UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL

DANIELI DELELLO SCHNEIDER

**Efeitos dos metais cobre e zinco no desenvolvimento e capacidade bioacumuladora de
Pistia stratiotes e *Azolla filiculoides* em condições nutricionais diferenciadas**

São Carlos

2014

DANIELI DELELLO SCHNEIDER

**Efeitos dos metais cobre e zinco no desenvolvimento e capacidade bioacumuladora de
Pistia stratiotes e *Azolla filiculoides* em condições nutricionais diferenciadas**

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Evaldo L.G. Espíndola

São Carlos
2014

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

D346e Delello Schneider, Danieli
 Efeito dos metais cobre e zinco no desenvolvimento
 e capacidade bioacumuladora de *Pistia stratiotes* e
 Azolla filiculoides em condições nutricionais
 diferenciadas / Danieli Delello Schneider; orientador
 Evaldo L.G. Espíndola. São Carlos, 2014.

 Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em
 Ciências da Engenharia Ambiental e Área de Concentração
 em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de
 Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
 2014.

 1. Ecotoxicologia. 2. Macrófitas. 3. Metais. 4.
 Fósforo. 5. Bioacumulação. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Bacharel e Licenciada **DANIELI DELELLO SCHNEIDER**.

Título da tese: "Efeitos dos metais cobre e zinco sobre o desenvolvimento e capacidade bioacumuladora de *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides* em condições nutricionais diferenciadas".

Data da defesa: 14/11/2014

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Associado **Evaldo Luiz Gaeta Espíndola (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

Aprovada

Profa. Dra. **Suzelei Rodgher**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/UNESP- São José dos Campos)

Aprovada

Profa. Dra. **Maria Beatriz Bohrer Morel**
(Universidade Estadual de Campinas/UNICAMP)

Aprovada

Profa. Dra. **Dalva Maria da Silva Matos**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

Aprovada

Dra. **Bruna Horvath Vieira**
(Pós-Doutoranda CNPq)

Aprovada

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Paulo César Lima Segantine**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo, por ter me concedido saúde, alegria e força de vontade para caminhar durante esse importante período da minha vida e por eu ter conseguido concluí-lo da melhor maneira possível.

Ao meu orientador Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, pela oportunidade oferecida, orientação concedida, pelo profissionalismo e conhecimento admirável, pela paciência e valiosa amizade e pelo dom que possui em sempre nos fazer acreditar que somos capazes.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo e pela oportunidade e apoio financeiro para realização do Doutorado sanduíche na Espanha (Processo PDSE 5948/11-8).

A Prof^a Dra. Susana Redondo Gómez, do Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, España, pela oportunidade oferecida, orientação concedida, pela disponibilização de estrutura, material, equipamentos e equipe necessária para a realização do meu doutorado sanduíche e acima de tudo pela grande amizade que construímos.

A Prof^a Raquel Parra Martin, do Departamento de Biología Vegetal y Ecología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, España, pela ajuda na realização do experimento e amizade.

À Prof^a Dra. Odete Rocha, da Universidade Federal de São Carlos, pelos esclarecimentos durante a pesquisa e por ter disponibilizado o laboratório do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) para realização de análises laboratoriais.

Aos técnicos Marcelo Menezes Nogueira e Amândio Menezes Nogueira do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) do CCEAMA/EESC/USP, pelo apoio na realização dos ensaios de laboratório e campo, análises laboratoriais e conhecimento compartilhado.

Ao técnico José Valdecir de Lucca do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) - Universidade Federal de São Carlos, pelas análises laboratoriais realizadas e conhecimento compartilhado.

Aos técnicos José María Higuera Carranza e Jesús Valentín García López, de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla, pelo apoio na montagem e no decorrer dos experimentos.

A todos os professores e funcionários do CCEAMA, sem exceção, por todo apoio, amizade e conhecimento transmitido no decorrer desses anos de doutorado.

A todos os funcionários da biblioteca da EESC, pelo apoio, gentileza e prestatividade, em especial à Elena Palloni.

A todos os amigos do CCEAMA e em especial do NEEA pela amizade, troca de conhecimento, auxílio, parceria em trabalhos, enfim pelo convívio durante todos esses anos de doutorado, tornando os dias mais felizes.

Aos amigos Haroldo e Bruna, pela ajuda na montagem dos experimentos, estatística e demais detalhes na elaboração da tese.

Aos amigos Patrícia e Vanderlei, pela amizade e pela disposição em ajudar, mesmo estando distantes.

A todos os amigos que fiz durante minha estada na Universidad de Sevilla e principalmente ao José María Barcia Piedras, primeiramente pela amizade sincera, por ter sido meu braço direito durante todo o tempo de execução do meu doutorado sanduiche e pela convivência fora da universidade.

Aos meus queridos pais Marlene e Helio, vózinha Guilhermina e todas minhas irmãs e sobrinhos pela alegria e satisfação que me dão pelo simples fato de existirem em minha vida, pela convivência maravilhosa, pelo imenso amor, carinho, alento e apoio que sempre me disponibilizam, por eu sempre poder contar para o que der e vier e por sempre me mostrarem que eu posso alcançar tudo aquilo que almejo.

Ao meu querido esposo Rodrigo pelo amor, carinho e companheirismo, por me apoiar em todos os sentidos, pela paciência nas horas mais turbulentas, por sempre estar ao meu lado e fazer parte da minha vida.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram ou estiveram presentes em minha vida durante esse trajeto.

***“O cientista não é o homem que fornece as
verdadeiras respostas; é quem faz as
verdadeiras perguntas”.***

(Claude Lévi-Strauss)

RESUMO

DELELLO-SCHNEIDER, D. **Efeitos dos metais cobre e zinco no desenvolvimento e capacidade bioacumuladora de *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides* em condições nutricionais diferenciadas.** 2014. 152f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O crescente desenvolvimento populacional, industrial e a expansão agrícola vêm contribuindo de forma significativa para o aporte de nutrientes e metais nos ecossistemas aquáticos, interferindo na composição e estrutura das comunidades, dentre elas as macrófitas, ocasionando desequilíbrio ambiental, com perda das funções e serviços ecossistêmicos. Entre os diversos elementos inseridos de forma direta e indireta nos corpos hídricos, destacam-se fósforo, cobre e zinco, os quais, apesar de serem fundamentais para o metabolismo biológico, quando em excesso tornam-se prejudiciais, requerendo avaliações mais efetivas, de forma a melhor compreender e prevenir os potenciais riscos da exposição biológica a estes elementos estressores. Considerando o acima exposto, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito do metal cobre sobre o desenvolvimento da macrófita *Pistia stratiotes* e o efeito dos metais cobre e zinco sobre o desenvolvimento e capacidade bioacumuladora da macrófita *Azolla filiculoides*, em diferentes concentrações de fósforo, por meio de testes ecotoxicológicos. Para tanto, aspectos nutricionais (nitrogênio, fósforo, cobre total e clorofila *a* e total) e de desenvolvimento (biomassa, TCR, número de folhas nascidas, ganho de diâmetro, altura e largura foliar, número de raízes nascidas, comprimento das raízes principais, clorose e necrose foliar) foram avaliados em estudos laboratoriais para *P. stratiotes* e aspectos nutricionais (todos acima citados) e de desenvolvimento (biomassa e TCR) para *A. filiculoides*. Pelos resultados obtidos verifica-se que os metais cobre e zinco, nas concentrações testadas, ocasionaram interferência no desenvolvimento e nutrição das macrófitas, sendo a maior sensibilidade ao cobre observada para *P. stratiotes*, registrando-se efeitos de maior toxicidade do cobre em relação ao zinco em ambas as macrófitas. Verificou-se, ainda, que o fósforo proporcionou maior proteção a *A. filiculoides* contra o efeito dos metais conforme o aumento de sua concentração e já no teste ecotoxicológico com *P. stratiotes* não foram registradas diferenças significativas em função do aumento das concentrações de fósforo. Dessa maneira, conclui-se que o metal cobre causou maior toxicidade às macrófitas do que o zinco, principalmente em concentrações mais baixas de fósforo, verificando-se maior capacidade bioacumuladora da espécie *A. filiculoides* quando comparada com *P. stratiotes*.

Palavras-chave: Ecotoxicologia. Macrófitas. Metais. Fósforo. Bioacumulação.

ABSTRACT

DELELLO-SCHNEIDER, D. **Effects of copper and zinc in the development and bioaccumulating ability of *Pistia stratiotes* and *Azolla filiculoides* on different nutritional conditions**. 2014. 152p. Thesis (Doctorate/PhD) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The increasing population and industrial growth and the agricultural expansion have contributed significantly to the supply of nutrients and metals in aquatic ecosystems, affecting the composition and structure of communities, among them the macrophytes, causing environmental imbalance, with loss of ecosystem functions and services. Among the various elements inserted directly and indirectly on water bodies, phosphorus, copper and zinc stand out, which, despite being fundamental to the biological metabolism, when in excess become harmful, and assessments that are more effective are required to better understand and prevent the potential risks of biological exposure to these stressors. Considering the above, the objective of this research was to evaluate the effect of copper metal on the development of the macrophyte *Pistia stratiotes* and the effect of copper and zinc metals on the development and the bioaccumulation capacity of the macrophyte *Azolla filiculoides*, in different concentrations of phosphorus, through ecotoxicological tests. To do that, nutritional (nitrogen, phosphorus, copper total and chlorophyll *a* and total) and development (biomass, RGR, number of leafs born, diameter gain, leaf height and width, number of roots born, length of the main roots, leaf chlorosis and necrosis) aspects were evaluated in laboratory studies for *P. stratiotes* and nutritional (all above) and development (biomass and RGR) aspects for *A. filiculoides*. From the results obtained it appears that the metals copper and zinc, on the tested concentrations, caused interference in the development and nutrition of the macrophytes, where more sensitivity to copper was observed for *P. stratiotes*, and the effects of enhanced toxicity of copper relative to zinc in both macrophytes. It was also found that the phosphorus provided greater protection to *A. filiculoides* against the effects of metals as its concentration was increased and, on the ecotoxicological test with *P. stratiotes*, no significant differences were found with the increasing concentrations of phosphorus. Thus, it is concluded that the copper metal has caused more toxicity to macrophytes than zinc, especially at lower concentrations of phosphorus, and was verified a greater bioaccumulation capacity on the *A. filiculoides* species when compared to *P. stratiotes*.

Keywords: 1. Ecotoxicology. Macrophytes. Metals. Phosphorus. Bioaccumulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Delineamento experimental do teste de toxicidade com *Pistia stratiotes* em laboratório. 43
- Figura 2. Delineamento experimental dos testes de bioacumulação com *Azolla filiculoides* e cobre.51
- Figura 3. Delineamento experimental dos testes de bioacumulação com *Azolla filiculoides* e zinco.51
- Figura 4. Concentração de nitrogênio orgânico total em biomassa de *P. stratiotes* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b e c) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey. 58
- Figura 5. Concentração de fósforo total em biomassa de *P. stratiotes* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. Letras (a) – indica diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 59
- Figura 6. Concentração de cobre total em biomassa de *P. stratiotes* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indica diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 60
- Figura 7. Concentração de clorofila *a* e total em biomassa de *P. stratiotes* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a e A) – indicam diferença entre controles para clorofila *a* e clorofila total, respectivamente e (b e B) entre tratamentos com cobre para clorofila *a* e clorofila total, respectivamente, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Kruskal -Wallis e ANOVA. 61
- Figura 8. Ganho de biomassa fresca (média $\pm$ DP) nos controles (C) e nos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p < 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 62

Figura 9. Taxa de crescimento relativo (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p < 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 63

Figura 10. Número de folhas nascidas (média $\pm$ DP) nos controles (C) e nos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p < 0.05$) teste Mann-Whitney e t-Student. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 64

Figura 11. Ganho de diâmetro foliar (média $\pm$ DP) nos controles (C) e nos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c e d) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey. 65

Figura 12. Ganho de altura foliar (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 66

Figura 13. Ganho de largura foliar (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 66

Figura 14. Número de raízes nascidas (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey e ANOVA. 67

Figura 15. Comprimento da raiz principal (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA. 68

Figura 16. Comprimento das raízes principais de *P. stratiotes* expostas nos controles (A) e nos tratamentos com cobre (B), no 4º, 8º e 10º (último) dia de ensaio de toxicidade. As setas indicam locais com acúmulo de cobre, apresentando coloração negra nas nervuras das folhas e parte das raízes. 69

Figura 17. Número de brotos nascidos (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) Kruskal-Wallis e ANOVA. 70

Figura 18. Número de folhas com clorose (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Kruskal-Wallis e ANOVA. 71

Figura 19. Aspecto de clorose e necrose em folhas de *P. stratiotes* expostas nos controles (A) e nos tratamentos com cobre (B) no 10º (último) dia de ensaio de toxicidade. Os círculos vermelhos apontam sinais de necrose nas folhas. 72

Figura 20. Número de folhas com necrose (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Kruskal-Wallis e ANOVA. 73

Figura 21. Análise de componentes principais das variáveis nutricionais e de desenvolvimento de *P. stratiotes* e nutricionais da água, após 10 dias de observação. 74

Figura 22. Concentração de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,3 e $12,7 \text{ mg L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L^{-1}), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0,05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i, j) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0,05$) teste de Tukey. 78

Figura 23. Concentração de fósforo total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,3 e $12,7 \text{ mg L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L^{-1}), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c, d, e, f, g, h, i, j) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey e Kruskal-Wallis. 79

Figura 24. Concentração de cobre total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e $12,7 \text{ mg L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L^{-1}), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett e Kruskal-Wallis. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b, c, d, e, f, g, h, i) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey e Kruskal-Wallis. 80

Figura 25. Concentração de clorofila *a* e total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) e (■) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles para clorofila *a* e clorofila total respectivamente ($p \leq 0.05$) teste de Dunnett. Letras (a e b) e (A, B, C) – indicam diferença entre controles para clorofila *a* e clorofila total respectivamente, (c, d, e, f, g, h) e (D, E, F, G, H) – indicam diferença entre os diferentes tratamentos com cobre para clorofila *a* e clorofila total respectivamente, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey. 82

Figura 26. Ganho de biomassa fresca de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste de Dunnett. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c, d, e, f, g) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey e Kruskal-Wallis. 83

Figura 27. Biomassa final de *A. filiculoides* após 14 dias de experimento, quando expostas nos controles (P(3), P(15) e P(46)) e diferentes concentrações de cobre (Cu0,007; Cu1,3 e Cu12,7). Letra A – Aspecto de *A. filiculoides* antes da montagem do experimento. Letra B – Aspecto de *A. filiculoides* com formação de antocianinas no último dia de experimento. 84

Figura 28. Taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste de Dunnett. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c, d, e, f, g) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey. 85

Figura 29. Análise de componentes principais das variáveis nutricionais e de desenvolvimento de *P. stratiotes* e nutricionais da água, após 14 dias de observação. 87

Figura 30. Concentração de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste de Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey. 91

Figura 31. Concentração de fósforo total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste de Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey. 92

Figura 32. Concentração de zinco total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey. 93

Figura 33. Concentração de clorofila *a* e clorofila total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey 94

Figura 34. Biomassa final de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey 95

Figura 35. Taxa de crescimento relativo de biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey e Kruskal-Wallis 96

Figura 36. Biomassa final de *A. filiculoides* após 14 dias de experimento, quando expostas nos controles (P(3), P(15) e P(46)) e diferentes concentrações de zinco (Zn5, Zn10 e Zn20) 97

Figura 37. Análise de componentes principais das variáveis nutricionais e de desenvolvimento de *P. stratiotes* e nutricionais da água, após 14 dias de observação 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis físicas e químicas analisadas na água (meio experimental) no ensaio com *P. stratiotes*, cobre e fósforo, medidos no início (1º dia) e no final do experimento (10º dia). C = controle, P(55, 70 e 130) = tratamento com 55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo; Cu (73) = tratamento com 73 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre. 57

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis físicas e químicas analisadas na água (meio experimental) no ensaio com *A. filiculoides*, metal cobre e fósforo, medidos no início (no 1º dia, 1 hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final do experimento (no 14º dia). C = controle; P (3, 15 e 46) = tratamento com 3, 15 e 46 mg L^{-1} de fósforo; Cu (0,07, 1,3 e 12,7) = tratamento com 0,07, 1,3 e 12,7 mg L^{-1} de cobre. 76

Tabela 3. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis físicas e químicas analisadas na água (meio experimental) no ensaio com *A. filiculoides*, metal zinco e fósforo, medidos no início (no 1º dia, 1 hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final do experimento (no 14º dia). C = controle; P (3, 15 e 46) = tratamento com 3, 15 e 46 mg L^{-1} de fósforo; Zn(5, 10 e 20) = tratamento com 5, 10 e 20 mg L^{-1} de zinco. 89

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	26
2.2. OBJETIVO GERAL	26
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. HIPÓTESES	26
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
4.1. EUTROFIZAÇÃO DE AMBIENTE AQUÁTICO	27
4.2. METAIS EM AMBIENTE AQUÁTICO.....	29
4.3. A IMPORTÂNCIA DOS TESTES ECOTOXICOLÓGICOS E A UTILIZAÇÃO DE PLANTAS AQUÁTICAS COMO ORGANISMO-TESTE.	34
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
ABORDAGEM 1 - AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO METAL COBRE NO DESENVOLVIMENTO DA MACRÓFITA AQUÁTICA <i>P. STRATIOTES</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO.....	42
5.1. CULTIVO DO ORGANISMO TESTE.....	42
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	42
5.3. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA.....	43
5.4. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E BIOLÓGICA DA ÁGUA	44
5.5. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E BIOLÓGICA DE <i>P. STRATIOTES</i>	45
5.5.1. PREPARAÇÃO DA MACRÓFITA PARA AS DIFERENTES ANÁLISES.....	45
5.5.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO TOTAL EM BIOMASSA DE <i>P. STRATIOTES</i>	46
5.5.3. CONCENTRAÇÃO DE COBRE TOTAL EM BIOMASSA DE <i>P. STRATIOTES</i>	46
5.5.4. CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA A E TOTAL EM <i>P. STRATIOTES</i>.....	46
5.6. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE <i>P. STRATIOTES</i>	47
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	48

ABORDAGEM 2 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BIOACUMULADORA DE COBRE E ZINCO POR *AZOLLA FILICULOIDES* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO.....49

5.8. CULTIVO DO ORGANISMO-TESTE.....49

5.9. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL49

5.10. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA52

5.11. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E BIOLÓGICA DA ÁGUA.....52

5.12. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E BIOLÓGICA DE *A. FILICULOIDES*52

5.12.1 PREPARAÇÃO DA MACRÓFITA PARA AS DIFERENTES ANÁLISES52

5.12.2. CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO, FÓSFORO, COBRE E ZINCO EM BIOMASSA DE *A. FILICULOIDES*53

5.12.3. CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA A E TOTAL EM *A. FILICULOIDES*53

5.13. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *A. FILICULOIDES*54

5.13.1. GANHO DE BIOMASSA E TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO DE *A. FILICULOIDES*.....54

5.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....54

6. RESULTADOS.....56

ABORDAGEM 1 – AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO METAL COBRE NO DESENVOLVIMENTO DA MACRÓFITA AQUÁTICA *P. STRATIOTES* EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO.56

6.1. VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA56

6.2. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E BIOLÓGICA DE *P. STRATIOTES*.....57

6.2.1. CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO E FÓSFORO TOTAL EM BIOMASSA DE *P. STRATIOTES*57

6.2.2. CONCENTRAÇÃO DE COBRE TOTAL EM BIOMASSA DE *P. STRATIOTES*.....59

6.2.3. CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA A E CLOROFILA TOTAL EM BIOMASSA DE *P. STRATIOTES*60

6.3. AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE *P. STRATIOTES* (GANHO DE BIOMASSA, TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO, FOLHAS NASCIDAS, GANHO DE DIÂMETRO, GANHO DE ALTURA FOLIAR, GANHO DE LARGURA FOLIAR, RAÍZES NASCIDAS, COMPRIMENTO DA RAIZ, BROTO NASCIDOS, FOLHAS COM CLOROSE E FOLHAS COM NECROSE)61

6.4. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS73

ABORDAGEM 2 – AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BIOACUMULADORA DE COBRE E ZINCO POR <i>AZOLLA FILICULOIDES</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO.	75
“RESULTADOS PARA O METAL COBRE”	75
6.5. AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA	75
6.6. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E BIOLÓGICA DE <i>A. FILICULOIDES</i>	77
6.6.1. CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E COBRE TOTAL, CLOROFILA A E TOTAL EM BIOMASSA DE <i>A. FILICULOIDES</i>	77
6.7. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>A. FILICULOIDES</i>	82
6.7.1. GANHO DE BIOMASSA E TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO DE <i>A. FILICULOIDES</i>	82
6.8. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	86
“RESULTADOS PARA O METAL ZINCO”	88
6.9. AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA	88
6.10. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E BIOLÓGICA DE <i>A. FILICULOIDES</i>	90
6.10.1. CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO, FÓSFORO E ZINCO TOTAL, CLOROFILA-A E TOTAL EM BIOMASSA DE <i>A. FILICULOIDES</i>	90
6.11. AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE CRESCIMENTO DE <i>A. FILICULOIDES</i>	94
6.11.1. GANHO DE BIOMASSA E TAXA DE CRESCIMENTO RELATIVO DE <i>A. FILICULOIDES</i>	94
6.12. ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS	97
7. DISCUSSÃO	99
7.1 ANÁLISE DOS EFEITOS DE COBRE EM <i>PISTIA STRATIOTES</i> EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO.	99
7.2 EFEITOS DIFERENCIADOS DE METAIS SOBRE <i>AZOLLA FILICULOIDES</i> E A AVALIAÇÃO DE SUA CAPACIDADE BIOACUMULADORA.	111
8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	119
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXO	138

1. INTRODUÇÃO

A eutrofização dos corpos d'água, em especial lagos e represas, proporcionada pelo despejo de efluentes domésticos e industriais sem tratamento adequado, processos de mineração, uso insustentável de pesticidas e fertilizantes na agricultura, atividades como a aquicultura e a suinocultura, entre outros, faz com que uma grande quantidade de nutrientes (em especial o fósforo e o nitrogênio), metais e pesticidas contaminem o ambiente aquático, causando toxicidade aos organismos e desequilíbrio a todo esse ecossistema, podendo afetar toda cadeia trófica até chegar ao homem, prejudicando sobremaneira a qualidade de vida (CALLISTO; GONÇALVES JÚNIOR, 2005; GOMES FILHO et al., 2001; ROMITELLI, 1983; VON SPERLING, 1996; ZHU et al., 1999).

O fósforo é um nutriente de grande importância no ambiente aquático, uma vez que participa dos processos de funcionamento metabólico dos organismos, sendo considerado um elemento energético para o crescimento desses indivíduos (ESTEVES, 1998). Porém, em concentrações acima do necessário para os organismos, esse nutriente passa a ser prejudicial, causando a proliferação de algas e algumas espécies de plantas aquáticas e a morte de outros organismos que dependem da oxigenação da água e intensidade luminosa, para sobreviverem.

Assim como o fósforo, os metais quando em excesso nos ambientes aquáticos são de grande preocupação, devido a sua toxicidade e acumulação (SILVA et al., 1990). Por serem poluentes que não se degradam, os metais persistem inalterados no meio ambiente e são biomagnificados pelos organismos, podendo atingir de forma comprometedor toda cadeia trófica (GRATÃO et al., 2005), provocando sérios problemas ecológicos e de saúde humana (BAHADIR et al., 2007; BLAZQUEZ et al., 2005; MALIK, 2004).

Normalmente os metais ocorrem na natureza em pequenas quantidades, na ordem de parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb), sendo o Mg, Fe, Zn, Mn, Cu, Co, Mo, Al, Ni e Br considerados micronutrientes essenciais para vegetais e animais, desde que estejam disponíveis em concentrações necessárias aos organismos (FREEDMAN, 1995). Em baixas concentrações estes elementos podem levar os organismos à deficiência nutricional (MARTIN; SIGEL, 1980) e já em concentrações acima daquelas consideradas necessárias, tornam-se tóxicos, causando danos ecológicos (FREEDMAN, 1995). Os metais podem apresentar-se no ambiente como íons-livres ou como complexos organo-minerais solúveis ou adsorvidos às partículas sólidas, sendo o Pb, Cd, Cu, Zn, Ni, Cr e Hg os que recebem maior atenção devido a sua acumulação nos compartimentos solo, vegetação, águas superficiais e subterrâneas (PIETROBELLI, 2007).

Para Rand et al. (1975), cobre, zinco, cádmio, mercúrio e chumbo são os metais mais preocupantes, pois em altas concentrações tornam-se tóxicos aos organismos. Porém muitos deles são essenciais em baixas concentrações, como é o caso do cobre e do zinco, fazendo parte das funções bioquímicas dos organismos, exercendo função em complexos enzimáticos ou formando um sistema doador de elétrons (HEATH, 1995; RAND, 1975).

O cobre é um metal de transição essencial redox-ativo, que age como um elemento estrutural em proteínas reguladoras e participa do transporte de elétrons na fotossíntese, respiração mitocondrial, respostas ao estresse oxidativo, sinalização hormonal e metabolismo da parede celular (RAVEN et al., 1999; YRUELA, 2005), além de ser essencial para o crescimento das plantas, (Ait Ali et al., 2004). Porém, em altas concentrações passa a ser tóxico para os organismos, principalmente os de água doce (CAMPBELL et al.¹, 1988 *apud* MASUTTI, 2004), comprometendo os processos bioquímicos e fisiológicos, alterando a permeabilidade da membrana nas plantas, a estrutura da cromatina, síntese proteica, atividade enzimática, fotossíntese, processos respiratórios e consequentemente levando a senescência (MONFERRÁN et al., 2009; YRUELA, 2005).

O zinco, por sua vez, é componente estrutural de diversas metaloenzimas e metaloproteínas, participando do funcionamento de reações do metabolismo celular e de processos fisiológicos como o de crescimento, desenvolvimento e funções antioxidante e imune (VALLE², 1993 *apud* CASTRO, 2011). É um micronutriente essencial para as plantas, porém em altas concentrações passa a interferir no crescimento desse organismo (MARSCHNER, 1995). A biodisponibilidade desse metal irá depender das propriedades químicas e físicas do meio em que este se encontra e dos processos biológicos, entre outros fatores. O zinco é um metal reativo que se combina facilmente com outros elementos para formar compostos insolúveis que não são biodisponíveis (ICZ, 2014).

Através dos estudos ecotoxicológicos é possível avaliar o impacto dos poluentes sobre determinada espécie ou ambiente, de forma qualitativa ou quantitativa em relação aos efeitos tóxicos sobre os organismos (RAND; PETROCELLI, 1985), possibilitando estimar o impacto que esses poluentes podem ocasionar às comunidades aquáticas e estabelecer os limites permitidos dessas substâncias no ecossistema (ARAÚJO et. al., 2006). Os testes ecotoxicológicos são geralmente realizados com os organismos indicadores do ambiente com significativa representação ecológica (MAGALHÃES; FILHO, 2008) e por isso a utilização

¹ CAMPBELL, P.G.C. et al. (1988). *Biologically available metals in sediments*. Publication No. NRCC 27694. 298p. NRCC/CNRC. Ottawa, Canada.

² VALLE, B.L.; FALCHUK, K.H. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiological Reviews Published*, v.73, n.1, p.79-118, 1993.

de macrófitas aquáticas nestes testes é de grande importância, visto que as mesmas fazem parte da classe de produtores primários, sendo consideradas importantes componentes estruturais dos ecossistemas aquáticos e são fundamentais para a dinâmica das biocenoses desses ambientes (PITELLI, 1998).

São inúmeros os trabalhos já realizados com o intuito de se averiguar os efeitos causados por diferentes metais sobre as espécies de macrófitas ou o efeito do fósforo sobre a fisiologia das mesmas, porém a avaliação da ação dos metais cobre e zinco sobre o desenvolvimento e capacidade bioacumuladora de *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides*, considerando diferentes meios nutricionais, ainda são inexistentes e uma vez que o estado nutricional dos corpos d'água estão em constante processo de degradação, é de grande importância que estudos mais detalhados por meio de ensaios ecotoxicológicos sejam desenvolvidos para que novas espécies bioindicadoras e bioacumuladoras possam ser identificadas e utilizadas no processo de prevenção ou remediação da contaminação ambiental.

Considerando o acima exposto em relação ao fósforo e aos metais cobre e zinco, este estudo se direciona para a avaliação dos efeitos da interação dessas substâncias sobre as macrófitas *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides*, que se encontram presentes em diversos corpos d'água, sendo ambas amplamente utilizadas em ensaios ecotoxicológicos e de bioacumulação para avaliação dos efeitos de diversos estressores ambientais.

2. OBJETIVOS

2.2. Objetivo geral

O objetivo geral da presente pesquisa foi verificar o potencial de uso de macrófitas aquáticas (*Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides*) na avaliação dos efeitos de metais (cobre e zinco), por meio de estudos experimentais laboratoriais, verificando se diferentes concentrações de fósforo implicariam em diferentes respostas estruturais e funcionais das macrófitas aquáticas.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do metal cobre sobre o desenvolvimento da macrófita aquática *Pistia stratiotes*, considerando três diferentes concentrações de fósforo, por meio de ensaio ecotoxicológico crônico em laboratório; verificando se estas diferentes concentrações de fósforo exercem alguma interferência na ação do metal cobre sobre os aspectos de desenvolvimento, assimilação de nutrientes e pigmentação da referida macrófita;
- Analisar os efeitos dos metais cobre e zinco sobre a capacidade bioacumuladora e aspectos de desenvolvimento da macrófita aquática *Azolla filiculoides*, considerando três diferentes concentrações de fósforo, por meio de ensaio ecotoxicológico crônico em laboratório; avaliando os efeitos de cobre e zinco sobre esta macrófita e possíveis interferências das concentrações de fósforo nas respostas biológicas frente aos metais.

3. HIPÓTESES

As hipóteses da presente pesquisa foram:

- As macrófitas *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides* tem potencial para utilização nos estudos de avaliação de toxicidade ambiental, sendo que ambas, em função de sua capacidade de bioacumulação (nutrientes e metais), também podem ser recomendadas para uso em sistemas de tratamento de efluentes.
- As condições tróficas do sistema aquático promovem efeitos deletérios diferenciados no desenvolvimento das macrófitas aquáticas *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides*, quando expostas aos metais cobre e zinco.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. Eutrofização de ambiente aquático

O crescente desenvolvimento populacional e consequentemente aumento das áreas urbanas devido às migrações descontroladas, a expansão agrícola e o desenvolvimento industrial, tem feito com que os recursos naturais sejam cada vez mais degradados e exauridos (GOULART; CALLISTO, 2003; MOTTA, 1996).

Ações antrópicas como desmatamento florestal, desvio de curso de rios, construção de reservatórios, mineração acentuada, lançamento de efluentes domésticos e industriais em corpos d'água sem tratamento prévio e o escoamento superficial de áreas agricultáveis são exemplos de fatores que levam ao processo de eutrofização do meio aquático (BORRELEY et al., 2000; CALLISTO; GONÇALVES JÚNIOR, 2005; MORAES; JORDÃO, 2002; TUNDISI, 2003).

Segundo Franzen (2009), as áreas urbanas podem ser citadas como foco de disseminação de eutrofização dos corpos d'água devido as ligações clandestinas de esgotos em redes pluviais e a percolação de fossas sépticas.

Outra fonte que contribui com o aporte de grande quantidade de nutrientes nos rios e reservatórios são os efluentes de aquicultura. O cultivo de peixes em reservatórios naturais ou artificiais, em tanques-rede e gaiolas, é uma alternativa de baixo investimento e alta produção em um período curto de tempo (KUBITZA, 1999), aumentando dessa maneira a demanda de alimentos na forma de proteína animal (KUBITZA, 2003).

Porém, quanto mais alta é a produtividade desses organismos na aquicultura, consequentemente maior será o impacto negativo gerado sobre esse ecossistema se os efluentes desses não forem tratados adequadamente (HENRY-SILVA; CAMARGO, 2008), uma vez que a entrada de grande quantidade de poluentes como matéria orgânica, nitrogênio e fósforo, oriundos dos restos de ração utilizados na alimentação desses organismos, além de excretas e metabólitos, deterioram a qualidade da água do próprio local de produção, além de eutrofizar outros corpos d'água quando estes são despejados, diminuindo por sua vez a oxigenação do ambiente aquático (BOYDE, QUEIROZ 1997; PILLAY, 2004).

Merece destaque também a suinocultura que, apesar de ter grande importância social e econômica é também reconhecida como uma atividade poluidora ambiental, pois a água utilizada na lavagem dos criadouros em regime de confinamento (GOMES FILHO et al., 2001) e os dejetos líquidos utilizados na fertirrigação sem tratamento adequado (COSTA et al., 2000) ou aplicados em quantidade acima do suportado pela área de plantio, passam a

poluir o solo e os corpos d'água superficiais ou subsuperficiais por percolação (BASSO et al., 2005; KUNZ et al., 2004), propiciando a entrada de nutrientes como nitrogênio e fósforo, sólidos suspensos, matéria orgânica e metais como o cobre e o zinco oriundos das rações, além de hormônios e antibióticos, sendo considerado altamente poluidor (BARROS et al., 2003; STONE et al., 1998).

De maneira geral, todas as fontes acima citadas são ricas em nutrientes, em especial nitrogênio e fósforo, matéria orgânica e metais, os quais, quando em grande quantidade, podem causar a eutrofização de um ambiente aquático, provocando desequilíbrio entre os organismos ali existentes e degradando o meio ambiente (BATISTA et al., 2014; ZHU et al., 1999).

A eutrofização também pode resultar na mudança da estrutura das comunidades aquáticas uma vez que propicia o aumento da bioamassa algal, especialmente de cianobactérias, as quais produzem cianotoxinas que podem inviabilizar o uso da água para abastecimento público e seus usos múltiplos, sendo ainda capazes de provocar efeitos negativos no sistema hepático e nervoso ou até serem fatais ao homem e aos demais animais (CHORUS; BARTRAM, 1999; TUNDISI, 2003; FIGUEIRÊDO et al., 2007). Com isso, diversos efeitos ocorrem ao longo de toda a cadeia alimentar, incluindo desaparecimento de macrófitas aquáticas submersas, proliferação de macrófitas flutuantes, predominância de peixes cuja alimentação é baseada em seres bentônicos e plantas (FERRÃO-FILHO et al., 2009; FRAGOSO JUNIOR et al., 2007; POMPÊO, 2008), redução da transparência da água e aumento da turbidez e sedimentação (KLAPPER, 1991).

O fósforo, assim como o nitrogênio, é considerado um dos principais nutrientes limitantes dos produtores primários e por isso é responsável pela eutrofização artificial de rios, córregos, lagos e reservatórios. Por outro lado esse elemento é um nutriente essencial na manutenção da vida dos organismos aquáticos, fazendo parte da síntese de ATP, fosfolipídios, ácidos nucleicos e proteínas (ESTEVES, 1998; ODUM, 1984; PILLAY, 2004). O fósforo compõe as rochas fosfáticas e sua liberação natural no meio ambiente ocorre através da erosão, sendo lixiviado para o solo e posteriormente carregado para dentro dos corpos d'água, onde é disponibilizado sob a forma dissolvida e particulada (LARCHER, 2000) e assimilado pelos produtores primários na forma de ortofosfato (BRAGA et al., 2005). A sua origem antrópica ocorre pela decomposição de matéria orgânica, detergentes, despejos de esgotos, fertilizantes e dejetos animais (VON SPERLING, 1996).

Devido o tratamento convencional de águas residuárias não surtir efeito efetivo na eliminação do fósforo e demais nutrientes, além de outros contaminantes, uma solução é a

utilização de sistemas ecológicos compostos por macrófitas aquáticas (MITSCH; JORGENSEN, 2004), uma vez que essas plantas possuem a capacidade de bioacumular ou degradar as substâncias indesejadas através da microbiota de suas raízes (GRANATO, 1995), sendo também boas bioindicadoras de locais contaminados.

4.2. Metais em ambiente aquático

Assim como a contaminação por fósforo. O crescimento populacional e industrial acelerado e as práticas de extração e descarte dos recursos minerais de maneira incorreta vêm provocando em escala cada vez mais ampla a contaminação dos corpos d'água por metais, verificando-se que desde a revolução industrial a biosfera vem sendo contaminada por esse poluente, sendo alguns deles muito tóxicos mesmo em concentrações muito baixas (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007). Isso ocorre porque os metais, em contraste com a maioria dos outros poluentes, não são biodegradáveis (SILVA et al., 1990), podendo persistir no ambiente por um período longo e acumular-se a níveis prejudiciais em todos os seres vivos por meio da cadeia trófica. Esses metais fazem parte da categoria principal de poluentes, podendo ser encontrados no solo, água e também no ar, na emissão de gases tóxicos formados na atmosfera por reações fotoquímicas (GRATÃO et al., 2005).

Os metais ocorrem em pequenas concentrações na natureza (na ordem de parte por milhão ou parte por bilhão) e sua entrada no ambiente pode ocorrer de maneira natural; através de processos geoquímicos como lixiviação de solos, intemperismo das rochas e deposição atmosférica por precipitação contendo esses elementos metálicos; ou de forma antropogênica; através do uso de pesticidas, fertilizantes, por efluentes industriais, domésticos, resíduos de curtume, queima de combustíveis fósseis, mineração e fundição de minérios, entre outros (PEREIRA et al., 2006; VARDANYAN; INGOLE, 2006; ZHOU; WEI, 2008). Uma vez disponíveis no ambiente, os metais passam por vários processos de transformação, os quais irão ocorrer dependendo das propriedades físico-químicas do ambiente e quantidade disponíveis, causando danos à biocenose de todo ecossistema (SUNDA; HUNTSMAN, 1998).

É de grande complexidade o comportamento dos metais em ambiente aquático, pois o que irá definir o seu ciclo e biodisponibilidade no ecossistema serão as diversas interações que este irá sofrer com os demais componentes dissolvidos e particulados ali existentes. (CAMPBELL, 1995; SALOMONS; FORSTNER, 1984). Porém, da mesma maneira que a presença de metais impõe alterações aos ecossistemas aquáticos e aos organismos vivos

presentes, os corpos aquáticos receptores também podem influenciar na distribuição, transporte e biodisponibilidade desses metais (VELÁSQUEZ et al., 2002).

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores suscetíveis de poluição, pois recebem poluentes de forma direta e indireta (ANDRADE, 2004). Segundo KHAN et al., (2005) e LACERDA, (1998), nos ambientes aquáticos a maior fração de metais fica aderida ao sedimento na forma não biodisponível e isso faz com que a concentração dos metais fique menos disponível para a biota. Porém, devido às reações ambientais como a diminuição de pH e de potencial de oxidação (CHUAN et al., 1996; FEEMA, 1992), esses metais podem tornar-se biodisponíveis na coluna de água, sendo incorporados por organismos filtradores e detritívoros, aumentando a concentração desses metais por bioacumulação, causando problemas a saúde humana via cadeia alimentar (KHAN et al, 2005; REEVE, 1994).

Quanto a sua forma de ocorrência no ambiente aquático, os metais podem apresentar-se em solução na forma de íons hidratados livres ou na forma de complexos solúveis orgânicos e inorgânicos, podendo estar também presente na forma sólida, devido a várias associações com sedimentos ou material particulado suspenso (STUM, 1996). Essas formas irão depender de variáveis como pH, força iônica, temperatura, presença de ligantes disponíveis, velocidade das correntezas e da atividade biológica (FEEMA, 1992).

A concentração de metais existente no meio aquático nem sempre aponta os reais valores disponíveis para a biota (CHEN; FOLT, 2000). Podemos tomar como exemplo as macrófitas aquáticas que tem a capacidade de acumular uma quantidade de até 100 mil vezes mais do que a disponível no sistema (MISHRA et al., 2008). Esse fato deixa clara a necessidade de investigação das concentrações de metais biodisponíveis na biota, além dos compartimentos água e sedimento.

Alguns metais como o cobre, ferro e zinco são considerados elementos essenciais aos organismos. Outros como cádmio, mercúrio e chumbo são considerados elementos não-essenciais, pois além de não serem necessários às funções biológicas podem ocasionar efeitos tóxicos nos organismos, mesmo que ocorram em pequenas quantidades (FERREIRA et al., 2001). Resíduos contendo cádmio, cromo, manganês e níquel possuem alto poder de contaminação podendo causar dermatites alérgicas, ulcerações na pele, perfurações do septo nasal, câncer, distúrbios afetivos, irritação neuromuscular, cefaleia, náuseas, desmaios, e até afetar o sistema imunológico humano (SALGADO, 2003). O cobre e o manganês, quando em excesso, também podem causar estresse oxidativo e comprometer a função fotossintética das plantas (DUCIC ; POLLE, 2005; KÜPPER et al., 2003).

Independente do estresse nas plantas ter sido causado tanto por fatores bióticos como abióticos, são causados por “espécies reativas de oxigênio” (EROs), recebendo o nome também de estresse oxidativo (ODJEGBA; FASIDI, 2007). As EROs destroem as proteínas e lipídios da membrana e ácido nucleicos (MATSUMURA et al., 2002; MONFERRÁN et al., 2009) e a produção excessiva de espécies reativas de EROS interfere no ambiente redox celular causando estresse oxidativo (SHAW et al., 2004). As respostas das plantas frente ao estresse provocado pelas concentrações de metais podem se manifestar na forma de produção de compostos orgânicos secundários como mecanismos de tolerância, conferindo à planta maior resistência ao estresse, através do acúmulo desses metais. Esse acúmulo de metais como resposta é chamado de fitorremediação e é uma alternativa para o desenvolvimento de tecnologias para a retirada de metais do ambiente, tanto aquático como terrestre (ZOCHE, 2002).

As macrófitas aquáticas são reconhecidas e utilizadas como biorremediadoras justamente por serem resistentes a contaminação por metais e possuem a capacidade de absorver e armazenar essas substâncias nos seus tecidos (MIKRYAKOVA, 2002; ODJEGBA; FASIDI, 2007). Por esta razão, muitas pesquisas são realizadas para se ter o conhecimento de quais espécies de plantas são boas bioacumuladoras de metais, como realmente acontece esse processo de absorção e até que faixa de concentração esse processo é possível, entre outros aspectos relacionados a fisiologia da planta.

Cada metal causa um efeito diferenciado sob o meio ambiente, porém a presente pesquisa terá como foco o estudo sobre os efeitos de cobre e zinco e por isso serão descritas informações apenas sobre esses dois metais.

O cobre ocorre naturalmente e essencialmente em todas as plantas e animais. Para as plantas é essencial no crescimento e desenvolvimento, estando presente normalmente no tecido vegetal. No organismo humano age no processo de catalisação e assimilação do ferro na síntese da hemoglobina, facilitando a cura da anemia (GUYTON, 1988). Apesar do cobre ser essencial a esses organismos, também pode ser altamente tóxico a algas, fungos, invertebrados, sementes de plantas e moderadamente tóxico aos mamíferos (BOWEN³, 1966 *apud* MASUTTI, 2004).

Estudos mostraram que concentrações de 0,5 mg L⁻¹ são letais para alguns tipos de peixes como trutas, carpas, bagres, entre outros, acima de 1,0 mg L⁻¹ ocorre a morte de micro-organismos, acima de 2,5 mg L⁻¹ passam a transmitir sabor amargo à água e uma

³ BOWEN, H.J.M. (1996). *Trace metals in biochemistry*. Academic Press. 241p.

concentração de 20 mg L^{-1} ou um teor total de 100 mg L^{-1} por dia na água é suficiente para produzir intoxicações ao homem, sendo de 2 mg L^{-1} o valor máximo permitido pelo padrão de potabilidade para esse metal, de acordo com a Portaria 518 (CETESB, 2010). O limite máximo permitido de cobre dissolvido em corpos de água pela Resolução 357/05 do CONAMA é de $0,009 \text{ mg L}^{-1}$ para os de classe I e II, de $0,013 \text{ mg L}^{-1}$ para os de classe 3 e de 1 mg L^{-1} para lançamento de efluentes (CONAMA, 2010).

O cobre pode apresentar vários estados de oxidação, como o Cu (I), (II) e (III), sendo o Cu^{2+} o mais comum. Na água seu transporte ocorre em especial pela adsorção no sedimento, a qual irá variar dependendo do tipo de sedimento, valores de pH, tipos de cátions, presença de ligantes, óxidos de ferro e manganês. Sua desorção também irá depender de fatores como salinidade, pH e presença de compostos quelantes naturais ou artificiais (MOORE; RAMAMMORTHY⁴, 1984 *apud* MASUTTI, 2004).

As principais fontes de cobre ocorrem devido à produção de fertilizantes, tintas anti-incrustantes, resíduos de mineração, poeira, efluentes domésticos e industriais, sendo estas as principais vias de entrada desse metal no ambiente aquático (ANDRADE, 2004). Compostos de cobre, como o sulfato, é muito utilizado na agricultura como algicida e fungicida no tratamento de doenças de plantas, no tratamento de água, como conservantes de madeira e como pigmento para tintas. Esse metal ainda pode ser disposto no ambiente por contaminação pelas minas de cobre ou de outros metais, efluentes de estações de tratamento de esgoto e aterros (ATSDR, 2004).

Anualmente são liberadas para atmosfera mais de 75.000 toneladas de cobre, sendo que apenas um quarto desse valor é proveniente de fontes naturais e o restante é decorrente de atividades antropogênicas. Do total de cobre utilizado anualmente no mundo, aproximadamente 65% são empregados na indústria elétrica e eletrônica, 15% na construção civil e os 20% restantes em equipamentos de transporte, de refrigeração, hidráulicos e de uso doméstico (WHO, 1998).

O metal zinco faz parte da formação natural da crosta terrestre, compondo as rochas ígneas, sendo o 24º elemento mais abundante da Terra e o terceiro metal não ferroso mundialmente mais consumido, depois do alumínio e do cobre. A China é o país que mais produz e consome esse metal, enquanto que no Brasil o consumo aparente desse metal é da ordem de 240.000 toneladas/ano (MME, 2010)

⁴ MOORE, J.W.; RAMAMMORTHY, S. *Heavy metals in natural waters*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1984.

O zinco é encontrado na natureza na forma de sulfetos, estando associado a outros metais como o cobre, chumbo, ferro e prata (RUSSEL, 1994), sendo a erosão e erupções vulcânicas as vias naturais de entrada desse metal nos corpos d'água (ICZ, 2014; USEPA, 1987) e os efluentes de galvanoplastia não tratados, atividades biológicas, incêndios florestais, processo de mineração e lixiviação de solos agricultáveis contendo pesticidas ou fertilizantes com zinco, as vias antropogênicas de contaminação (CETESB, 2014).

O único estado de oxidação que o zinco apresenta é o 2^+ , sendo o zinco e seus compostos muito utilizados no processo de galvanização de produtos de ferro e aço, fabricação de ligas resistentes à corrosão. Seus principais compostos como o óxido (ZnO) são utilizados na indústria de borracha, cerâmica, tintas; o cloreto de zinco é utilizado na preservação de madeiras; o sulfato de zinco (ZnS) em tintas luminescentes, produtos para enriquecimento de solos e indústria têxtil e o zinco dietílico na indústria farmacêutica na fabricação de bloqueadores solares, desodorantes, xampu anticapa, entre outros produtos (MME, 2010; CETESB, 2014). O zinco é utilizado também em curtumes, na produção de medicamentos, fertilizantes, explosivos, ração animal, entre outros (COPPENET et al., 1993; DEMIREZEN ET AL., 2007; MAHAN, 1995; MISHRA et al., 2008).

O zinco é essencial para o metabolismo do homem, plantas e animais, desempenhando papel de grande importância na formação de auxinas, compondo muitas enzimas como a desidrogenase, proteinase e peptidases (LINDSAY, 1972), garantindo a estabilidade de domínios proteico (dedos de zinco ou “zinc finger”) que mediam o reconhecimento do DNA entre as interações (COLEMAN, 1992, 1998; JESUS, 2001). No homem, a deficiência de zinco pode causar atraso no crescimento, problemas de fertilização, retardo na cicatrização e doenças crônicas (HOROWTTZ; DANTAS, 1976). Quando em altas concentrações, o zinco provoca a diminuição do oxigênio em peixes interferindo no crescimento e fecundidade desse organismo (MOORE; RAMAMOORTHY, 1984), podendo levar a asfixia devido a coagulação do muco existente em suas brânquias (BRANCO, 1970). Em plantas o excesso do zinco provoca a diminuição da área foliar e necrose da mesma, diminuição do crescimento das raízes e aparecimento de pigmentação pardo-avermelhado devido a interferência da absorção de fósforo e ferro pela planta (MALAVOLTA, 1980).

São muitos os trabalhos já realizados tendo o metal cobre e o zinco como contaminantes em diferentes situações, sendo vários deles associados com a análise de biocumulação e toxicidade em macrófitas aquáticas, podendo ser citado o de Vardanyan e Ingole (2006), que avaliaram o efeito de 14 metais pesados em 45 espécies de macrófitas aquáticas, compreendendo a sua importância no processo de fitorremediação; Srivastava et al.

(2006), que analisaram o potencial tóxico do cobre na macrófita aquática *Hydrilla verticillata* (Lf); Upadhyay e Panda (2009), que observaram a toxicidade de concentrações de cobre em *Pistia stratiotes*, avaliando as alterações bioquímicas e fisiológicas da planta; Monferrán et al. (2009), que avaliaram a toxicidade e bioacumulação do cobre através da macrófita *Potamogeton pusillus* L.; Domingos et al. (2005), que verificaram a influência do cobre, utilizando diferentes concentrações desse metal na solução de Sarruge et al. (1975), na atividade da pirogalol peroxidase de *Myriophyllum aquaticum*; Mishra e Tripathi (2008), que analisaram a capacidade de *Pistia stratiotes*, *Spirodela polyrrhiza* e *Eichhornia crassipes* na remoção de diferentes concentrações dos metais ferro, zinco, cobre, cromo e cádmio; Upadhyay e Panda (2010), que investigaram a toxicidade sofrida por *Spirodela polyrrhiza* L. quando exposta a soluções de cobre e zinco; Módenes, et al. (2009), que avaliaram por meio de testes cinéticos e de equilíbrio o poder de remoção do metal zinco por biomassa seca de *Egeria densa*; Wolff et al. (2009), que analisaram o grau de toxicidade para *Salvinia auriculata* quando exposta a concentrações de zinco de 0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 mg L⁻¹ para avaliar se a mesma é boa indicadora ou fitorremediadora de locais contaminados com esse metal; Mondardo et al. (2009), que observaram a eficiência de *Eichhornia crassipes* no processo de remoção dos metais cobre e zinco para utilização da mesma como bioindicadora e depuradora desses metais em biofertilizantes de origem suína, entre outros estudos.

4.3. A importância dos testes ecotoxicológicos e a utilização de plantas aquáticas como organismo-teste.

Nas últimas décadas, para se adquirir conhecimento dos efeitos de agentes químicos sobre a biota aquática, têm sido utilizados testes com vários organismos de águas continentais, estuarinas e marinhas, sob condições de campo e de laboratório, por meio dos quais tem sido verificada a toxicidade dos compostos (ARAÚJO et al., 2000). Esse conhecimento nos permite estabelecer os limites permissíveis de uso das substâncias para proteção da vida aquática e saber qual é o grau de impacto que esses produtos podem ocasionar à biota dos corpos hídricos, sendo isso possível através dos estudos ecotoxicológicos (ARAÚJO et al., 2006).

As análises ecotoxicológicas são de grande importância para o controle, regulamentação e classificação de novas substâncias tóxicas quanto ao potencial de risco ambiental (USEPA, 2002, MAGALHÃES; FILHO, 2008).

Os testes ecotoxicológicos têm como principal objetivo a verificação dos efeitos provocados a curto, médio e longo prazo, por doses letais e subletais fornecidas continua ou repetidamente, durante um determinado tempo, funcionando como um mecanismo para a compreensão dos efeitos sobre os compartimentos bióticos, utilizando para isso organismos vivos que atuam como biossensores, podendo prever antecipadamente impactos de determinado poluente sobre a biota (BRANCO, 2002).

Esses testes podem avaliar a toxicidade relativa de diversos agentes químicos para uma ou diversas espécies e sua sensibilidade ao agente tóxico (MASUTTI et al., 2006). Permitem ainda avaliar a contaminação ambiental por diversas fontes poluidoras, tais como: efluentes agrícolas, industriais e domésticos, sedimentos, medicamentos e produtos químicos em geral; assim como avaliar o resultado de seus efeitos sinérgicos e antagônicos (LOMBARDI, 2004).

Os testes ecotoxicológicos podem ser classificados em agudos ou crônicos e podem ser realizados em laboratório ou em campo (ZAGATTO, BERTOLETTI, 2008). Os testes ecotoxicológicos agudos avaliam efeitos mais severos e rápidos sofridos pelos organismos-teste, quando em contato com uma determinada substância tóxica, em um curto período de tempo (geralmente de 0 a 96 horas), sendo os parâmetros de avaliação a taxa de letalidade; determinada através do cálculo da Concentração Letal Média (CL_{50}); ou imobilidade do organismo; determinada através da Concentração Efetiva Média (CE_{50}); (RAND; PETROCELLI, 1985, 1995). Esses testes são utilizados na avaliação da qualidade da água complementando as análises físico-químicas, as quais não são suficientes para assegurar o adequado monitoramento dos tóxicos na biota aquática (ZAMBONI, 1993).

Já nos testes ecotoxicológicos crônicos, o organismo-teste é exposto a doses subletais de contaminantes de maneira contínua, durante um período maior de tempo, podendo muitas vezes não levar o organismo à morte, mas causar distúrbios comportamentais ou fisiológicos ao longo do ciclo de vida (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008; TOMITA; BEIRUTH, 2002). Os testes crônicos dependem diretamente dos resultados dos testes de toxicidade aguda, uma vez que as concentrações subletais são calculadas a partir da Concentração Letal (CL_{50}). (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Em relação ao local de realização dos testes ecotoxicológicos, estes podem ser desenvolvidos em laboratório ou em campo, sendo as vantagens e desvantagens de cada um deles bastante discutidas em relação ao método mais sensível, complexidade do teste, replicabilidade, padronização, custos, entre outros aspectos. Na realidade, as respostas obtidas em testes realizados em campo podem ser comparadas com as respostas obtidas nos testes

realizados em laboratório, e vice e versa, podendo haver, ou não, complementação entre ambos (CLEMENTS; KIFFNEY⁵, 1996 *apud* ARAGÃO; ARAÚJO, 2008).

Os testes em campo são um meio para investigar o problema da relevância ecológica reduzindo assim as incertezas associadas aos bioensaios de laboratório, representando um elo entre bioensaios de laboratório, ambiente e realidade (MOREIRA; SANTOS et al., 2004; SCHULZ; LIESS, 2001).

Em 2005, os testes ecotoxicológicos foram integrados à legislação federal sobre qualidade das águas superficiais destinadas ao abastecimento humano e à vida aquática. Os grupos utilizados nesses estudos são as algas, bactérias, peixes, invertebrados aquáticos zooplancônicos e bentônicos, macroinvertebrados (FONSECA, 1997; KARR, 1991; MELETTI, 2003) e macrófitas (OECD, 2002).

As macrófitas são muito utilizadas como biorremediadoras no tratamento de águas residuárias, indicadores de contaminação ambiental, em testes de toxicidade são mais utilizadas na verificação da ocorrência de bioacumulação como parâmetro de efeito (CERVANTES et al., 2001; MAINE et al., 2004), na avaliação de alterações celulares, inibição da fotossíntese, capacidade na mudança de respiração e inibição do crescimento. A vantagem em se utilizar macrófitas como bioindicadoras é que estas possuem alta taxa de crescimento, elevada tolerância à poluição aquática por toxicantes como os metais (BETTINELLI et al., 2002), por serem convenientes para amostragem possuindo tamanho perceptível, fáceis de realizar levantamento em laboratório (ZHOU et al., 2008), e por terem uma influência considerável sobre o destino e o comportamento de poluentes em águas superficiais (HAND et al., 2001).

Os trabalhos relacionados com os demais contaminantes que provocam diversos problemas ao meio ambiente, em especial ao meio aquático, e que utilizam macrófitas aquáticas como organismo teste, são mais frequentes. Podem ser citados, entre outros, trabalhos como o de Fairchild e Sappington (2002), que analisaram o efeito e destino do herbicida triazinon em mesocosmos, por meio de macrófita, peixe e invertebrados; Hanson et al. (2005), que estudaram a toxicidade do perfluorooctano ácido sulfônico em microcosmos, tendo como organismo bioindicador as macrófitas *Myriophyllum sibiricum* e *Myriophyllum spicatum*; Bouldin et al. (2005), que avaliaram o destino e efeito do herbicida “triazina” e do inseticida piretróide “lambda-cialotrina” em microcosmos com *Juncus effusus* e *Ludwigia*

⁵ CLEMENTS, W.H.; KIFFNEY, P.M. 1996. *Validation of whole effluent toxicity tests: integrated studies using field assessments, microcosms*. Cap.8. In: Grothe et al. *Whole Effluent toxicity testing: in evaluation of methods and prediction of receiving systems impacts*. SETAC, Pensacola, Florida. 340p.

peplóides; Belgers et al. (2007), que avaliaram o efeito tóxico do herbicida 2,4-D em nove espécies de macrófitas submersas; Mohr et al. (2007), que analisaram os efeitos tóxicos do herbicida metazachlor sobre diferentes tipos de macrófitas em dois ambientes diferentes, (lóticos e lenticos) e Belgers et al. (2009), que testaram a sensibilidade de nove espécies de macrófitas submersas na obtenção de resposta para quatro tipos de fungicidas.

As macrófitas ainda são organismos muito utilizados em testes de bioacumulação de metais como o mercúrio (COELHO-SOUZA et al., 2007; GUPTA; CHANDRA, 1998), chumbo (COSTA JÚNIOR, 2007; ESPINOZA-QUIÑONES, 2009), cádmio (MISHRA et al., 2007), cobre e zinco (PIETROBELLI, 2007), em ensaios de sensibilidade (LIMA, M., 2010; LIMA, P., 2010; MASUTTI et al., 2006; MCGREGOR et al., 2008), em biomonitoramento (RETTING et al., 1997; MAL et al., 2002; NGAYILA et al., 2007); avaliação de fitotoxicidade de antibióticos (BRAIN et al., 2004, 2005, 2006); em estudos de estrutura de comunidade (WIGAND, 2000); indicador de ambientes eutrofizados (SCHNEIDER, 2007); bioensaios de fluorescência (KUSTER; ALTENBURGER, 2007); entre outros.

Levando-se em consideração que cada ecossistema aquático possui características ambientais distintas e que a ação e o destino dos compostos químicos podem atuar de forma variada em relação a esse fato, torna-se de grande importância que esses aspectos sejam analisados na atual pesquisa. Esses aspectos são confirmados por Sprague (1985), onde o autor cita que os fatores ambientais definidos pelas características bióticas (tipo de organismo, estágio de desenvolvimento, tamanho, estado nutricional e de saúde, alterações sazonais no estado fisiológico, dentre outros) e abióticas (características físicas e químicas da água que circunda o organismo vivo, como temperatura, pH, teor de oxigênio dissolvido na água, salinidade, dureza, conteúdo de matéria orgânica, material particulado em suspensão, velocidade do fluxo da água, dentre outros) podem alterar a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático.

Guimarães (2006), avaliando as macrófitas *Azolla caroliniana*, *Salvinia minima* e *Lemna gibba* na remediação de ambientes contaminados por arsênio (As) e atrazina (herbicida inibidor do processo de fotossíntese), observou que em solução com baixa concentração de fosfato as macrófitas absorveram maior quantidade de As, mas demonstraram alta sensibilidade ao herbicida, apresentando um potencial baixo na remoção do mesmo.

Resultados semelhantes também foram obtidos por Wandt-Rasch (2004), que ao avaliar o efeito de uma mistura de pesticidas em ecossistemas aquáticos com estados tróficos diferentes, utilizando macrófitas submersas e flutuantes e comunidade de algas perifíticas como indicadores de resposta, obteve diferentes resultados entre os ecossistemas estudados,

significando que a diferença de estrutura e estado trófico são de grande importância para se conhecer o resultado real da exposição aos pesticidas, mostrando a importância da realização de estudos em diferentes tipos de ecossistemas a fim de avaliar os riscos da utilização dos mesmos.

A escolha da macrófita *Pistia stratiotes* para a realização da presente pesquisa deve-se ao fato desta espécie ser bastante utilizada em testes de toxicidade, podendo ser citado os trabalhos de Arts et al. (2008), Coors (2006), Guilizzoni (1991), Hanson (2005), Lima, M. (2010), Lima, P. (2010), Masutti (2006), Roshon (1997), Wandt-Rasch (2004), entre outros. Segundo Tarlyn et al. (1998), para estudos em fisiologia e bioquímica, a espécie *Pistia stratiotes* apresenta características morfológicas mais adequadas por se reproduzir por brotos, fato este que possibilita a utilização de plantas geneticamente idênticas para seu uso em bioensaios. Além disso, nos estudos de Maine et al. (2004), dentre todas as espécies de macrófitas estudadas, *Pistia stratiotes* foi a que apresentou o melhor desempenho, sendo escolhida para estudos mais detalhados sobre fitorremediação. Também vale ressaltar que essa espécie ocorre na maioria dos reservatórios brasileiros, durante todo o ano, sendo dessa forma de fácil acesso para realização de testes.

A macrófita *Pistia stratiotes* é uma erva aquática, da família das Araceae, de hábito flutuante livre ou semi enraizada quando se encontra em águas rasas (AMARAL et al. 2008; POTT ; POTT, 2000). Também é conhecida como alface-d'água, flor-d'água (AMARAL, op cit.), erva-de-Santa Luzia, camalotinho (POTT ; POTT, op cit.), golfo e mururé-pajé no Amazonas; pajé, no Marajó; e pasta, no Ceará. (PIO CORREA⁶, 1931 *apud* SILVA, 1981). Reproduzem-se principalmente por estolões, mas podem se reproduzir também por sementes, sendo estas dispersadas pela água. As plantas jovens priorizam o desenvolvimento de folhas, enquanto as adultas priorizam a produção de estolões (SILVA, op cit.), aumentando sua biomassa consideravelmente durante o período de seca, pois nessa época há uma concentração maior de matéria orgânica e nutrientes na água, e necessitam de muita luz. Alterações antropogênicas, tais como a eutrofização e o aquecimento global, podem promover seu crescimento e provocar a expansão de sua área de distribuição (LORENZI, 2000). Possui origem pantropical ou desconhecida, sendo cosmopolita tropical e subtropical, ocorrendo em margens de rios e lagos em todo o Brasil e nas regiões que percorrem o sul dos Estados Unidos à Argentina (AMARAL et al., 2008; POTT ; POTT, 2000).

⁶ PIO CORREA, M. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro. Ministério da Agricultura. Serviço de informação agrícola, v.3, p.234-236, 1931.

A espécie *Azolla filiculoides* foi escolhida pelo fato de ser muito utilizada em testes de bioacumulação e tolerar altas concentrações de fósforo, uma vez que o intuito da pesquisa com essa planta foi avaliar a capacidade bioacumuladora para utilização da mesma como ferramenta na despoluição de efluentes com altas concentrações de metais e fósforo.

O gênero *Azolla* pertence à família Azollaceae, sendo representado por ervas aquáticas de hábito flutuante livre, de pequeno porte (de 2,0 a 2,5cm) e coloração que pode variar de verde a vermelha e parda, dependendo do seu tempo de vida e influência de fatores ambientais. Ocorrem normalmente em lagos e valas de água doce ou em rios com pouca correnteza, com solos argilosos ou arenosos férteis de regiões quentes, tropicais ou temperadas, sendo o fósforo e a intensidade luminosa um dos fatores limitantes de seu crescimento, podendo duplicar sua biomassa a cada 3 ou 6 dias (POTT; POTT, 2000; SCUNTHORPE, 1967). Dentro desse gênero existem várias espécies que se distribuem em diferentes regiões. *Azolla filiculoides* é originária da América do Sul (POTT; POTT, op cit.), porém hoje encontra-se distribuída do sul da América do Sul estendendo-se pela América do Norte e Alasca. Segundo Scunthorpe (1967), antigamente essa espécie era nativa da Europa sendo extinta durante a última era glacial e reintroduzida no século 19 como planta ornamental, se espalhando mais tarde como planta invasora (THE AZOLLA FOUNDATION, 2013). Podem se reproduzir de forma sexuada, mas a reprodução assexuada é mais frequente, ocorrendo por fragmentação e crescimento dos caules (CARRAPIÇO, 2001).

Devido à associação simbiótica entre essa macrófita e a cianobactéria *Anabaena azollae*, todo o nitrogênio atmosférico fixado pela cianobactéria é disponibilizado para o crescimento da *Azolla*, tornando-a muito utilizada como adubo verde em arrozais, purificadoras de águas contaminadas (POTT; POTT, 2000), além de servirem como alimentação para organismos aquáticos, peixes, aves, bovinos e suínos, pois são ricas em proteínas, aminoácidos, vitaminas (vitamina A, vitamina B12, beta-caroteno), sais minerais como o cálcio, fósforo, potássio, ferro, cobre, magnésio, etc. (CARRAPIÇO, 2006; PILLAI et al., 2002).

Muitos estudos já foram realizados com as várias espécies de *Azolla* existentes em diferentes enfoques, tais como bioacumulação de metais (ZHAO, et al., 1999; BENAROYA et al., 2004; BENNICELLI, et al., 2004; ADALBERTO et al., 2004; GUIMARÃES, 2006; KHELLAF; ZERDAOUI, 2009), bioadsorção e dessorção (BARROS, 2012), produção de biogás (JAIN et al., 1991), toxicidade (CARVALHO; LOPES, 1994, LAHIVE et al., 2011; SELA et al., 1989; SILVA et al., 2012; SOUZA et al., 2009), aspectos biológicos, fisiológicos e ecológicos (LUMPKIN; PLUCKNETT, 1980; TRINDADE, 2011), entre outros. Porém,

pouco se sabe sobre os efeitos que os metais cobre e zinco podem causar sobre o desenvolvimento e capacidade bioacumuladora de *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides* quando estes se encontram em ambientes aquáticos com diferentes concentrações de fósforo.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida com duas diferentes abordagens, porém todas com o mesmo enfoque: o problema de contaminação de corpos d'água pela entrada excessiva de nutrientes e metais, bem como a busca por maior conhecimento sobre aspectos fisiológicos e de desenvolvimento de macrófitas aquáticas para utilização das mesmas como ferramenta na descontaminação de ambientes aquáticos poluídos. Sendo assim as seguintes abordagens de pesquisa foram desenvolvidas:

Abordagem 1 – Realização de teste ecotoxicológico em laboratório, para avaliação do efeito do metal cobre sobre o desenvolvimento da macrófita aquática *Pistia stratiotes* levando-se em consideração concentrações diferenciadas de fósforo, simulando ambientes aquáticos eutrofizados. Nesse teste foram avaliados parâmetros de crescimento, pigmentação e assimilação de nutrientes e cobre por *P. stratiotes*.

Abordagem 2 – Realização de dois testes individuais de bioacumulação, sendo um com o metal cobre e outro com zinco, ambos em combinação com três concentrações diferenciadas de fósforo, simulando efluentes com elevada concentração de nutrientes e utilizando como organismo-teste a macrófita aquática *Azolla filiculoides*. Nesses testes foram avaliadas a capacidade de *A. filiculoides* bioacumular os metais e a possível existência de interferência dos diferentes meios nutricionais nesse processo de bioacumulação, além de observação de mudanças de aspectos de desenvolvimento da macrófita em questão, tais como ganho de biomassa, taxa de crescimento relativo, alteração na concentração de clorofila *a* e total e mudanças visuais na pigmentação das folhas. Esses ensaios foram executados na Universidad de Sevilla - Espanha, sob supervisão da Prof^a Dr^a Susana Redondo Gómez, e fizeram parte da minha pesquisa de doutorado-sanduiche realizada de março a junho de 2012.

ABORDAGEM 1 - Avaliação dos efeitos do metal cobre no desenvolvimento da macrófita aquática *P. stratiotes* em diferentes concentrações de fósforo.

5.1. Cultivo do organismo teste

Os testes de toxicidade foram conduzidos no Núcleo de Estudos em Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), do Centro de Ciências da Engenharia Aplicada ao Meio Ambiente (CCEAMA), pertencente à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP), localizado no município de Itirapina, São Paulo, Brasil.

Foi utilizado como organismo teste a macrófita aquática flutuante *Pistia stratiotes*, sendo as plantas matrizes coletadas no reservatório do Lobo (Itirapina, São Paulo, Brasil) e cultivadas nas dependências do CCEAMA, em caixas d'água com capacidade de 1000 L, onde foram adicionados 45L de terra vegetal e 400g de adubo (N:P:K, na proporção de 4:14:8), diluídos em aproximadamente 800L de água de torneira, mantendo-se os valores de pH em torno de 6,0 (LIMA, P., 2010).

5.2. Delineamento experimental

As macrófitas utilizadas no teste de toxicidade foram selecionadas nas caixas de cultivo mediante semelhança entre tamanho e número de folhas, procurando manter um padrão entre os indivíduos selecionados. Por isso, indivíduos que apresentavam de 3 a 4 cm de altura e entre 4 e 5 folhas foram levados para o laboratório de ecotoxicologia e lavados em água de torneira para retirada de quaisquer organismos (adaptado de MASUTTI, 2004), sendo aclimatados em recipientes de polietileno contendo solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a 10%, sob temperatura de $26^{\circ}\text{C} \pm 2$ e irradiância de 7.000 lux fornecida por lâmpadas fluorescentes branco frio, em fotoperíodo de 12 hrs claro/12hrs escuro, durante 72 horas (LIMA, P., 2010).

Após as 72 horas de aclimação, a menor folha de cada macrófita foi marcada, amarrando-se em sua porção basal um fio de linha de algodão com numeração, para que todos os parâmetros analisados no início do experimento fossem comparados com exatidão no final. Previamente à realização dos testes, a biometria das plantas foram determinadas e as raízes retiradas por completo, seguindo a mesma metodologia utilizada em testes com *Lemna* sp. (USEPA, 1996), adaptada por MASUTTI (2004).

O teste ocorreu no mesmo laboratório e com as mesmas características de temperatura e fotoperíodo da aclimação. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado,

estático, todos em triplicata, inclusive os controles de cada tratamento (Figura 1), sendo cinco indivíduos de *P. stratiotes* colocados aleatoriamente em cada um dos 18 recipientes de polietileno com capacidade para 10 litros, contendo cada um deles 6 litros de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a 10% e livre do composto fósforo.

O fósforo foi adicionado separadamente através de alíquotas diferenciadas (1,07ml; 2,75ml; 6,89ml) de uma solução matriz composta por 0,5g de fosfato de amônio monobásico ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) diluído em 1 litro de água Milli-Q, para simulação dos diferentes meios eutrofizados (55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo total), sendo esses valores elegidos com base na tabela de classificação do índice de estado trófico para águas de reservatórios utilizada pela CETESB (2010). A contaminação pelo metal cobre ocorreu através da adição de alíquota de 4,23 ml de uma solução matriz composta por 0,039g de sulfato de cobre penta-hidratado ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$) diluído em 100ml de água Milli-Q, simulando uma concentração de 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre que, juntamente com os 3 $\mu\text{g L}^{-1}$ já existente nos recipientes-teste devido a composição da solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) a 10%, totalizou uma concentração de 73 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre. Este valor foi elegido, baseado em uma média das concentrações máximas encontradas para cobre total em alguns reservatórios brasileiros listados no Relatório de Águas Superficiais do Estado de São Paulo (CETESB, 2010).

O teste teve duração de 10 dias, o qual foi definido quando 50% dos exemplares de *Pistia stratiotes* apresentaram os primeiros brotos, entrando em estágio de reprodução.

Figura 1. Delineamento experimental do teste de toxicidade com *Pistia stratiotes* e cobre.

5.3. Avaliação dos parâmetros físicos e químicos da água

Amostras de 50 ml da água de cada recipiente-teste foram coletadas em copos plásticos descartáveis, no início do experimento (após 1 hora da contaminação) e no final (10

dias depois), sendo avaliadas quanto ao pH (potenciômetro B374), temperatura e oxigênio dissolvido (medidor de O.D. YSI) e condutividade (condutivímetro 145A).

5.4. Avaliação nutricional e biológica da água

Amostras de 200ml de água de cada recipiente-teste foram coletadas no início e final do experimento, acondicionadas em frascos de polietileno, previamente lavados com HNO_3 a 10%, e congeladas para posterior análise da concentração de nitrogênio orgânico total e fósforo total (APHA, 1995), sendo os resultados expressos em mg L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Para a análise de nutrientes dissolvidos, tais como nitrito e nitrato (MACHERETH et al., 1978), íon amônio (KOROLEFF, 1976), fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico dissolvido (APHA, 1995), foram coletadas outras amostras de 200ml de água de cada recipiente-teste, sendo estes volumes filtrados logo após a coleta, em duplicata, em filtros de fibra de vidro GF/C com abertura de $0,45\mu\text{m}$, sendo o filtrado acondicionado em frascos de polietileno e congelados para posterior análise, sendo os resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para avaliação de cobre total, amostras de 200ml foram coletadas e acidificadas com 0,3ml de HNO_3 para preservação, as quais foram mantidas refrigeradas até o dia da análise, quando foram submetidas ao procedimento de abertura de metais descrito em APHA (1995), e quantificados através de leitura em espectrofotômetro de absorção atômica de chama e/ou forno de grafite (Varian AA 220), sendo os resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Para análise de cobre biodisponível, as amostras de água foram filtradas em filtros de acetato de celulose de $0,4\mu\text{m}$ previamente lavados em ácido nítrico a 30%, sendo o filtrado também acidificado com 0,3ml de HNO_3 e refrigerado até o dia da análise, quando foram lidos diretamente em espectrofotômetro de absorção atômica de chama e/ou forno de grafite (Varian AA 220) conforme APHA (1995), sendo os resultados expressos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

As concentrações de nutrientes totais, dissolvidos e metais totais e biodisponível foram determinadas por espectrofotometria e todas acompanhadas por branco. Para cobre total o limite de detecção da leitura foi de $0,0005 \mu\text{g L}^{-1}$ e o de quantificação foi de $0,0016 \mu\text{g L}^{-1}$. Para cobre biodisponível o limite de detecção da leitura foi de $0,0004 \mu\text{g L}^{-1}$ e o de quantificação foi de $0,0013 \mu\text{g L}^{-1}$.

Os respectivos filtros utilizados na filtração de nutrientes totais foram guardados em envelopes devidamente identificados e acondicionados em frasco escuro contendo sílica e

mantidos em freezer com temperatura abaixo de 0°C até o momento de extração da clorofila *a*.

A extração da clorofila *a* foi realizada em sala escura, segundo o método de NUSCH (1980), utilizando etanol a 80% e técnica do choque térmico, sendo as absorbâncias lidas nos comprimentos de onda de 665 nm e 750 nm por espectrofotometria (espectrofotômetro Micronal B280). Os valores de clorofila foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Chl } a = (27,9 \times (A_{665} - A_{750}) \times v / V \times I)$$

onde:

27,9 = coeficiente de absorção da clorofila

A = absorbância da amostra não acidificada

v = volume do etanol (em ml)

V = volume da amostra filtrada (em L)

I = percurso óptico da cubeta (em cm)

OBS: Todos os resultados de nutrientes totais e dissolvidos, cobre total e dissolvido e clorofila *a* obtidos nesse subitem, encontram-se disponíveis em Anexo.

5.5. Avaliação nutricional e biológica de *P. stratiotes*

5.5.1. Preparação da macrófita para as diferentes análises

Para avaliar as diferenças nutricionais e a capacidade bioacumuladora do organismo-teste, um lote de *P. stratiotes* proveniente das bandejas de aclimação, que não foi utilizado na montagem dos experimentos, foi coletado no mesmo dia do início do experimento e serviu como valor inicial para comparação das concentrações de nitrogênio, fósforo, cobre total, clorofila *a*, *b* e total da biomassa das amostras finais de cada tratamento, incluindo o controle.

Para observação da concentração de nitrogênio total, fósforo total e cobre total, a biomassa final de cada tratamento e do lote inicial foram acondicionadas em sacos de papel devidamente identificadas e secas em estufa a 65°C por aproximadamente 48 horas (até peso constante). Em seguida a moagem dessa biomassa seca foi feita em moinho tipo Willey (modelo TE340), com peneira de 0,5 mm, acondicionadas em sacos de papel devidamente identificados e guardados em dessecadores de vidro com sílica, no laboratório, até o dia da análise.

Para análise de clorofila *a* e total, amostras de 0,1g da porção mediana das folhas frescas de *P. stratiotes*, do lote inicial e de cada tratamento, foram pesadas em triplicatas e acondicionadas em sacos plásticos identificados, sendo estes guardados em vidro escuro contendo sílica e armazenados em freezer com temperatura abaixo de 0°C.

Todos os procedimentos de análise de nutrientes e metais da biomassa do organismo-teste foram acompanhados por brancos.

5.5.2. Concentração de nitrogênio e fósforo total em biomassa de *P. stratiotes*

Para avaliar a concentração de nitrogênio orgânico total, 0,3g de biomassa seca e moída da macrófita foi analisada através de processos de digestão com H₂SO₄ em bloco digestor, seguido por destilação e titulação com ácido sulfúrico a 0,05N, conforme metodologia de Esteves e Camargo (1982), sendo os valores expressos em porcentagem.

Para analisar a concentração de fósforo total seguiu-se a metodologia de Andersen (1976), que consiste basicamente no aquecimento em mufla de 0,2g de biomassa seca e moída da macrófita, digestão em chapa com HCl 1N seguida de adição de reagente misto e leitura em comprimento de onda de 880nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2101 PC – UV – VIS Scanning), sendo os valores expressos em µg.g⁻¹.

5.5.3. Concentração de cobre total em biomassa de *P. stratiotes*

A análise de cobre total foi feita por digestão ácida (HNO₃ e H₂O₂), utilizando 0,3g de biomassa seca e moída, conforme APHA (1995). As amostras, inclusive as triplicatas de brancos, foram lidas em espectrofotômetro de absorção atômica, sendo a concentração final expressa em µg g⁻¹ de peso seco. O limite de detecção foi de 0,0005 µg L⁻¹ e o de quantificação de 0,0016 µg L⁻¹.

5.5.4. Concentração de Clorofila *a* e total em *P. stratiotes*

Para análise de clorofila-*a* e total foram pesadas amostras de 0,25g da porção mediana das folhas de *P. stratiotes* de cada tratamento, embaladas individualmente e congeladas em freezer com temperatura abaixo de 0°C. A clorofila desse material foi extraída por maceração com acetona a 80% e uma pitada de carbonato de magnésio, conforme metodologia de Lichtenthaler (1987). As concentrações de clorofila *a* e total foram lidas imediatamente após a maceração, em espectrofotômetro (Micronal B280), nos comprimentos de onda 646,8 nm e

663,2 nm, sendo os valores de leitura substituídos na fórmula descrita abaixo, para obtenção do resultado em $\mu\text{g g}^{-1}$ pf (peso fresco):

$$\text{Chl } a = ((12,25 \times A_{663,2}) - (2,79 \times A_{646,8})) / v / \text{pf}$$

$$\text{Chl total} = ((18,71 \times A_{646,8}) + (7,15 \times A_{663,2})) / v / \text{pf}$$

onde:

A = absorbância

v = volume do solvente utilizado (mL)

pf = peso fresco da amostra vegetal (g)

OBS.: O uso do carbonato de magnésio durante a maceração serviu para neutralizar possível acidificação provocada pelo rompimento de compartimentos celulares tais como vacúolo, cloroplastos, mitocôndrias, etc, que possuem pH mais ácido do que o da célula, podendo haver dessa maneira degradação da clorofila e subestimação dos valores.

5.6. Avaliação do desenvolvimento de *P. stratiotes*

Após os 10 dias de observação as macrófitas foram retiradas dos recipientes-teste, colocadas sobre papel absorvente para retirada do excesso de água por aproximadamente 5min e então as medidas biométricas finais de cada planta foram tomadas, com a finalidade de se comparar com as medidas iniciais.

Os parâmetros avaliados foram: ganho de biomassa, ganho de diâmetro da roseta, número de folhas nascidas, ganho de altura e largura da folha marcada, número de raízes nascidas, comprimento da raiz principal (ODJEB; FASIDI, 2004), número de brotos nascidos, número de folhas com clorose (visualização) e número de folhas com necrose (visualização), seguindo metodologia modificada para testes com *Lemna* (USEPA, 1996) e adaptada por Masutti (2004). Todos esses parâmetros foram observados no início e final do experimento, com exceção do número de raízes nascidas, comprimento da raiz e aspectos de clorose e necrose, que só puderam ser avaliados no final.

Também foi avaliada a taxa de crescimento relativo (TCR), a qual expressa o incremento da biomassa seca/fresca por unidade de peso inicial, em um intervalo de tempo,

segundo Causton (1994), utilizando a seguinte fórmula para valores médios, sendo o resultado expresso em ($\text{g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$):

$$\text{TCR} = \frac{(\ln M2 - \ln M1)}{(t2 - t1)}$$

onde:

$\ln$ = logaritmo neperiano

$M1$ e $M2$ = massa da planta

$t1$ e $t2$ = tempo inicial e final, respectivamente

5.7. Análise estatística dos dados

As variáveis medidas referentes às análises na água (nitrito, nitrato, amônio, nitrogênio orgânico total, fósforo total, fosfato total dissolvido, fosfato inorgânico dissolvido, cobre total, cobre dissolvido e clorofila *a*), em *Pistia stratiotes* (nitrogênio total, fósforo total, cobre total, clorofila *a* e clorofila total) e às análises fisiológicas (biomassa, taxa de crescimento relativo, número de folhas, diâmetro, altura e largura da folha, número de raízes nascidas, comprimento da raiz, número de brotos, número de folhas com clorose e número de folhas com necrose) foram analisadas para a normalidade (teste do chi-quadrado) e para a homogeneidade (teste de Bartlett) de suas distribuições.

Em seguida dois tipos de análises estatísticas foram realizadas nesse experimento. No primeiro tipo de análise estatística, as variáveis medidas para a concentração nominal do cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) foram comparadas com o controle para uma mesma concentração nominal de fósforo total, sendo os dados considerados normais analisados pelo teste *t* (t-Student) e os dados não normais analisados pelo teste Mann-Whitney.

No segundo tipo de análise estatística, as variáveis medidas para as diferentes concentrações nominais de fósforo total (55 , 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$) foram comparadas entre si para a mesma concentração de cobre, utilizando a ANOVA (One-way analysis variance) seguido pelo teste de Tukey quando diferenças significativas foram encontradas nos dados. Quando os dados não foram normais, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado e as comparações múltiplas foram feitas com o método de Dunnet.

Em todos os testes estatísticos, a significância foi aceita quando $p \leq 0.05$. O programa utilizado foi SigmaPlot versão 10.0 (Systat, 2006).

As diferentes combinações de fósforo e cobre e as variáveis medidas foram também analisadas por PCA (Principal Component Analysis). Os pesos (loadings) foram especificados para o primeiro (CP1) e segundo (CP2) componentes principais. O programa utilizado foi o PAST versão 3.01 (HAMMER et al., 2013).

ABORDAGEM 2 – Avaliação da capacidade bioacumuladora de cobre e zinco por *Azolla filiculoides* em diferentes concentrações de fósforo.

5.8. Cultivo do organismo-teste

Para esse experimento foi utilizado como organismo-teste a macrófita aquática *Azolla filiculoides*, sendo estas adquiridas em uma casa de plantas ornamentais em Sevilla, Espanha. As macrófitas foram aclimatadas em casa de vegetação pertencente a Universidad de Sevilla durante três dias, em bandejas de polietileno contendo solução de Hoagland e Arnon a 30%, com temperatura ambiente de $21,5 \pm 3,5$ °C, fotoperíodo de 14hrs claro/10hrs escuro e intensidade luminosa de $1856'1 \pm 101'4$ lux.

5.9. Delineamento experimental

Após três dias de aclimação foram iniciados dois experimentos em paralelo, no mesmo local e com as mesmas características ambientais da aclimação, tendo ambos o intuito de analisar a capacidade bioacumuladora de cobre e zinco pela macrófita *Azolla filiculoides* quando estas foram expostas a diferentes concentrações de fósforo e assim observar as possíveis alterações em seu desenvolvimento.

As macrófitas foram retiradas das caixas de aclimação, lavadas com água destilada para remoção de sedimento e matéria orgânica de suas raízes e colocadas em papel absorvente por aproximadamente 5min para retirada do excesso de água. Após esse procedimento porções de 4g de *A. filiculoides* foram pesadas e distribuídas em bandejas de polietileno (24,5 x 17,0 x 6,0cm) com capacidade para 2 litros, contendo cada uma delas 1,5 litros da solução teste (solução de Hoagland e Arnon a 30%, sem adição do composto fósforo).

No teste com o metal cobre (Figura 2), foram adicionadas nas bandejas quatro concentrações nominais do metal cobre (0; 0,07; 1,3 e 12,7mg L⁻¹); sendo estas concentrações adquiridas pela adição de 0; 1,0; 18,57 e 181,43ml de uma solução matriz composta por 0,8244g de sulfato de cobre penta-hidratado (CuSO₄.5H₂O) juntamente com 0,3116g de

EDTA, dissolvidos em 2L de água deionizada; e três concentrações nominais de fósforo total (3; 15 e 46 mg L⁻¹); sendo estas concentrações obtidas pela adição de 1,0; 5,0 e 15,33 ml de uma solução matriz composta por 16,69 g de fosfato de amônio monobásico (NH₄.H₂PO₄) diluído em 1 litro de água deionizada. Os controles foram considerados ter 0 mgL⁻¹ de cobre uma vez que não foi adicionado esse metal nas respectivas bandejas.

Os valores escolhidos para cobre foram baseados na média das concentrações máximas encontradas em reservatórios brasileiro (0,073 mg L⁻¹) (CETESB, 2010), concentração máxima permitida para lançamento de efluentes (1 mg L⁻¹), segundo Resolução CONAMA 357/05 (CONAMA, 2010) e extrapolação dessa concentração em 12 vezes. As concentrações de fósforo elegidas para os experimentos foram baseadas em concentrações médias e máximas encontradas em efluentes domésticos, industriais e de aquicultura (CONAMA, 2010; Von Sperling, 2005) e concentrações utilizadas em pesquisa com *Azolla* (10⁻⁷ e 10⁻³ mol L⁻¹ de fosfato) (ADALBERTO, et al., 2004).

Para o teste com o metal zinco (Figura 3), foram aplicadas as mesmas concentrações de fósforo utilizadas no teste com cobre e quatro concentrações nominais do metal zinco (0; 5; 10 e 20mg L⁻¹) sob a forma de sulfato de zinco hepta-hidratado (ZnSO₄.7H₂O), sendo estas concentrações obtidas através da adição de 0; 1; 2 e 4ml da solução matriz composta por 9,8970g de ZnSO₄.7H₂O + 2,9048g de EDTA + 300ml de água deionizada). Tais valores elegidos para zinco foram baseados no valor máximo aceito em lançamento de efluentes (5 mg L⁻¹) conforme Resolução CONAMA 357/05 (CONAMA, 2010) e extrapolações apartir da referida concentração.

Os testes tiveram duração de 14 dias, ocorrendo simultaneamente e possuindo um delineamento experimental totalmente ao acaso com 3 repetições.

Figura 2. Delineamento experimental do teste de bioacumulação com *Azolla filiculoides* e cobre.

Figura 3. Delineamento experimental do teste de bioacumulação com *Azolla filiculoides* e zinco.

5.10. Avaliação dos parâmetros físicos e químicos da água

As amostras de água foram avaliadas no início do experimento (após contaminação) e no final (14 dias depois) quanto ao pH (medidor portátil – Crison pH/mV p-506, Spain), temperatura e oxigênio dissolvido (medidor de O.D. YSI 550A) e condutividade (condutivímetro Crison-522, Spain).

5.11. Avaliação nutricional e biológica da água

Amostras de 50ml de água de cada recipiente teste foram coletadas no início do experimento (após contaminação) e no final (14 dias depois), acondicionadas em frascos plásticos limpos e congeladas em freezer com temperatura abaixo de 0°C. Posteriormente essas amostras foram enviadas para análise de fósforo total, cobre total e zinco total no CSIC – Consejo Superior de Investigaciones Científicas - Centro de Edafologia e Biología Aplicada del Segura, onde foram analisadas por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-OES ICAP 6500 DUO/IRIS INTREPID II XDL), sendo os valores expressos em mg L⁻¹.

OBS: Todos os resultados de fósforo total, cobre total e zinco total da água obtidos nesse subitem, encontram-se disponíveis em Anexo.

5.12. Avaliação nutricional e biológica de *A. filiculoides*

5.12.1 Preparação da macrófita para as diferentes análises

Para avaliar a capacidade bioacumuladora de *A. filiculoides*, amostras de biomassa fresca provenientes das caixas de aclimação que não foram utilizadas na montagem dos experimentos, foram coletadas no mesmo dia do início do experimento e serviram como parâmetro inicial para comparação com a biomassa final das macrófitas de cada tratamento, em relação à concentração de nitrogênio, fósforo, cobre e zinco total.

Depois de 14 dias de observação os exemplares de *A. filiculoides* foram retirados das bandejas de teste e colocados em papel absorvente por 5min para escoamento do excesso de água; como feito no início do experimento; pesados e separados em saquinhos de papel devidamente etiquetados, para posterior análise de nutrientes e metais, e em saquinhos plásticos envoltos com papel alumínio identificados, para posterior análise de clorofila *a* e total.

5.12.2. Concentração de nitrogênio, fósforo, cobre e zinco em biomassa de *A. filiculoides*

Para a realização de análise da concentração de nitrogênio, fósforo, cobre e zinco total em biomassa de *A. filiculoides*, as amostras acondicionadas em saquinhos de papel foram levadas para secagem em estufa, com circulação de ar forçada (Binder - FED), a 70°C por 48 horas. Após esse período, as macrófitas depois de frias foram trituradas em moedor (Moulinex A505) e acondicionadas em frascos plásticos com tampa, devidamente identificados e enviados para análise no CSIC – Consejo Superior de Investigaciones Cientificas - Centro de Edafologia y Biología Aplicada del Segura.

A concentração de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides* foi determinada por biomassa seca não digerida através de um Analizador Elemental C/N (FLASH EA 1112 SERIES-LECO TRUSPEC), sendo os valores expressos em g 100g⁻¹.

Para determinação das concentrações de fósforo total, cobre e zinco total, uma alíquota de 0,5g do material seco e moído foi digerido com 6ml HNO₃, 0,5 ml de HF, e 1 ml de H₂O₂ e analisado por espectrometria de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplado - ICP- OES (ICAP 6500 DUO/IRIS INTREPID II XDL), sendo os valores de fósforo expressos em g 100g⁻¹ e os de cobre e zinco em mg Kg⁻¹.

5.12.3. Concentração de clorofila *a* e total em *A. filiculoides*

Para análise de clorofila *a* e total, amostras de 0,10 g de biomassa fresca de *A. filiculoides* (folhas + raíz) pesadas em triplicatas e acondicionadas em sacos plásticos, foram armazenadas em freezer com temperatura abaixo de 0°C.

No dia da análise, cada amostra foi macerada com 10ml de acetona a 80%, seguindo metodologia proposta por Lichtenthaler (1987), junto com uma pitada de carbonato de magnésio. As concentrações de clorofila foram lidas imediatamente após a maceração, em espectrofotômetro (Hitachi U- 2000, Japan) com limite de detecção de 0,1 µg L⁻¹ para essa variável, nos comprimentos de onda 663,2 nm e 646,8 nm, sendo os valores de leitura substituídos na fórmula descrita a seguir, para obtenção do resultado em µg g⁻¹ pf (peso fresco):

$$\text{Chl } a = ((12,25 \times A_{663,2}) - (2,79 \times A_{646,8})) / v / \text{pf}$$

$$\text{Chl total} = ((18,71 \times A_{646,8}) + (7,15 \times A_{663,2})) / v / \text{pf}$$

Onde:

A = absorvância

v = volume do solvente utilizado (mL)

pf = peso fresco da amostra vegetal (g)

5.13. Avaliação do desenvolvimento de *A. filiculoides*

5.13.1. Ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides*

Após os 14 dias de observação e término do experimento, medidas do peso final da biomassa de *A. filiculoides* de cada tratamento, inclusive os controles, foram retomadas para comparação com os valores de biomassa iniciais, com a finalidade de observar possível interferência causada pelos metais cobre e zinco sobre o crescimento da macrófita em questão. Além disso a taxa de crescimento relativo foi calculada, sendo esse parâmetro analisados através da fórmula já descrita no subitem 5.6.

5.14. Análise estatística dos dados

Todas as variáveis analisadas na água (fósforo total e cobre ou zinco total) e em *A. filiculoides* (Ganho de biomassa, taxa de crescimento relativo, nitrogênio total, fósforo total, cobre e zinco total e concentrações de clorofila *a* e total) foram primeiro analisadas para a normalidade (teste do chi-quadrado) e para a homogeneidade (teste de Bartlett) de suas distribuições.

Em seguida dois tipos de análises estatísticas foram realizadas. No primeiro tipo de análise, as variáveis medidas para as diferentes concentrações nominais do metal cobre (0,07; 1,3 e 12,7 mg L⁻¹) e do metal zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) foram comparadas com o controle para uma mesma concentração nominal de fósforo total, aplicando-se a ANOVA (one-way analysis of variance) seguido pelo teste de Dunnett para os dados considerados normais e para os dados considerados não normais foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis.

No segundo tipo de análise estatística, as variáveis medidas para as diferentes concentrações nominais de fósforo total (3; 15 e 46 mg L⁻¹), para uma mesma concentração de

metal (cobre ou zinco), foram comparadas entre si através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey quando diferenças significativas foram encontradas nos dados. Para os dados considerados não normais foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis e as comparações múltiplas foram feitas através do teste de Dunnett.

Em todos os testes estatísticos, a significância foi aceita quando $p \leq 0,05$. O programa utilizado foi SigmaPlot versão 10.0 (Systat, 2006).

As diferentes combinações de fósforo e cobre e de fósforo e zinco e as variáveis medidas foram também analisadas por PCA (principal component analysis). Os pesos (loadings) foram especificados para as primeira (CP1) e segunda (CP2) componentes principais. O programa utilizado foi o PAST versão 3.01 (Hammer et al., 2013).

6. RESULTADOS

Abordagem 1 – Avaliação dos efeitos do metal cobre no desenvolvimento da macrófita aquática *P. stratiotes* em diferentes concentrações de fósforo.

6.1. Variáveis físicas e químicas da água

Na tabela 1 estão apresentados os resultados das variáveis físicas e químicas analisadas na água (meio experimental) no início (no 1º dia, 1 hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final do experimento (10º dia).

Para temperatura registrou-se mínima de 22,43°C no tratamento Cu73 P(55) e máxima de 22,63°C no controle P(130) e seu tratamento, com redução para 21,47°C no tratamento Cu73 P(70) e máxima de 21,80°C no tratamento Cu73 P(130). O valor médio mínimo de pH foi de 5,43 no controle P(55) e máximo de 5,55 no controle P(130) e seu tratamento, com redução nos valores finais (média mínima de 4,49 no controle P(55) e máxima de 5,68 no tratamento Cu73 P(130)). Para a condutividade verificou-se média mínima de 221 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no tratamento Cu73 P(55) e máxima de 230,33 $\mu\text{S cm}^{-1}$ nos controles P(55) e P(130), ocorrendo aumento em todos os valores finais, com média mínima de 257,33 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no controle P(70) e máxima de 322,67 no tratamento Cu73 P(70). Quanto ao oxigênio dissolvido, as médias mínimas iniciais foram de 7,58 mgL^{-1} no controle P(55) e máxima de 7,71 mgL^{-1} no controle P(130) e seu tratamento com cobre, apresentando médias finais semelhantes às iniciais, com mínima de 7,35 mgL^{-1} no tratamento Cu73 P(130) e máxima de 7,54 mgL^{-1} nos tratamentos Cu73 P(55) e P(70).

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis físicas e químicas obtidas na água (meio experimental) no ensaio com *P. stratiotes*, cobre e fósforo, medidos no início (1º dia) e no final do experimento (10º dia). C = controle, P (55, 70 e 130) = tratamento com 55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo total; Cu (73) = tratamento com 73 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cobre total.

Tratamentos	1º dia	10º dia	1º dia	10º dia
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		pH	
C P(55)	22,50 ($\pm 0,10$)	21,50 ($\pm 0,10$)	5,43 ($\pm 0,06$)	4,49 ($\pm 0,09$)
Cu73 P(55)	22,43 ($\pm 0,06$)	21,53 ($\pm 0,06$)	5,46 ($\pm 0,02$)	5,61 ($\pm 0,37$)
C P(70)	22,57 ($\pm 0,12$)	21,50 ($\pm 0,10$)	5,44 ($\pm 0,05$)	4,54 ($\pm 0,06$)
Cu73 P(70)	22,47 ($\pm 0,06$)	21,47 ($\pm 0,06$)	5,44 ($\pm 0,01$)	5,54 ($\pm 0,26$)
C P(130)	22,63 ($\pm 0,06$)	21,67 ($\pm 0,12$)	5,55 ($\pm 0,01$)	4,87 ($\pm 0,17$)
Cu 73 P(130)	22,63 ($\pm 0,06$)	21,80 ($\pm 0,10$)	5,55 ($\pm 0,01$)	5,68 ($\pm 0,20$)
	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	
C P(55)	230,33 ($\pm 1,15$)	285,00 ($\pm 6,56$)	7,58 ($\pm 0,12$)	7,36 ($\pm 0,05$)
Cu73 P(55)	221,00 ($\pm 1,00$)	319,33 ($\pm 30,27$)	7,64 ($\pm 0,01$)	7,54 ($\pm 0,06$)
C P(70)	226,33 ($\pm 5,51$)	257,33 ($\pm 16,29$)	7,60 ($\pm 0,08$)	7,48 ($\pm 0,03$)
Cu73 P(70)	223,00 ($\pm 4,36$)	322,67 ($\pm 40,02$)	7,62 ($\pm 0,02$)	7,54 ($\pm 0,03$)
C P(130)	230,33 ($\pm 1,15$)	273,00 ($\pm 4,36$)	7,71 ($\pm 0,02$)	7,45 ($\pm 0,07$)
Cu73 P(130)	227,67 ($\pm 5,51$)	319,00 ($\pm 10,15$)	7,71 ($\pm 0,03$)	7,35 ($\pm 0,08$)

6.2. Avaliação nutricional e biológica de *P. stratiotes*

6.2.1. Concentração de nitrogênio e fósforo total em biomassa de *P. stratiotes*

Após 10 dias de exposição ao tratamento com cobre nas diferentes concentrações de fósforo, verificou-se redução significativa na concentração de nitrogênio total em *P. stratiotes* quando foi exposta ao cobre nos tratamentos de fósforo P(55); com médias de 18,69% no controle e de 1,67% no tratamento ($t = 10,277$, $p < 0,001$); e em P(70); apresentando médias de 16,80% no controle e 8,74% no tratamento ($t = 3,252$, $p = 0,031$). No tratamento P(130), pode ser observada uma tendência de redução de concentração do nitrogênio total entre controle e tratamento com cobre, porém estatisticamente essa diferença não foi significativa ($t = 1,508$, $p = 0,206$). Em relação aos diferentes tratamentos com fósforo, pode ser observado um aumento significativo de nitrogênio total em *P. stratiotes* nos tratamentos com cobre nas duas maiores concentrações de fósforo testadas, apresentando valores médios de 8,74 e 13,84, respectivamente ($F_{2,8} = 17,208$, $p = 0,003$). Entre os controles não houve diferença significativa ($F_{2,8} = 0,771$, $p = 0,504$), conforme pode ser observado na Figura 4.

Figura 4. Concentração de nitrogênio orgânico total em biomassa de *P. stratiotes* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b e c) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey.

Para fósforo total, não foram observadas diferenças significativas nas concentrações desse nutriente em biomassa de *P. stratiotes* quando estas foram expostas ao tratamento com cobre (P(55) $t = -0,477$, $p = 0,658$; P(70) $U = 2$, $p = 0,400$; P(130) $U = 4$, $p = 1,000$) visto que apresentaram médias entre $7,75$ e $8,95 \mu\text{g g}^{-1}$ nas macrófitas dos controles e entre $7,90$ e $9,22 \mu\text{g g}^{-1}$ nas macrófitas dos tratamentos com cobre. Também não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos com diferentes concentrações de fósforo, nem entre controles ($F_{2,8} = 0,73$, $p = 0,520$) e nem entre tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 0,871$, $p = 0,466$), conforme pode ser observado na Figura 5.

Figura 5. Concentração de fósforo total em biomassa de *P. stratiotes* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. Letras (a) – indica diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

6.2.2. Concentração de cobre total em biomassa de *P. stratiotes*

Houve um aumento significativo da concentração desse metal em biomassa de *P. stratiotes* quando essa foi exposta ao tratamento com cobre (em P(55) $t = -7,453$, $p = 0,002$; em P(70) $t = -8,696$, $p < 0,001$; em P(130) $t = -8,718$, $p < 0,001$), uma vez que os controles apresentaram médias entre $25,24$ e $29,37 \mu\text{g g}^{-1}$ e os tratamentos com cobre apresentaram médias entre $139,11$ e $160,88 \mu\text{g g}^{-1}$ (Figura 6). Entre as diferentes concentrações de fósforo testadas, as concentrações de cobre total encontradas em *P. stratiotes* não diferiram de maneira significativa nem entre os controles ($F_{2,8} = 0,285$, $p = 0,762$) e nem entre os tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 0,599$, $p = 0,579$).

Figura 6. Concentração de cobre total em biomassa de *P. stratiotes* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indica diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

6.2.3. Concentração de clorofila *a* e clorofila total em biomassa de *P. stratiotes*

Conforme pode ser observado na Figura 7, *P. stratiotes* só apresentou alteração significativa na concentração de clorofila *a* em sua biomassa quando foi exposta ao tratamento com cobre na concentração de fósforo P(70) ($t = -2,992$, $p = 0,040$), apresentando média de $1,79 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) no controle e $2,33 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) no tratamento com cobre. Não foi observada diferença significativa na concentração de clorofila-*a* presente em *P. stratiotes* entre as diferentes concentrações de fósforo testadas, uma vez que os valores médios apresentaram mínima e máxima de $1,79$ e $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) nos controles ($H = 1,156$, $p = 0,629$) e mínima e máxima de $1,89$ e $2,33 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) nos tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 1,357$, $p = 0,326$).

Quanto à clorofila total, *P. stratiotes* não apresentou diferença significativa na concentração dessa variável quando exposta ao tratamento com cobre quando comparamos com seu controle (P(55) $t = 0,249$, $p = 0,815$; P(70) $t = -2,224$, $p = 0,09$; P(130) $t = -0,274$, $p = 0,797$), visto que as médias nos controles ficaram entre $8,10$ e $8,94 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) ($F_{2,8} = 0,947$, $p = 0,439$) e as médias nos tratamentos com cobre ficaram entre $8,40$ e $9,29 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) ($F_{2,8} = 0,599$, $p = 0,400$), conforme pode ser visto também na Figura 7.

Figura 7. Concentração de clorofila *a* e total em biomassa de *P. stratiotes* (média ± DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (73 µg L⁻¹) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e 130 µg L⁻¹), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a e A) – indicam diferença entre controles para clorofila *a* e clorofila total, respectivamente e (b e B) entre tratamentos com cobre para clorofila *a* e clorofila total, respectivamente, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Kruskal -Wallis e ANOVA.

6.3. Avaliação do desenvolvimento de *P. stratiotes* (ganho de biomassa, taxa de crescimento relativo, folhas nascidas, ganho de diâmetro, ganho de altura foliar, ganho de largura foliar, raízes nascidas, comprimento da raiz, brotos nascidos, folhas com clorose e folhas com necrose)

Conforme apresentado na Figura 8, observa-se a ocorrência de redução de biomassa fresca de *P. stratiotes* quando essa foi exposta aos tratamentos com cobre, havendo diferença significativa entre todos os controles e tratamentos com o metal (em P(55) $t = 29.586$, $p < 0.001$; em P(70) $t = 12.329$, $p < 0.001$; em P(130) $t = 16.018$, $p < 0.001$), variando de 2,35 a 2,62g nos controles e de 0,84 a 1,05g nos tratamentos com cobre. Porém, não houve diferença significativa dessa variável de crescimento nas diferentes concentrações de fósforo total testadas, nem entre os controles ($F_{2,8} = 3,591$, $p = 0,094$) e nem entre os tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 2,792$, $p = 0,139$).

Figura 8. Ganho de biomassa fresca (média $\pm$ DP) nos controles (C) e nos tratamentos com cobre (73 $\mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p < 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

Quanto à taxa de crescimento relativo, houve diferença significativa entre controles e tratamentos, ocorrendo redução dessa variável quando *P. stratiotes* foi exposta ao tratamento com cobre (em P(55) $t = 9.93$, $p < 0.001$; em P(70) $t = 10.107$, $p < 0.001$; em P(130) $t = 11.787$, $p < 0.001$), variando de 0,10 a 0,11g no controle e de 0,05 a 0,06g nos tratamentos com cobre. Porém, assim como para a variável ganho de biomassa, não foi observada diferença significativa entre as diferentes concentrações de fósforo testadas, nem entre os controles ($F_{2,8} = 1,433$, $p = 0,310$) e nem entre os tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 4,796$, $p = 0,057$), conforme pode ser observado na Figura 9.

Figura 9. Taxa de crescimento relativo (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p < 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

Para o número de folhas nascidas verificou-se redução significativa apenas quando *P. stratiotes* foi exposta ao tratamento com cobre no tratamento P(130), apresentando média de 2,87 no tratamento com cobre e de 3,40 em seu controle ($t = 4$, $p = 0,016$), conforme pode ser observado na Figura 10. Considerando os diferentes tratamentos de fósforo, observou-se diferença significativa apenas entre os controles ($F_{2,8} = 5,286$, $p = 0,047$), os quais apresentaram valores médios de 2,93 em P(55) e de 3,40 em P(130), podendo-se dizer que talvez a presença do cobre impediu que a *P. stratiotes* tivesse um maior número de folhas nascidas na maior concentração do fósforo testada.

Figura 10. Número de folhas nascidas (média $\pm$ DP) nos controles (C) e nos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p < 0.05$) teste Mann-Whitney e t-Student. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

Através da representação da Figura 11, observa-se que os exemplares de *P. stratiotes* apresentaram redução no ganho de diâmetro quando expostos ao tratamento com cobre, havendo diferença significativa entre controles e tratamentos, visto que estes apresentaram valores médios de 1,36 e 1,79 cm entre os controles e de 0,31 e 0,70 cm entre os tratamentos (em P(55) $t = 12,934$ $p < 0,001$; em P(70) $t = 7,873$, $p = 0,001$; em P(130) $t = 8,404$, $p = 0,001$). Em relação aos diferentes tratamentos de fósforo, houve redução significativa de diâmetro foliar de *P.stratiotes* tanto entre os controles quanto entre os tratamentos com cobre entre P(55) e P(130); visto que estes apresentaram médias de 1,70 e 1,36 cm nos controles, respectivamente ($F_{2,8} = 6,252$, $p = 0,011$) e médias de 0,48 e 0,31 cm nos tratamentos, respectivamente ($F_{2,8} = 6,575$, $p = 0,031$).

Figura 11. Ganho de diâmetro foliar (média $\pm$ DP) nos controles (C) e nos tratamentos com cobre (73 $\mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c e d) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey.

Quanto ao ganho de altura foliar (Figura 12), houve redução dessa variável quando *P. stratiotes* foi exposta ao cobre nos tratamentos P(55) e P(130), de forma que apresentaram médias de 0,31 e 0,33 cm nos controles, respectivamente ($t = 4,01$, $p = 0,016$) e de 0,17 e 0,18 cm nos tratamentos, respectivamente ($t = 11,5$, $p < 0,001$). No tratamento P(70), a redução na altura foliar talvez não pode ser observada ($t = 1,334$, $p = 0,253$) devido ao grande desvio-padrão do seu controle. Novamente, entre as diferentes concentrações de fósforo, não foi observada diferença significativa para o ganho de altura foliar, nem entre os controles ($F_{2,8} = 0,323$, $p = 0,736$) e nem entre os tratamentos ($F_{2,8} = 0,62$, $p = 0,569$).

Figura 12. Ganho de altura foliar (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

Para o ganho de largura foliar (Figura 13), não foi observada diferença significativa nem quando *P. stratiotes* foi exposta ao tratamento com cobre, comparando com o controle (em P(55) $U = 0$, $p = 0,100$; em P(70) $t = 1,114$, $p = 0,328$; em P(130) $t = -0,267$, $p = 0,802$), e nem entre as diferentes concentrações de fósforo testadas, entre controles ($F_{2,8} = 2,625$, $p = 0,152$) e entre os tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 2,624$, $p = 0,152$).

Figura 13. Ganho de largura foliar (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

Conforme pode ser observado na figura 14, não houve diferença significativa no número de raízes nascidas quando *P. stratiotes* foi exposta ao cobre, quando comparado com seu controle (em P(55) $t = -1,069$, $p = 0,345$; em P(70) $t = 1,331$, $p = 0,254$; em P(130) $t = 1,232$, $p = 0,285$). No entanto, quando observamos os resultados entre as diferentes concentrações de fósforo, verifica-se que houve aumento significativo no número de raízes apenas entre os controles ($F_{2,8} = 12,337$, $p = 0,007$), onde os valores médios de 14,73, 17,80 e 19,87 representam os controles dos tratamentos P(55), P(70) e P(130), respectivamente.

Figura 14. Número de raízes nascidas (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0,05$) teste de Tukey e ANOVA.

Para a variável comprimento das raízes (Figura 15), houve redução significativa desta, quando *P. stratiotes* foi exposta ao tratamento com cobre, quando comparado com seu controle, apresentando comprimento mínimo de 10,27 e máxima de 12,40 cm entre os controles e mínima de 2,64 e máxima de 2,69 cm entre os tratamentos com cobre (em P(55) $t = 17,055$, $p < 0,001$; em P(70) $t = 13,659$, $p < 0,001$; em P(130) $t = 18,259$, $p < 0,001$). Porém não foi observado diferença significativa entre os tratamentos com diferentes concentrações de fósforo testadas nem entre controles ($F_{2,8} = 4,173$, $p = 0,073$) e nem entre tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 1,154$, $p = 0,377$).

Figura 15. Comprimento da raiz principal (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) ANOVA.

Na Figura 16 pode ser visualizada a diferença do comprimento das raízes principais de *P. stratiotes* quando expostas aos controles e tratamentos com cobre, em três períodos durante os 10 dias de experimento.

Figura 16. Comprimento das raízes principais de *P. stratiotes* expostas nos controles (A) e nos tratamentos com cobre (B), no 4º, 8º e 10º (último) dia de ensaio de toxicidade. As setas indicam prováveis locais com acúmulo de cobre, apresentando coloração negra nas nervuras das folhas e parte das raízes.

Quanto ao número de brotos nascidos, *P. stratiotes* apresentou diferença significativa na redução no número de brotos somente quando foi exposta ao tratamento de cobre no tratamento de P(70), quando comparado com seu controle ($t = 2,828$, $p = 0,047$), sendo de 3,07 e 2,53 as médias do controle e tratamento com cobre, respectivamente (Figura 18). Entre os tratamentos com diferentes concentrações de fósforo, não houve diferença significativa no número de brotos nascidos, nem entre os controles ($H = 0,0952$, $p = 0,993$), visto que as médias ficaram entre 3,07 e 3,13 ($F_{2,8} = 2,572$, $p = 0,156$) e nem entre tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 2,572$, $p = 0,156$), apresentando médias entre 2,53 e 3,13, conforme pode ser observado na Figura 17.

Figura 17. Número de brotos nascidos (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) Kruskal-Wallis e ANOVA.

Em relação ao número de folhas com clorose (Figura 18), houve um aumento significativo desta variável quando *P. stratiotes* foi exposta ao tratamento com cobre, quando comparado com o controle, nos tratamentos de P(55); o qual apresentou médias de 1,27 e 1,98 no controle e tratamento, respectivamente ($t = -3,846$, $p = 0,018$); e de $130 \mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo, com valores médios de 0,80 e 1,87 em controle e tratamento, respectivamente ($t = -2,744$, $p = 0,042$). Quando consideramos os diferentes tratamentos de fósforo, observamos que não houve diferença significativa nem entre os controles ($H=1$, $p = 0,422$) e nem entre os tratamentos ($F_{2,8} = 0,483$, $p = 0,639$).

Figura 18. Número de folhas com clorose (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e $130 \mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Kruskal-Wallis e ANOVA.

Na Figura 19 estão apresentadas imagens de *P. stratiotes* no último dia do experimento com cobre, podendo ser visualizado o aspecto de clorose e necrose quando estas foram expostas tanto nos tratamentos com cobre como nos controles.

Figura 19. Aspecto de clorose e necrose em folhas de *P. stratiotes* expostas nos controles (A) e nos tratamentos com cobre (B) no 10º (último) dia de ensaio de toxicidade. Os círculos vermelhos apontam sinais de necrose nas folhas.

Para a variável folhas necrosadas (Figura 20), mesmo havendo tendência para aumento do número de folhas necrosadas de *P. stratiotes* quando estas foram expostas ao tratamento com cobre, quando comparada com os controles, estes valores não foram estatisticamente significativos (P(55) $t = -2,625$, $p = 0,058$; P(70) $t = 0,817$, $p = 0,460$; P(130) $t = -2,219$, $p = 0,091$) provavelmente devido ao alto desvio-padrão encontrado para *P. stratiotes* nos tratamentos com cobre, visto que as médias apresentaram mínima de 0,20 e máxima de 0,33 nos controles e mínima de 0,80 e máxima de 1,18 nos tratamentos com cobre. Também não foram encontradas diferenças significativas no número de folhas necrosadas nos diferentes tratamentos de fósforo, nem entre os controles ($H = 0,214$, $p = 0,813$) e nem entre os tratamentos com cobre ($F_{2,8} = 0,537$, $p = 0,610$).

Figura 20. Número de folhas com necrose (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (73 $\mu\text{g L}^{-1}$) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (P 55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$), após 10 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste t-Student. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b) entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Kruskal-Wallis e ANOVA.

6.4. Análise de componentes principais

A Figura 21 é resultante da análise dos componentes principais (PCA biplot) no qual estão representados os escores e os pesos (loadings) associados aos resultados do experimento com diferentes tratamentos de fósforo e cobre. Os pesos das duas primeiras componentes principais explicaram juntas 97,80% da variação total dos dados.

A primeira componente principal (CP1) explicou 79,3% da variância total dos dados e discriminou a variável “Cobre dissolvido” (loading = -0,98), seguida pelo “Cobre total na água” (loading = -0,97) e pelo “Cobre” (loading = -0,96). À direita da PC1 (variação positiva) ficaram localizadas as combinações do fósforo nas concentrações de 55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ sem a presença do metal cobre (0,00 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Pontos 1, 3 e 5), as quais foram associadas às variáveis biomassa, altura foliar, comprimento das raízes, nitrogênio total presente em *P. stratiotes*, diâmetro foliar, número de brotos, fósforo inorgânico dissolvido na água, número de folhas, largura foliar, clorofila *a* na água, nitrogênio orgânico total, raízes nascidas, nitrato na água e amônio na água. Na esquerda da PC1 (variação negativa) ficaram localizadas as combinações do fósforo nas concentrações de 55, 70 e 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ com a concentração de cobre de 73 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Pontos 2, 4 e 6). Neste caso, as combinações foram associadas às variáveis cobre dissolvido na água, cobre total na água, concentração de cobre, cobre total em

P. stratiotes, concentração de fósforo, fósforo total na água, fósforo total dissolvido, folhas necrosadas, folhas com clorose, nitrito na água, clorofila *a* e clorofila total na *P. stratiotes*.

A segunda componente principal (CP2) explicou 18,5% da variância total dos dados e discriminou a variável “Fósforo total na água” (loading = 0,92), seguida pelo “Fósforo” (loading = 0,91). Na variação positiva (acima da linha horizontal) ficaram localizadas as combinações do fósforo nas concentrações de 55 e 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ sem e com a presença do metal cobre (0 e 73 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Pontos 1, 2, 3 e 4) e na variação negativa (abaixo da linha horizontal) ficaram localizadas as combinações do fósforo na concentração de 130 $\mu\text{g L}^{-1}$ sem e com a presença de cobre (0 e 73 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Pontos 5 e 6). Neste caso, as combinações referentes aos pontos 1 e 3 foram associadas às variáveis diâmetro foliar, comprimento das raízes e amônio na água. As combinações referentes aos pontos 2, 4 e 6 foram associadas às variáveis cobre dissolvido na água, cobre total na água, concentração de cobre, cobre total na *P. stratiotes*, nitrito na água, folhas necrosadas e com clorose, clorofila *a* e total presente na *P. stratiotes*. A combinação referente ao ponto 6 também foi associada às variáveis fósforo total dissolvido na água, fósforo total na água, concentração de fósforo e fósforo total na *P. stratiotes*.

Figura 21. Análise de componentes principais das variáveis nutricionais e de desenvolvimento de *Pistia stratiotes* e nutricionais da água, após 10 dias de exposição ao cobre.

ABORDAGEM 2 – Avaliação da capacidade bioacumuladora de cobre e zinco por *Azolla filiculoides* em diferentes concentrações de fósforo.

“RESULTADOS PARA O METAL COBRE”

6.5. Avaliação das variáveis físicas e químicas da água

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados das variáveis físicas e químicas analisadas na água (meio experimental) no início e final do experimento com *Azolla filiculoides* e o metal cobre. A temperatura inicial apresentou média mínima de 21,57°C no controle P(46) e máxima de 22,34°C na concentração Cu12,7 P(15), havendo aumento na temperatura final em todos os controles e tratamentos, apresentando média mínima de 22,02°C no controle P(15) e 22,96°C na concentração Cu12,7 P(3). Para a variável pH foi observada mínima inicial de 4,09 na concentração Cu12,7 P(46) e máxima de 5,81 no controle P(3), ocorrendo redução na maioria dos tratamentos finais (com exceção da concentração Cu12,7 que apresentou aumento nos valores em todos os tratamentos de fósforo), onde estes apresentaram média mínima final de 3,32 na concentração Cu0,07 P(46) e máxima de 6,21 no controle P(3). Quanto à condutividade, foi observada média mínima inicial de 787 $\mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração Cu12,7 P(46) e máxima de 1140 $\mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração de Cu1,3 P(46), ocorrendo redução na maioria dos valores finais, sendo observada mínima de 880 $\mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração Cu12,7 P(46) e máxima de 1049 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no controle P(46). Em relação à quantidade de oxigênio dissolvido, esta apresentou média mínima inicial de 5,34 mg L^{-1} na concentração Cu0,07 P(3) e máxima de 5,76 mg L^{-1} no controle P(3), sendo observada, assim como ocorreu para pH e condutividade, queda na maioria dos valores de oxigênio dissolvido final, sendo registrada média mínima de 5,00 mg L^{-1} na concentração Cu12,7 P(46) e máxima de 5,97 no controle P(3).

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis físicas e químicas analisadas na água (meio experimental) no ensaio com *A. filiculoides*, cobre e fósforo, medidos no início (no 1º dia, 1 hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final do experimento (no 14º dia). C = controle; P (3, 15 e 46) = tratamentos com 3, 15 e 46 mg L⁻¹ de fósforo; Cu (0,07, 1,3 e 12,7) = tratamentos com 0,07, 1,3 e 12,7 mg L⁻¹ de cobre.

Tratamentos	1º dia	14º dia	1º dia	14º dia
	Temperatura (°C)		pH	
C P3	21,61($\pm$ 0,02)	22,15($\pm$ 0,05)	5,81($\pm$ 0,06)	6,21($\pm$ 0,30)
Cu0,07 P3	21,86($\pm$ 0,05)	22,60($\pm$ 0,04)	4,23($\pm$ 0,04)	3,84($\pm$ 0,09)
Cu1,3 P3	21,79($\pm$ 0,01)	22,40($\pm$ 0,03)	5,25($\pm$ 0,03)	3,98($\pm$ 0,13)
Cu12,7 P3	21,87($\pm$ 0,06)	22,96($\pm$ 0,05)	4,69($\pm$ 0,05)	5,03($\pm$ 0,06)
C P15	21,58($\pm$ 0,08)	22,02($\pm$ 0,02)	5,80($\pm$ 0,02)	5,65($\pm$ 0,14)
Cu0,07 P15	21,89($\pm$ 0,01)	22,87($\pm$ 0,07)	4,22($\pm$ 0,07)	3,59($\pm$ 0,10)
Cu1,3 P15	21,82($\pm$ 0,02)	22,63($\pm$ 0,12)	5,43($\pm$ 0,12)	3,66($\pm$ 0,05)
Cu12,7 P15	22,34($\pm$ 0,03)	22,53($\pm$ 0,03)	4,42($\pm$ 0,03)	4,75($\pm$ 0,19)
C P46	21,57($\pm$ 0,10)	22,26($\pm$ 0,09)	5,36($\pm$ 0,09)	3,39($\pm$ 0,09)
Cu0,07 P46	21,83($\pm$ 0,06)	22,37($\pm$ 0,01)	4,12($\pm$ 0,01)	3,32($\pm$ 0,03)
Cu1,3 P46	22,00($\pm$ 0,02)	22,73($\pm$ 0,04)	4,99($\pm$ 0,04)	3,35($\pm$ 0,03)
Cu12,7 P46	22,02($\pm$ 0,04)	22,47($\pm$ 0,03)	4,09($\pm$ 0,03)	4,92($\pm$ 0,09)
	Condutividade (μ S cm ⁻¹)		Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	
C P3	966($\pm$ 2,52)	921($\pm$ 1,73)	5,76($\pm$ 0,06)	5,97($\pm$ 0,14)
Cu0,07 P3	972($\pm$ 9,50)	898($\pm$ 7,00)	5,34($\pm$ 0,09)	5,44($\pm$ 0,38)
Cu1,3 P3	968($\pm$ 8,08)	928($\pm$ 4,58)	5,58($\pm$ 0,02)	5,42($\pm$ 0,03)
Cu12,7 P3	1010($\pm$ 8,74)	918($\pm$ 6,00)	5,67($\pm$ 0,04)	5,27($\pm$ 0,27)
C P15	983($\pm$ 2,31)	940($\pm$ 1,15)	5,70($\pm$ 0,04)	5,41($\pm$ 0,29)
Cu0,07 P15	1062($\pm$ 5,29)	896($\pm$ 9,61)	5,48($\pm$ 0,03)	5,59($\pm$ 0,05)
Cu1,3 P15	1008($\pm$ 8,72)	907($\pm$ 4,16)	5,55($\pm$ 0,07)	5,26($\pm$ 0,04)
Cu12,7 P15	822($\pm$ 4,04)	881($\pm$ 3,51)	5,58($\pm$ 0,12)	5,26($\pm$ 0,05)
C P46	1022($\pm$ 3,46)	1049($\pm$ 1,15)	5,73($\pm$ 0,04)	5,49($\pm$ 0,03)
Cu0,07 P46	1070($\pm$ 9,81)	1023($\pm$ 4,16)	5,55($\pm$ 0,07)	5,46($\pm$ 0,03)
Cu1,3 P46	1140($\pm$ 2,00)	1028($\pm$ 3,61)	5,59($\pm$ 0,17)	5,48($\pm$ 0,16)
Cu12,7 P46	787($\pm$ 8,33)	880($\pm$ 7,09)	5,45($\pm$ 0,11)	5,00($\pm$ 0,11)

6.6. Avaliação nutricional e biológica de *A. filiculoides*

6.6.1. Concentração de nitrogênio, fósforo e cobre total, clorofila *a* e total em biomassa de *A. filiculoides*

Na Figura 22 estão apresentados os resultados obtidos para a concentração de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides*. Após 14 dias de exposição ao tratamento com diferentes concentrações de cobre e diferentes concentrações de fósforo, *A. filiculoides* apresentou redução significativa de nitrogênio total em sua biomassa em todas as concentrações de cobre, quando comparada com os controles, sendo a concentração Cu(12,7) a que apresentou as menores médias de nitrogênio total (2,95, 3,29 e 3,52 g 100g⁻¹) nos tratamentos P(3), P(15) e P(46), respectivamente, sendo de 4,05, 4,46 e 4,61g100g⁻¹ as médias para seus controles, respectivamente (P(3): F3,11=1310,1, p<0,001; P(15): F3,11=296,85, p<0,001; P(46): F3,11=18,87, p<0,001), podendo também ser visualizado na Figura 22, um decréscimo na concentração de nitrogênio total conforme o aumento da concentração de cobre, nos três tratamentos de fósforo. Considerando as respostas de *A. filiculoides* entre os diferentes tratamentos de fósforo, pode ser observado um aumento crescente da concentração de nitrogênio total, da menor para a maior concentração de fósforo, possuindo diferença significativa tanto entre os controles (F2,8=117,11, p<0,001) quanto entre os tratamentos de cobre (P(3): F2,8=114,85, p<0,001; P(15): F2,8=3,97, p=0,008; P(46): F2,8=119,89, p<0,001), sendo o tratamento P(46) o que apresentou as maiores concentrações de nitrogênio total em todas as concentrações de cobre, variando entre 3,52 e 4,04 g100g⁻¹.

Figura 42. Concentração de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,3 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0,05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i, j) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0,05$) teste de Tukey.

Quanto à concentração de fósforo total (Figura 23), foi observado aumento significativo desse nutriente em biomassa de *A. filiculoides* entre tratamento com cobre e controle, quando estas foram expostas às concentrações de Cu(1,3) no tratamento P(3) ($F_{3,11}=1841$, $p<0,001$); visto que apresentaram médias de 0,31 g 100g⁻¹ no tratamento com cobre e 0,36 g 100g⁻¹ no controle; e de Cu(1,3) e Cu(12,7) no tratamento (P46) ($F_{3,11}=13,3$, $p=0,002$), apresentando médias de 1,05 e 1,15 g 100g⁻¹ respectivamente nos tratamentos e de 0,89 g 100g⁻¹ no controle. Porém, foi observada redução significativa da concentração de fósforo total quando *A. filiculoides* foi exposta às concentrações de Cu(12,7) no tratamento P(3); apresentando média de 0,31 g 100g⁻¹; e na concentração de Cu(0,07) no tratamento P(15) ($F_{3,11}=1564$, $p=0,001$), visto que apresentou média de 0,82 g 100g⁻¹ no tratamento e de 0,93 g 100g⁻¹ no controle. Em relação aos diferentes tratamentos de fósforo, pode ser observada diferença significativa entre controles ($F_{2,8}=404,29$, $p<0,001$) e entre tratamentos (P(3): $F_{2,8}=451,64$, $p<0,001$; P(15): $H=7,2$, $p=0,004$ e P(46): $F_{2,8}=287,68$, $p<0,001$), sendo que as menores concentrações de fósforo total em biomassa de *A. filiculoides*, em todas as concentrações de cobre e controle, ocorreram no tratamento P(3), apresentando valores entre 0,31 e 0,38 g 100g⁻¹ e as maiores concentrações ocorreram no tratamento P(46), onde os valores variaram entre 0,89 e 1,15 g 100g⁻¹.

Figura 23. Concentração de fósforo total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,3 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c, d, e, f, g, h, i, j) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey e Kruskal-Wallis

Para as concentrações de cobre total encontradas em biomassa de *A. filiculoides* (Figura 24), verifica-se que não houve um padrão definido para os diferentes tratamentos desse metal, com aumento significativo apenas na concentração de Cu(0,07) no tratamento P(3), visto que a média foi de 37,29 mg Kg⁻¹ no tratamento e de 16,48 mg Kg⁻¹ no seu controle ($H = 9,46$, $p = 0,024$). Para os tratamentos de Cu(12,7) em P(15), Cu(0,07) e Cu(1,3) em P(46), houve redução significativa na concentração do metal cobre em biomassa de *A. filiculoides*, com valores de 15,46 e 17,42 mg Kg⁻¹ em P(15) e de 11,58; 12,03 e 15,38 mg Kg⁻¹ em P(46) (P(15): $F_{3,11}=18,52$, $p < 0,001$; P(46): $F_{3,11}=6,91$, $p = 0,013$), respectivamente nos tratamentos e nos controles. Em relação aos diferentes tratamentos de fósforo, não foi possível observar diferença significativa entre os controles ($F_{2,8}=1,76$, $p = 0,25$), porém nas diferentes concentrações de cobre entre os diferentes tratamentos de fósforo verificou-se diferença significativa (Cu(0,07): $H=7,2$, $p = 0,004$; Cu(1,3): $F_{2,8}=24,84$, $p = 0,001$; Cu(12,7): $F_{2,8}=300,1$, $p < 0,001$), podendo também ser percebida uma tendência de diminuição da concentração de cobre total assimilado por *A. filiculoides* conforme o aumento da concentração de fósforo.

Figura 24. Concentração de cobre total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett e Kruskal-Wallis. Letras (a) – indicam diferença entre controles e (b, c, d, e, f, g, h, i) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey e Kruskal-Wallis.

Na Figura 25 estão apresentados os resultados obtidos para clorofila *a* e clorofila total na biomassa de *A. filiculoides*. Quanto à concentração de clorofila *a*, não houve um padrão definido desta variável para as diferentes concentrações de cobre, podendo ser observado que pelo menos 2 das 3 concentrações de cobre, dentro dos tratamentos P(3) e P(15), apresentaram redução significativa de clorofila *a* quando comparadas com seus controles ($F_{3,11}=81,1$, $p<0,001$ e $F_{3,11}=36,48$, $p<0,001$ respectivamente) e em P(46) todas as concentrações de cobre apresentaram redução de clorofila *a* significativa em relação ao seu controle ($F_{3,11}=13,69$, $p=0,002$). Em P(3) os tratamentos de Cu(0,07) e Cu(1,3) apresentaram concentrações de 1,86 e 3,44 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf), sendo menores do que seu controle (5,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf)). Em P(15) e P(46) as reduções de clorofila *a* ocorreram nos tratamentos Cu(0,07) e Cu(12,7), onde as médias foram de 2,10 e 3,67 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf), respectivamente, e em P(46) as médias variaram entre 4,01 e 2,72 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf), respectivamente. Considerando as concentrações de cobre nos diferentes tratamentos com fósforo, verifica-se que houve diferença significativa entre os controles ($F_{2,8}=16,1$, $p=0,004$), sendo a média máxima de 5,76 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) registrada em P(3) e a mínima de 4,36 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) observada em P(15). Entre os tratamentos de cobre

só não houve diferença significativa entre as concentrações de Cu(1,3), apresentando mínima de $3,44 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) e máxima de $4,11 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) ($F_{2,8}=1,14$, $p=0,38$), sendo também possível visualizar que, com exceção da concentração média de clorofila *a* registrada em Cu(12,7) no tratamento P(3), os tratamentos P(15) e P(46) apresentaram maior concentração desse pigmento em biomassa de *A. filiculoides* quando comparado com P(3).

Exatamente o mesmo padrão de tendências ocorreu para clorofila total, nas diferentes concentrações de cobre e seus controles, com a diferença do tratamento P(15) significativa em relação ao seu controle somente na concentração de Cu(0,07); sendo observadas médias de $6,08 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) no controle e de $4,58 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) no tratamento com cobre ($F_{3,11}=4,98$, $p=0,031$). Em P(46) só houveram diferenças significativas nas concentrações de Cu(0,07) e Cu(12,7) as quais apresentaram médias de $5,28$ e $3,96 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf), respectivamente, sendo de $7,15 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) a média de seu controle ($F_{3,11}=11,52$, $p=0,003$). Para os diferentes tratamentos de fósforo, houve diferença significativa entre todos os controles ($F_{2,8}=34,22$, $p<0,001$), sendo registrada a média máxima de $8,89 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) em P(3) e mínima de $7,15 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) em P(46) ($F_{2,8}=34,22$, $p<0,001$). Entre as diferentes concentrações de cobre, a média máxima de $7,62 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) e a mínima de $3,87 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso fresco (pf) foram ambas observadas no tratamento (P3) nas concentrações de Cu(0,07) e Cu(12,7), respectivamente ($F_{2,8}=5,17$, $p=0,05$ e $F_{2,8}=40,81$, $p<0,001$).

Figura 25. Concentração de clorofila *a* e total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) e (■) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles para clorofila *a* e clorofila total respectivamente ($p \leq 0.05$) teste de Dunnett. Letras (a e b) e (A, B, C) – indicam diferença entre controles para clorofila *a* e clorofila total respectivamente, (c, d, e, f, g, h) e (D, E, F, G, H) – indicam diferença entre os diferentes tratamentos com cobre para clorofila *a* e clorofila total respectivamente, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste de Tukey.

6.7. Avaliação de parâmetros de crescimento de *A. filiculoides*

6.7.1. Ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides*

Conforme demonstrado na Figura 26, *A. filiculoides* apresentou redução significativa de biomassa final apenas quando foi exposta ao tratamento de Cu(12,7); em todos os tratamentos de fósforo; quando comparado com o controle. Quanto às demais concentrações de cobre, somente Cu(0,07) e Cu(1,3) no tratamento P(3); as quais apresentaram médias de 53,37 e 40,71g, respectivamente ($F_{3,11}=77,35$, $p < 0,001$); e Cu(0,07) e Cu(1,3) no tratamento P(15); que obtiveram médias de 53,94 e 58,43g, respectivamente ($F_{3,11}=311,82$, $p < 0,001$); com aumento significativo de biomassa entre controle e tratamento. No tratamento P(46), os demais tratamentos com cobre não foram significativos em relação ao controle (49,87g), com máxima de 51,01g no tratamento Cu(1,3) ($F_{3,11}=241,23$, $p < 0,001$). Já em relação aos diferentes tratamentos com fósforo, houve diferença significativa entre os controles ($F_{2,8}=69,31$, $p < 0,001$); sendo a média mínima de 32g observada em P(3) e a máxima de 49,87g observada em P(46); e entre as demais concentrações de cobre, somente a concentração de Cu(12,7) não apresentou diferença significativa entre os tratamentos de

fósforo ($F_{2,8}=0,62$, $p=0,57$), obtendo média mínima de 19,83 em P(46) e média máxima de 21,36 em P(3). De um modo geral, *A. filiculoides* apresentou os maiores ganhos de biomassa no tratamento P(15), com mínima de 45,10g no controle e máxima de 58,43g na concentração de Cu(1,3).

Figura 26. Ganho de biomassa fresca de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e 12,7 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0,05$) teste de Dunnett. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c, d, e, f, g) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0,05$) teste de Tukey e Kruskal-Wallis.

Na Figura 27 pode ser visualizada a diferença de biomassa final obtida por *A. filiculoides* em cada tratamento de cobre, inclusive nos controles, podendo ser notada a formação de antocianinas na concentração Cu(12,7) em todos os tratamentos de fósforo.

Figura 27. Biomassa final de *A. filiculoides* após 14 dias de experimento, quando expostas nos controles (P(3), P(15) e P(46)) e diferentes concentrações de cobre (Cu0,007; Cu1,3 e Cu12,7). Letra A – Aspecto de *A. filiculoides* antes da montagem do experimento. Letra B – Aspecto de *A. filiculoides* com formação de antocianinas no último dia de experimento.

Na Figura 28 encontram-se os valores obtidos para a variável taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides* durante os 14 dias de experimento. Assim como para a variável ganho de biomassa, apenas a concentração Cu(12,7) causou redução significativa da taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides* quando comparada com o controle, em todos os tratamentos de fósforo. Já as concentrações de Cu(0,07), com média de $0,19 \text{ g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$, e Cu(1,3), com média de $0,17 \text{ g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$ no tratamento P(3) ($F_{3,11}=64,387$, $p<0,001$) e Cu(0,07), com média de $0,17 \text{ g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$ e Cu(1,3), com média de $0,19 \text{ g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$ no tratamento (P15) ($F_{3,11}=296,192$, $p<0,001$), foram as únicas concentrações com aumento significativo na taxa de crescimento relativo. Em P(46) os valores da taxa de crescimento foram idênticos ao controle, com valor de $0,18 \text{ g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$ ($F_{3,11}=369,798$, $p<0,001$). Considerando os diferentes tratamentos de fósforo, observou-se que, em geral, assim como para ganho de biomassa, as maiores taxas de crescimento foram registradas em P(15) nos tratamentos Cu(0,07) e Cu(1,3), ambos com valor de $0,19 \text{ g g}^{-1}\text{dia}^{-1}$ (Cu(0,07) $F_{2,8}=9,061$, $p=0,015$; Cu(1,3) $F_{2,8}=28,161$, $p<0,001$).

Figura 28. Taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com cobre (0,07; 1,30 e 12,7 mg L^{-1}) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L^{-1}), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com cobre e seus controles ($p \leq 0,05$) teste de Dunnett. Letras (a e b) – indicam diferença entre controles e (c, d, e, f, g) diferença entre os diferentes tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0,05$) teste de Tukey.

6.8. Análise de componentes principais

A figura 29 abaixo é resultante da análise dos componentes principais (PCA biplot) no qual estão representados os escores e os pesos (loadings) associados aos resultados do experimento com diferentes tratamentos de fósforo e cobre. Os pesos das duas primeiras componentes principais explicaram juntas 94,30% da variação total dos dados.

A primeira componente principal (CP1) explicou 59% da variância total dos dados e discriminou a variável “Fósforo” (P) (loading = 0,97). À direita da PC1 (variação positiva) ficaram localizadas as combinações do fósforo na concentração de 46 mg L⁻¹ com quatro diferentes concentrações de cobre (0,00, 0,07, 1,30 e 12,7 µg L⁻¹), as quais foram associadas às variáveis fósforo (P), fósforo total presente na água (PT Água), fósforo total presente na *Azolla* (PT *Azolla*), nitrogênio total presente na *Azolla* (NT *Azolla*) e a biomassa. Com relação à esquerda da PC1 (variação negativa) ficaram localizadas as combinações do fósforo nas concentrações de 3 e 15 mgL⁻¹ com quatro diferentes concentrações de cobre (0,00, 0,07, 1,30 e 12,7 µg L⁻¹). Neste caso, as combinações foram associadas às variáveis cobre (Cu), cobre presente na água (Cu Água), clorofila *a* (Chl *a*), clorofila total (Chl total) e cobre presente na *Azolla* (Cu *Azolla*).

A segunda componente principal (CP2) explicou 35,3% da variância total dos dados, sendo responsável principalmente pela discriminação da variável “Cobre” (Cu) (loading = 0,92). Na variação positiva (acima da linha horizontal) ficaram localizadas as combinações de número 4, 8 e 12, as quais foram associadas às maiores concentrações de cobre e cobre na água e também a combinação 1 associada às maiores concentrações de clorofila *a* e clorofila total. Na variação negativa (abaixo da linha horizontal) ficaram localizadas as combinações de número 2 e 3 associada às maiores concentrações de cobre presente na *Azolla* (Cu *Azolla*), a combinação 7 foi associada à maior biomassa final e as combinações 9, 10 e 11 foram associadas às maiores concentrações de nitrogênio total presente na *Azolla* (NT *Azolla*).

Figura 5. Análise de componentes principais das variáveis nutricionais e de desenvolvimento de *Azolla filiculoides* e nutricionais da água, após 14 dias de exposição ao cobre.

“RESULTADOS PARA O METAL ZINCO”

6.9. Avaliação das variáveis físicas e químicas da água

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das variáveis físicas e químicas analisadas na água (meio experimental) no início (1º dia) e final do experimento (14º dia) com *Azolla filiculoides* e o metal zinco.

A temperatura inicial mínima foi de 21,42°C na concentração Zn20 P(46) e máxima de 21,70°C na concentração Zn5 P(15) e as médias finais não foram muito diferentes das iniciais, apresentando média mínima de 22,97°C na concentração Zn20 P(46) e máxima de 22,26 no controle P(46). Para a variável pH foi observada mínima inicial de 4,37 na concentração Zn10 P(46) e máxima de 5,81 no controle P(3), ocorrendo redução na maioria dos tratamentos finais (com exceção da concentração Cu12,7, com aumento nos valores em todos os tratamentos de fósforo), onde estes apresentaram média mínima final de 3,39 no controle P(46) e máxima de 6,21 no controle P(3).

Quanto à condutividade, foi observada média mínima inicial de 965 $\mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração Zn10 P(3) e máxima de 1079 $\mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração Zn20 P(46), ocorrendo redução na maioria dos valores finais, com média mínima final de 810 $\mu\text{S cm}^{-1}$ na concentração Zn5 P(15) e máxima de 1049 $\mu\text{S cm}^{-1}$ no controle P(46). Para oxigênio dissolvido, os valores das médias iniciais atingiram mínima de 5,50 mg L^{-1} no controle P(15) e concentrações Zn20 P(15) e Zn20 P(46) e máxima de 5,76 mg L^{-1} no controle P(3), mantendo a mesma faixa de valores nas medidas finais, com média mínima de 5,09 mg L^{-1} na concentração Zn20 P(15) e máxima de 5,97 no controle P(3).

Tabela 3. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis físicas e químicas obtidas na água (meio experimental) no ensaio com *A. filiculoides*, zinco e fósforo, medidos no início (no 1º dia, 1 hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final do experimento (no 14º dia). C = controle; P (3, 15 e 46) = concentração de fósforo em 3, 15 e 46 $\mu\text{g L}^{-1}$; Zn (5, 10 e 20) = tratamento com zinco com 5, 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tratamentos	1º dia	14º dia	1º dia	14º dia
	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)		pH	
C P3	21,61($\pm$ 0,02)	22,15($\pm$ 0,05)	5,81($\pm$ 0,09)	6,21($\pm$ 0,15)
Zn5 P3	21,59($\pm$ 0,02)	22,20($\pm$ 0,02)	4,67($\pm$ 0,04)	4,90($\pm$ 0,59)
Zn10 P3	21,44($\pm$ 0,11)	22,13($\pm$ 0,06)	4,55($\pm$ 0,04)	5,62($\pm$ 0,07)
Zn20 P3	21,49($\pm$ 0,03)	22,17($\pm$ 0,06)	4,54($\pm$ 0,04)	4,16($\pm$ 0,08)
C P15	21,58($\pm$ 0,08)	22,02($\pm$ 0,58)	5,80($\pm$ 0,10)	5,65($\pm$ 0,25)
Zn5 P15	21,70($\pm$ 0,02)	22,07($\pm$ 0,16)	4,66($\pm$ 0,02)	4,63($\pm$ 0,09)
Zn10 P15	21,46($\pm$ 0,05)	22,00($\pm$ 0,17)	4,55($\pm$ 0,04)	4,52($\pm$ 0,21)
Zn20 P15	21,50($\pm$ 0,03)	22,16($\pm$ 0,05)	4,51($\pm$ 0,04)	4,14($\pm$ 0,14)
C P46	21,57($\pm$ 0,10)	22,26($\pm$ 0,05)	5,36($\pm$ 0,13)	3,39($\pm$ 0,09)
Zn5 P46	21,65($\pm$ 0,06)	22,01($\pm$ 0,11)	4,55($\pm$ 0,07)	3,40($\pm$ 0,04)
Zn10 P46	21,45($\pm$ 0,06)	21,97($\pm$ 0,15)	4,37($\pm$ 0,07)	3,46($\pm$ 0,06)
Zn20 P46	21,42($\pm$ 0,07)	22,19($\pm$ 0,01)	4,49($\pm$ 0,02)	3,71($\pm$ 0,16)
	Condutividade ($\mu\text{S cm}^{-1}$)		Oxigênio dissolvido (mg L^{-1})	
C P3	966($\pm$ 2,53)	921($\pm$ 1,73)	5,76($\pm$ 0,06)	5,97($\pm$ 0,14)
Zn5 P3	989($\pm$ 1,53)	852($\pm$ 3,51)	5,51($\pm$ 0,04)	5,31($\pm$ 0,08)
Zn10 P3	965($\pm$ 2,65)	910($\pm$ 22,50)	5,55($\pm$ 0,05)	5,10($\pm$ 0,11)
Zn20 P3	1007($\pm$ 10,07)	913($\pm$ 5,00)	5,52($\pm$ 0,03)	5,22($\pm$ 0,08)
C P15	983($\pm$ 2,31)	940($\pm$ 1,15)	5,70($\pm$ 0,04)	5,41($\pm$ 0,29)
Zn5 P15	989($\pm$ 5,51)	810($\pm$ 2,00)	5,50($\pm$ 0,08)	5,36($\pm$ 0,07)
Zn10 P15	976($\pm$ 10,41)	841($\pm$ 3,06)	5,56($\pm$ 0,07)	5,10($\pm$ 0,01)
Zn20 P15	1055($\pm$ 8,33)	929($\pm$ 4,04)	5,50($\pm$ 0,03)	5,09($\pm$ 0,01)
C P46	1022($\pm$ 3,46)	1049($\pm$ 1,15)	5,73($\pm$ 0,04)	5,49($\pm$ 0,03)
Zn5 P46	990($\pm$ 10,39)	974($\pm$ 2,08)	5,56($\pm$ 0,05)	5,36($\pm$ 0,05)
Zn10 P46	978($\pm$ 5,51)	1015($\pm$ 3,06)	5,68($\pm$ 0,04)	5,22($\pm$ 0,03)
Zn20 P46	1079($\pm$ 19,43)	994($\pm$ 33,56)	5,50($\pm$ 0,02)	5,23($\pm$ 0,02)

6.10. Avaliação nutricional e biológica de *A. filiculoides*

6.10.1. Concentração de nitrogênio, fósforo e zinco total, clorofila-*a* e total em biomassa de *A. filiculoides*.

Após 14 dias de exposição ao tratamento com diferentes concentrações de zinco e diferentes concentrações de fósforo (Figura 30), verificou-se redução significativa de nitrogênio total na biomassa de *A. filiculoides*, quando expostas às concentrações de Zn(10) e Zn(20) tanto no tratamento P(3) ($F_{3,11}=101,29$, $p<0,001$); com médias de 3,82 e 3,06 g 100g⁻¹ respectivamente; como no tratamento P(15) ($F_{3,11}=1060,1$, $p<0,001$); com médias de 4,15 e 3,07 g 100g⁻¹, respectivamente; e na concentração de Zn(20) no tratamento P(46), que obteve média de 2,87 g 100g⁻¹ ($F_{3,11}=74,96$, $p<0,001$). A concentração de Zn(5), no tratamento P(3), foi a única em que se verificou aumento significativo de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides* quando comparada com seu controle, sendo observado média de 4,29 g 100g⁻¹. Quanto aos diferentes tratamentos de fósforo, foi possível observar que houve diferença significativa entre os controles ($F_{2,8}=117,11$, $p<0,001$); onde a menor e a maior concentração (4,05 e 4,61 g 100g⁻¹) foram observadas nos tratamentos P(3) e P(46), respectivamente; e entre as concentrações de zinco. Em relação às diferentes concentrações de zinco, pode ser observado que ocorreu um declínio na concentração de nitrogênio total, com o aumento da concentração de zinco, nos três tratamentos de fósforo, podendo dizer também que as maiores concentrações de nitrogênio total foram obtidas por *A. filiculoides* nos tratamentos P(15) (médias entre 4,49 e 3,07 g 100g⁻¹) e P(46) (médias entre 4,61 e 2,87 g 100g⁻¹).

Figura 30. Concentração de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey.

Os resultados para fósforo total podem ser observados na Figura 31. Houve redução significativa da concentração de fósforo total na biomassa de *A. filiculoides* quando esta foi exposta às concentrações de Zn(10) nos tratamentos P(3) ($F_{3,11}=143,58$, $p<0,001$) e P(15) ($F_{3,11}=110,9$, $p<0,001$); os quais apresentaram valores de 0,32 e 0,78 g 100g⁻¹, respectivamente; e na de Zn(20) em todos os tratamentos de fósforo; apresentando média mínima de 0,20 em P(46) e máxima de 0,22 g 100g⁻¹ em P(15); quando comparado com seus controles (médias entre 0,36 e 0,93). Levando-se em consideração os resultados para os diferentes tratamentos de fósforo, é possível perceber que houve diferença significativa entre os controles ($F_{2,8}=404,29$, $p<0,001$); com média mínima de 0,36 em P(3) e máxima de 0,93 em P(15); e entre as concentrações de Zn(5) ($F_{2,8}=59,12$, $p<0,001$) e Zn(10) ($F_{2,8}=1189,14$, $p<0,001$). Nota-se que, com exceção da concentração Zn(10) no tratamento P(46), há uma tendência de decréscimo da concentração de fósforo total na biomassa de *A. filiculoides* com o aumento das concentrações de zinco em todos os tratamentos de fósforo e sendo os tratamentos P(15) e P(46), com exceção da concentração Zn(20), os que apresentaram as maiores concentrações de fósforo total (média máxima de 0,84 e 0,83 g 100g⁻¹, respectivamente) quando comparado com P(3), que atingiu média máxima de 0,34 g 100g⁻¹.

Figura 31. Concentração de fósforo total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey.

Para a variável zinco total (Figura 32), não se verificou uma tendência mais definida entre as diferentes concentrações de zinco testadas, havendo redução significativa deste metal na biomassa de *A. filiculoides* quando esta foi exposta às concentrações de Zn(10) em todos os tratamentos de fósforo (P(3): $F_{3,11}=178,57$, $p<0,001$; P(15): $F_{3,11}=49,6$, $p<0,001$; P(46): $F_{3,11}=25,04$, $p<0,001$) quando comparado com seus controles; sendo registrada média máxima de 76,14 mg Kg⁻¹ em P(3) e mínima de 62,50 mg Kg⁻¹ em P(46); e de Zn(20) em P(46), apresentando média de 61,52 mg Kg⁻¹. Quando *A. filiculoides* foi exposta à concentração de Zn(5), verificou-se aumento significativo de concentração de zinco total em sua biomassa, quando comparado com o controle, nos tratamentos P(3) e P(15); sendo registradas médias de 163,26 e 105,45 mg Kg⁻¹mg, respectivamente; com aumento significativo também quando exposta ao tratamento Zn(20) em P(3), com média de 149,13 mg Kg⁻¹. Em relação às diferentes concentrações de fósforo testadas, foi observada diferença significativa entre os controles ($F_{2,8}=16,25$, $p=0,004$); com a média máxima de 99,39 mg Kg⁻¹ observada em P(3) e a média mínima de 78,74 mg Kg⁻¹ observada em P(46); e entre todas as concentrações de zinco testadas (P(3): $F_{2,8}=126,96$, $p<0,001$; P(15): $F_{2,8}=35,82$, $p<0,001$; e P(46): $F_{2,8}=684,21$, $p<0,001$), com máxima de 163,26 mg Kg⁻¹ na concentração Zn(5) em P(3) e mínima de 61,52 mg Kg⁻¹ em Zn(20) em P(46). Nota-se que P(3) foi o tratamento em

que verificou-se as maiores concentrações de zinco total na biomassa de *A. filiculoides* quando comparado com P(15) e P(46), ficando subentendido que, quanto maior a concentração de fósforo no meio, menor a assimilação do zinco pela planta.

Figura 32. Concentração de zinco total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey.

Na Figura 33 estão representadas as concentrações de clorofila *a* e clorofila total em biomassa fresca de *A. filiculoides*. Em relação à clorofila-*a* nota-se que houve redução significativa na concentração desse pigmento quando a *A. filiculoides* foi exposta a todas as concentrações de zinco, quando comparada aos seus controles (P(3): $F_{3,11}=367,77$, $p < 0,001$; P(15): $F_{3,11}=130,78$, $p < 0,001$; P(46): $F_{3,11}=313,39$, $p < 0,001$), sendo de 1,33 $\mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ a concentração mínima de clorofila *a* observada em Zn(5) no tratamento P(3) e a máxima de 2,09 $\mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ registrada em Zn(5) no tratamento P(46). Considerando os diferentes tratamentos de fósforo, nota-se no controle de P(15) uma redução no teor desse pigmento quando comparado com os controles de P(3) e P(46), visto que apresentaram médias de 4,36; 5,76 e 5,21 $\mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$, respectivamente ($F_{2,8}=16,1$, $p=0,004$), ocorrendo o mesmo para a concentração Zn(5) em P(3) quando comparado com Zn(5) nos tratamentos P(15) e P(46), com concentrações médias de 1,33; 1,96 e 2,09 $\mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$, respectivamente ($F_{2,8}=17,57$, $p=0,003$). Nas demais concentrações de zinco não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes tratamentos de fósforo, mas nota-se uma tendência dos tratamentos P(15) e

P(46) apresentarem igual ou maior concentração de clorofila *a* presente em biomassa de *A. filiculoides* quando comparado com as concentrações desse pigmento encontradas no tratamento P(3).

O mesmo padrão ocorreu para clorofila total, tanto nas diferentes concentrações de cobre e seus controles; com média mínima de $3,35 \mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ em Zn(5) no tratamento P(3) e média máxima de $5,19 \mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ em Zn(5) no tratamento (P46) (P(3): $F_{3,11}=182,28$, $p<0,001$; P(46): $F_{3,11}=81,81$, $p<0,001$); quanto entre os diferentes tratamentos de fósforo, onde a média mínima observada entre os controles foi de $6,08 \mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ em P(15) e a máxima de $8,89 \mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ em P(3) ($F_{2,8}=34,22$, $p<0,001$) e entre as concentrações de Zn(5), a mínima de $3,35 \mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ foi registrada em P(3) e a máxima de $5,19 \mu\text{g g}^{-1}\text{pf}$ em P(46) (Zn(5) $F_{2,8}=15,77$, $p=0,004$).

Figura 33. Concentração de clorofila *a* e clorofila total em biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L^{-1}) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L^{-1}), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey.

6.11. Avaliação de parâmetros de crescimento de *A. filiculoides*

6.11.1. Ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides*

Os efeitos de zinco sobre a biomassa de *A. filiculoides* estão apresentados na Figura 34. Foi possível observar que houve redução significativa na biomassa de *A. filiculoides*,

apenas quando esta foi exposta às concentrações de Zn(10) e Zn(20) no tratamento de P(46); com pesos médios de 41,13 e 40,86g, respectivamente; quando comparado com seu controle (peso médio de 51,53g) ($F_{3,11}=10,81$, $p=0,003$). A concentração de Zn(5), no tratamento P(15), foi a única em que *A. filiculoides* se verificou aumento significativo de biomassa (média de 57,68g) quando comparada com seu controle, com média de 52,50 g ($F_{3,11}=6,33$, $p=0,017$). Quanto aos diferentes tratamentos de fósforo, foi registrada diferença significativa entre os controles; com mínima de 35,33g em P(3) e máxima de 51,53g em P(46) ($F_{2,8}=5,44$, $p=0,045$); e entre as concentrações de zinco; com exceção da concentração Zn(5) em P(15) ($F_{2,8}=13,78$, $p=0,006$) já comentada anteriormente; não houve diferença significativa entre as demais concentrações de zinco nos diferentes tratamentos de fósforo, sendo a média mínima de 35,14g observada em Zn(20) no tratamento P(3) e a máxima de 57,68g observada em Zn(5) no tratamento P(15) (Zn(10): $F_{2,8}=0,21$, $p=0,82$ e Zn(20): $F_{2,8}=4,4$, $p=0,06$).

Figura 34. Ganho de biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0,05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com zinco, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0,05$) teste Tukey.

Para a taxa de crescimento relativo (Figura 35), apenas nas concentrações de Zn(10) e Zn(20) no tratamento P(46) (média de 0,17 g g⁻¹dia⁻¹ para ambas) foi observado redução significativa da taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides* quando comparadas com o controle, o qual apresentou média de 0,18 g g⁻¹dia⁻¹ ($F_{3,11}=11,292$, $p=0,003$). As demais

concentrações de zinco não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (P(3) $F_{3,11}=3,492$, $p=0,070$; P(15) $F_{3,11}=485,5$, $p=0,33$). Para os diferentes tratamentos de fósforo, assim como para a variável biomassa, foi observada diferença significativa entre os controles ($F_{2,8}=5,178$, $p=0,049$); apresentando mínima de 0,16 em P(3) e máxima de 0,18 em P(46); e entre as concentrações de Zn(5) ($F_{2,8}=12,557$, $p=0,007$); sendo registrada mínima de 0,17 em P(3) e máxima de 0,19 em P(15).

Figura 35. Taxa de crescimento relativo de biomassa de *A. filiculoides* (média $\pm$ DP) dos controles (C) e dos tratamentos com zinco (5; 10 e 20 mg L⁻¹) nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo (3; 15 e 46 mg L⁻¹), após 14 dias de ensaio de toxicidade. (*) - indica diferença significativa dos tratamentos com zinco e seus controles ($p \leq 0.05$) teste Dunnett. Letras (a, b, c) – indicam diferença entre controles e (d, e, f, g, h, i) diferença entre tratamentos com cobre, nos tratamentos com diferentes concentrações de fósforo total ($p \leq 0.05$) teste Tukey e Kruskal-Wallis.

Na Figura 36 estão apresentadas imagens onde pode ser avaliada a diferença da biomassa final obtida por *A. filiculoides* nos controles e em cada tratamento de zinco, após 14 dias de experimentação.

Figura 36. Biomassa final de *A. filiculoides* após 14 dias de experimento, quando expostas nos controles (P(3), P(15) e P(46)) e diferentes concentrações de zinco (Zn5, Zn10 e Zn20).

6.12. Análise de componentes principais

A Figura 37 é resultante da análise dos componentes principais (PCA biplot) na qual estão representados os escores e os pesos (loadings) associados aos resultados do experimento com diferentes tratamentos de fósforo e zinco. Os pesos das duas primeiras componentes principais explicaram juntas 93,30% da variação total dos dados.

A primeira componente principal (CP1) explicou 80,3% da variância total dos dados e discriminou a variável “Zinco presente na *Azolla*” (Zn *Azolla*) (loading = 0,91). À direita da PC1 (variação positiva) ficaram localizadas as combinações do fósforo nas concentrações de 3 e 15 mg L⁻¹ com três diferentes concentrações de zinco (0, 5 e 20 mg L⁻¹), as quais foram

associadas às maiores concentrações de zinco presente na *Azolla*. Com relação à esquerda da CP1 (variação negativa) ficaram localizadas as combinações do fósforo nas concentrações de 3, 15 e 46 mg L⁻¹ com quatro diferentes concentrações de zinco (0, 5, 10 e 20 mg L⁻¹). Neste caso, as combinações foram associadas às variáveis clorofila a (Chl a), zinco (Zn), zinco presente na água (Zn Água), clorofila total (Chl total), concentração de fósforo (P), concentração de fósforo total presente na água (PT Água), concentração de fósforo total presente na *Azolla* (PT *Azolla*), concentração de nitrogênio total presente na *Azolla* (NT *Azolla*) e biomassa.

A segunda componente principal (CP2) explicou 13,0% da variância total dos dados, sendo responsável principalmente pela discriminação das variáveis “Fósforo” (P) (loading = 0,90) e “Zinco presente na *Azolla*” (Zn *Azolla*) (loading = 0,41). Na variação positiva (acima da linha horizontal) ficaram localizadas as combinações de número 3, 7 e 8, as quais foram associadas às menores concentrações de zinco presente na *Azolla*. Na variação negativa (abaixo da linha horizontal) ficaram localizadas as combinações de número 9, 10, 11 e 12 associadas às maiores concentrações de fósforo (P) e fósforo total na água (PT Água) e as combinações 2, 4 e 6 associadas às maiores concentrações de zinco presente na *Azolla* (Zn *Azolla*).

Figura 37. Análise de componentes principais das variáveis nutricionais e de desenvolvimento de *Azolla filiculoides* e nutricionais da água, após 14 dias de exposição ao zinco.

7. DISCUSSÃO

7.1 Análise dos efeitos de cobre em *Pistia stratiotes* em diferentes concentrações de fósforo.

Os resultados observados no ensaio de toxicidade laboratorial com concentração de $73\mu\text{g L}^{-1}$ do metal cobre em combinação com as diferentes concentrações de fósforo (55, 70 e $130\mu\text{g L}^{-1}$), demonstraram que o cobre, na concentração utilizada, causou efeito significativo sobre os parâmetros nutricionais e de desenvolvimento de *Pistia stratiotes*. Os únicos parâmetros analisados que não apresentaram nenhuma diferença estatisticamente significativa nos tratamentos com cobre, em relação ao seu controle, ou entre os três diferentes meios nutricionais foram: “concentração de fósforo em biomassa de *P. stratiotes*”, “ganho de largura foliar” (apesar de ter apresentado redução de 50% e 30,77% nos tratamentos com cobre em P(55) e P(70) respectivamente, em relação aos seus controles), “número de raízes nascidas” e “número de folhas com necrose” (apesar de ter sido registrado aumento de 83,05%, 58,75% e 66,25% nos tratamentos com cobre em P(55), P(70) e P(130) respectivamente, em relação a seus controles), sendo os últimos três parâmetros citados não considerados estatisticamente significativos devido ao alto desvio padrão apresentando pelos dados, porém a tendência é clara.

Quanto à concentração de nitrogênio orgânico total em biomassa de *P. stratiotes* pode ser observado que o metal cobre causou efeito no processo de absorção desse nutriente pela macrófita, apresentando redução significativa de 91,07% em P(55) e 47,98% em P(70) em relação aos seus controles. Quando expostas ao cobre no tratamento de P(130), não foi possível verificar interferência significativa devido ao alto desvio padrão apresentado nesse tratamento, podendo ser sugerido que uma concentração maior de fósforo gerou uma certa proteção contra a toxicidade do cobre no processo de absorção do nitrogênio. Além disso, notou-se que entre os tratamentos com cobre ocorreu aumento gradativo na concentração de nitrogênio na biomassa de *P. stratiotes* conforme o aumento de fósforo. Esses resultados corroboram com os observados por Pistori (2009), que analisando o efeito de diferentes concentrações de fósforo total sobre o crescimento e a composição química das macrófitas aquáticas flutuantes *Pistia stratiotes*, *Salvinia molesta* e *Eichhornia crassipes*, observou que a concentração de nitrogênio total na biomassa final de *P. stratiotes* foi significativamente maior apenas nos tratamentos com altas concentrações de fósforo, estando esse fato provavelmente relacionado com o ganho de biomassa. Segundo Llorens et al. (2000), a metabolização do nitrogênio pelas plantas é afetado quando estas encontram-se expostas a

concentrações altas de metais, dentre eles o cobre, acarretando em redução deste nutriente na biomassa da planta. Xiong et al. (2006), analisando o efeito de cobre (0,3 e 10,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$) sobre o metabolismo do nitrogênio em *Brassica pekinensis* Rupr. (couve chinesa), observaram que esse metal propiciou a diminuição da atividade da enzima nitrato redutase e, como consequência, ocorreu a redução do teor de clorofila total em folhas e raízes, além do encurtamento das raízes, diminuição do número de folhas e redução da biomassa e crescimento da planta.

Complementando o mencionado acima, o nitrogênio é considerado um dos principais constituintes quantitativos da fitomassa; depois do carbono, oxigênio e hidrogênio; sendo responsável pelo aumento da biomassa das plantas, onde é assimilado pela raiz ou conduzido por meio da corrente transpiracional e incorporado às substâncias orgânicas na porção aérea da planta (LARCHER, 2000).

Em relação à concentração de cobre em biomassa de *P. stratiotes* na presente pesquisa, ficou claro que o tratamento com cobre ocasionou o aumento significativo desse metal na biomassa da macrófita, apresentando aumento médio entre os tratamentos com cobre de 81,43% em relação às médias obtidas nos controles, que foi de 2,77%, resultando em acúmulo médio desse metal nas macrófitas do tratamento com cobre de 149,46 $\mu\text{g g}^{-1}$ e nas dos controles de 27,75 $\mu\text{g g}^{-1}$. Verifica-se, portanto, diferença significativa apenas entre controles e tratamentos, sugerindo nesse caso que as diferentes concentrações de fósforo não interferiram significativamente no processo de absorção de cobre pela macrófita em questão. Foi observado também, no final do experimento, coloração negra nas pequenas raízes e nervuras das folhas das macrófitas que estavam expostas nos tratamentos com cobre, indicando ser provavelmente acúmulo de cobre aderido na parede celular das plantas. Esse fato é corroborado pelos resultados de pesquisa desenvolvida por Maine et al. (2004), os quais observaram após 30 dias de experimentação com cromo, precipitados desse metal em raízes de *P. stratiotes*, acumulados a partir de óxidos de cromo hidratados, quando expostas à concentrações de 6 ppm. Benaroya et al. (2004), também observaram o acúmulo de precipitado escuro agregado nas paredes celulares e vacúolos celulares das folhas de *Azolla filiculoides* quando estas foram submetidas a concentrações de chumbo. Kamal et al. (2003), avaliando a capacidade de *Myriophyllum aquaticum*, *Ludwigia palustris* e *Mentha aquatic* em remover Cu, Fe, Zn e Hg de água contaminada, observaram que a quantidade de cobre retirado da água foi maior do que a utilizada pela planta, devido o cobre ter sido removido da água através de precipitação formada pela reação entre o fósforo (28,5 mg L^{-1}); que foi adicionado ao meio como nutriente para as plantas; e o cobre (5,56 mg L^{-1}), formando fosfato

de cobre ($\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$). Devido a isso, cerca de 40% a 60% de cobre foi removido da água, dependendo do tipo de planta, e o restante, cerca de 40% a 61% foi precipitado na forma de fosfato de cobre.

Segundo Kabata e Pendias (1992) o cobre tende a se acumular principalmente nas raízes devido a forte ligação a esses tecidos e a sua baixa mobilidade, sendo esse fato também observado em trabalhos de vários outros autores como Lima, M. (2010), Lima, P. (2010), Masutti et al. (2004), Paiva et. al. (2009), Sinha et al. (2009), entre outros. Ainda segundo Kabata e Pendias (op cit.), a quantidade de cobre em biomassa de macrófitas denuncia a condição do local onde estas vivem. Por exemplo, plantas apresentando concentração média de cobre entre 5 mg kg^{-1} e 9 mg kg^{-1} indicam que são provenientes de locais sem contaminação e quando apresentam concentração entre 20 mg kg^{-1} e 100 mg kg^{-1} indicam que são de locais contaminados. Esse fato confirma o observado na presente pesquisa, onde os exemplares de *P. stratiotes* apresentaram concentração média final de $149,46 \mu\text{g g}^{-1}$ de cobre.

Segundo Torres et al. (2007), o pH é o elemento que mais influencia a absorção dos metais pelas plantas devido ao efeito que provoca na solubilidade destes, deixando-os mais ou menos solúveis, principalmente na presença de nutrientes. Em trabalho desenvolvido por esses autores, foi observado que o cobre atingiu maior solubilidade em pH mais baixo, inclusive na presença de nutrientes, devido estes possuírem diversos ânions quelantes, porém pH abaixo de 4 pode ser nocivo para a planta, ocorrendo separação das raízes. Também foi registrado que *P. stratiotes* possui alto poder bioacumulador de cobre em solução aquosa com até 1 mg L^{-1} de cobre em pH 5, atingindo 70% de absorção do metal inicial adicionado à água. Na presente pesquisa, apesar da média do pH inicial e final terem se mantido na faixa entre 5,48 e 5,61 respectivamente, a porcentagem de absorção de cobre do meio aquoso por *P. stratiotes* (resultados não apresentados na pesquisa, estando disponíveis em anexo) considerando a concentração adicionada inicialmente nos tratamentos e a observada no final, atingiu média de 36,57%, sendo dessa forma considerada baixa quando comparado com o trabalho citado acima e de demais autores. Essa baixa absorção de cobre ocorrida pode estar relacionada com o citado acima por Kamal et al. (2003) sobre a ocorrência de precipitação causada pela reação entre o fósforo e o cobre tornando esse metal indisponível para absorção pela planta. Outra possível explicação seria porque os exemplares de *P. stratiotes* utilizados no ensaio de toxicidade estavam na fase jovem do seu ciclo de vida e por isso apresentaram maior sensibilidade ao metal, podendo também o resultado ser atribuído a ausência das raízes, as quais foram retiradas no início do experimento e não atingiram desenvolvimento suficiente para que ocorresse maior absorção do metal, mostrando dessa forma que o cobre realmente foi

tóxico na concentração testada, impedindo o crescimento das raízes, durante os 10 dias de exposição.

Assim como observado nas pesquisas de Lima, M. (2010), Lima, P. (2010), Masutti (2004), os metais tendem a se bioacumular nas raízes. Como na presente pesquisa as raízes foram removidas no início do ensaio e pode ser observada claramente a interferência do cobre sobre o crescimento dessas raízes, supõe-se que a absorção ocorreu pelas folhas que estavam em contato com a água e depois pelos poucos centímetros de raízes que tentaram se desenvolver, ficando esse metal precipitado nessas pequenas raízes e nervuras das folhas. Devido a esses fatores pode ser observado baixa porcentagem de bioacumulação de cobre em *P. stratiotes* na presente pesquisa.

Segundo Mengel e Kirkby⁷ (1987 *apud* DOMINGOS et al., 2005), o mecanismo de tolerância das plantas aos metais, dentre eles o cobre, envolve além de atividade de enzimas, a complexação desse metal com outras substâncias, estando seu acúmulo associado a diversas alterações celulares, as quais contribuem com a capacidade de tolerância das plantas ao metal, podendo ser citada a ligação de grandes quantidades de cobre com substâncias pécticas nas paredes de células do córtex das raízes. Ainda segundo esse mesmo autor, a redução do desenvolvimento de plantas aquáticas quando em contato com cobre explica-se devido a formação de complexos de cobre e nitrogênio, além de compostos aminados, devido a afinidade existente entre ambos, deixando o nutriente indisponível para uso nas funções metabólicas.

Quanto à concentração de clorofila *a* e clorofila total em biomassa de *P. stratiotes* observado na presente pesquisa, em geral não houve diferença significativa da concentração de clorofila nem entre as diferentes concentrações de fósforo e nem entre controles e tratamentos com cobre, com exceção da clorofila *a* no tratamento com cobre na concentração de fósforo P(70) que apresentou aumento significativo de 23,17%, em relação ao seu controle. Este fato pode estar relacionado tanto com a ação estressante do cobre como com a ação energética do fósforo, visto que nesse tratamento com cobre a concentração de fósforo registrada no início do experimento, no meio aquoso (resultados não apresentado na tese, porém encontra-se disponível em anexo), foi um pouco mais elevada do que no seu controle. Apesar de Li et al. (2006), entre muitos outros autores, afirmarem que o acúmulo de metais por macrófitas aquáticas normalmente ocasionam, além de muitas alterações no metabolismo desses organismos, a degradação do conteúdo clorofiliano, esse último fator não foi

⁷ MENGEL, K.; KIRKBY, E.A. *Principles of plant nutrition*. 4ed. Bern: International Potash Institute Bern, 1987, 677p.

observado na atual pesquisa na maioria dos tratamentos, podendo este fato talvez estar relacionado com a concentração de cobre utilizada no experimento não ser tão alta a ponto de causar interferência nesse parâmetro, já que *P. stratiotes* é considerada boa acumuladora de metais. Esse fato é confirmado por Shah e Nongkynrih (2007) que citam que como *P. stratiotes* é uma boa bioacumuladora, esta suporta ser exposta a altas concentrações de metais por um período prolongado sem que haja interferência no seu conteúdo de clorofila.

Ainda em relação ao presente estudo, outra hipótese para os resultados apresentados; mesmo que não tenham sido realizadas medidas em diferentes períodos; pode ter havido interferência na concentração de clorofila no início do experimento seguido de restabelecimento deste parâmetro no final do ensaio. Essa suposição foi observada por Lima, P. (2010), que avaliando os efeitos de diferentes concentrações de cobre (entre $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ a $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes tempos de exposição (12 a 60 horas) sobre o teor de clorofila de *P. stratiotes*, observou que a concentração de clorofila *a* e *b* aumentaram significativamente nas primeiras horas de exposição, em relação ao seu controle e depois reduziram consideravelmente no final da exposição (53 e 60 horas) nas concentrações mais altas, sendo o teor de clorofila *b* mais afetado do que o de clorofila *a* no início do experimento.

O mesmo foi observado por Upadhyay e Panda (2009) que, avaliando os efeitos do aumento das concentrações de cobre (de 0 a $100 \mu\text{M}$) sobre o crescimento e parâmetros bioquímicos de *P. stratiotes*, constataram aumento das concentrações de clorofila nas primeiras horas do experimento, seguido de significativa redução no final do ensaio, juntamente com o conteúdo de proteínas totais. Sinha et al. (2005), também observaram redução da concentração de clorofila quando *P. stratiotes* foi exposta a diferentes concentrações de cromo (0, 10, 40, 80 e $160 \mu\text{M}$) durante 48, 96 e 144 horas, sendo esta redução proporcional ao aumento da concentração do metal e tempo de exposição. Lima, P. (2010), assim como na atual pesquisa, não observou variações no teor de clorofila quando *P. Stratiotes* foi exposta até $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de cromo. Porém quando expostas a concentrações entre $1,7$ e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$, houve diminuição de clorofila *a*, *b* e total. Maine et al. (2004) observaram a diminuição da concentração de clorofila em biomassa de *Pistia stratiotes* conforme o aumento da concentração de Cr acima de 1 mg L^{-1} . Ainda segundo esses autores, o declínio no teor de clorofila sugere que o metal afetou o sistema de síntese de clorofila e atividade clorofilase, porém mesmo com esses efeitos tóxicos sobre sua biomassa, *P. stratiotes* continuou a

bioacumular o metal. Segundo Padmaja et al.⁸ (1990 *apud* SINHA et al. 2005), a inibição da biossíntese de clorofila em plantas sobre estresse provocado por metais está relacionado com a redução da atividade da enzima d-aminolevulínico desidratase (ALAD).

Baseado no que foi apresentado até esse momento, fica claro que os efeitos significativos (redução de nitrogênio e aumento de concentração de cobre) observados no metabolismo de *P. stratiotes*, foram provocados pela ação do cobre, independente dos tratamentos de fósforo. Por outro lado, em relação a clorofila-*a*, houve ação tanto do cobre quanto do fósforo.

Conforme Upadhyay e Panda (2005), mesmo o cobre sendo um elemento essencial para o metabolismo das plantas, concentrações superiores as necessárias para os organismos se tornam tóxicas, podendo afetar além da concentração de clorofila, o crescimento, a produtividade, inibição da fotossíntese e respiração. Marschner (1995) e Wolff et al. (2009), por sua vez, acrescentam que aspectos de clorose e necrose foliar, redução da biomassa, manchas avermelhadas ou descoloração das folhas e até inibição de crescimento da raiz, são sintomas de plantas que estão ou estiveram em contato com altas concentrações de metais, podendo esses aspectos serem utilizados como ferramentas visuais na avaliação de contaminantes em ambientes aquáticos. Muitos desses parâmetros visuais de desenvolvimento foram avaliados na presente pesquisa e quase todos apresentaram resultados significativos em relação a interferência do cobre, sendo discutidos a seguir apenas os parâmetros que apresentaram respostas significativas.

Quanto ao ganho de biomassa de *P. stratiotes* houve interferência significativa do cobre, apresentando redução média entre os tratamentos com cobre de 63,46% em relação à média dos controles. A taxa de crescimento relativo sofreu redução média entre os tratamentos com cobre de 50,92% em relação à média dos controles. Como não houve diferença entre os controles fica claro a ação do cobre sobre esse parâmetro, estando de acordo com pesquisa realizada por Oliveira (2010) que, avaliando o efeito de cádmio nas concentrações de 0,0; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,2 mg L⁻¹ no desenvolvimento de *P. stratiotes* observou maior crescimento da parte aérea e desenvolvimento das raízes no tratamento controle, registrando redução de biomassa da raiz de 13,54% e de 21,19% da parte aérea em relação ao controle quando exposta na concentração 0,4 mg L⁻¹, apresentando de um modo geral decréscimo de biomassa conforme o aumento da concentração de Cd. O mesmo foi observado por Lima, M. (2010) ao avaliar o efeito de cromo sobre os parâmetros de crescimento de

⁸ PADMAJA, K. et al. Inhibition of chlorophyll synthesis in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings by cadmium acetate. *Photosynthetica*, v.24, n.3, p.399-405, 1990.

P. stratiotes nas concentrações de 1 mg L^{-1} a 6 mg L^{-1} . Stiborova et al. (1986), avaliando o efeito do cobre sobre o crescimento de *Zea mays* observou que esse metal, em concentração de 60 ug L^{-1} , foi suficiente para inibir o crescimento dessa planta. Já Mufarrege et al. (2010) observaram em seu trabalho que, mesmo a taxa de crescimento relativo de *P. stratiotes* não tendo sido afetada pelos tratamentos de cromo e zinco, estes interferiram na síntese de clorofila, sendo esse fator dependente do tipo de cada planta e sua capacidade de acumulação. Mishra e Tripathi (2008), por sua vez, registraram a eficiência de *Pistia stratiotes* e *Eichhornia crassipes* na remoção dos metais cobre, ferro, zinco, cromo e cádmio, todos em concentrações de 1,0, 2,0 e 5,0 mg L^{-1} e observaram após 15 dias que estas macrófitas removeram e acumularam cerca de 90% desses metais sem apresentarem redução em seu crescimento ou qualquer outro sintoma de toxicidade.

Muitos autores como Camargo e Biudes (2006), Corrêa et al. (2002), Henry-Silva et al. (2008), Oliveira (2010), Pistori (2009), entre outros, encontraram em seus estudos uma relação gradativa entre a disponibilidade de nutrientes como nitrogênio e fósforo no meio e a produção de biomassa de macrófitas aquáticas, dentre elas a *Pistia stratiotes*. Na presente pesquisa, mesmo as concentrações variando de $55 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ a $130 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de fósforo total e sendo esses valores considerados típicos de ambientes eutrofizados e hipereutrofizados, respectivamente, isso não ocorreu quando os controles foram comparados, havendo apenas uma tendência de aumento, podendo esse fato estar relacionado tanto com o tempo reduzido de exposição das plantas no meio (10 dias) como com a alta capacidade de desenvolvimento dessa macrófita em ambientes com concentrações bem maiores do que as testadas nesse ensaio, conforme foi observado em pesquisa de Bini et al. (1999), Biudes, Camargo, (2006) e Pistori (2009).

Quanto ao número de folhas nascidas, houve redução significativa de 15,58% no tratamento com cobre em P(130) quando comparado com seu controle. Entre os controles fica claro o aumento desse parâmetro conforme o incremento da concentração de fósforo, podendo-se inferir que o aumento de fósforo contribui para o nascimento de um maior número de folhas nessa espécie de macrófita na ausência do cobre. Porém, a resposta desse parâmetro particularmente não é considerada um bom parâmetro de avaliação. Lima, M. (2010), por exemplo, avaliando o efeito de diferentes concentrações de cromo sobre parâmetros de crescimento de *P. stratiotes*, conseguiu observar o aumento do número de folhas em função do tempo porém sem haver diferença significativa entre as diferentes concentrações do metal, atribuindo esse fato a baixa variação do número de folhas nascidas entre as plantas. Masutti (2004), avaliando os efeitos de cobre sobre parâmetros de

desenvolvimento de *P. stratiotes* também observou que o número de folhas não é considerado um bom parâmetro de efeito, visto que apresentou comportamento diferenciado durante a repetição dos ensaios.

Na presente pesquisa também foi registrado o efeito do cobre sobre o diâmetro de *P. stratiotes*, verificando-se redução de 73,18%; 56,96% e 77,20% entre os tratamentos com cobre em P(55), P(70) e P (130), respectivamente. Em relação aos controles apenas com fósforo, houve uma tendência de redução do diâmetro conforme o aumento da concentração do fósforo, porém esse fato está relacionado a um erro na metodologia de medida desse parâmetro, devido as luzes do sistema experimental terem sido apagadas todas de uma vez e o intervalo de medida entre um tratamento e outro demandou certo tempo para ser concluído, fazendo com que a abertura das folhas das macrófitas diminuíssem gradualmente. Lima (2010), avaliando os efeitos do cromo sobre parâmetros de desenvolvimento de *P. stratiotes* durante 21 dias, observou que até o 7º dia de exposição as plantas submetidas aos tratamentos com maior concentração (5,3 e 6,0 mg L⁻¹) apresentaram redução do diâmetro e as expostas nas menores concentrações mantiveram seu tamanho ou aumentaram. Já no final do experimento (21 dias depois), todas as plantas expostas ao tratamento com cromo, independente de sua concentração, apresentaram diminuição do seu diâmetro em relação às macrófitas do controle. Masutti (2004) observou aumento do diâmetro médio de *P. stratiotes* quando estas foram expostas às concentrações de 1,0 e 10,0 mg L⁻¹ de cromo, quando comparada com seu controle, em todas as concentrações.

Em relação à altura foliar, *P. stratiotes* sofreu redução significativa devido à ação do cobre nos tratamentos P(55) e P(130), não sendo observada redução significativa em P(70) devido ao alto desvio padrão de seu controle. Chegou-se a conclusão que a redução foi ocasionada pelo metal cobre, uma vez que os exemplares de *P. stratiotes* que estavam nos controles apresentaram melhor desenvolvimento em relação a essa variável. Porém, não foi encontrada na literatura uma explicação para justificar tal redução.

Quanto ao comprimento das raízes principais, essa sofreu redução acentuada causada pelo cobre, na mesma proporção entre os três tratamentos de fósforo (média de 75,55%), não havendo diferença entre os controles. Esses resultados corroboram com os observados por Wong e Bradshaw⁹ (1982 *apud* FERNANDES; HENRIQUES 1991), que avaliando a toxicidade de dez diferentes metais, constataram que o cobre foi o mais tóxico, produzindo uma inibição de 50% do crescimento da raiz da gramínea *Lolium perenne*, em concentrações

⁹ WONG, M.H.; BRADSHAW, A.D. A comparison of the toxicity of heavy metals, using root elongation of ryegrass, *Lolium perenne*. *New Phytol.*, n.91, p.255-261.

de 0,02 ppm. Mufarrege et al. (2010) observaram em seu experimento que, quando *Pistia stratiotes* foi exposta ao tratamento com os metais Cr, Ni, Zn na presença de fósforo, esta apresentou o maior comprimento de raiz e taxa de crescimento relativo quando comparado com os demais tratamentos com metais individuais e causou aumento significativo no CSAs (cross-sectional áreas) dos vasos do metaxilema total, sugerindo que o fósforo aumentou a tolerância de *P. stratiotes* em relação à ação dos metais. Gupta e Mukherji (1977), observando possíveis alterações metabólicas provocadas pelo sulfato cúprico em germinação de sementes de arroz, registrou que essa substância em concentração de 10^{-2} M de CuSO_4 provocou a redução do comprimento de caules em 37% e raízes em 85%, parando a germinação por completo na concentração de 10^{-1} M. Meng et al. (2007), avaliando o efeito de diferentes concentrações de cobre (de 10^{-5} M a 10^{-3} M) em tratamento hidropônico, sobre o crescimento e atividades enzimáticas de *Allium sativum* L, observou a ocorrência de inibição significativa do crescimento desse organismo, nas concentrações de 10^{-4} M e 10^{-3} M de cobre principalmente das raízes, devido o acúmulo desse metal ocorrer mais nas raízes do que nas folhas, aumentando a atividade da SOD que é um componente crucial de defesa antioxidante das plantas. Masutti (2006), avaliando o efeito de concentrações de cobre; que variaram de 0,2 a 1,0 mg L^{-1} ; sobre *P. stratiotes*, observou o estímulo de desenvolvimento de raízes em número, apresentando CE50 de 0,18 a 0,47 mg L^{-1} e em comprimento, apresentando CE50 de 0,146 a 0,52 mg L^{-1} de cobre, nos valores mais baixos, considerando estes parâmetro, dentre vários analisados, o melhor para avaliação em teste de toxicidade com *Pistia*. Chen et al. (2000), analisando os efeitos do cobre (20 a 50 μM) em mudas de arroz, observou que houve diminuição progressiva do comprimento da raiz, porém não da parte aérea, sendo essa diferença explicada pelo fato do cobre acumular principalmente nas raízes. Kopittke et al. (2011), investigando a distribuição e especiação de cobre, níquel e zinco in situ utilizando raízes hidratadas do feijão-frade (*Vigna unguiculata*), pode observar após 24 horas de exposição do material à 1,5 μM de cobre, que grande parte desse metal ficou ligado ao ácido polygalacturônico das rizodermas e córtex exterior, sugerindo que essa ligação contribuiu para os efeitos tóxicos de cobre, reduzindo significativamente o crescimento da raiz quando comparado com o controle.

Quanto ao número de brotos, somente as macrófitas expostas ao tratamento com cobre na concentração de P(70) apresentaram menor número de brotos em relação ao controle, não havendo diferença entre os diferentes controles. Oliveira (2010), avaliando o efeito de cádmio (concentrações de 0,0; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2 mg L^{-1}) sobre o crescimento de novas rosetas filhas em *P. stratiotes*, observou maior número de rosetas nos tratamentos sem o metal, havendo

diminuição no número destas conforme o aumento da concentração de Cd, porém não sendo estatisticamente significativo a diferença nas duas maiores concentrações. Segundo Cancian et al. (2009), a influência da temperatura, do fotoperíodo e da disponibilidade de nutrientes pode afetar o ganho de biomassa e a produção de brotos na espécie *P. stratiotes*, não estando esses dois parâmetros necessariamente relacionados, no entanto, ainda se desconhece como isso ocorre.

Quanto ao número de folhas com clorose na presente pesquisa, mesmo as macrófitas não apresentando diferença significativa de concentração de clorofila-*a* e total entre quase todos os tratamento com cobre e seus respectivos controles, as mesmas apresentaram diferença significativa para a análise visual da clorose, quando expostas ao tratamento com cobre em P(55) e P(130), só não sendo observada diferença significativa em P(70) devido ao alto desvio padrão apresentado por seu controle. Esse resultado é corroborado por pesquisa desenvolvida por Saenz et al. (2008) que avaliando o efeito do metal cobre (0,50 e 100mg L⁻¹) na concentração de clorofila e açúcares das macrófitas *Eichhornia*, *Hydrocotyle* e *Lemna* após 5 dias de experimentação, observaram que não houve efeito significativo na concentração de clorofila em nenhuma das três espécies, porém foi comprovado visualmente o efeito de clorose na espécie *Hydrocotyle*, após 24 horas de exposição. Já Oliveira (2010), além de observarem clorose nas folhas jovens expostas a 1,6 e 3,2 mg L⁻¹ de cádmio, registrou também a diminuição gradual do tamanho da planta conforme o aumento da concentração do metal. Conforme Schmidt et al.¹⁰ (1997 *apud* PÄTSIKKÄ et al. 2002), como o cobre e o ferro são metais que competem pela absorção de íons em processos metabólicos em folhas de vegetais, quando o cobre encontra-se em excesso esse processo provoca a clorose foliar. Segundo Zampieri (2010), as plantas que crescem em locais com alta concentração de cobre apresentam alterações enzimáticas, redução da biomassa e sintomas como clorose. Ainda segundo esse autor, o papel do cobre na inibição do crescimento da planta é pouco claro, podendo-se dizer que o excesso desse metal pode inibir o alongamento celular, dependente da turgência da célula, síntese de componentes da parede, além do conteúdo regulador do crescimento.

Vale ressaltar que o parâmetro “número de folhas com necrose” não será discutido nessa pesquisa por não ter apresentado diferença significativa, uma vez que tanto os controles como os tratamentos com cobre, apresentaram valores altos de desvio padrão. Porém, quando

¹⁰ SCHMIDT, W. et al. Physiological effects on iron acquisition processes in *Plantago*. *New Phytol.*, v.135, p.659-666, 1997.

observamos o gráfico apresentado nos resultados, fica evidente a ocorrência de aumento de folhas necrosadas em macrófitas que foram expostas ao cobre.

Foi possível observar pela literatura que o efeito do cobre sobre o metabolismo dos vegetais, em geral, ocasiona efeitos deletérios tanto na nutrição como na fisiologia e desenvolvimento desses organismos, podendo sua resposta ser reconhecida através de sintomas como ganho ou redução de biomassa, taxa de crescimento relativo, número de folhas e raízes nascidas, comprimento de raiz, concentração de pigmentos, aspectos de clorose e necrose, entre outros.

Devido a isso, pode-se dizer que na natureza uma espécie de macrófita pode apresentar diferentes aspectos fisiológicos e de desempenho como bioindicadora ou como biorremediadora dependendo das características de como e onde foram cultivadas, apresentando respostas ou resultados diferenciados. Fica claro na atual pesquisa que quase todos os efeitos deletérios observados sobre os parâmetros nutricionais e de desenvolvimento de *P. stratiotes*, quando estas foram expostas ao cobre, se deveu a ação desse metal, não havendo interferência significativa do fósforo, independente de sua concentração, na ação deste metal, com exceção do observado para nitrogênio e clorofila-*a* e total. Quando os resultados entre os controles são comparados, nota-se a ação do fósforo nos parâmetros número de folhas e raízes nascidas que aumentam conforme o aumento da concentração desse nutriente.

Na maioria das pesquisas já realizadas com *P. stratiotes* esta é considerada uma boa bioacumuladora de poluentes, frente sua alta capacidade de absorver e acumular substâncias e já na atual pesquisa esta macrófita se mostrou uma boa bioindicadora de locais contaminados, uma vez que apresentou sensibilidade a uma concentração de cobre considerada até que baixa em testes de toxicidade. Essa diferença entre o papel de bioacumuladora e bioindicadora pode se dever ao estágio de vida da planta a ser utilizada nos ensaios ou pelo fato de possuírem ou não raízes e devido a isso suportarem e acumularem uma maior ou menor concentração do contaminante. Na atual pesquisa, como foram utilizados exemplares de macrófitas em fase jovem; praticamente brotos; e sem raízes, isso fez com que essa macrófita absorve-se menor concentração de cobre, em relação a outros trabalhos, uma vez que a ação desse metal não permitiu que suas raízes se desenvolvessem.

Comparando os resultados observados na atual pesquisa com resultados obtidos por Masutti (2004), que também avaliou os efeitos do metal cobre sobre o desenvolvimento da macrófita *Pistia stratiotes* nas mesmas condições de laboratório, observou-se que na atual pesquisa as macrófitas apresentaram maior sensibilidade ao metal cobre, visto que a

concentração utilizada para avaliação dos parâmetros era inferior ($73 \mu\text{g L}^{-1}$) às utilizadas por Masutti (2004) (1, 5 e 10 mg L^{-1}), onde o autor conseguiu registrar aumento de diâmetro em todas as concentrações testadas e aumento de número de folhas em concentração de até 5 mg L^{-1} de cobre, apresentando valores de CE (I) 50 nos testes de 14 dias maiores do que os observados para o teste de 7 dias, indicando que as macrófitas desenvolveram tolerância ou diminuição de sensibilidade ao cobre ao longo do tempo de exposição. Porém, assim como na atual pesquisa, Masutti (2004) também observou que o melhor parâmetro de avaliação utilizado foi o comprimento das raízes principais, sendo o parâmetro número de folhas nascidas não considerado um bom parâmetro para esse tipo de macrófita,

Em trabalho realizado em condição de mesocosmos por esse mesmo autor, avaliando os efeitos do cobre em concentração de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ e do cromo em concentração de $0,50 \text{ mg L}^{-1}$ sobre os parâmetros de desenvolvimento (biomassa, altura, diâmetro, número de brotos) e de bioacumulação de *P. stratiotes*, este observou após 15 dias de exposição aos metais que as macrófitas apresentaram ganho de biomassa e nascimento de novos brotos, não havendo diferença significativa estatisticamente entre controle e tratamentos para os parâmetros de desenvolvimento tanto para cobre como para cromo. Em relação à absorção de metais pelas macrófitas, só houve diferença significativa entre controles e tratamentos para o metal cromo, não sendo observado diferença significativa para o cobre, tendo provavelmente ocorrido esse resultado devido a concentração de metal utilizada ser baixa (concentração máxima permitida pelo CONAMA para águas de classe II), além dessa concentração ser típica do local onde foi desenvolvido o ensaio de toxicidade.

Comparando os resultados observados entre os ensaios realizados em condição de laboratório e de mesocosmos, tanto de Masutti (2004) quanto na atual pesquisa, observa-se que mesmo que as concentrações de metais utilizada no ensaio de mesocosmo tenham sido menores quando comparada com as utilizadas em laboratório, nota-se que os resultados obtidos em mesocosmos são menos pronunciados, podendo esse fato estar relacionado com a complexidade do compartimento (sedimento, organismo, água e parâmetros ambientais não controláveis), o que as vezes não ocorre em laboratório, onde tudo é muito mais controlado.

Em pesquisa de Lima, M. (2010), foram avaliados o efeito de cromo também sobre alguns parâmetros de desenvolvimento de *P. stratiotes* nas concentrações de 1,0; 1,7, 3,5, 5,3 e $6,0 \text{ mg L}^{-1}$, sendo observado após 21 dias de ensaio alterações no diâmetro das plantas, em todas as concentrações quando comparado com seu controle, o que também foi observado na presente pesquisa com cobre. A taxa de crescimento relativo também foi afetada, em todas as concentrações, mas principalmente a partir de $3,5 \text{ mg L}^{-1}$. Quanto ao número de folhas

nascidas houve crescimento, porém não houve diferença significativa entre as diferentes concentrações de cromo, sendo considerado pelo autor como um parâmetro não muito significativo para avaliação de toxicidade. Quanto a concentração de clorofila, somente na concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ do metal, não foi observado variação em seu teor de clorofila. As demais concentrações apresentaram redução em relação aos controles, principalmente nos dois maiores tratamentos de cromo.

Lima, P. (2010), avaliando os efeitos de cobre (2,0; 3,2; 6,0; 8,8 e $10,0 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ aplicados por 12, 19, 36, 53 e 60h) sobre parâmetros de bioacumulação, concentração de clorofila e indução de estresse oxidativo sobre *P. stratiotes*, observou que a bioacumulação nas folhas foi dependente do tempo. Quanto ao conteúdo de clorofila foi observado um decréscimo apenas nas concentrações mais elevadas e nos tempos de exposição mais prolongados, sendo a concentração de clorofila *a* mais afetada do que a de clorofila *b*. Quanto ao estresse oxidativo, houve variação na resposta da peroxidação de lipídios, assim como na atividade da catalase (CAT; EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX; EC 1.11.1.11) e glutatona redutase (GR; EC 1.6.4.2), confirmando que o cobre induziu o estresse oxidativo em *P. stratiotes* e esta demonstrou capacidade de tolerância ao estresse imposto, sendo indicada pelo autor como biomarcadora e fitorremediadora de ambientes poluídos. Se compararmos os resultados observados por esse autor, onde foi utilizado concentrações de cobre e tempo de exposição das macrófitas bem menores do que na atual pesquisa, observamos que essa conseguiu apresentar resultados de bioacumulação e diferença de concentração de clorofila bem mais acentuados do que o da atual pesquisa, estando estes resultados provavelmente relacionados com a presença das raízes dessa macrófita.

7.2 Efeitos diferenciados de metais sobre *Azolla filiculoides* e a avaliação de sua capacidade bioacumuladora.

A discussão a seguir refere-se aos ensaios de toxicidade laboratoriais utilizando *Azolla filiculoides* como organismo-teste, quando exposta às concentrações de cobre ($0,07$, $1,3$ e $12,7 \text{ mg L}^{-1}$) e de zinco (5 , 10 e 20 mg L^{-1}), em três tratamentos de fósforo (3 , 15 e 46 mg L^{-1}), durante 14 dias. Cada parâmetro avaliado serão discutidos em conjunto para que haja melhor entendimento sobre o efeito de cada metal sobre *Azolla filiculoides*.

Quanto à concentração de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides*, pode ser observado que o metal cobre ocasionou efeito de redução da concentração desse nutriente em

todas suas concentrações, quando comparado com seu controle, causando efeito mais acentuado conforme o aumento de sua concentração, em todos os tratamentos de fósforo, mas principalmente na menor concentração (P3). Sugere-se que a redução da concentração de nitrogênio total observada tenha ocorrido pelo fato de que as altas concentrações desse metal causaram danos à colônia de cianobactérias *Anabaena azollae* que vivem em associação com a *Azolla*, as quais são responsáveis pela fixação e disponibilização do nitrogênio para essa macrófita. Além disso, possivelmente essa interferência foi mais acentuada no tratamento com menor concentração de fósforo (P3) devido essa macrófita se desenvolver melhor em locais com concentrações mais elevada desse nutriente. Esse argumento está de acordo com o observado por Adalberto et al. (2004), os quais analisando o metabolismo da fixação de nitrogênio da simbiose entre *Azolla caroliniana* e *Anabaena azollae*, cultivada no campo sob condições controladas, observou que houve ocorrência de estresse por deficiência de fósforo. Essa redução da atividade fixadora da cianobactéria refletiu em menores teores de nitrogênio acumulado nos tecidos dessa macrófita sob tais condições. Sela et al. (1989), avaliando a acumulação e o efeito de metais pesados sobre *Azolla filiculoides*, observou que o metal cobre em concentrações entre 5 e 20 mg L⁻¹ inibiu parcialmente a fixação de nitrogênio, confirmando o ocorrido na atual pesquisa. Campbel (1999) cita que altas concentrações de cobre podem afetar o crescimento e a concentração de nitrogênio da planta, uma vez que esse metal reduz o processo da atividade nitrato redutase, interferindo na velocidade de assimilação do nitrato por esse organismo.

Para o metal zinco, verificou-se que este ocasionou redução de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides*, quando comparado com seus controles, nas duas maiores concentrações desse metal (Zn10 e Zn20) nos dois tratamentos mais baixos de fósforo (P3 e P15), enquanto que no tratamento mais alto (P46) este apresentou redução de nitrogênio apenas na concentração Zn20. De um modo geral, foi observado que o efeito do zinco foi mais tóxico conforme o aumento da sua concentração, sendo esses efeitos menos acentuados conforme o aumento da concentração de fósforo.

A ocorrência do aumento ou estabilidade do nitrogênio quando a *Azolla* foi exposta às menores concentrações de zinco, pode se dever ao fato desse metal ser de grande importância para a manutenção do metabolismo dos organismos clorofilados, quando em pequenas concentrações. Esse argumento confere com citação feita por Jain et al. (1990), o qual afirma que o zinco possui ação benéfica para as plantas em concentrações de até 4 mg L⁻¹, favorecendo seu crescimento e sobrevivência, porém em concentrações mais altas pode causar toxicidade e interferência no crescimento do organismo.

Outra observação a ser feita em relação à presente pesquisa é que, tanto no caso do cobre quanto no caso do zinco, é perceptível que o fósforo proporcionou maior condição de desenvolvimento quanto maior foi sua concentração, podendo-se inferir que o nitrogênio é dependente do fósforo, na presença de estressantes como os metais, no desenvolvimento de *Azolla*.

Quanto à concentração de fósforo total em biomassa de *A. filiculoides* quando exposta ao metal cobre, notou-se a ocorrência de redução de concentração desse nutriente na maior concentração de cobre (Cu12,7) no menor tratamento de fósforo (P3) e na menor concentração de cobre (Cu0,07) no tratamento (P15). Foi observado também aumento significativo da concentração de fósforo total quando a macrófita foi exposta à concentração de Cu (1,3) no tratamento de fósforo P(3) e nas concentrações Cu(1,3) e Cu(12,7), ambas no tratamento P(46). Esses resultados podem ser explicados por Lales et al.¹¹ (1993 *apud* ADALBERTO et al., 2004), devido ao fato dessa macrófita, quando submetida a elevadas concentrações de metais, sintetizar fitoquelatinas, as quais contribuem para um processo de desintoxicação. Sob baixos teores de fósforo, provavelmente seu metabolismo não possibilitou esta proteção e já sob concentrações mais elevadas de fósforo, esse mecanismo protetivo permitiu maior absorção deste nutriente. Guimarães (2006), avaliando a influência do fosfato na remoção de arsênio por *Azolla caroliniana*, *Salvinia mínima* e *Lemna gibba*, observou que as três macrófitas absorveram menor concentração de arsênio conforme o aumento do fosfato no meio, atribuindo esse fato à competição pelos mesmos sítios de ligação existente entre essas duas substâncias. Viveros (2012), avaliando a absorção de diferentes elementos químicos por *A. filiculoides* quando expostas a diferentes concentrações de cobre (0,02, 0,2, 1 e 2 mM), observou que o fator de bioconcentração dessa planta diminuiu conforme o aumento da concentração de cobre, nas duas concentrações mais baixas, porém nas duas concentrações mais altas ocorreu o inverso. Outra observação feita por esse autor foi que o conteúdo de fósforo aumentou ligeiramente nas plantas até a concentração de 0,2 mM e depois sofreu decaimento conforme o aumento do metal na solução.

Quanto à concentração de fósforo total em biomassa de *A. filiculoides* quando exposta ao metal zinco, foi observado que este causou reduções significativas na concentração de fósforo total na concentração Zn (10) nos tratamentos P(3) e P(15) e em Zn(20), em todos os tratamentos de fósforo. Nota-se tendência decrescente da concentração de fósforo total conforme o aumento da concentração de zinco nos tratamentos P(3) e P(15), não ocorrendo o

¹¹ LALES et al. *Azolla* as biological scavenger of geothermal ions III. Arsenic and boron uptake under field conditions. *Philippine Agriculturist*, v.76, p.185-191, 1993.

mesmo em P(46). Pode-se inferir, nesse caso, que o zinco em concentrações acima de 5mg L^{-1} causou toxicidade em *A. filiculoides* em concentrações com até 15mg L^{-1} de fósforo, podendo suportar até 10mg L^{-1} desse metal em locais com maior quantidade de fósforo (46mg L^{-1}), notando-se que o fósforo em maiores concentrações proporcionou proteção contra os efeitos do zinco em *A. filiculoides*.

Em relação à concentração de cobre total em biomassa de *A. filiculoides*, na presente pesquisa, foi observado que essa macrófita só conseguiu absorver cobre significativamente quando comparado com seu controle, quando foi exposta à menor concentração de cobre ($\text{Cu}0,07$) no menor tratamento de fósforo (P3). De um modo geral pode ser observado que nos tratamentos de fósforo (P15 e P46), a absorção de cobre pela macrófita diminuiu conforme o aumento da concentração de cobre e de fósforo. Segundo Lopes-Ferreira (1995), a alta concentração de nutrientes pode saturar as plantas, podendo ocorrer degeneração do seu metabolismo, embora a assimilação em excesso desses nutrientes possa ser limitada por mecanismos de defesa como o uso de fitoquelatinas e redução da concentração interna por efluxo. Quanto as altas concentrações de cobre, Aust et al.¹² (1989 *apud* CARDOSO et al., 2003) citam que devido a alta capacidade geradora de espécies reativas de oxigênio desse metal, quando encontra-se em excesso, causam danos ao metabolismo da planta, induzindo a peroxidação de lipídios das membranas celulares e dessa forma ocasionando a diminuição de absorção desses nutrientes.

Em relação à concentração de zinco total em biomassa de *A. filiculoides*, pode ser notado que a macrófita absorveu maior concentração desse metal quando exposta a menor concentração de zinco (Zn5), nos tratamentos P3 e P15; sendo provavelmente uma concentração ótima para o desenvolvimento dessa planta; e absorveu menor concentração de zinco quando foi exposta a concentração Zn(10), em todos os tratamentos de fósforo, além de Zn 20 no tratamento P46, já sendo essas concentrações consideradas estressantes para *A. filiculoides*. Esses resultados corroboram com o ocorrido em pesquisa de Khellaf; Zerdaoui (2009), os quais, analisando a fitoacumulação de zinco por *Lemna gibba* observaram que esta macrófita removeu zinco com maior eficiência, atingindo taxa de 71%, quando as concentrações iniciais desse metal na água eram em torno de 6mg L^{-1} . Malavolta (1994) e Malavolta et al. (1978), avaliando os efeitos de deficiência e excesso de minerais sobre parâmetros de crescimento, composição química e fixação de nitrogênio de *Azolla filiculoides* Lam, observaram que a deficiência de fósforo promoveu maior absorção de ferro e zinco,

¹² AUST et al. Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free Radic. Biol. Med.*, v.1, p.3-25, 1989.

indicando que altas concentrações de fósforo inibiu a absorção do zinco pela planta. A observação feita por esse autor confirma o ocorrido na presente pesquisa, onde foi registrado um decaimento na absorção de zinco por *A. filiculoides* conforme o aumento da concentração de fósforo entre os três diferentes tratamentos desse nutriente. O mesmo foi observado por Corrêa et al. (2002), os quais afirmam que a disponibilidade de zinco para as plantas é reduzida quando estas encontram-se em locais com concentrações altas de fósforo e isso ocorre devido o zinco se ligar ao cátion que acompanha o fósforo.

Quanto ao aumento significativo encontrado em Zn20 no tratamento P3 na presente pesquisa, não foi encontrada uma explicação plausível, visto que nos demais parâmetros analisados para esse tratamento, o mesmo sempre apresentou reduções significativas em relação ao seu controle, com exceção de biomassa e taxa de crescimento relativo que apresentou semelhança em relação ao seu controle.

Em relação à concentração de clorofila *a* em biomassa de *A. filiculoides*, quando exposta ao metal cobre na presente pesquisa, foi observado que este metal provocou a redução da concentração de clorofila *a* e total na macrófita, em todas as concentrações de metal, quando comparado com seus controles, estando de acordo com o observado pela maioria dos autores. Porém, em geral, com exceção da concentração Cu(12,7) no tratamento P(3), a tendência foi aumentar a concentração de clorofila *a* da concentração de Cu0,07 para Cu1,3 e depois decair em Cu12,7 nas três concentrações de fósforo, podendo estar associado ao fato de que quanto maior for o estresse provocado pelo metal, maior será a concentração de clorofila produzida pela macrófita na tentativa de desintoxicação desse metal até um certo ponto, ocorrendo decaimento em seguida. Observou-se também que tanto os aumentos como as reduções mais acentuadas foram registradas no tratamento P(46), observando-se aumento crescente da concentração de clorofila da menor para a maior concentração de fósforo, o que ocorreu pelo fato desse nutriente possuir papel energético no metabolismo dos organismos clorofilados em geral. O mesmo foi observado por Ovsiany e Delai (2007), os quais, avaliando a capacidade da mamona para fitorremediação de chumbo, registraram o mesmo comportamento para o parâmetro clorofila, onde as plantas apresentaram aumento do teor desse pigmento conforme o aumento da concentração de chumbo, sendo esse fato atribuído pelos autores como uma provável defesa do organismo, buscando uma forma de aumentar a produção de energia para combater o estresse de metal.

Quanto a concentração de clorofila total, foi observado quase o mesmo padrão observado em clorofila *a* com a diferença das concentrações de cobre Cu12,7 no tratamento

P15 e a concentração Cu1,3 em P46 não apresentarem mais redução significativa, indicando que quem sofreu redução maior nesse caso pode ter sido a clorofila *b* em relação a clorofila *a*.

Em relação a concentração de clorofila *a* e clorofila total em biomassa de *A. filiculoides*, quando exposta ao metal zinco, na presente pesquisa, foram registradas reduções significativamente mais acentuadas do que as ocasionadas pelo metal cobre, em todas as concentrações de zinco, nos diferentes tratamentos de fósforo, podendo ser observada tendência de aumento da concentração de clorofila nas concentrações de Zn5 conforme o aumento de fósforo, provavelmente por que nessa concentração de zinco a concentração de fósforo ainda surtiu efeito energético no metabolismo de *A. filiculoides* e já nas demais concentrações de zinco a concentração de fósforo já não fez mais essa diferença, estacionando a produção de clorofila pela macrófita. Wolff et al. (2009), observou danos morfológicos em *Salvinia auriculata*, tais como clorose e manchas avermelhadas em torno das nervuras centrais das folhas no terceiro e quarto dia de exposição ao zinco em concentrações de 7,5 e 10 mg L⁻¹, sendo observado após dez dias de exposição, nas mesmas concentrações, escurecimento e pouco desenvolvimento das raízes. Na presente pesquisa, ocorreu a redução da concentração de clorofila em biomassa de *A. filiculoides*, mas não foi observado clorose ou mudança de coloração da macrófita.

Em relação ao ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides* quando exposta ao metal cobre, no presente estudo foi observado que esse metal ocasionou as reduções no ganho de biomassa em sua maior concentração (Cu12,7) em todos os tratamentos de fósforo, estando esse fato relacionado com a redução da concentração de nitrogênio provocada pela alta concentração do cobre, que por sua vez interferiu no desenvolvimento da macrófita. Esse fato pode ser confirmado por Gaur et al. (1994), que avaliando a relação entre a acumulação de metais e a toxicidade causada por esses metais em *Spirodela polyrhiza* (L.) e *Azolla pinnata* R. Br, observou que a redução da taxa de crescimento relativo dessas duas plantas foi dependente da concentração dos metais, onde o cobre apresentou-se mais tóxico e inibitório para ambas as plantas quando comparado com o zinco, ocorrendo exatamente o mesmo na presente pesquisa. Sela et al. (1989) observaram em seu estudo que a *Azolla* quando exposta a altas concentrações de metais, apresentou redução da taxa de crescimento, do teor de água e mudança da textura e cor da parte aérea da planta. Guimarães (2006), avaliando o efeito de arsênio e atrazine sobre *Azolla caroliniana*, *Lemna gibba* e *Salvinia mínima*, registrou redução no ganho de biomassa conforme o aumento da concentração do contaminante. Bennicelli et al. (2004), também fez essa observação quando *Azolla*

caroliniana foi exposta a concentrações de mercúrio e cromo (III) e (IV), registrando a inibição do crescimento dessa macrófita entre 20 e 31% quando em contato com esses metais.

O aumento significativo apresentado quando *A. filiculoides* foi exposta às concentrações de Cu0,07 e Cu1,3 nos tratamentos de fósforo P3 e P15, provavelmente ocorreu por essas concentrações ainda serem estimulantes e não provocarem toxicidade para essa macrófita e mesmo as concentrações de clorofila sendo baixa nesses tratamentos, não houve danos no crescimento da *Azolla*. Viveros (2012), avaliando os efeitos de cobre (0, 0,02, 0,2, 1 e 2mmol) sobre o desenvolvimento de duas espécies de *Azolla*, observou que *A. filiculoides* apresentou bom desenvolvimento (46%) nas concentrações mais baixas de cobre (0,02 e 0,2), porém nas concentrações mais altas (1 e 2 mmol) o cobre inibiu o desenvolvimento de *A. filiculoides* em 20% .

Quanto ao ganho de biomassa de *A. filiculoides* quando exposta ao metal zinco no presente estudo, foi registrado aumento significativo na menor concentração de zinco (Zn5) no tratamento P15. Isso se deveu ao efeito benéfico do zinco, o qual em baixas concentrações é indispensável ao metabolismo da planta para seu bom desenvolvimento, sendo também essa resposta complementada pela ação energética do fósforo na concentração apresentada. Isso pode ser confirmado por Jain et al. (1990), os quais avaliando a capacidade de absorção dos metais chumbo e zinco por *Azolla* e *Lemna* e os efeitos ocasionados nos parâmetros de crescimento dessa macrófita, observaram que a adição de zinco até 4,0 mg L⁻¹ possui um efeito favorável sobre o crescimento de ambas as plantas, devido estas utilizarem esse metal como micronutriente para seu desenvolvimento, porém, em concentrações acima deste valor, esse metal torna-se tóxico. O descrito por esses autores acaba por justificar as reduções observadas no ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo de *A. filiculoides*, registrado nas duas maiores concentrações de zinco (Zn10 e Zn20) no tratamento P46.

Em relação à pigmentação avermelhada apresentada nas macrófitas do experimento com cobre, na concentração de 12,7 mg L⁻¹ desse metal, provavelmente a mesma ocorreu em função da produção de antocianinas que confere tal coloração à planta quando esta é submetida a condições de estresse (HOLST, 1977). As antocianinas são grupos compostos por flavonoides responsáveis pela coloração de muitas flores, frutas e vegetais (LONGO et al., 2007), contribuindo com a proteção da fotoinibição (STEIN et al., 2002), protegendo o aparato fotossintético da planta, absorvendo alta intensidade de luz e transformando em calor (LUMPKIN; PLUCKNETT, 1980), captação de espécies reativas de oxigênio, quelação de metais e simbiose entre planta e organismo (COHEN et al., 2002; HALE et al., 2001; NEILL; GOULD, 2003). As antocianinas normalmente acumulam e conferem a coloração

avermelhada ou arroxeadada ao tecido dos vegetais como resposta ao estresse ocasionado por fatores como baixa concentração de fósforo disponível no ambiente, onde estas se encontram (ADALBERTO et al., 2004; TALLEY et al., 1977), contaminação por metais, temperaturas baixas (GOULD et al., 2002; POSMYK et al., 2009) ou muito altas e altos níveis de luz, estando esses dois últimos fatores relacionados com a ocorrência da diminuição do tempo de duplicação da clorofila e indução da produção de antocianina (ZIMMERMAN, 1985).

Apesar de Pott e Pott (2000) citar que a *Azolla filiculoides*, gênero utilizado na presente pesquisa, apresentar coloração verde quando jovem e depois com o passar do seu ciclo de vida passa a apresentar coloração parda e avermelhada, na atual pesquisa, mesmo não tendo sido feitas análise específicas para quantificar a concentração de antocianina, sendo apenas observado visualmente essa característica da macrófita, acredita-se que a coloração avermelhada observada está relacionada com a produção de antocianinas decorrente do estresse provocado pelo metal cobre e a coloração parda é resultante da desidratação das folhas também provocada por esse metal, pois tanto as macrófitas utilizadas no experimento com o metal cobre quanto no experimento com o metal zinco, foram retiradas do mesmo lote de plantas e somente as que foram expostas aos tratamentos com 12,7 mg L⁻¹ de cobre apresentaram essa coloração. Nossos resultados corroboram com os observados por Viveros (2012), que avaliando efeitos do cobre provocados em *A. filiculoides* e *A. caroliniana*, observaram que estas quando submetidas a concentrações de 1 e 2 mmol de cobre passaram a apresentar desidratação das folhas seguida de mudança de coloração de verde para parda, confirmando os resultados observados na presente pesquisa. Guimarães (2006), analisando os efeitos de intoxicação ocasionados pelo arsênio em *Azolla caroliniana*, quando expostas às concentrações de 2,5 e 5,0 mg L⁻¹ desse metal, observou que estas apresentaram coloração arroxeadada nas bordas em suas folhas a partir do terceiro dia de exposição, sendo esse efeito atribuído a ação do metal em questão.

Comparando a ação do metal cobre e do zinco na presente pesquisa, nota-se que o cobre, em geral e em especial na concentração de 12,7 mg L⁻¹, causou mais efeitos deletérios sobre o desenvolvimento de *A. filiculoides* do que o zinco, em todos os tratamentos de fósforo. Pode ser observado também na presente pesquisa que essa macrófita é uma ótima hiperacumuladora de cobre e zinco, visto que o mínimo acumulado foi de 11,58 mg Kg⁻¹ MS de cobre e de 61,52 mg Kg⁻¹ MS de zinco e conforme Baker et al. (2000) para uma planta ser considerada uma hiperacumuladora, esta tem que ser capaz de acumular mais de 1mg gMS do metal.

8. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Diante dos resultados observados na presente pesquisa, foi possível concluir que:

- 1) O metal cobre na concentração nominal de $73 \mu\text{g L}^{-1}$ (concentração média real de $68,7 \mu\text{g L}^{-1}$) causou efeito tóxico sobre *Pistia stratiotes*, na maioria dos parâmetros nutricionais e de desenvolvimento avaliados, sendo: concentração de cobre total e de nitrogênio orgânico total em biomassa da respectiva macrófita, ganho de biomassa, taxa de crescimento relativo, ganho de diâmetro da roseta, comprimento da raiz, número de folhas com clorose e altura foliar os parâmetros que apresentaram resultados mais expressivos de toxicidade. Já número de folhas nascidas, ganho de largura foliar e número de raízes nascidas, não foram considerados bons parâmetros de avaliação. Número de folhas com necrose é um ótimo parâmetro de avaliação de toxicidade, apesar desse parâmetro não ter sido significativo na presente pesquisa.
- 2) Não foi observada interferência das diferentes concentrações de fósforo na ação do cobre sobre os aspectos de desenvolvimento e capacidade de assimilação de nutrientes por *Pistia stratiotes*, em relação aos controles, com exceção do parâmetro nitrogênio orgânico total, o qual foi mais assimilado pela macrófita conforme o aumento da concentração de fósforo no meio, que por sua vez proporcionou efeito positivo para a macrófita contra a ação tóxica do cobre.
- 3) No ensaio de toxicidade com *Azolla filiculoides* o metal cobre também causou efeitos tóxicos em todos os parâmetros nutricionais, biológico e de desenvolvimento avaliados. No caso de nitrogênio total em biomassa de *A. filiculoides*, as reduções foram mais acentuadas conforme o aumento da concentração do metal, em todos os tratamentos de fósforo. Para fósforo total foi observada reduções na maior concentração de cobre no tratamento com menor concentração de fósforo. Já para os parâmetros cobre total e clorofila *a* e total notou-se a redução destes conforme o aumento da concentração de fósforo do meio. Já para ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo só houve toxicidade e redução desses parâmetros na maior concentração de cobre ($12,7 \text{ mg L}^{-1}$), em todos os tratamentos de fósforo.
- 4) De um modo geral, pode-se afirmar que o fósforo interferiu de maneira positiva na ação deletéria do cobre sobre os aspectos nutricionais, de bioacumulação e desenvolvimento de *Azolla filiculoides*, sendo os parâmetros nitrogênio total, cobre total, clorofila *a* e total, ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo os parâmetros que apresentaram resultados mais expressivos de toxicidade.
- 5) No ensaio de toxicidade com *Azolla filiculoides* e zinco, todos os parâmetros avaliados apresentaram toxicidade. Nitrogênio total em biomassa da respectiva macrófita e fósforo total sofreram reduções nas maiores concentrações de zinco (10 e 20 mg L^{-1}), nos menores tratamentos de fósforo (3 e 15 mg L^{-1}) e na maior concentração de zinco (20 mg L^{-1}) no maior tratamento de fósforo (46 mg L^{-1}). Já para zinco total pode ser

observado que, quanto maior a concentração de fósforo do meio, menor foi a capacidade de absorção desse nutriente pela macrófita em questão, indicando 5 mg L⁻¹ de zinco como uma concentração ótima para o desenvolvimento dessa espécie, nos três diferentes tratamentos de fósforo, e a concentração a partir de 10 mg L⁻¹ considerada estressante, em todos os tratamentos de fósforo testados.

- 6) Quanto aos parâmetros clorofila *a* e total em biomassa de *A. filiculoides*, estes apresentaram reduções significativas em todas as concentrações de zinco, em todos os tratamentos de fósforo, sendo menos acentuado conforme o aumento da concentração de fósforo do meio. Já em relação ao ganho de biomassa final e taxa de crescimento relativo, *A. filiculoides* só apresentou toxicidade nas maiores concentrações de zinco (10 e 20 mg L⁻¹) no tratamento com maior concentração de fósforo (46 mg L⁻¹).
- 7) Assim como ocorreu no teste de toxicidade com cobre, pode-se afirmar que o fósforo interferiu de maneira positiva na ação deletéria do zinco sobre os aspectos nutricionais, de bioacumulação e desenvolvimento de *A. filiculoides*, sendo todos os parâmetros avaliados para esse metal considerados bons parâmetros de avaliação de toxicidade.
- 8) Desse modo, a primeira hipótese de que *Pistia stratiotes* e *Azolla filiculoides* tem potencial para utilização nos estudos de avaliação de toxicidade ambiental, sendo que ambas, em função de sua capacidade de bioacumulação (nutrientes e metais), podem ser recomendadas para uso em sistemas de tratamento de efluentes, foi confirmada apenas para *Azolla filiculoides* para os dois metais e refutada para *P. stratiotes*, nas condições do presente experimento, podendo essa última espécie ser utilizada, nesse caso, como bioindicadora de locais contaminados.
- 9) A segunda hipótese de que as diferentes concentrações de fósforo do meio influenciariam nas ações dos metais, também foi confirmada, onde fica claro que quanto maior a concentração de fósforo do ambiente, maior proteção esse nutriente vai oferecer a planta aquática (até certo ponto), contra as ações deletérias desses metais. Porém, devido a essa proteção, no caso dos metais cobre e zinco, estes serão menos absorvidos pelas macrofitas, quando em ambiente com altas concentrações de fósforo, tornando-se mais biodisponíveis na água.
- 10) Em resumo, recomenda-se que testes de toxicidade sejam realizados com um maior número de contaminantes e espécies bioindicadoras possíveis, sendo estes testes agudos e crônicos, em laboratório e *in situ*, com tempo de observação de poucas horas até muitos meses, para que tenhamos acesso a um maior número de resultados que possam ser utilizados como base para tomada de decisões sobre o uso ou interdição de determinadas substâncias e identificação dos melhores bioindicadores e metodologias para avaliação desses compostos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADALBERTO, P.R. et al. Efeito do fósforo na captação de minerais e pigmentação de *Azolla caroliniana* Willd. (Azollaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.27, n.3, p.581-585, 2004.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for copper**. U.S. Department of Health and Human Services. 2004.

Disponível em:<<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp132.pdf>>. Acesso em: 10 Jan. 2014.

AIT ALI, N.; BERNAL, M. P.; ATER, M. Tolerance and bioaccumulation of Cd by *Phragmites australis* grown in the presence of elevated concentration of cadmium, copper, and zinc. **Aquatic Botany**, n.80, p.163-176, 2004.

AMARAL, M.C.E. et al. **Guia de campo para plantas aquáticas e palustres do Estado de São Paulo**. Ribeirão Preto: Holos, 2008.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. American Water Work Association. Water Control federation. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 19^a ed. New York, 1995.

ANDRADE, L.R.; FARINA, M.; AMADO FILHO, G.M. Effects of copper on *Enteromorpha flexuosa* (Chlorophyta) *in vitro*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, n.58, p.117-125, 2004.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. 2. ed. 2008, São Carlos, São Paulo: RiMa, 2008. p.117-152.

ARAÚJO, A.C.P.; NOGUEIRA, D.P.; AUGUSTO, L.G.S. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura de tomate. **Saúde Pública**, v.34, n.3, p.309-313, 2000.

ARAÚJO, C.V.M. et al. In situ and laboratory bioassays using *Poecilia reticulata* Peters, 1859 in the biomonitoring of an acidic lake at Camaçari, BA, Brazil. **Chemosphere**, v.65, p.599-603, 2006.

ARTS, G.H.P. et al. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. **Environmental Pollution**, n.153, p.199-206, 2008.

BAHADIR, T. et al. The investigation of lead removal by biosorption: An application at storage battery industry wastewaters. **Enzyme and Microbial Technology**, v.41, p.98-102, 2007.

BAKER, A.J.M. et al. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Ed.). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton: Lewis, 2000. p.85-107.

BARROS, L.S.S.; AMARAL, L.A.; LUCAS JÚNIOR, J. Poder poluente de águas residuárias de suinocultura após utilização de um tratamento integrado. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, n.2, p.126-35, 2003. Suplemento.

BASSO, C.J. et al. Dejeito líquido de suínos: II – perdas de nitrogênio e fósforo por percolação no solo sob plantio direto. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1234-1242, 2005.

BATISTA A.A. et al. Sazonalidade e variação espacial do índice de estado trófico do açude Orós, Ceará, Brasil. **Revista Agro@mbiente On-line**, v.8, n.1, p.39-48, jan./abr. 2014.

BELGERS, J.D.M.; AALDERINK, G.H.; VAN DEN BRINK, P.J. (2009). Effects of four fungicides on nine non-target submersed macrophytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.579–584.

BELGERS, J.D.M. et al. Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. **Aquatic Botany**, v.86, p.260–268, 2007.

BENAROYA, R.O. et al. Lead accumulation in the aquatic fern *Azolla filiculoides*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.639–645, 2004.

BENNICELLI, R. et al. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water. **Chemosphere**, v.55, p.141–146, 2004.

BETTINELLI, et al. The role of analytical methods for the determination of trace elements in environmental biomonitors. **Microchemical Journal**, v.73, n.1/2, p.131-152, 2002.

BINI, L.M. et al. Aquatic macrophyte distribution in relation to water and sediment conditions in the Itaipu Reservoir, Brazil. **Hydrobiologia**, n.415, p.147–154, 1999.

BIUDES, J.F.V.; CAMARGO, A.F.M. Changes in biomass, chemical composition and nutritive value of *Spartina alterniflora* due to organic pollution in the Itanhaém river Basin (Sp, Brazil). **Brazilian Journal Biology**, v.66, n.3, p.781-789, 2006.

BLÁZQUEZ, G. et al. Removal of cadmium ions with olive stones: the effect of some parameters. **Process Biochemistry**, v.40, n.8, p.2649-2654, 2005.

BORRELEY, S.I.; TORNIERI, P.H.; SAMPA. M.H.O. Avaliação da toxicidade aguda em efluentes industriais, afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgotos. In: ESPÍNDOLA, E.L.G. et al. (Ed.). **Ecotoxicologia – perspectivas para o século XXI**. [S.l.:s.n.], 2000.

BOULDIN, J.L. et al. Evaluated fate and effects of atrazine and lambda- cyhalothrin in vegetated and unvegetated microcosm. **Environmental Toxicology**, vol.20, n.5, p:487-498.

BOYD, C.E.; QUEIROZ, J. Aquaculture pond effluent management. **Aquaculture**, vol.4, n.6, p: 43-46.

BRAGA, B. et al. **Introdução à engenharia ambiental**. 2ª ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2005.

BRAIN, R.A. et al. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna minor* using a seven-day static renewal test. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.2, p.371–382, 2004.

BRANCO, S.M. **Poluição e intoxicação de peixes**. [S.l.]: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí, 1970.

CALLISTO, M.; GONÇALVES JÚNIOR, J. F. Bioindicadores bentônicos. In: ROLAND, F.; CÉSAR, D.; MARINHO, M. (Ed.). **Lições de limnologia**. [S.l.:s.n.], 2005. p.371-379.

CAMPBELL, C.S. **Biology**. 4^aed. Riverside: University of California; The Benjamin/Cummings, 1995.

CAMPBELL, C.S.; OGDEN, M. **Constructed wetlands in the sustainable landscape**. New York: Wiley, 1999.

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

CARDOSO, D. R.; LIMA-NETO, B. S.; FRANCO, D. W. Influência do material do destilador na composição química das aguardentes de cana. Parte II. **Química Nova**, v.26, n.2, p.165-169, 2003.

CARRAPIÇO, F. **Azolla em Portugal**. Lisboa: Instituto da Água; Ministério do Meio Ambiente e o Ordenamento do Território; Centro de Biologia Ambiental; Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2001. Disponível em: <<http://azolla.fc.ul.pt/documents/AzollaPortugal.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2012.

_____. **Is the *Azolla-Anabaena* symbiosis a co-evolution case?**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE “GENERAL BOTANY: traditions and perspectives”, 2006. **Proceedings...** [S.l.]: Department of Botany of the Kazan University, 2006.

CARVALHO, E.F.; LOPES, N.F. Crescimento, pigmentação e fixação de nitrogênio em *Azolla* spp. cultivada em quatro níveis de densidade do fluxo radiante. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.29, n.2, p.221-236, 1994.

CASTRO, L.F.A. **Avaliação do zinco plasmático nos pacientes idosos no hospital regional de Araguaiana, Tocantins**. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CAUSTON, D.R. Plant growth analysis: a note on the variability of unit leaf rate (net assimilation rate) within a sample. **Annals of Botany**, v.74, n.5, p.513-518, 1994.

CERVANTES, C. et al. Interactions of chromium with microorganisms and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, p.335-347, 2001.

CHEN, C.Y. et al. Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes. **Limnology Oceanography**, n.45, p.1525-1536, 2000.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management.** London: E & FN Spon, 1999.

CHUAN, M.C.; SHU, G.Y.; LIU, J.C. Solubility of heavy metals in a contaminated soil: effects of redox potential and pH. **Water, Air and Soil Pollution**, v.90, p.543-556, 1996.

CLABEUX, A.N. et al. Combined effects of cadmium and zinc on growth, tolerance, and metal accumulation in *Chara australis* and enhanced phytoextraction using EDTA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.98, p.236-243, 2013.

COELHO-SOUZA, S.A.; MIRANDA, M.R.; GUIMARÃES, J.R.D. A Importância das macrófitas aquáticas no ciclo do mercúrio na bacia do rio Tapajós (PA). **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.2, p.252-263, 2007.

COHEN, M.F. et al. Synergistic effect of deoxyanthocyanins from symbiotic fern *Azolla* spp. on hrmA gene induction in the cyanobacterium *Nostoc punctiforme*. **Molecular Plant Microbe Interact**, v.15, n.9, p.875-882, 2002.

COLEMAN, J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v.21, p.441-483, 1992.

_____. Zinc enzymes. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.2, n.2, p.222-234, 1998.

COLEMAN, J. O. D.; RANDALL, R.; BLAKE-KALFF, M. M. A. Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent assay using monochlorobimane. **Plant Cell Environment**, v. 20, p449-460, 1997.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Qualidade das águas superficiais no estado de São Paulo.** São Paulo: Governo do Estado de São Paulo; Secretaria do Meio Ambiente, 2010. (Série Relatórios) Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em: 15 mar. 2010.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Ficha de informação toxicológica – zinco.** 2014. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/Zinco.pdf>>. Acesso em: 12 jun. 2014.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. 2010. **Padrões de qualidade para corpos d'água.** Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br>. Acesso em março de 2010.

COORS, A. et al. Application of in-situ bioassays with macrophytes in aquatic mesocosm studies. **Ecotoxicology**, vol.15, p:583-591. (2006).

COPPENET, M. et al. Évolution chimique des sols en exploitation d'élevage intensif: exemple du finistère. **Agronomie**, v.13, n.2, p.77-83, 1993.

CORRÊA, F. L. O. et al. Fósforo e zinco no desenvolvimento de mudas de Aceroleira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 24, n.3, p.793-796, 2002.

COSTA, R. H. R et al. Tertiary treatment of piggery waste in water hyacinth ponds. **Water Science and Technology**, v.42, n.10/11, p.211-214, 2000.

COSTA JR, I.L. **Cinética de bioacumulação do íon Pb^{+2} na macrófita aquática *Pistia stratiotes***. 2007 110p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2007.

DEMIREZENETAL, D.; AKSOY, A.; URUC, K. Effect of population density on growth, biomass and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae). **Chemosphere**, v.66, n.3, p.553-557, 2007.

DOMINGOS, V.D. et al. Efeito do cobre na atividade da enzima pirogalol peroxidase em plantas de *Myriophyllum aquaticum* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, v.23, n.2, p.375-380, 2005.

DUCIC, T.; POLLE, A. Transporte and detoxification of manganese and copper. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.17, n.1, p.103-112, 2005.

ESPINOZA-QUIÑONES, F.R. et al. Study of the bioaccumulation kinetic of lead by living aquatic macrophyte *Salvinia auriculata*. **Chemical Engineering Journal**, v.150, n.2/3, p.316-322, 2009.

ESTEVES, F.A. **Fundamentos de limnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Interciência, 1998.

ESTEVES, F.A.; CAMARGO, A.F.M. Caracterização de sedimentos de 17 reservatórios do Estado de São Paulo com base no teor de feopigmentos, carbono orgânico e nitrogênio orgânico. **Ciência e Cultura**, v.34, n.5, p.699-674, 1988.

FAIRCHILD, J.F.; SAPPINGTON, L.C. Fate and effects of the triazione herbicide metribuzin in experimental pond mesocosms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.43, p.198-202, 2002.

FERNANDES, J.C.; HENRIQUES, F.S. Biochemical, physiological and strutral effects of excess copper in plant. **The Botanical Review**, v.57, n.3, p.246-266,1991.

FERRÃO-FILHO, A. D. S.; MOLICA, R.; AZEVEDO, S. M. F. O. Ecologia, ecofisiologia e toxicologia de cianobactérias. **Oecologia Australis**, v.13, n.2, p.225-228, 2009.

FERREIRA, A.C.B. et al. Características agronômicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.131-138, 2001.

FIGUEIRÊDO, M.C.B.; TEIXEIRA, A.S.; ARAÚJO, L.F. Avaliação da vulnerabilidade ambiental de reservatórios à eutrofização. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.12, n.4, p.399-409, 2007.

FONSECA, A.L. **Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados**. 1997. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.

FRAGOSO JUNIOR, C.R. et al. Simulação de eutrofização em lagos rasos II: Sistema do Taim (RS). **Revista Brasileira de Recursos Hídricos**, v.12, n.4, p.37-48, 2007.

FRANZEN, M. **Dinâmica do fósforo na interface água-sedimentos em reservatório**. 2009. Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

FREEDMAN, B. **Environmental ecology** – the ecological effects of pollution, disturbance and others stresses. 2nded. San Diego: Academic Press, 1995. Chapter 3, p. 62-93.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE. **Classificação de atividades industriais e não industriais e seu potencial poluidor**. [S.l.]: Comissão Permanente de Normalização Técnica, 1992.

GAUR, J.P.; NORAHO, N.; CHAUHAN, Y.S. Relationship between heavy metal accumulation and toxicity in *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleid and *Azolla pinnata* R. Br. **Aquatic Botany**, v.49, p.183-192, 1994.

GOMES FILHO, R.R. et al. Remoção de carga orgânica e produtividade da aveia forrageira em cultivo hidropônico com águas residuárias da suinocultura. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.5, n.1, p.131-134, 2001.

GOULART, M. D.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista da FAPAM**, ano 2, n.1, 2003.

GOULD, K.S.; MICKELVIE, J.; MARKHAM, K.R. Do Anthocyanins function as antioxidants in leaves? Imaging of H₂O₂ in red and green leaves after mechanical injury. **Plant Cell Environ**, v.25, n.10, p.1261-1269, 2002.

GRANATO, M. **Utilização do aguapé no tratamento de efluentes com cianetos**. Rio de Janeiro: Centro de Tecnologia Mineral, 1995. (Série Tecnologia Ambiental, 5).

GRATÃO, P. L. et al. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, n.6, p.481-494, 2005.

GUILLIZONI, P. The Role of heavy metals and toxic materials in the physiological ecology of submerged macrophytes. **Aquatic Botany**, n.41, p.87-109, 1991.

GUIMARÃES, F.P. **Potencial de macrófitas para remoção de arsênio e atrazine em solução aquosa**. 2006. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

GUPTA, M.; CHANDRA, P. Bioaccumulation and toxicity of mercury in rooted-submerged macrophyte *Vallisneria spiralis*. **Environmental Pollution**, v.103, p.327-332, 1998.

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

HALE, K.L. et al. Molybdenum sequestration in *Brassica* Species. A Role for Anthocyanins? **Plant Physiology**, v.126, n.4, p.1391-1402, 2001.

HAND, L.H. et al. Influences of aquatic plants on the fate of the pyrethroid insecticide lambdacyhalothrin in aquatic environments. **Environmental Toxicology Chemistry**, v.20, n.8, p.1740-1745, 2001.

HANSON, M.L. et al. Microcosm evaluation of the toxicity and risk to aquatic macrophytes from perfluorooctane sulfonic acid. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v.48, n.3, p.329-337, 2005.

HEATH, A.G. **Water pollution and fish physiology**. New York: CRC Press, 1995.

HENRY-SILVA, G.G.; CAMARGO, A.F.M. Impacto das atividades de aquicultura e sistemas de tratamento de efluentes com macrófitas aquáticas – relato de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.34, n.1, p.165-175, 2008.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experimental Station, 1950.

HOLST, R.W. Anthocyanins of *Azolla*. **American Fern Journal**, v.64, p.99-100, 1977.

HORST, W. J.; MARSCHNER, H. Effect of silicon on manganese tolerance of beanplants (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v.50, p.287-303, 1978.

HOROWTTZ, A.; DANTAS, H.S. Geoquímica dos elementos menores nos solos de Pernambuco. IV. Zinco na zona litoral-Mata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.11, n.12, Série Agronomia, p.27-33, 1976.

INSTITUTO DE METAIS NÃO FERROSOS. **O Zinco e o meio ambiente**. Disponível em:<<http://www.icz.org.br/zinco-meio-ambiente.php>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

JAIN, S.K.; VASUDEVAN, P.; JHA, N.K. *Azolla pinnata* Br. And *Lemna minor* L. for removal of lead and zinc from polluted water. **Water Research**, v.24, n.2, p.177-183, 1990.

JESUS, C.A.G. **Zinco**. Balanço Mineral Brasileiro, 2001. Disponível em:<<http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/zinco.pdf>>. Acesso em: 5 jun. 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, E. **Trace elements in soils and plants**. 2nded. Boca Raton: CRC Press, 1992.

KAMAL, M. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. **Environment International**, v.29, n.8, p.1029-1039, 2004.

KARR, J.R. Biological integrity: a long-neglected aspect of water resource management. **Ecological Applications**, v.1, p.66-84, 1991.

KHAN, R. et al. Heavy metal pollution assessment in surface water bodies and its suitability for irrigation around the neyevli lignite mines and associated industrial complex, Tamil Nadu, India. **MineWater and the Environment**, v. 24, p.155-161, 2005.

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Phytoaccumulation of zinc by the aquatic plant, *Lemna gibba* L. **Bioresource Technology**, v.100, p.6137–6140, 2009.

KUBITZA, F. Tanques-rede, rações e impacto ambiental. **Panorama da Aquicultura**, v.9, n.51, jan./fev., 1999.

KUBITZA, F. A Evolução da tilapicultura no Brasil: produção e mercados. **Panorama da Aqüicultura**, v.13, n.76, p.25-35, mar./abr., 2003.

KUNZ, A. et al. **Recomendações técnicas para uso de esterqueiras para a armazenagem de dejetos de suínos**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2004. (Comunicado Técnico, 361).

KUSTER, A.; ALTENBURGER, R. Development and validation of a new fluorescence-based bioassay for aquatic macrophyte species. **Chemosphere**, n.67, p.194–201, 2007.

LACERDA, L.D. **Trace metals biogeochemistry and diffuse pollution in mangrove ecosystems**. Japan: International Society for Mangrove Ecosystem, 1998.

LAHIVE, E.; HALLORAN, J.O.; JANSEN, M.A.K. Differential sensitivity of four Lemnaceae species to zinc sulphate. **Environmental and Experimental Botany**, v.71, p.25-33, 2011.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Paulo: Rima, 2000.

LI, M. et al. Copper and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in the microalga *Pavlova viridis* (Prymnesiophyceae). **Chemosphere**, v.62, n.4, p.565–572, 2006.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v.148, p.331-382, 1987.

LIMA, M.V. **Avaliação do potencial de bioacumulação de cromo por *Pistia stratiotes***. 2010. 42f. Monografia (Graduação) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

LIMA, P.G. **Estudo dos mecanismos de detoxificação e tolerância aos metais cobre e cromo em *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Pistia stratiotes* e o uso das macrófitas *Thypha* sp. e *Phragmites* sp. na redução de nutrientes em wetlands construídos**. 2010. 283f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

LINDSAY, W.L. Zinc in soils and plant nutrition. **Advances in Agronomy**, v.24, p.147-186, 1972.

LLORENS, N. et al. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v.160, n.1, p.159–163, 2000.

LOMBARDI, J.V. Fundamentos de toxicologia aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T., TAKEMOTA, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p.261-270.

LONGO, L.; SCARDINO, A.; VASAPOLLO, G. Identification and quantification of anthocyanins in the berries of *Pistacia lentiscus* L., *Phillyrea latifolia* L. and *Rubia peregrine* L. *Innov. Food Science and Emerging Technologies*, v.8, n.3, p.360-364, 2007.

LOPES-FERREIRA, C. M. **O Papel de uma região colonizada por mcrófitas aquáticas na depuração de efluentes domésticos na lagoa imboacica (Macaé-RJ)**. 1995. 96 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2000.

LUMPKIN, T.A.; PLUCKNEET, D.L. *Azolla*: botany, physiology and use as green manure. *Society for Economic Botany*, v.34, p.111-113, 1980.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO FILHO, A.S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasileira*, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MAHAN, D. C. Selenium metabolism in animals: what role does selenium yeast have?. In: LYONS, T.P.; JACQUES, K.A. (Ed.). **Biotechnology in the feed industry**. Nottingham: Nottingham University Press, 1995. p.257-267.

MAINE, M. A.; SUÑE, N. L.; LAGGER, S. C. Chromium bioaccumulation: comparison of the capacity of two floating aquatic macrophytes. **Water Resouces**, v.38, p.1494-1501, 2004.

MAL, T.K.; ADORJAN, P.; CORBETT, A.L. Eeffect of copper on growth of an aquatic macrophyte *Elodea Canadensis*. **Environmental Pollution**, v.120, p.307-311, 2002.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental**: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos. São Paulo: ProduQuímica, 1994.

MALAVOLTA, E.; AMARAL, F. A. L. Nutritional efficiency of 104 bean varieties (*Phaseolus vulgaris* L.). In: INTERNATIONAL COLLOQUIUM ON PLANT ANALYSIS AND FERTILIZER PROBLEMS, 8., 1978, Auckland. **Proceedings...** Auckland: New Zealand Department of Scientific & Industrial Research, 1978. v. 2, p. 313-318.

MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. **Environment International**, v.30, p.261-278, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nded. London: Academic Press, 1995.

MARTIN, R.B.; SIGEL, H. Bioinorganic chemistry of metal íon toxicity. In: SIGEL, H. **Metal in Íons biological systems**. New York: Marcel Dekker, 1980. v.18, p.21-65.

MASUTTI, M. B. **Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos**: uma análise laboratorial e “In Situ” (experimentos em micro e mesocosmos). 2004. 390p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004.

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

MATSUMURA, T. et al. Wheat catalase expressed in transgenic rice can improve tolerance against low temperature stress. **Physiology Plant**, v.116, p.317-327, 2002.

McGREGOR, E.B.; SOLOMON, K.R.; HANSON, M.L. Monensin is not toxic to aquatic macrophytes at environmentally relevant concentrations. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v.43, p.541-551, 2008.

MELETTI, P. C. **Avaliação da degradação ambiental por meio de testes de toxicidade com sedimento e de análises histopatológicas em peixes**. 2003. 209p. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

MENG, Q. et al. Effect of Cu²⁺ concentration on growth, antioxidant enzyme activity and malondialdehyde content in garlic (*Allium sativum* L.). **Acta Biologica Cracoviensia**, v.49, n.1, Series Botanica, p.95-101, 2007.

MIKRYAKOVA, T. F. Accumulation of heavy metals by macrophytes at different levels of pollution of aquatic medium. **Water Research**, v.29, n.2, p.230-32, 2002.

MISHRA, K.K.; RAI, U.N.; PRAKASH, O. Bioconcentration and phytotoxicity of Cd in *Eichhornia crassipes*. **Environment Monitor Assessment**, v.130, p.237-243, 2007.

MIRSHA, V. K.; TRIPATHI, B. D. Concurrent removal and accumulation of heavy metals by the three aquatic macrophytes. **Bioresource Technology**, v.99, n.15, p.7091-7097, 2008.

MITSCH, W.J.; JØRGENSEN, S.E. **Ecological engineering and ecosystem restoration**. New York: Wiley, 2004.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. Secretaria de geologia, mineração e transformação mineral. **Produto 16 – minério de zinco**. Relatório técnico 25 – Perfil do minério de zinco. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/sgm/galerias/arquivos/plano_duo_decenal/a_mineracao_brasileira/P16_RT25_Perfil_do_Minério_de_Zinco.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2010.

MÓDENES, A.N. Potencial de biofixação do zinco pela macrófita *Egeria densa*. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14 n.4, p.465-470, 2009.

MOHR, S. Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosms. **Aquatic Toxicology**, v.82, n.2, p.73-84, 2007.

MONDARDO, E.; GONÇALVES JÚNIOR, A.C.; SACON, E. Uso da macrófita aquática (*Eichhornia crassipes*) na remoção de cobre e zinco em biofertilizante de origem suína. **Publicatio UEPG: ciências exatas e da terra, ciências agrárias e engenharia**, v.12, n.2, p.13-20, ago., 2006.

MONFERRÁN, M.V. et al. Copper induced response of physiological parameters and antioxidant enzymes in the aquatic macrophyte *Potamogeton pusillus*. **Environmental Pollution**, v.157, n.8/9, p.2570-2576, 2009.

MOORE, J. W.; RAMAMOORTHY, S. **Heavy metals in natural waters: applied monitoring and impact assessment**. New York; Berlin: Springer-Verlag, 1984.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. Degradação de recursos hídricos e seus efeitos sobre a saúde humana. **Revista Saúde Pública**, v.36, n.3, p.370-374, 2002.

MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A.M.V.M.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.59, p.164-173, 2004.

MOTTA, R.S. **Indicadores ambientais no Brasil: aspectos ecológicos, de eficiência e distributivos**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 1996.

MUFARREGE, M.M.; HADAD, H.R.; MAINE, M.A. Response of *Pistia stratiotes* to heavy metals (Cr, Ni, and Zn) and phosphorous. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, v.58, n.1, p.53-61, 2010.

NEILL, S.O.; GOULD, K.S. Anthocyanins in leaves: light attenuators or antioxidants?. **Functional Plant Biology**, v.30, p.865-873, 2003.

OCHIAI, E.J. Toxicity of heavy metals and biological defense. Principles and applications in bioinorganic chemistry – VII . **Journal of chemical education**, v.72, n.6, p.479, 483.

ODJEBA, V.J.; FASIDI, I.O. Accumulation of trace elements by *Pistia stratiotes*: implications for phytoremediation. **Ecotoxicology**, v.13, n.7, p.637-646, 2004.

_____. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. **Revista de Biologia Tropical**, v.55, n.3/4, p.815-823, 2007.

ODUM, E.P. The Mesocosm. **BioScience**, v.34, n.9, p.558-562, 1984.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **Guidelines for the testing of chemicals**, *Lemna* sp. Growth inhibition test. Paris-França, 2002. 22p.

OLIVEIRA, C. **Características morfoanatomicas e fisiológicas na avaliação do potencial bioindicador e fitorremediador de *P. stratiotes* L. na presença de cádmio, chumbo e arsênio**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

OVSYANI, R.; DELAI, R.M. **Testes fisiológicos para validação da mamona como uma planta fitorremediadora**. 2007. Disponível em:<http://www.fag.edu.br/tcc/2007/Ciencias_Biologicas_Bacharelado/Testes_fisio%C3%B3gicos_para_valida%C3%A7%C3%A3o_da_mamona_como_uma_planta_fitorremediadora.pdf>. Acesso em: 5 ago. 2014.

PADMAVATHIAMMA, P.K.; LI, L.Y. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. **Water, Air and Soil Pollution**, v.184, n.1, p.105-126, 2007.

PAIVA, L. B. et al. Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr^{3+} and Cr^{6+} . **Environmental and Experimental Botany**, v.65, n.2/3, p.403-409, 2009.

PÄTSIKKÄ, E. et al. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll. **Plant Physiology**, v.129, n.3, p.1359–1367, 2002.

PEREIRA, I. et al. Discovering *Azolla*. In: SYMBIOSIS TEACHING WORKSHOP INTERNATIONAL SYMBIOSIS SOCIETY CONGRESS, 5., 2006, Vienna. **Proceedings...** [S.l.:s.n.], 2006.

PIETROBELLI, J.M.T.A. **Avaliação do potencial de biofixação dos íons Cd(II) , Cu(II) e Zn(II) pela macrófita *Egeria densa***. 2007. 114f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Campus de Toledo, 2007.

PILLAI, K.P.; PREMALATHA, S.; RAJAMONY, S. *Azola*-A sustainable feed substitute for livestock. **Leisa India**, v.4, p.15-17, 2002.

PILLAY, T.V.R. **Aquaculture and the environment**. 2nded. Oxford: Blackwell, 2004.

PISTORI, R.E.T. **Crescimento das macrófitas aquáticas flutuantes *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms, *Pistia stratiotes* L. e *Salvinia molesta* (Mitchell) em diferentes concentrações de nutrientes**. 2009. 61f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2009.

PITELLI, R. A. Macrófitas aquáticas do Brasil, na condição de problema. In: WORKSHOP CONTROLE DE PLANTAS AQUÁTICAS, 1998, Brasília. **Resumos...** Brasília, DF: IBAMA, 1998. p.19.

POMPÊO, M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, n.3, p.406-424, 2008.

POSMYK, M.M.; KONTEK, R.; JANAS, K.M. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v.72, n.2, p.596-602, 2009.

POTT, V.J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília, DF: EMBRAPA/Centro de pesquisa agropecuária do Pantanal (Corumbá-MS), 2000.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington: Hemisphere, 1985.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Hemisphere, 1995, 666 p.

RAND, G.M.; WELLS, P.G.; McCARTY, L.S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Ed.). **Fundamentals of toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**, 2nded. Washington: Taylor & Francis, 1995.

RAVEN, J. A.; EVANS, M. C. W.; KORB, R. E. The Role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. **Photosynthesis Research**, v.60, p.111-149, 1999.

REEVE, R.N. **Environmental analysis**. New York: John Wiley, 1994.

RETTIG, J.E. et al. Fluctuating asymmetry indicates levels of competition in an even-aged poplar clone. **Oikos**, v.80, p123–127, 1997.

ROMITELLI, M.S. Remoção de fósforo em efluentes secundários com emprego de macrófitas aquáticas do gênero Eichhornia. **Revista DAE**, v.133, p.66-68, 1983.

ROSHON, R.D. **A toxicity test for the effects of chemicals on the non-target submersed aquatic macrophyte, *myriophyllum sibiricum* komarov**. 1997. 496p. Thesis (Phd) The Faculty of Graduate Studies, The University of Guelph, Canada, 1997.

RUSSEL, J.B. **Química geral**. 2.ed. São Paulo: Makron Books, 1994.

SÁENZ, N.I.A. et al. Evaluación de dos parámetros bioquímicos en três macrofitas acuáticas expuestas a cobre. **Polibotánica**, n.26, p.149-158, 2008.

SALGADO, P.E.T. **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

SALOMONS, W.; FOSTNER, U. **Metals in the hydrocycle**. New York: Springer-Verlag, 1984.

SARRUGE, J.R. et. al. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, v.1, n.3, p.231-233, 1975.

SCHNEIDER, S. Macrophyte trophic indicator values from a European perspective. **Limnologia**, v.37, p.281–289, 2007.

SCHULZ, R.; LIESS, M. Runoff simulation with particle-bound fenvalerate in multispecies stream microcosms: importance of biological interactions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.20, p.757–762, 2001.

SCUNTHORPE, C.D. **The Biology of aquatic vascular plants**. London: Edward Arnold, 1967.

SELA, M.; GARTY, J.; TEL-OR, E. The Accumulation and the effect of heavy metals on the water fern *Azolla filiculoides*. **New Phytologist**, v.112, n.1, p.7-12, 1989.

SHAH, K.; NONGKYNRIH, J.M. Metal hyperaccumulation and bioremediation. **Biologia Plantarum**, v.51, n.4, p.618-634, 2007.

SHAW, J.P. et al. Seasonal variation in cytochrome P450 immunopositive protein levels, lipid peroxidation and genetic toxicity in digestive gland of the mussel *Mytilus edulis*. **Aquatic Toxicology**, v.6, n.4, p.25-336, 2004.

SILVA, A.F. et al. Ecotoxicidade de herbicidas para a macrófita aquática *Azolla caroliniana*. **Planta Daninha**, v.30, n.3, p.541-546, 2012.

SILVA, C.A.R.; LACERDA, L.D.; REZENDE, C.E. Heavy metal reservoirs in a red mangrove forest. **Biotropica**, v.22, n.4, p.339-345, 1990.

SILVA, C.J. Observações sobre a biologia reprodutiva de *Pistia stratiotes* L. (Araceae). **Acta Amazonica**, v.11, n.3, p.487-504, 1981.

SINHA, S.; SAXENA, R.; SINGH, S. Chromium induced lipid peroxidation in the plants of *Pistia stratiotes* L.: role of antioxidants and antioxidant enzymes. **Chemosphere**, v.58, n.5, p.595-604, 2005.

SINHA, S. et al. Multivariate modeling of chromium-induced oxidative stress and biochemical changes in plants of *Pistia stratiotes* L. **Ecotoxicology**, v.18, n.5, p.555-566, 2009.

SOUZA, V. L. et al. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botanica Brasilica**, v.23, n.2, p.343-354, 2009.

SPRAGUE, J.B. Factors that modify toxicity. In: RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. Washington: Hemisphere, 1985. p.124-163.

SRIVASTAVA, S. et al. Copper-induced oxidative stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. **Aquatic Toxicology**, v.80, n.4, p.405-415, 2006.

STEIN, W.J. et al. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. **New Phytologist**, v.155, n.3, p.349-361, 2002.

STIBOROVA, M.; HROMADKOVA, R.; LEBLOVA, S. Effect of ions of heavy metals on the photosynthetic apparatus of maize (*Zea mays* L.). **Biologia (Bratislava)**, v.41, p.1221-1228, 1986.

STONE, K.C. et al. Impact of swine waste application on ground and stream water quality in an eastern coastal plain watershed. **American society of agricultural Engineers**, v.41, n.6, p.1665-1670, 1998.

STUM, W.; MORGAN, J. J. **Aquatic chemistry** – an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. New York: John Wiley, 1996.

SUNDA, W.G.; HUNTSMAN, S.A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. **The Science of the Total Environment**, v.219, n.2, p.165-181, 1998.

SYSTAT SOFTWARE INCORPORATION. SigmaPlot for windows version 10.0. [S.l.:s.n.], 2006.

TALLEY, S.N.; TALLEY, B.J.; RAINS, D.W. Nitrogen fixation by *Azolla* in rice fields. In: HOLLAENDER, A. (Ed). **Basic life science, genetic engineering**. New York: Plenum Press, 1977. p.259-281.

TARLYN, N. M. et al. Axenic cultures of *Pistia stratiotes* for use in plant biochemical studies. **Aquatic Botany**, v.60, n.2, p.161-168, 1998.

THE AZOLLA FOUNDATION. *Azolla*. Disponível em: <<http://theazollafoundation.org/azolla/azollas-geographic-distribution/>>. Acesso em: 20 jun. 2013.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v.64, n.2, p.135-142, 2002.

TORRES, G. et al. Estudio preliminar de la fitoremediación de cobre divalente mediante *Pistia stratiotes* (lechuga de agua). **Revista Latinoamericana de Recursos Naturales**, v. 3, n. 1, p. 13-20, 2007.

TRINDADE , C. R.; ALBERTONI, E. F.; PALMA-SILVA, C. Variação temporal de biomassa e estado nutricional de *Azolla filiculoides* Lam (SALVINIACEAE) em um pequeno lago raso distrófico. **Acta limnológica Brasiliensia**, v. 23, n. 4, p. 368-375, 2011.

TUNDISI, J. G. **Água no século XXI**: enfrentando a escassez. São Carlos: RiMa, 2003.

UPADHYAY, R. K.; PANDA, S. K. Biochemical changes in *Azolla pinnata* L. under chromium toxicity, **Journal of Plant Biology**, v. 32, p. 49–52, 2005.

UPADHYAY, R. K.; PANDA, S. K. Copper-induced growth inhibition oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). **Comptes Rendus Biologies**, v. 332, n. 7, p. 623-632, 2009.

UPADHYAY, R.; PANDA, S. K. Zinc reduces copper toxicity induced oxidative stress by promoting antioxidant defense in freshly grown aquatic duckweed *Spirodela polyrhiza* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 175, n. 1, p. 1081–1084, 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Constructed wetlands and aquatic plant systems for municipal wastewater treatment**: design manual. Cincinnati: Office of Research and Development, Center of Environmental Research Information, 1988.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Ecological effects test guidelines OPPTS 850.4400 **Aquatic plant toxicity test using *Lemna* spp.**, Tiers I and II. 1996.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Guidelines for the health: risk assessment guidance for superfund (RAGS)**. 2002. Disponível em: <www.epa.gov/superfund/programs/risk/rags/ch.7>. Acesso em: 10 fev. 2009.

VARDANYAN, L. G.; INGOLE, B. S. Studies on heavy metal accumulation in aquatic macrophytes from Sevan (Armenia) and Carambolim (India) lake systems. **Environment International**, v. 32, n. 2, p. 208-218, 2006.

VELÁSQUEZ, I. B.; JACINTO, J. S.; VALERA, F. S. The speciation of dissolved copper, cadmium and zinc in Manila Bay, Philippines. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, n. 1, p. 210–217, 2002.

VIVEROS, G. S. **Mecanismos de tolerância del simbiosistema *Azolla-Anabaena azollae* ante arsénico y cobre**. 148 f. 2012. Tesis (Doctorado en Ciencias) – Institución de Enseñanza y Investigación em Ciencias Agrícolas, Montecillo.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias – introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. Belo Horizonte: DESA/UFGM, 1996.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. v. 1, 3. ed. Belo Horizonte, Minas Gerais: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFGM, 2005.

WENDT-RASCH, L. et al. The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, n. 3, p. 383–398, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Copper**. Geneva, 1998. (Environmental Health Criteria 200).

WIGAND, C. et al. Effect of *Vallisneria americana* (L.) on community structure and ecosystem function in lake mesocosms. **Hydrobiologia**, v. 418, n. 1, p. 137–146, 2000.

WOLFF, G. et al. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. **Planta Daninha**, v. 27, n. 1, p. 133-137, 2009.

XIONG, Z. T.; LIU, C.; GENG, B. Phytotoxic effects of copper on nitrogen metabolism and plant growth in *Brassica pekinensis* Rupr. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, n. 3, p. 273–280, 2006.

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

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. 2. ed. 2008, São Carlos, São Paulo: RiMa, 2008. 486p.

ZAMBONI, A. J. **Avaliação da qualidade de água e sedimento do canal de São Sebastião através de testes de toxicidade com *Lytechinus variegatus***. 114 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1993.

ZAMPIERI, M. C. T. **Estudo sobre os efeitos de cobre e zinco no crescimento de plântula de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivada in vitro**. Aplicação da análise por ativação com nêutrons. 166 f. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ZHAO, B. S.; BI, H. W. Research advances on toxicology of heavy metals in plant cell. **Journal of Zibo University**, v. 1, p. 86–88, 1999.

ZHOU, Q. et al. Biomonitoring: an appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, n. 2, p. 135-150, 2008.

ZHU, Y. L. et al. Phytoaccumulation of trace elements by wetland plants: II. Water Hyacinth. **Journal of Environmental Quality**, v. 28, n. 1, p. 339–344, 1999.

ZIMMERMAN, W. J.; LUMPKIN, T. A; WATANABE, I. Classification of *Azolla* spp., section *Azolla*. **Euphytica**, v. 43, n. 3, p. 223-232, 1989.

ZOCHE, J. J. **Comunidades vegetais de savana sobre estruturas mineralizadas de cobre na Mina Volta Grande, Lavras do Sul, RS**. 205 f. 2002. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ANEXO

Experimento com cobre e *Pistia stratiotes*

Tabela 1. Valores médios ($\pm$ DP) da concentração de nutrientes da água do teste com *P. stratiotes* e cobre, observados no primeiro dia (1hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final (após 10 dias de experimento).

Tratamentos	1° dia	após 10 dias	1° dia	após 10 dias
Nitrogênio orgânico total (mg L⁻¹)		Nitrato (µg L⁻¹)		
Controle P(55)	0,25 ($\pm$ 0,03)	0,27 ($\pm$ 0,03)	0,76 ($\pm$ 0,13)	1,13 ($\pm$ 0,15)
Trat. Cobre P(55)	0,31 ($\pm$ 0,02)	0,29 ($\pm$ 0,05)	0,31 ($\pm$ 0,11)	24,83 ($\pm$ 3,97)
Controle P(70)	0,28 ($\pm$ 0,05)	0,53 ($\pm$ 0,14)	0,56 ($\pm$ 0,16)	1,53 ($\pm$ 0,63)
Trat. Cobre P(70)	0,25 ($\pm$ 0,02)	0,48 ($\pm$ 0,11)	0,40 ($\pm$ 0,08)	31,29 ($\pm$ 2,80)
Controle P(130)	0,32 ($\pm$ 0,03)	0,63 ($\pm$ 0,13)	0,94 ($\pm$ 0,14)	2,34 ($\pm$ 0,84)
Trat. Cobre P(130)	0,21 ($\pm$ 0,02)	0,42 ($\pm$ 0,05)	0,83 ($\pm$ 0,10)	30,33 ($\pm$ 2,55)
Nitrato (µg L⁻¹)		Amônio (µg L⁻¹)		
Controle P(55)	10,83 ($\pm$ 0,96)	9,67 ($\pm$ 0,47)	1,73 ($\pm$ 0,42)	38,35 ($\pm$ 1,18)
Trat. Cobre P(55)	9,99 ($\pm$ 2,36)	9,62 ($\pm$ 0,38)	1,46 ($\pm$ 0,76)	0,41 ($\pm$ 0,45)
Controle P(70)	9,94 ($\pm$ 0,76)	10,30 ($\pm$ 0,47)	5,74 ($\pm$ 2,00)	15,05 ($\pm$ 3,46)
Trat. Cobre P(70)	9,50 ($\pm$ 2,38)	9,80 ($\pm$ 0,27)	4,97 ($\pm$ 1,11)	12,89 ($\pm$ 1,62)
Controle P(130)	11,50 ($\pm$ 1,64)	9,78 ($\pm$ 0,72)	13,46 ($\pm$ 4,58)	0,41 ($\pm$ 0,20)
Trat. Cobre P(130)	10,40 ($\pm$ 0,00)	10,03 ($\pm$ 0,46)	10,22 ($\pm$ 2,04)	10,68 ($\pm$ 0,66)
Fósforo total (µg L⁻¹)		Fosfato total dissolvido (µg L⁻¹)		
Controle P(55)	55,45 ($\pm$ 6,07)	21,65 ($\pm$ 3,15)	20,79 ($\pm$ 1,55)	10,46 ($\pm$ 1,67)
Trat. Cobre P(55)	63,84 ($\pm$ 2,74)	25,93 ($\pm$ 3,01)	19,46 ($\pm$ 0,92)	10,74 ($\pm$ 1,20)
Controle P(70)	70,82 ($\pm$ 2,68)	30,27 ($\pm$ 2,93)	41,02 ($\pm$ 1,69)	9,93 ($\pm$ 1,21)
Trat. Cobre P(70)	84,67 ($\pm$ 0,62)	45,15 ($\pm$ 3,89)	39,24 ($\pm$ 0,75)	13,25 ($\pm$ 0,83)
Controle P(130)	131,80 ($\pm$ 2,79)	55,71 ($\pm$ 5,91)	94,93 ($\pm$ 1,38)	19,01 ($\pm$ 1,38)
Trat. Cobre P(130)	141,07 ($\pm$ 7,35)	72,02 ($\pm$ 7,07)	91,27 ($\pm$ 0,84)	24,55 ($\pm$ 0,30)
Fosfato inorgânico dissolvido (µg L⁻¹)		Clorofila-a (µg L⁻¹)		
Controle P(55)	17,87 ($\pm$ 1,55)	3,62 ($\pm$ 1,51)	1,86 ($\pm$ 0,81)	5,12 ($\pm$ 0,80)
Trat. Cobre P(55)	18,43 ($\pm$ 0,64)	2,24 ($\pm$ 0,65)	1,86 ($\pm$ 0,81)	0,47 ($\pm$ 0,80)
Controle P(70)	37,02 ($\pm$ 1,74)	3,55 ($\pm$ 1,93)	0,93($\pm$ 0,81)	5,58 ($\pm$ 1,39)
Trat. Cobre P(70)	37,61 ($\pm$ 0,63)	2,13 ($\pm$ 0,71)	1,86 ($\pm$ 0,81)	2,79($\pm$ 2,41)
Controle P(130)	91,93 ($\pm$ 2,41)	5,59 ($\pm$ 1,07)	2,79 ($\pm$ 1,40)	31,16 ($\pm$ 3,51)
Trat. Cobre P(130)	91,62 ($\pm$ 4,62)	4,26 ($\pm$ 2,01)	0,00 ($\pm$ 0,00)	8,37 ($\pm$ 2,79)
Cobre total (µg L⁻¹)		Cobre biodisponível (µg L⁻¹)		
Controle P(55)	3,38 ($\pm$ 0,59)	0,04 ($\pm$ 0,06)	1,27 ($\pm$ 0,29)	0,00 ($\pm$ 0,00)
Trat. Cobre P(55)	68,67 ($\pm$ 0,50)	47,29 ($\pm$ 3,22)	56,53 ($\pm$ 1,47)	38,60 ($\pm$ 1,49)
Controle P(70)	5,64 ($\pm$ 0,47)	0,00 ($\pm$ 0,00)	2,08 ($\pm$ 0,93)	0,00 ($\pm$ 0,00)
Trat. Cobre P(70)	70,18 ($\pm$ 1,96)	43,21 ($\pm$ 3,85)	56,74 ($\pm$ 0,75)	36,44 ($\pm$ 4,45)
Controle P(130)	3,11 ($\pm$ 0,42)	0,00 ($\pm$ 0,00)	1,72 ($\pm$ 0,64)	0,00 ($\pm$ 0,00)
Trat. Cobre P(130)	67,21 ($\pm$ 8,48)	40,20 ($\pm$ 2,12)	55,92 ($\pm$ 1,48)	35,00 ($\pm$ 3,03)

Tabela 2. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis nutricionais e biológicas observadas em biomassa de exemplares de *P.stratiotes* no início (antes da contaminação) e final do experimento com cobre (10 dias depois).

Nitrogênio Orgânico Total (%)						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
Concen. média inicial de NOT	19,13	19,13	19,13	19,13	19,13	19,13
R1	21,93	2,29	18,64	12,39	13,86	16,01
R2	17,03	1,14	15,40	4,53	17,06	12,79
R3	17,10	1,57	16,36	9,29	18,57	12,72
Concen. média final de NOT	18,69	1,67	16,80	8,74	16,50	13,84
DP	2,81	0,58	1,66	3,96	2,41	1,88
Fósforo Total ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
Concen. média inicial de PT	9,44	9,44	9,44	9,44	9,44	9,44
R1	7,86	7,31	10,78	11,26	10,53	10,28
R2	7,86	8,17	7,85	8,08	8,27	8,22
R3	7,53	8,21	7,60	8,32	8,05	8,13
Concen. média final de PT	7,75	7,90	8,74	9,22	8,95	8,88
DP	0,19	0,51	1,77	1,77	1,38	1,21
Cobre total ($\mu\text{g g}^{-1}$)						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
Concen. média inicial de PT	26,98	26,98	26,98	26,98	26,98	26,98
R1	20,13	111,76	20,92	122,76	18,52	133,35
R2	34,19	147,75	29,26	156,66	29,28	163,51
R3	33,78	157,81	35,74	165,78	27,91	185,76
Concen. média final de PT	29,37	139,11	28,64	148,40	25,24	160,88
DP	8,01	24,21	7,43	22,67	5,85	26,31
Clorofila a ($\mu\text{g gfw}^{-1}$)						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
Concen. média inicial de PT	2,24	2,24	2,24	2,24	2,24	2,24
R1	2,12	2,41	1,47	2,19	1,75	1,94
R2	1,73	1,98	1,95	2,44	1,94	1,87
R3	2,15	1,97	1,96	2,34	2,02	1,84
Concen. média final de PT	2,00	2,12	1,79	2,33	1,90	1,89
DP	0,24	0,25	0,28	0,12	0,14	0,05
Clorofila total ($\mu\text{g gfw}^{-1}$)						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
Concen. média inicial de PT	10,95	10,95	10,95	10,95	10,95	10,95
R1	9,38	10,06	7,58	9,05	7,19	9,83
R2	8,62	7,14	7,92	9,55	9,30	6,77
R3	8,82	8,96	9,12	9,28	7,81	8,60
Concen. média final de PT	8,94	8,72	8,21	9,29	8,10	8,40
DP	0,39	1,48	0,81	0,25	1,08	1,54

Tabela 3. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis de desenvolvimento de *P. stratiotes* observados no experimento com cobre, no primeiro dia (1hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final (após 10 dias de experimento).

Ganho de biomassa (g)						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	2,42	0,87	2,25	0,75	2,65	0,90
R2	2,26	0,83	2,30	0,83	2,50	1,16
R3	2,38	0,81	2,60	0,95	2,71	0,97
média	2,35	0,84	2,38	0,84	2,62	1,01
DP	0,08	0,03	0,19	0,10	0,11	0,14
Taxa de crescimento relativo (g g ⁻¹ dia ⁻¹)						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	0,11	0,05	0,09	0,04	0,11	0,05
R2	0,10	0,05	0,10	0,05	0,11	0,07
R3	0,10	0,05	0,11	0,05	0,11	0,06
média	0,10	0,05	0,10	0,05	0,11	0,06
DP	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01
Número de folhas						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	2,80	2,80	3,40	3,00	3,60	2,80
R2	3,00	3,00	3,00	3,00	3,40	3,00
R3	3,00	3,00	3,20	2,80	3,20	2,80
média	2,93	2,93	3,20	2,93	3,40	2,87
DP	0,12	0,12	0,20	0,12	0,20	0,12
Ganho de diâmetro						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	1,64	0,54	1,58	0,52	1,16	0,34
R2	1,78	0,40	1,60	0,62	1,58	0,34
R3	1,96	0,50	1,56	0,90	1,34	0,26
média	1,79	0,48	1,58	0,68	1,36	0,31
DP	0,16	0,07	0,02	0,20	0,21	0,05
Ganho de altura foliar						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	0,36	0,20	0,14	0,16	0,32	0,18
R2	0,32	0,18	0,44	0,18	0,34	0,16
R3	0,26	0,13	0,24	0,12	0,34	0,20
média	0,31	0,17	0,27	0,15	0,33	0,18
DP	0,05	0,04	0,15	0,03	0,01	0,02
Ganho de largura foliar						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	0,22	0,10	0,08	0,10	0,16	0,12
R2	0,18	0,14	0,20	0,08	0,14	0,14
R3	0,20	0,05	0,12	0,10	0,14	0,20
média	0,20	0,10	0,13	0,09	0,15	0,15
DP	0,02	0,05	0,06	0,01	0,01	0,04

Número de raízes nascidas						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	14,60	17,20	17,80	17,80	21,60	18,20
R2	14,80	14,60	17,00	16,80	20,40	18,40
R3	14,80	15,00	18,60	14,60	17,60	18,60
média	14,73	15,60	17,80	16,40	19,87	18,40
DP	0,12	1,40	0,80	1,64	2,05	0,20
Comprimento da raiz principal						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	9,88	2,50	12,82	2,56	9,52	2,80
R2	11,44	2,60	13,36	2,74	10,92	2,72
R3	11,04	2,83	11,02	2,78	10,38	2,86
média	10,79	2,64	12,40	2,69	10,27	2,79
DP	0,81	0,17	1,23	0,12	0,71	0,07
Número de brotos nascidos						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	3,00	2,40	3,20	2,60	3,00	2,60
R2	3,40	2,80	3,00	2,0	3,00	3,40
R3	3,00	2,75	3,00	2,80	3,20	3,40
média	3,13	2,65	3,07	2,53	3,07	3,13
DP	0,23	0,22	0,12	0,31	0,12	0,46
Número de folhas com clorose						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	1,40	2,20	1,60	1,60	0,60	1,40
R2	1,40	2,00	1,60	1,80	1,00	1,60
R3	1,00	1,75	0,40	1,60	0,80	2,60
média	1,27	1,98	1,20	1,67	0,80	1,87
DP	0,23	0,23	0,69	0,12	0,20	0,64
Número de folhas com clorose						
Fósforo	P [55]		P [70]		P [130]	
Cobre	C	Cu [73]	C	Cu [73]	C	Cu [73]
R1	0,00	1,80	0,20	0,80	0,20	0,40
R2	0,60	1,00	0,60	0,20	0,20	0,80
R3	0,00	0,75	0,20	1,40	0,40	1,20
média	0,20	1,18	0,33	0,80	0,27	0,80
DP	0,35	0,55	0,23	0,60	0,12	0,40

Experimento com cobre e *Azolla filiculoides*

Tabela 4. Valores médios ($\pm$ DP) da concentração de nutrientes da água do teste com *A. filiculoides* e cobre, observados no primeiro dia (1hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final (após 14 dias de experimento).

Fósforo total na água ($\mu\text{g L}^{-1}$)					Cobre total na água ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
Fósforo	P [3]				P [3]			
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
	PT	PT	PT	PT	Cu	Cu	Cu	Cu
média inicial	3.00	3.00	3.00	3.00	0.00	0.07	1.30	12.70
R1	0.00	0.00	0.00	0.27	0.00	0.00	0.62	7.94
R2	0.00	0.00	0.00	0.34	0.00	0.00	0.64	6.96
R3	0.00	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.61	6.09
média final	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.62	7.00
DP	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.02	0.93
Fósforo	P [15]				P [15]			
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
	PT	PT	PT	PT	Cu	Cu	Cu	Cu
média inicial	15.00	15.00	15.00	15.00	0.00	0.07	1.30	12.70
R1	3.31	0.00	2.00	0.21	0.00	0.00	0.61	7.51
R2	2.99	0.13	1.80	0.19	0.00	0.00	0.64	8.18
R3	0.00	0.13	2.01	0.18	0.00	0.01	0.61	6.94
média final	2.10	0.09	1.94	0.19	0.00	0.00	0.62	7.54
DP	1.83	0.08	0.12	0.02	0.00	0.00	0.02	0.62
Fósforo	P [46]				P [46]			
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
	PT	PT	PT	PT	Cu	Cu	Cu	Cu
média inicial	2.36	1.29	2.17	0.06	0.00	0.00	0.03	0.95
R1	46.00	46.00	46.00	46.00	0.00	0.07	1.30	12.70
R2	26.88	31.16	30.00	0.24	0.00	0.01	0.64	8.22
R3	31.42	32.66	28.73	0.35	0.00	0.01	0.65	6.66
média final	28.01	33.73	32.96	0.25	0.00	0.01	0.68	8.38
DP	28.77	32.52	30.56	0.28	0.00	0.01	0.66	7.75

Tabela 5. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis nutricionais (nitrogênio total e fósforo total) observadas em biomassa de exemplares de *A. filiculoides* no início (antes da contaminação) e final do experimento (14 dias depois) com cobre.

Nitrogênio total g 100g ⁻¹					Fósforo total g 100g ⁻¹			
Fósforo	P (3)				P (3)			
Cobre	C	Cu (0,07)	Cu (1,30)	Cu (12,7)	C	Cu (0,07)	Cu (1,30)	Cu (12,7)
	NT	NT	NT	NT	PT	PT	PT	PT
média inicial	3.92	3.92	3.92	3.92	0.40	0.40	0.40	0.40
R1	4.08	3.45	3.43	2.95	0.36	0.35	0.38	0.32
R2	4.02	3.50	3.41	2.94	0.36	0.35	0.37	0.30
R3	4.06	3.46	3.39	2.95	0.35	0.37	0.40	0.32
média final	4.05	3.47	3.41	2.95	0.36	0.36	0.38	0.31
DP	0.03	0.03	0.02	0.01	0.01	0.01	0.02	0.01
Fósforo	P (15)				P (15)			
Cobre	C	Cu (0,07)	Cu (1,30)	Cu (12,7)	C	Cu (0,07)	Cu (1,30)	Cu (12,7)
	NT	NT	NT	NT	PT	PT	PT	PT
média inicial	4.42	3.56	3.68	3.34	0.90	0.86	0.92	0.92
R1	4.48	3.61	3.56	3.23	0.95	0.80	0.93	0.93
R2	4.47	3.62	3.57	3.32	0.92	0.80	0.90	0.91
R3	4.46	3.60	3.60	3.29	0.93	0.82	0.92	0.92
média final	0.03	0.03	0.07	0.06	0.03	0.03	0.01	0.01
DP	3.92	3.92	3.92	3.92	0.40	0.40	0.40	0.40
Fósforo	P (46)				P (46)			
Cobre	C	Cu (0,07)	Cu (1,30)	Cu (12,7)	C	Cu (0,07)	Cu (1,30)	Cu (12,7)
	NT	NT	NT	NT	PT	PT	PT	PT
média inicial	4.62	4.10	3.64	3.53	0.87	0.94	1.05	1.12
R1	4.53	4.06	3.71	3.57	0.86	0.89	1.12	1.09
R2	4.66	3.96	4.27	3.47	0.93	0.90	0.97	1.23
R3	4.61	4.04	3.87	3.52	0.89	0.91	1.05	1.15
média final	0.07	0.07	0.34	0.05	0.04	0.02	0.08	0.08
DP	3.92	3.92	3.92	3.92	0.40	0.40	0.40	0.40

Tabela 6. Valores médios ($\pm$ DP) da variável cobre total observada em biomassa de exemplares de *A. filiculoides* no início (antes da contaminação) e final do experimento (14 dias depois) com cobre.

Cobre total (mg Kg ⁻¹)			
P [3,0]			
C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
16.58	35.30	16.74	18.92
17.11	37.10	16.16	18.83
15.76	39.46	18.25	18.93
16.48	37.29	17.05	18.89
0.68	2.08	1.08	0.05
21.67	21.67	21.67	21.67
P [15,0]			
C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
16.81	19.27	16.40	15.27
18.02	18.34	16.83	15.85
17.44	17.84	16.30	15.26
17.42	18.48	16.51	15.46
0.60	0.72	0.28	0.33
21.67	21.67	21.67	21.67
P [46,0]			
C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
14.07	10.85	10.98	14.98
14.24	12.12	13.38	14.91
17.84	11.76	11.73	14.66
15.38	11.58	12.03	14.85
2.13	0.65	1.23	0.17
21.67	21.67	21.67	21.67

Tabela 7. Valores médios ($\pm$ DP) da concentração de clorofila *a* e total observada em exemplares de *A. filiculoides*, após 14 dias de experimento com cobre.

Clorofila- <i>a</i> $\mu\text{g g}^{-1} \text{fw}^{-1}$					Clorofila total $\mu\text{g g}^{-1} \text{fw}^{-1}$			
Fósforo	P(3)							
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
R1	5.59	1.74	3.14	5.46	8.89	3.54	4.28	8.03
R2	6.14	1.74	3.38	5.37	8.67	3.54	4.86	8.13
R3	5.57	2.12	3.79	4.65	9.11	4.53	5.47	6.70
média	5.76	1.86	3.44	5.16	8.89	3.87	4.87	7.62
DP	0.324	0.222	0.328	0.445	0.220	0.576	0.596	0.800
Fósforo	P(15)							
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
R1	4.28	1.83	4.11	3.65	5.92	3.83	5.65	5.18
R2	4.70	2.34	4.52	3.64	6.73	5.19	6.14	5.09
R3	4.09	2.15	3.69	3.72	5.60	4.71	5.25	5.26
média	4.36	2.10	4.11	3.67	6.08	4.58	5.68	5.18
DP	0.309	0.261	0.413	0.044	0.581	0.689	0.445	0.085
Fósforo	P(46)							
Cobre	Chl a	Chl a	Chl a	Chl a	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
R1	5.34868	3.65626	3.22206	2.97488	7.35	5.31	4.65	4.34
R2	5.40	3.43	3.87	2.67	7.38	5.01	5.47	3.88
R3	4.88	3.84	4.94	2.52	6.72	5.53	7.03	3.67
média	5.21	3.64	4.01	2.72	7.15	5.28	5.72	3.96
DP	0.28	0.20	0.87	0.23	0.376	0.260	1.213	0.345

Tabela 8. Valores médios ($\pm$ DP) do ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo (TCR) de *A. filiculoides* observados no último dia de experimentação com cobre.

Ganho de biomassa (g)					TCR ($\text{g g}^{-1} \text{ dia}^{-1}$)			
Fósforo	P [3]				P [3]			
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
R1	31.77	55.55	44.36	22.20	0.148	0.188	0.172	0.122
R2	33.57	51.63	41.32	18.51	0.152	0.183	0.167	0.109
R3	30.66	52.94	36.44	23.36	0.145	0.184	0.158	0.126
média	32.00	53.37	40.71	21.36	0.15	0.19	0.17	0.12
SD	1.469	1.996	3.995	2.533	0.003	0.003	0.007	0.009
Fósforo	P [15]				P [15]			
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
R1	47.98	55.22	58.74	20.91	0.177	0.188	0.192	0.118
R2	44.81	52.95	57.91	21.05	0.173	0.185	0.191	0.119
R3	42.50	53.65	58.65	18.46	0.169	0.185	0.192	0.109
média	45.10	53.94	58.43	20.14	0.17	0.19	0.19	0.12
SD	2.751	1.162	0.455	1.457	0.004	0.002	0.001	0.005
Fósforo	P [46]				P [46]			
Cobre	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]	C	Cu [0,07]	Cu [1,30]	Cu [12,7]
R1	50.02	44.74	49.50	20.03	0.180	0.172	0.180	0.115
R2	48.62	48.74	52.52	20.69	0.178	0.179	0.184	0.117
R3	50.96	49.44	51.00	18.77	0.182	0.180	0.182	0.110
média	49.87	47.64	51.01	19.83	0.18	0.18	0.18	0.11
SD	1.178	2.536	1.510	0.975	0.002	0.004	0.002	0.004

Experimento com zinco e *Azolla filiculoides*

Tabela 9. Valores médios ($\pm$ DP) da concentração de nutrientes da água do teste com *A. filiculoides* e zinco, observados no primeiro dia (1hora depois da contaminação dos tratamentos) e no final (após 14 dias de experimento).

Fósforo total na água ($\mu\text{g L}^{-1}$)					Zinco total na água ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
Fósforo	P[3]				P[3]			
zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	3.00	3.00	3.00	3.00	0.02	3.35	7.34	19.22
R1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	2.77	9.54	19.12
R2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.55	8.27	19.54
R3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	3.22	8.38	19.29
média final	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.40	1.10	0.22
DP	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	10.00	20.00
Fósforo	P [15]				P [15]			
zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	15.00	15.00	15.00	15.00	0.01	3.79	9.08	19.18
R1	3.31	0.21	0.17	0.05	0.00	2.92	8.67	19.27
R2	3.99	0.17	0.22	0.10	0.01	4.25	9.56	21.04
R3	0.00	0.16	0.00	0.13	0.01	3.65	9.10	19.83
média final	2.43	0.18	0.13	0.09	0.01	0.67	0.45	1.05
DP	2.14	0.03	0.11	0.04	0.00	5.00	10.00	20.00
Fósforo	P [46]				P [46]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	46.00	46.00	46.00	46.00	0.02	4.04	10.43	20.82
R1	26.88	30.97	35.01	33.34	0.03	4.05	9.08	18.39
R2	31.42	28.98	31.29	31.85	0.02	4.04	8.65	19.95
R3	28.01	31.82	29.04	29.18	0.03	4.04	9.39	19.72
média final	28.77	30.59	31.78	31.46	0.00	0.00	0.93	1.23
DP	2.36	1.46	3.02	2.11	0.00	5.00	10.00	20.00

Tabela 10. Valores médios ($\pm$ DP) das variáveis nutricionais nitrogênio e fósforo total observadas em biomassa de exemplares de *A. filiculoides* no início (antes da contaminação) e final do experimento (14 dias depois) com zinco.

Nitrogênio total (g 100 g ⁻¹)					Fósforo total (g 100 g ⁻¹)			
Fósforo	P [3]				P [3]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	3.92	3.92	3.92	3.92	0.40	0.40	0.40	0.40
R1	4.08	4.17	3.80	2.98	0.36	0.32	0.32	0.21
R2	4.02	4.22	3.85	3.08	0.36	0.34	0.31	0.20
R3	4.06	4.48	3.81	3.11	0.35	0.35	0.32	0.20
média final	4.05	4.29	3.82	3.06	0.36	0.34	0.32	0.21
DP	0.03	0.17	0.03	0.07	0.009	0.016	0.004	0.005
Fósforo	P [15]				P [15]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	3.92	3.92	3.92	3.92	0.40	0.40	0.40	0.40
R1	4.42	4.47	4.17	3.10	0.90	0.96	0.77	0.22
R2	4.48	4.49	4.18	3.08	0.95	0.78	0.80	0.22
R3	4.47	4.51	4.09	3.04	0.92	0.80	0.78	0.22
Média final	4.46	4.49	4.15	3.07	0.93	0.84	0.78	0.22
DP	0.03	0.02	0.05	0.03	0.027	0.101	0.017	0.001
Fósforo	P [46]				P [46]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	3.92	3.92	3.92	3.92	0.40	0.40	0.40	0.40
R1	4.62	4.20	4.43	2.87	0.87	0.87	0.94	0.23
R2	4.53	4.77	4.27	2.86	0.86	0.84	0.90	0.18
R3	4.66	4.30	4.41	2.87	0.93	0.78	0.93	0.20
Média final	4.61	4.42	4.37	2.87	0.89	0.83	0.92	0.20
DP	0.07	0.30	0.09	0.00	0.038	0.047	0.022	0.028

Tabela 11. Valores médios ($\pm$ DP) da variável zinco total observada em biomassa de exemplares de *A. filiculoides* no início (antes da contaminação) e final do experimento (14 dias depois) com zinco.

Zinco total (mg Kg⁻¹)				
Fósforo	P [3]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	131.54	131.54	131.54	131.54
R1	106.83	155.57	75.24	151.04
R2	96.53	162.94	74.49	149.38
R3	94.83	171.28	78.69	146.96
Média final	99.39	163.26	76.14	149.13
DP	6.494	7.861	2.240	2.053
Fósforo	P [15]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	131.54	131.54	131.54	131.54
R1	89.02	110.70	68.26	88.17
R2	94.75	98.91	72.31	85.51
R3	91.70	106.72	70.63	85.32
Média final	91.82	105.45	70.40	86.33
DP	2.866	5.998	2.034	1.591
Fósforo	P [46]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
média inicial	131.54	131.54	131.54	131.54
R1	78.38	87.18	64.17	60.10
R2	75.76	83.55	60.94	57.93
R3	82.08	77.39	62.39	66.54
Média final	78.74	82.71	62.50	61.52
DP	3.174	4.949	1.619	4.480

Tabela 12. Valores médios ($\pm$ DP) da concentração de clorofila-*a* e total observada em exemplares de *A. filiculoides*, após 14 dias de experimento com zinco.

Clorofila <i>a</i> ($\mu\text{g g}^{-1} \text{fw}^{-1}$)					Clorofila total ($\mu\text{g g}^{-1} \text{fw}^{-1}$)			
Fósforo	P[3]				P[3]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
R1	5.59	1.21	1.46	1.61	8.89	2.98	3.78	4.23
R2	6.14	1.36	1.42	1.66	8.67	3.36	3.68	4.39
R3	5.57	1.42	1.74	1.64	9.11	3.72	4.56	4.37
média	5.76	1.33	1.54	1.64	8.89	3.35	4.01	4.33
DP	0.324	0.109	0.176	0.028	0.220	0.366	0.481	0.086
Fósforo	P[15]				P[15]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
R1	4.28	1.83	1.48	1.71	5.92	4.73	3.83	4.58
R2	4.70	2.22	1.40	1.71	6.73	5.65	3.63	4.45
R3	4.09	1.83	1.40	1.92	5.60	4.52	3.50	5.15
média	4.36	1.96	1.43	1.78	6.08	4.97	3.65	4.73
DP	0.309	0.227	0.046	0.121	0.581	0.599	0.168	0.372
Fósforo	P[46]				P[46]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
R1	5.35	1.93	1.52	1.82	7.35	4.91	3.90	4.76
R2	5.40	2.13	1.41	1.94	7.38	5.19	3.59	5.04
R3	4.88	2.22	1.52	1.78	6.72	5.48	3.90	4.70
média	5.21	2.09	1.48	1.84	7.15	5.19	3.80	4.83
DP	0.283	0.147	0.066	0.084	0.376	0.287	0.179	0.180

Tabela 13. Valores médios ($\pm$ DP) do ganho de biomassa e taxa de crescimento relativo (TCR) de *A. filiculoides* observados no último dia de experimentação com zinco.

Ganho de biomassa (g)					TCR (g g dia ⁻¹)			
Fósforo	P [3,0]				P [3,0]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
R1	31.77	43.87	37.87	30.86	0.148	0.171	0.161	0.146
R2	33.57	42.19	45.2	41.1	0.152	0.168	0.173	0.166
R3	40.66	45.2	43.89	33.45	0.166	0.173	0.171	0.152
média	35.33	43.75	42.32	35.14	0.16	0.17	0.17	0.15
DP	4.700	1.508	3.909	5.324	0.009	0.002	0.007	0.011
Fósforo	P [15,0]				P [15,0]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
R1	47.98	56.15	41.17	47.38	0.177	0.189	0.167	0.177
R2	34.81	60.2	41.91	42.18	0.155	0.194	0.168	0.168
R3	52.50	56.7	41.86	42.19	0.184	0.189	0.168	0.168
média	45.10	57.68	41.65	43.92	0.17	0.19	0.17	0.17
DP	9.191	2.197	0.414	2.999	0.015	0.003	0.001	0.005
Fósforo	P [46,0]				P [46,0]			
Zinco	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]	C	Zn [5]	Zn [10]	Zn [20]
R1	50.02	52.64	41.27	39.05	0.180	0.184	0.167	0.163
R2	53.62	50.45	41.17	42.69	0.185	0.181	0.167	0.169
R3	50.96	43.01	40.94	40.84	0.182	0.170	0.166	0.166
média	51.53	48.70	41.13	40.86	0.18	0.18	0.17	0.17
DP	1.867	5.048	0.169	1.820	0.003	0.008	0.000	0.003