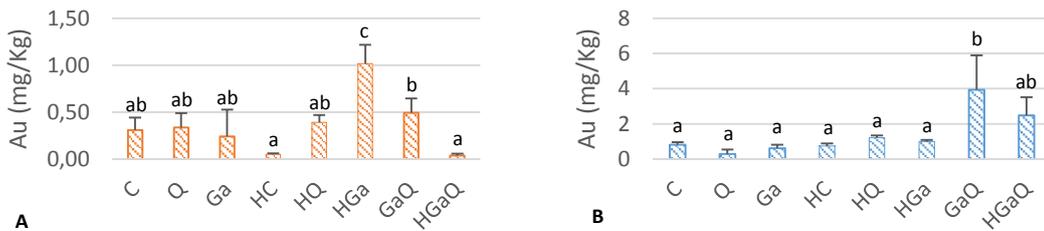


Figura 66- Concentração de Au (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

No gráfico 67, a concentração de Pb, apesar de algumas flutuações, não apresenta diferenças significativas na raiz e parte aérea entre os tratamentos.

-Chumbo

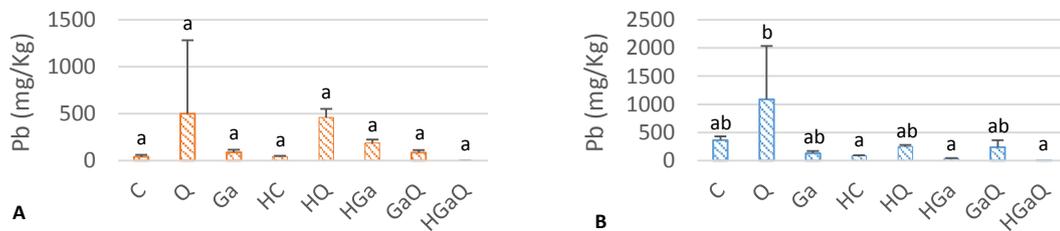


Figura 67- Concentração de Pb (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 68, podemos observar que a concentração de Bi, embora apresentando algumas variações, não apresenta diferenças significativas na raiz e parte aérea entre os tratamentos.

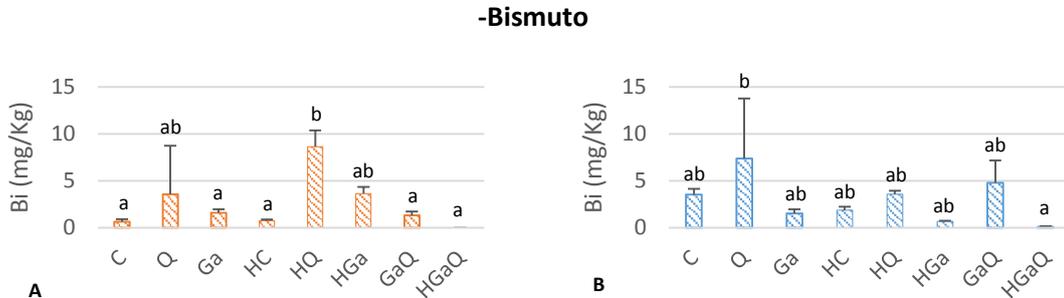


Figura 68- Concentração de Bi (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 69 verifica-se que, na parte aérea, nos tratamentos sem corretivo (sem húmus) e sem ácido giberélico a concentração de Zn aumenta. Estas diferenças podem ser explicadas pela maior retenção de Zn na rizosfera dos tratamentos com húmus e pela inibição de transporte de Zn pelo ácido giberélico. Na raiz, apesar das oscilações, não se verificam diferenças demasiado significativas.

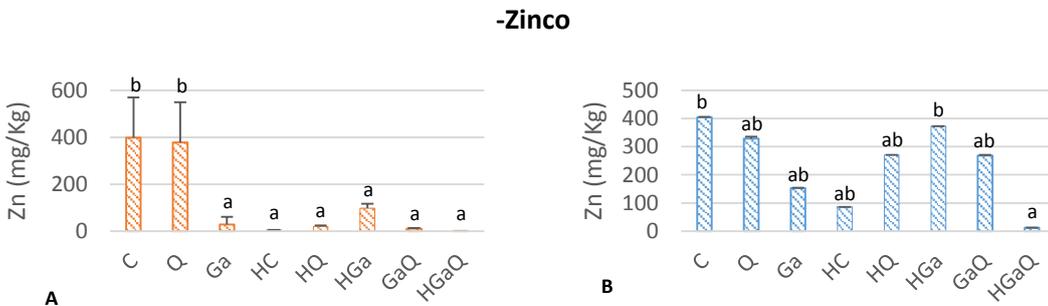


Figura 69- Concentração de Zn (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Na figura 70, apesar de existirem oscilações, as diferenças de concentração de Ba na raiz e parte aérea entre os tratamentos não são significativas.

-Bário

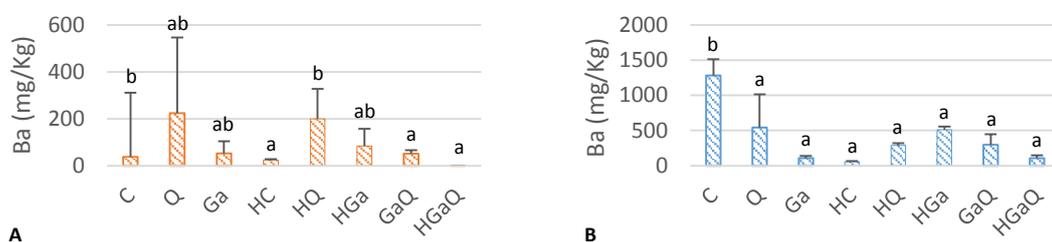


Figura 70- Concentração de Ba (mg/kg) na parte aérea (A) e na raiz (B). Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Analisando a tabela 20, correspondente aos valores do fator de bioacumulação, verifica-se que a *H. incana* tem um FBC > 1 para: Ag (tratamento Ga), Cd, Au (Controlo, HGa, Ga, GaQ HGaQ) e Zn (todos os tratamentos exceto HQ).

Tabela 20- Fator de Bioacumulação para a *H. incana*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Tratamento	Fator de Bioacumulação (FBC)							
	Elemento							
	As	Ag	Cd	Au	Pb	Bi	Zn	Ba
Controlo	0,05 \pm 0,00a	0,01 \pm 0,01a	2,07 \pm 3,49a	1,25 \pm 0,58a	0,02 \pm 0,01a	0,02 \pm 0,01a	1,60 \pm 2,69a	0,53 \pm 0,06a
Q	0,05 \pm 0,02a	0,17 \pm 0,24a	7,78 \pm 3,60a	0,63 \pm 0,35a	0,03 \pm 0,01a	0,01 \pm 0,00a	5,84 \pm 2,99a	0,62 \pm 0,44a
Ga	0,13 \pm 0,16a	1,23 \pm 2,01a	9,23 \pm 6,22a	0,64 \pm 0,11a	0,11 \pm 0,16a	0,03 \pm 0,1a	5,58 \pm 3,85a	0,37 \pm 0,35a
HC	0,02 \pm 0,02a	0,02 \pm 0,01a	2,20 \pm 1,36a	0,53 \pm 0,32a	0,01 \pm 0,01a	0,01 \pm 0,00a	0,90 \pm 0,60a	0,06 \pm 0,04a
HQ	0,04 \pm 0,05a	0,04 \pm 0,02a	1,14 \pm 0,71a	0,43 \pm 0,33a	0,04 \pm 0,05a	0,03 \pm 0,03a	0,41 \pm 0,28a	0,22 \pm 0,34a
HGa	0,07 \pm 0,03a	0,33 \pm 0,47a	2,41 \pm 0,96a	1,16 \pm 0,72a	0,06 \pm 0,03a	0,04 \pm 0,02a	1,28 \pm 0,97a	0,51 \pm 0,11a
GaQ	0,03 \pm 0,01a	0,43 \pm 0,33a	3,08 \pm 0,12a	1,89 \pm 0,69a	0,03 \pm 0,00a	0,02 \pm 0,00a	1,87 \pm 0,34a	0,27 \pm 0,12a
HGaQ	0,02 \pm 0,03a	0,03 \pm 0,03a	2,35 \pm 1,79a	1,67 \pm 0,00a	0,01 \pm 0,01a	0,01 \pm 0,01a	0,88 \pm 1,09a	0,08 \pm 0,08a

Na tabela 21 correspondente ao fator de translocação da *H. incana*, os valores são superiores a 1 para: As (HGa, HQ), Ag (Ga, HC, HQ, HGa), Au (Q, HGa), Pb (HQ, HGa), Bi (Ga, HQ) e Zn (Controlo, Q).

Tabela 21- Fator de Translocação para a *H. incana*. Os valores são médias \pm desvio padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os tratamentos, $p < 0.05$.

Tratamento	Fator de Translocação (FT)							
	Elemento							
	As	Ag	Cd	Au	Pb	Bi	Zn	Ba
Controlo	0,10 \pm 0,03a	0,05 \pm 0,02a	0,97 \pm 0,24ab	0,37 \pm 0,09a	0,11 \pm 0,03a	0,18 \pm 0,05a	0,96 \pm 0,24a	0,48 \pm 0,12ab
Q	0,35 \pm 0,31a	0,23 \pm 0,36a	1,40 \pm 1,30b	1,95 \pm 2,01a	0,29 \pm 0,32a	0,35 \pm 0,31a	1,92 \pm 1,97a	0,67 \pm 0,44ab
Ga	0,46 \pm 0,07ab	0,96 \pm 0,12a	0,33 \pm 0,43ab	0,52 \pm 0,72a	0,65 \pm 0,08ab	1,09 \pm 0,28b	0,25 \pm 0,33a	0,84 \pm 0,25b
HC	0,46 \pm 0,14ab	1,58 \pm 0,49a	0,07 \pm 0,02ab	0,07 \pm 0,02a	0,55 \pm 0,17a	0,42 \pm 0,13a	0,06 \pm 0,01a	0,45 \pm 0,14ab
HQ	1,39 \pm 0,37b	2,37 \pm 0,64a	0,13 \pm 0,04ab	0,33 \pm 0,09a	1,86 \pm 0,51b	2,46 \pm 0,66b	0,07 \pm 0,02a	2,27 \pm 0,62c
HGa	3,61 \pm 0,80c	24,32 \pm 5,45b	0,26 \pm 0,06ab	1,03 \pm 0,23a	4,51 \pm 1,01c	5,33 \pm 1,20c	0,27 \pm 0,06a	0,74 \pm 0,17ab
GaQ	0,36 \pm 0,10a	0,77 \pm 0,22a	0,09 \pm 0,02ab	0,14 \pm 0,04a	0,38 \pm 0,10a	0,30 \pm 0,09a	0,04 \pm 0,01a	0,19 \pm 0,05ab
HGaQ	0,06 \pm 0,02a	0,01 \pm 0,01a	0,00 \pm 0,00a	0,02 \pm 0,01a	0,00 \pm 0,00a	0,01 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a	0,00 \pm 0,00a

Estes resultados indicam que, a *H. incana* pode ser utilizada para a fitoestabilização de Ag (Ga), Cd, Au (Controlo, HGa, GaQ, HGaQ) e Zn (Controlo, Q, Ga, HGa, GaQ).

V. Conclusão

A constante necessidade de recursos minerais tem provocado o aumento de escombrelas em todo o mundo. Escombrelas estas, que frequentemente apresentam concentrações elevadas de metais que se podem dispersar no solo, água e ar, tornando-se um risco para o ambiente e para os seres vivos. A fitorremediação surge neste contexto como uma alternativa pro-ambiental e sustentável, para a mitigação da poluição causada pelas escombrelas. Este método pode ainda ser útil a nível económico, podendo algumas plantas funcionar como indicadores e fitoextratoras de elementos cujo valor de mercado possa ser interessante para a mineração comercial.

Nos ensaios de bioindicação, os resultados obtidos no ponto A da escombrela de Penedono concluíram que, a *C. multiflorus* pode ser utilizada na prospeção biogeoquímica, fitoestabilização e fitoextração de Zn, Mn e Cu. A *P. aquilinum* e *Graminaea sp.* apresentam potencial para a prospeção biogeoquímica, fitoestabilização e fitoextração de Zn, Mn, Cu e Cd podendo a primeira ser usada na fitoextração de Mn e a segunda na fitoextração de Mn e Zn. No caso da *P. commune*, esta espécie não revelou ser útil para a fitoextração, no entanto pode ser utilizada para a prospeção biogeoquímica, fitoestabilização e fitoextração de Zn, Mn.

Os ensaios de bioindicação realizados no ponto B da escombrela de Penedono indicam que a *C. multiflorus* tem utilidade para a prospeção biogeoquímica e fitoestabilização de Sr e Cu e para a fitoextração de Cu. *Agrostis sp* apresenta ser uma boa candidata para a prospeção biogeoquímica e fitoestabilização do solo para o Cu, Ag e Sr, assim como para a fitoextração de Sr. Por outro lado, a *L. taraxicoides* apresentou resultados que a definem como uma possível ferramenta para prospeção biogeoquímica, fitoestabilização e fitoextração de Cu, Sr e Cd.

Relativamente aos ensaios de fitorremediação:

- Penedono (*B. nigra*):
 - a) A *B. nigra* demonstrou capacidade para fitoestabilização de Zn, Co, Mn e fitoextração de Mn (nos tratamentos com ácido oxálico e 15% de húmus); e Co (nos tratamentos com ácido cítrico e 25% de húmus);
 - b) Os resultados mostraram que o húmus funcionou como corretivo, aumentando o pH da escombrela e a biomassa das plantas;
 - c) Os resultados evidenciaram que o ácido cítrico aumentou a biodisponibilidade do Bi e que o ácido oxálico aumentou a biodisponibilidade de Ag e Au, funcionando como quelantes para estes elementos;

d) Apesar do FBC<1 para o Au (por este ser altamente indisponível), os resultados sugerem que a adição de 25% de húmus e a aplicação de ácido oxálico podem ser relevantes para fitoextração de Au.

- Penedono (*M. sativa*):

a) A *M. sativa* demonstrou aptidão para fitoestabilização de Zn, Cu, Mn e fitoextração de Mn;

b) Os resultados comprovaram que o húmus funcionou como corretivo, aumentando o pH da escombreira e a biomassa das plantas;

c) Os resultados revelaram que o ácido cítrico aumentou a biodisponibilidade de Ag. Por outro lado, o ácido oxálico não funcionou como quelante de nenhum metal.

- Aljustrel (*H. incana*):

a) A espécie *H. incana* mostrou capacidade para fitoestabilização de Ag (Ga), Cd, Au (controlo, HGa, GaQ, HGaQ) e Zn (controlo, Q, Ga, HGa, GaQ).

b) Os resultados expuseram o potencial do húmus como corretivo, aumentando o pH da escombreira e a biomassa das plantas;

c) Os resultados mostraram que o tiocianato de amónio aumentou a biodisponibilidade de Ag, funcionando como quelante desse elemento;

d) O ácido giberélico não apresentou competência para favorecer o crescimento da planta. No entanto, quando aplicado simultaneamente com o tratamento contendo 15% de húmus, promoveu o aumento da concentração de Au na parte aérea da planta.

VI. Trabalhos futuros

Face ao aumento exponencial de escombrelras à escala mundial, a fitorremediação assumiu um papel de destaque como solução para mitigar a poluição provocada pela actividade mineira. Apesar da existência de inúmeros estudos sobre fitorremediação, estes estão na sua maioria circunscritos ao domínio laboratorial. O próximo passo para este trabalho seria a implementação dos ensaios *in situ*, de modo a avaliar o comportamento das plantas em ambiente natural e sob condições climáticas reais.

VII. Bibliografia

- Abreu, M. M., Santos, E. S., Anjos, C., & Nabais, C. (n.d.). Capacidade de absorção do chumbo por plantas do género *Cistus* espontâneas em ambientes mineiros Lead uptake capacity of *Cistus* plants growing in mining areas.
- Abreu, M. M., Santos, E. S., Magalhães, M. C. F., & Fernandes, E. (2012). Trace elements tolerance, accumulation and translocation in *Cistus populifolius*, *Cistus salviifolius* and their hybrid growing in polymetallic contaminated mine areas. *Journal of Geochemical Exploration*, *123*, 52–60. <http://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.05.001>
- Abreu, M. M., Tavares, M. T., & Batista, M. J. (2008). Potential use of *Erica andevalensis* and *Erica australis* in phytoremediation of sulphide mine environments: S??o Domingos, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration*, *96*(2–3), 210–222. <http://doi.org/10.1016/j.gexplo.2007.04.007>
- Agnello, A. C., Huguenot, D., Van Hullebusch, E. D., & Esposito, G. (2014). Enhanced Phytoremediation: A Review of Low Molecular Weight Organic Acids and Surfactants Used as Amendments. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, *44*(22), 2531–2576. <http://doi.org/10.1080/10643389.2013.829764>
- Ali, H., Khan, E., & Sajad, M. A. (2013). Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. *Chemosphere*, *91*(7), 869–881. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>
- Alvarenga, P. M., Araújo, M. F., & Silva, J. A. L. (2004). Elemental uptake and root-leaves transfer in *Cistus ladanifer* L. growing in a contaminated pyrite mining area (Aljustrel-Portugal). *Water, Air, and Soil Pollution*, *152*(1–4), 81–96. <http://doi.org/10.1023/B:WATE.0000015333.24165.5e>
- Anderson, R. L., Bishop, W. E., & Campbell, R. L. (1973). Authors :, *15*(1).
- Begum, Z. A., Rahman, I. M. M., Sawai, H., Mizutani, S., Maki, T., & Hasegawa, H. (2013). Effect of extraction variables on the biodegradable chelant-assisted removal of toxic metals from artificially contaminated european reference soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, *224*(3). <http://doi.org/10.1007/s11270-012-1381-4>
- Bernardo De Sousa, M. (1984). DO COMPLEXO XISTO-GRAUVÁQUICO (CXG), *9*, 9–36.
- Canha, N., Freitas, M. C., Anawar, H. M., Dionísio, I., Dung, H. M., Pinto-Gomes, C., & Bettencourt, A. (2010). Characterization and phytoremediation of abandoned contaminated mining area in Portugal by INAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, *286*(2), 577–582. <http://doi.org/10.1007/s10967-010-0780-5>
- Chen, Y., Wang, C., Wang, G., Luo, C., Mao, Y., Shen, Z., & Li, X. (2008). Heating treatment schemes for enhancing chelant-assisted phytoextraction of heavy metals from contaminated soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*(4), 888–896. <http://doi.org/10.1897/07-345.1>
- Clemens, S., Palmgren, M. G., & Krämer, U. (2002). A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. *Trends in Plant Science*, *7*(7), 309–315. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02295-1](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02295-1)
- de la Rosa, G., Torres, J., Parsons, J.G., Peralta-Videa, J.R., Castillo-Michel, H., Lopez, M.L., Cruz-

- Jimenez, G., Gardea-Torresdey, J. L. (2009). X-ray absorption spectroscopy unveils the formation of gold nanoparticles in corn. *Acta Universitaria*, 19(2), 76–81. Retrieved from <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/viewFile/106/93>
- Díez Lázaro, J., Kidd, P. S., & Monterroso Martínez, C. (2006). A phytogeochemical study of the Tr??s-os-Montes region (NE Portugal): Possible species for plant-based soil remediation technologies. *Science of the Total Environment*, 354(2–3), 265–277. <http://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.001>
- Dipu, S., Kumar, A. A., & Thanga, S. G. (2012). Effect of chelating agents in phytoremediation of heavy metals. *Remediation Journal*, 22(2), 133–146. <http://doi.org/10.1002/rem.21304>
- Do Nascimento, C. W. A., Amarasiriwardena, D., & Xing, B. (2006). Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution*, 140(1), 114–123. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.06.017>
- Duarte, B., Freitas, J., & Caçador, I. (2011). The role of organic acids in assisted phytoremediation processes of salt marsh sediments. *Hydrobiologia*, 674(1), 169–177. <http://doi.org/10.1007/s10750-011-0731-3>
- Evangelou, M. W. H., Ebel, M., & Schaeffer, A. (2007). Chelate assisted phytoextraction of heavy metals from soil. Effect, mechanism, toxicity, and fate of chelating agents. *Chemosphere*, 68(6), 989–1003. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.01.062>
- Favas, P. J. C., Pratas, J., Varun, M., Souza, R. D., & Paul, M. S. (2014a). *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. (M. C. Hernandez Soriano, Ed.), *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*. InTech. <http://doi.org/10.5772/57086>
- Favas, P. J. C., Pratas, J., Varun, M., Souza, R. D., & Paul, M. S. (2014b). Phytoremediation of Soils Contaminated with Metals and Metalloids at Mining Areas: Potential of Native Flora. *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination*, (3), 485–516. <http://doi.org/10.5772/57086>
- Fernandes, J. C., & Henriques, F. S. (1991). (*Juncus conglomeratus*, 102, 253–260.
- Flora-On. (2016). Flora de Portugal Interactiva.
- Gardea-Torresdey, J. L., Rodriguez, E., Parsons, J. G., Peralta-Videa, J. R., Meitzner, G., & Cruz-Jimenez, G. (2005). Use of ICP and XAS to determine the enhancement of gold phytoextraction by *Chilopsis linearis* using thiocyanate as a complexing agent. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(2), 347–352. <http://doi.org/10.1007/s00216-004-2966-6>
- Handayanto, E., Muddarisna, N., & Krisnayanti, B. D. (2014). Induced Phytoextraction of Mercury and Gold From Cyanidation Tailings of Small-Scale Gold Mining Area of West Lombok , Indonesia. *Advances in Environmental Biology*, 8(99), 1277–1284.
- Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 68, 167–182. <http://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Jones, J. B. (2001). *Laboratory Guide for Conducting Soil Tests and Plant Analysis*. Boca Raton: CRC Press.
- Kabata-Pendias, A. (2004). Soil-plant transfer of trace elements - An environmental issue. *Geoderma*, 122(2–4 SPEC. IIS.), 143–149. <http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.01.004>

- Khan, A., Khan, S., Khan, M. A., Qamar, Z., & Waqas, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(18), 13772–13799. <http://doi.org/10.1007/s11356-015-4881-0>
- Lamb, A. E., Anderson, C. W. N., & Haverkamp, R. G. (2001). The induced accumulation of gold in the plants *Brassica juncea*, *Berkheya coddii* and chicory. *Chemistry in New Zealand*.
- Moreira, H., Marques, A. P. G. C., Rangel, A. O. S. S., & Castro, P. M. L. (2011). Heavy metal accumulation in plant species indigenous to a contaminated Portuguese site: Prospects for phytoremediation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 221(1–4), 377–389. <http://doi.org/10.1007/s11270-011-0797-6>
- Nagajyoti, P. C., Lee, K. D., & Sreekanth, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(3), 199–216. <http://doi.org/10.1007/s10311-010-0297-8>
- Nordberg, G. F. (1990). Human health effects of metals in drinking water: Relationship to cultural acidification. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9(7), 887–894. [http://doi.org/10.1897/1552-8618\(1990\)9\[887:HHEOMI\]2.0.CO;2](http://doi.org/10.1897/1552-8618(1990)9[887:HHEOMI]2.0.CO;2)
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., & Friberg, L. (2009). *Handbook on toxicology of metals. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 1). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Nordberg, G., Fowler, B. A., Nordberg, M., & Friberg, L. (2009). *Handbook on the toxicology of metals*. (G. F. Nordberg, B. A. Fowler, M. Nordberg, & L. T. Friberg, Eds.) (Third). London: Academic Press.
- Novo, L. A. B., Covelo, E. F., & González, L. (2013). Phytoremediation of amended copper mine tailings with *Brassica juncea*. *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*, 27(April), 215–226. <http://doi.org/10.1080/17480930.2013.779061>
- Novo, L. A. B., & González, L. (2014). Germination and Early Growth of *Brassica juncea* in Copper Mine Tailings Amended with Technosol and Compost. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–9. <http://doi.org/10.1155/2014/506392>
- Novo, L. A. B., Mahler, C. F., & González, L. (2015). Plants to harvest rhenium: scientific and economic viability. *Environmental Chemistry Letters*, 13(4), 439–445. <http://doi.org/10.1007/s10311-015-0517-3>
- Pereira, S. I. A., Pires, C., Henriques, I., Correia, A., Magan, N., & Castro, P. M. L. (2015). Assessment of rhizospheric culturable bacteria of *Phragmites australis* and *Juncus effusus* from polluted sites. *Journal of Basic Microbiology*, 55(10), 1179–1190. <http://doi.org/10.1002/jobm.201500010>
- Pinheiro, J. C., Marques, C. R., Pinto, G., Bouguerra, S., Mendo, S., Gomes, N. C., ... Pereira, R. (2013). The performance of *Fraxinus angustifolia* as a helper for metal phytoremediation programs and its relation to the endophytic bacterial communities. *Geoderma*, 202–203, 171–182. <http://doi.org/10.1016/j.geoderma.2013.03.014>
- Pratas, J., Favas, P. J. C., D'Souza, R., Varun, M., & Paul, M. S. (2013). Phytoremediation assessment of flora tolerant to heavy metals in the contaminated soils of an abandoned Pb mine in Central Portugal. *Chemosphere*, 90(8), 2216–2225.

<http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.079>

- Pratas, J., Paulo, C., Favas, P. J. C., & Venkatachalam, P. (2014). Potential of aquatic plants for phytofiltration of uranium-contaminated waters in laboratory conditions. *Ecological Engineering*, 69, 170–176. <http://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.03.046>
- Reeves, R. D. (2006). Chapter 2 Hyperaccumulation of Trace Elements By Plants 2 . Historical Records of Metal-Accumulating Plants. *Phytoremediation of Metal-Contaminated Soils NATO Science Series*, 25–52.
- Salem et al. (2000). Heavy Metals in Drinking Water and Their Environmental Impact on Human Health. *Icehm*, 542–556.
- Salt, D. E., Smith, R. D., & Raskin, I. (1998). Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 643–668. <http://doi.org/10.1146/annurev.arplant.49.1.643>
- Santos, E. S., Abreu, M. M., Nabais, C., & Magalhães, M. C. F. (2012). Trace element distribution in soils developed on gossan mine wastes and *Cistus ladanifer* L. tolerance and bioaccumulation. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 45–51. <http://doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.05.006>
- Seth, C. S., Remans, T., Keunen, E., Jozefczak, M., Gielen, H., Opdenakker, K., ... Cuypers, A. (2012). Phytoextraction of toxic metals: A central role for glutathione. *Plant, Cell and Environment*, 35(2), 334–346. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02338.x>
- Sharma, R. K., & Agrawal, M. (2005a). Biological effects of heavy metals: An overview. *Journal of Environmental Biology*, 26(2 SUPPL.), 301–313.
- Sharma, R. K., & Agrawal, M. (2005b). Biological effects of heavy metals: an overview. *Journal of Environmental Biology*, 26(2), 301–313.
- Sheoran, V., Sheoran, A. S., & Poonia, P. (2013). Phytomining of gold: A review. *Journal of Geochemical Exploration*, 128, 42–50. <http://doi.org/10.1016/j.gexplo.2013.01.008>
- Sun, Y., Zhou, Q., & Diao, C. (2008). Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresource Technology*, 99(5), 1103–1110. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.02.035>
- Tripathi, R. D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D. K., & Maathuis, F. J. M. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants, 25(4). <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.02.003>
- Vamerali, T., Bandiera, M., & Mosca, G. (2009). Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, 8(1), 1–17. <http://doi.org/10.1007/s10311-009-0268-0>
- van der Ent, A., Baker, A. J. M., Reeves, R. D., Pollard, A. J., & Schat, H. (2013). Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. *Plant and Soil*, 362(1–2), 319–334. <http://doi.org/10.1007/s11104-012-1287-3>
- Wilson-Corral, V., Anderson, C. W. N., & Rodriguez-Lopez, M. (2012). Gold phytomining. A review of the relevance of this technology to mineral extraction in the 21st century. *Journal of Environmental Management*, 111, 249–57. <http://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.07.037>
- Wilson-Corral, V., Wilson-Perea, E., Báez, H. J. G., Sarmiento-Sanchez, J. I., Anderson, C. W. N., Partida-Ruvalcaba, L., ... Carrasco, W. R. (2014). Gold, Silver, And Copper Phytoextraction By

Helianthus annuus L . (Sunflower) Grown On Mine Tailings Amended With Plant Growth Regulators And Cyanide. *Shechtman International Symposium*, (December 2015), 1–11.

Zhang, W., & Tsang, D. C. W. (2013). Conceptual framework and mathematical model for the transport of metal-chelant complexes during in situ soil remediation. *Chemosphere*, 91(9), 1281–1288. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.034>