

ÉVIO EDUARDO CHAVES DE MELO

**FITOEEXTRAÇÃO INDUZIDA DE METAIS PESADOS: EFEITO
DE AGENTES QUELANTES E DO TEMPO DE CONTATO
METAL-SOLO**

**RECIFE
PERNAMBUCO – BRASIL
2006**

Évio Eduardo Chaves de Melo

**FITOEEXTRAÇÃO INDUZIDA DE METAIS PESADOS: EFEITO
DE AGENTES QUELANTES E DO TEMPO DE CONTATO
METAL-SOLO**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência do Solo da Universidade
Federal Rural de Pernambuco,
como exigência para obtenção do
título de Mestre.

Recife -PE
2006

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

M528f Melo, Évio Eduardo Chaves de
 Fitoextração induzida de metais pesados: efeito de
 agentes quelantes e do tempo de contato metal-solo/ Évio
 Eduardo Chaves de Melo. -- 2006.
 77f. : il.

 Orientador: Clístenes Williams Araújo do Nascimento.
 Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade
 Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Agronomia.
 Inclui bibliografia.

CDD 631.41

1. Metal pesado
2. Ácido orgânico
3. Fitoextração
4. Química do solo
- I. Nascimento, Clístenes Williams Araújo do
- II. Título

Évio Eduardo Chaves de Melo

Dissertação intitulada FITOEXTRAÇÃO INDUZIDA DE METAIS PESADOS: EFEITO DE AGENTES QUELANTES E DO TEMPO DE CONTATO METAL-SOLO, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como exigência para obtenção do título de Mestre, e aprovada em 23 de fevereiro de 2006.

Clístenes Williams Araújo do Nascimento, DS.

**PRESIDENTE DA BANCA EXAMINADORA
(ORIENTADOR)**

Adailson Pereira de Souza, DS.

EXAMINADOR

Adriana Maria de Aguiar Accioly, DS.

EXAMINADORA

Giuliano Marchi, DS.

EXAMINADOR

“O tipo de futuro que teremos dependerá muito dos conhecimentos, da visão, da capacidade de previsão e da competência na tomada de decisões hoje.”

Peter F. Drucker

Aos meus pais, José Edemilson Vieira de Melo e Maria de Fátima Chaves de Melo, e a minha avó, Wandira Costa Chaves, pelo amor e apoio em todas as etapas da minha vida. Aos meus irmãos, José Edemilson V. de Melo Júnior e Tatiana Chaves de Melo, pelo carinho e amizade.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a fonte de vida e sabedoria, por me iluminar e guiar por todos os caminhos.

A minha família, especialmente Tia Mimila, pela fé que depositaram em meu futuro.

Ao Professor Clístenes Williams Araújo do Nascimento pela amizade, confiança e toda riqueza de conhecimentos sempre transmitidos com respeito e dedicação desde a época de bolsista de Iniciação Científica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, em especial as professoras Adriana Maria de Aguiar Accioly e Maria Betânia Galvão dos Santos Freire, pelos conhecimentos, conselhos e orientações durante o mestrado.

Aos amigos de turma do mestrado Sebastião, Patrícia, Priscila, Carlos Eduardo, Michelângelo, Marcela, Sandro e em especial a Ana Cristiane, pelo companheirismo e apoio nas horas mais difíceis.

Aos amigos Marise, Michelangelo, Dagmar, Daniela, Edvan, Fátima, Karina, Cícero, Euzelina, Arlete, Eduardo Saldanha, Isaac, Júlio Guilherme, Júlio César e Valdemir pelas alegrias ao longo do inesquecível ano de pós-graduação.

As amigas Leila e Alexsandra pelo carinho e ótimos momentos proporcionados.

Aos estagiários do laboratório de Fertilidade do Solo da UFRPE pelo auxílio na condução deste trabalho.

Finalmente, a todos, em especial a Socorro e ao Seu Noca, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	6
CAPÍTULO I - FITOEXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE METAIS PESADOS APÓS APLICAÇÃO DE AGENTES QUELANTES	8
RESUMO	8
SUMMARY	9
INTRODUÇÃO	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
CAPÍTULO II - SOLUBILIZAÇÃO E ACÚMULO DE METAIS PESADOS POR MUCUNA PRETA (<i>Stizolobium aterrimum</i>) EM SOLO TRATADO COM ÁCIDOS ORGÂNICOS	33
RESUMO	33
SUMMARY	34
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	38
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
CONCLUSÕES	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
CAPÍTULO III - DISPONIBILIDADE E FRACIONAMENTO DE Cd, Pb, Cu E Zn EM FUNÇÃO DO TEMPO DE CONTATO COM O SOLO	56
RESUMO	56
SUMMARY	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS	60
RESULTADOS E DISCUSSÃO	64

CONCLUSÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

INTRODUÇÃO GERAL

No início da civilização, o homem exercia pequena influência sobre seu ambiente, mas ao dominar as técnicas agrícolas e de produção industrial, proporcionou uma melhor qualidade de vida e aumentou sua dependência tecnológica, gerando diversos impactos ambientais. Os impactos da poluição podem ser imediatos devido à liberação de uma grande quantidade de poluentes no ambiente, com uma recuperação lenta e gradual, ou cumulativos, resultante da acumulação de poluentes depositados durante anos ou décadas.

Embora sejam utilizados como sinônimos, os termos contaminação e poluição não têm o mesmo significado: contaminação do solo é o aumento da concentração de elementos tóxicos no meio que parece não causar efeitos danosos; o termo poluição, por sua vez, é a introdução no ambiente de substâncias ou energia pelo homem, que causam danos à saúde humana, aos sistemas ecológicos, destruições de estruturas e interferência na funcionalidade do ambiente (Alloway, 1990).

Metais pesados podem ser definidos como elementos com densidade atômica maior do que 6 g cm^{-3} (Alloway, 1990). Entre os metais pesados mais estudados, encontram-se elementos não essenciais aos vegetais, como o Pb e Cd bem como micronutrientes (Cu e Zn). Metais pesados ocorrem naturalmente na crosta terrestre, constituindo menos de 1% das rochas. Quanto à origem, podem ser litogênicos, quando provenientes de fontes geológicas, como resíduos de rocha liberados pelo intemperismo, ou antropogênicos, quando adicionados ao solo pela atividade humana, via mineração e aplicação de defensivos agrícolas e fertilizantes, por exemplo (Camargo et al., 2001).

A contaminação do solo por metais pesados pode acarretar sérias conseqüências sobre os componentes funcionais dos ecossistemas. Através da absorção destes pelas plantas, os metais podem entrar na cadeia trófica, contaminando o homem e animais (Accioly & Siqueira, 2000). O impacto dos metais pesados no solo depende, principalmente, da quantidade e das formas químicas em que se encontram: solúvel, trocável, ocluso ou fixado aos minerais, precipitados com outros compostos, na biomassa e complexado na matéria orgânica (McBride, 1994). Com vista a reduzir os impactos ambientais gerados pela contaminação do solo, cursos de água e lençol freático, muitas tecnologias aplicáveis à remediação de solos contaminados por metais pesados estão sendo estudadas.

Algumas tecnologias de remediação de solos poluídos por metais utilizam escavação e aterramento do solo, evitando perda de solo por erosão e lixiviação (Garbisu & Alkorta, 2001). No entanto, essas técnicas geram resíduos que requerem tratamento, tornando o processo dispendioso, apesar de eficaz (Khan et al., 2000). Outra técnica é a imobilização de metais pesados, que se refere à adição de amenizantes químicos, visando imobilizar ou tornar os contaminantes menos disponíveis no solo, seja para absorção por plantas ou lixiviação para o lençol freático (Soares et al., 2002; Galindo et al., 2005).

Um método ainda em desenvolvimento é a fitorremediação, no qual plantas são utilizadas para remover, conter, transferir, estabilizar ou tornar inofensivos os metais tóxicos (Raskin & Ensley, 2000). Este método é apropriado, quando soluções com baixos custos são essenciais ou quando é permitido um processo lento de remediação de áreas com baixa concentração de metais pesados (Nedelkoska & Doran, 2000).

Dentre as vantagens da fitorremediação, incluem-se a mínima destruição e desestabilização da área, baixo impacto ambiental e estética favorável (Nedelkoska & Doran, 2000). Além disso, é uma alternativa limpa, de baixo custo, fornece contenção dos lixiviados, manutenção e melhoria da estrutura física, da fertilidade e da biodiversidade do solo, e absorve metais do solo, cuja extração é dispendiosa, utilizando-se outra tecnologia (Khan et al., 2000).

A fitoextração, uma das técnicas de fitorremediação de solos, consiste no uso de plantas acumuladoras de metais, para extrair e transportar esses contaminantes do solo para a parte aérea (Marchiol et al., 2004). O contaminante deve estar em uma forma acessível para a absorção pelas raízes. Sua translocação da raiz para a parte aérea facilita a retirada do contaminante, quando a parte aérea é colhida. A taxa de remoção é dependente da biomassa coletada no final do ciclo, do número de cortes por ano e de sua concentração na biomassa colhida (Accioly & Siqueira, 2000).

A idéia de se utilizar plantas que hiperacumulem metais para remover e reciclar seletivamente metais em excesso no solo, surgiu com a descoberta de diferentes plantas, que acumulavam altas concentrações de metais em sua folhagem (Brooks, 1998).

São consideradas plantas hiperacumuladoras aquelas capazes de acumular naturalmente mais de 100 mg kg^{-1} de Cd, 1000 mg kg^{-1} de Ni, Pb e Cu, ou 10000 mg

kg⁻¹ de Zn e Mn na matéria seca, quando crescem em solos ricos nestes metais (McGrath & Zhao, 2003).

Segundo Jiang et al. (2003), a fitoextração pode ser conduzida de duas formas principais: a primeira, utilizando espécies de plantas hiperacumuladoras devido à alta capacidade de acumulação de metais, porém com baixa produção de biomassa (fitoextração natural); a segunda ocorre através do uso de plantas de alta produção que podem absorver quantidade relativamente alta de metais, quando a mobilidade de metais no solo é elevada devido à aplicação de agentes químicos (fitoextração quimicamente induzida).

O uso de plantas não acumuladoras em comparação com hiperacumuladoras é compensada pela produção de biomassa, embora essas não suportem altos teores de metais (Lasat, 2000). A adição de agentes quelantes ao solo, para aumentar a biodisponibilidade de contaminantes, pode, algumas vezes, induzir a hiperacumulação em plantas normais, porém pode provocar riscos ambientais indesejáveis (McGrath & Zhao, 2003).

Tanto raízes quanto microrganismos da rizosfera liberam ácidos orgânicos de baixo peso molecular, para aumentar a solubilidade de nutrientes por acidificação e formação de complexos orgânicos. Entre os exsudatos de raiz, uma faixa extensiva de ácidos pode ser encontrada, como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido propílico e ácido láctico. Eles funcionam como agentes quelantes naturais, capazes de solubilizar metais pesados (Wasay et al., 1998). A formação de complexos quelato/metais previne a precipitação e a adsorção dos metais e mantém sua disponibilidade para absorção pelas plantas.

Agentes quelantes sintéticos, tais como NTA (ácido nitrilotriacético), EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacético) e EDDS (ácido etilenodiaminodisucinato), vêm sendo utilizados para aumentar a biodisponibilidade de metais pesados para as plantas. Os quelatos resultantes são muito estáveis e, normalmente, não liberam seus íons metálicos, a não ser que haja uma queda significativa no pH do solo (Khan et al., 2000).

O uso de ácido orgânico funciona quando o metal a ser extraído possui biodisponibilidade inicialmente baixa, não sendo assim fitotóxico, permitindo o estabelecimento de uma alta biomassa vegetal antes da aplicação do quelante. Entretanto poucos estudos foram conduzidos para avaliar qual o melhor método de fitoextração quimicamente induzida para solos contaminados com vários metais

pesados. Alta contaminação de metais, como Cu, Zn e Cd, que são geralmente mais biodisponíveis, podem limitar o sucesso do método, devido à possível fitotoxidez, antes da aplicação do quelato (Sun et al., 2001).

A adição de EDTA em uma taxa de 10 mmol kg⁻¹ de solo aumentou para 1,6% a acumulação de Pb na parte aérea do milho. *Brassica juncea* exposta ao Pb e ao EDTA em solução hidropônica foi capaz de acumular mais de 1% do metal na matéria seca da parte aérea. O HEDTA (ácido hidroxietil-etilenodiamino-triacético), aplicado na taxa de 2 g kg⁻¹ de solo contaminado com 2.500 mg kg⁻¹ de Pb aumentou a acumulação de Pb na parte aérea da *B. juncea* de 40 para 10.600 mg kg⁻¹. A acumulação de níveis elevados de Pb é altamente tóxica e pode causar a morte da planta, sendo recomendada a aplicação de quelatos após a máxima produção de biomassa, uma semana antes da colheita. A aplicação de EDTA, também, estimulou a fitoacumulação de Cd, Cu, Ni e Zn (Lasat, 2000).

Cunningham & Ow (1996) e Huang et al. (1997) relataram um elevado acúmulo induzido de Pb em milho sob aplicação de EDTA no solo. Concentrações de Pb similares foram relatadas por Blaylock et al. (1997) em *B. juncea* sob tratamento com EDTA. Esses autores também relataram aumentos substanciais no acúmulo de outros metais, tais como Cu, Cd, Ni e Zn. Salt et. al. (1995) relataram alto acúmulo de Cd em *B. juncea*, após aplicação do EDTA. Jiang et.al. (2003) afirmaram que a aplicação de EDTA não aumentou a absorção de Cd em *B. juncea*, embora tenha parecido estimular a translocação do elemento das raízes à parte aérea.

Segundo Meers et al. (2004), para que a fitoextração seja eficiente, é necessária a disponibilidade de metal no solo e sua translocação para a parte aérea. Em estudos para comparar o efeito de ácidos sintéticos com ácidos biodegradáveis, estes autores comprovaram que EDTA e DTPA aumentaram a concentração de metais pesados (Cu, Zn, Cd, Pb e Ni) em milho, embora, devido as suas baixas biodegradabilidades, resultaram em alto risco ambiental.

O uso prático de quelantes para o melhoramento da remoção de metal em estratégias de fitoextração deve requerer avaliação cuidadosa do local específico, para minimizar o risco de séria contaminação ambiental secundária, como a contaminação do lençol freático e camadas de solo mais profundas (Jiang et al.,2003).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos, e seus resultados têm demonstrado que a fitoextração é uma técnica recente e promissora para recuperar locais contaminados por metais pesados. Sua utilização é indicada em áreas com contaminação variada e com baixa concentração de metais, onde as técnicas de engenharia não sejam viáveis economicamente. Logo, existe a necessidade de se testarem novas espécies, agentes quelantes ambientalmente seguros e modos de aplicação que maximizem a eficiência da fitoextração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACCIOLY, A.M.A. & SIQUEIRA, J.O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H. & SCHAEFER, C.E.G.R. Tópicos em Ciência do Solo. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. p. 299-352.
- ALLOWAY, B.J. The origins of heavy metals in soils. In: B. J. ALLOWAY (ed.) Heavy Metals in Soils. New York, 1990. p. 29-39.
- BLAYLOCK, M.J.; SALT, D.E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHROVA, O.; GUSSMAN, C.; KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B.D. & RASKIN, I. Enhanced accumulation of Pb in indian mustard by soil-applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.*, 13: 860-865. 1997.
- BROOKS, R.R. Plants that hyperaccumulate metals. CAB International, New York, NY, 1998. p. 392.
- CAMARGO, O.A.; ALLEONI, L.R.F. & CASAGRANDE, J.C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P.; RAIJ, B. & ABREU, C.A. Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura. Jaboticabal: Legis Summa, 2001. p.89-124.
- CUNNINGHAM, S.D. & OW, D.W. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.*, 110: 715-719, 1996.
- GALINDO, I.C.L.; BEZERRA, S.A.; NASCIMENTO, C.W.A. & ACCIOLY, A.M.A. Fertilizantes fosfatados e orgânicos e seus efeitos na imobilização de chumbo em solo contaminado. *CAATINGA*, 18(1): 58-65, 2005.
- GARBISU, C. & ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology*, 77:229 – 236, 2001.
- HUANG, J.W.; CHEN, J.; BERTI, W.R. & CUNNINGHAM, S.D. Phytoremediation of lead contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 800-805, 1997.
- JIANG, X.J.; LUO, Y.M.; ZHAO, Q.G.; BAKER, A.J.M.; CHRISTIE, P. & WONG, M.H. Soil Cd availability to Indian mustard and environmental risk following EDTA addition to Cd-contaminated soil. *Chemosphere*, 50: 813-818, 2003.
- KHAN, A.G.; KUEK, C.; CHAUDHRY, T.M.; KHOO, C.S. & HAYES, N.J. Role of plants, mycorrhizae and phytochelators in heavy metal contaminated land remediation. *Chemosphere*, 41:197 – 207, 2000.
- LASAT, M.M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2: 1-25, 2000.

- MARCHIOL, L.; ASSOLARI, S.; SACCO, P. & ZERBI, G. Phytoextraction of heavy metals by canola (*Brassica napus*) and radish (*Raphanus sativus*) grown on multicontaminated soil. *Environment Pollution*, 132: 21-27, 2004.
- McGRATH, S. P. & ZHAO, F. Phytoextraction of Metals and Metalloids from Contaminated Soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 14:277-282, 2003.
- McBRIDE, M. B. *Environmental chemistry of soils*. New York: Oxford University Press, 1994. p. 406.
- MEERS, E.; HOPGOOD, M.; LESAGE, E.; VERVAEKE, P.; TACK, F. M. G. & VERLOO, M. G. Enhanced Phytoextraction In: Search of EDTA Alternatives. *International Journal of Phytoremediation*, 6(2): 95–109, 2004.
- NEDELKOSKA, T.V. & DORAN, P.M. Characteristics of heavy metal uptake by plant species with potential for phytoremediation and phytomining. *Minerals Engineering*, 13 (5): 549 – 561, 2000.
- RASKIN, I. & ENSLEY, B. Phytoremediation of toxic metals - using plants to clean up the environment. *Plan Science*, 160: 1073 – 1075, 2000.
- SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, I.J. & RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. *Plant Physiol.*, 109: 1427–1433, 1995.
- SOARES, C.R.T.S.; ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O. & MOREIRA, F.M.S. Diagnóstico e reabilitação de área degradada pela contaminação por metais pesados. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5, Belo Horizonte, 2002. Livro de Palestras. Lavras: DCF/ UFLA/ SOBRAGE, 2002. p. 56-82.
- SUN, B.; ZHAO, F.J.; LOMBI, E. & McGRATH, S.P. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environmental Pollution*, 113:111 – 120, 2001.
- WASAY, S.A.; BARRINGTON, S. & TOKUNAGA, S. Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. *J. Environ. Technol.*, 19:369–380, 1998.

Capítulo I FITOEXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO DE METAIS PESADOS APÓS APLICAÇÃO DE AGENTES QUELANTES

RESUMO

A adição de agentes quelantes sintéticos para fitoextração aumenta a disponibilidade de metais no solo e eleva sua concentração na planta. No entanto, a baixa biodegradabilidade resulta em alto risco ambiental. Uma alternativa para os quelantes sintéticos pode ser os quelantes naturais, mais rapidamente degradados no solo. O trabalho objetivou comparar a performance de ácidos orgânicos naturais (gálico, cítrico e oxálico) com ácidos sintéticos (EDTA, DTPA e NTA) na fitoextração induzida dos metais Pb, Cu e Zn por milho (*Zea mays*) e mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*). O solo foi contaminado com Pb, Cu e Zn nas doses 500, 200 e 300 mg kg⁻¹, respectivamente, e cultivados por 35 dias. Os agentes quelantes (10 mmol kg⁻¹) foram aplicados 7 dias antes da coleta das plantas. As amostras de solo foram submetidas à extração química e fracionamento. EDTA, DTPA e NTA foram altamente eficientes na solubilização dos metais pesados. O ácido cítrico foi eficiente na solubilização dos metais nas primeiras 24 h após a aplicação. Devido à baixa produção de biomassa pelas espécies, nenhum quelante foi eficiente na fitoextração induzida de Pb, Cu e Zn no solo. O extrator CaCl₂ apresentou elevada correlação com metais na solução do solo, estimando adequadamente os teores lábeis dos metais. Os metais Pb, Cu e Zn no solo foram retidos principalmente na fração matéria orgânica. De modo geral, a adição dos quelantes sintéticos aumentou os teores trocáveis para Pb e Cu; e redução nas frações óxidos de ferro amorfo e cristalino para Pb, Cu e Zn.

SUMMARY

PHYTOEXTRACTION AND FRACTIONATION OF HEAVY METALS AS A FUNCTION OF CHELANTS APPLIED TO SOIL

The application of synthetic chelates to enhance phytoextraction increase metal availability as well as their concentration in shoots. However, synthetic chelates barely degradate in soil and pose a risk owing metal leaching. Natural organic acids can be an alternative to synthetic chelates thanks to their rapid biodegradability. The work aimed to comparing the performance of natural organic acids (gallic, citric, and oxalic) to chelates EDTA, DTPA, and NTA for phytoextraction of Pb, Cu and Zn by corn (*Zea mays*) and velvetbean (*Stizolobium aterrimum*). Soil samples were contaminated to reach the concentrations of 500 (Pb), 200 (Cu), and 300 (Zn) mg kg⁻¹ and cultivated for 35 days. The chelantes were applied at 10 mmol kg⁻¹ 7 days before plants harvest. Soil samples were submitted to chemical extraction by CaCl₂ and fractionation. EDTA, DTPA, and NTA were effective at solubilizing the heavy metals. Citric acid was efficient to solubilize metals on the first 24 h after application. Due to the low biomass production, none chelant was efficient for phytoextraction of Pb, Cu, or Zn. The CaCl₂ extractant presented high correlation with metals concentration in soil solution. Lead, Cu, and Zn were mainly retained in the organic matter fraction. In general, synthetic chelates application increased the concentration of Pb and Cu in the exchangeable and organic matter fractions and decreased the concentration of Pb, Cu, and Zn in the amorphous oxide and crystalline oxide fractions.

1. INTRODUÇÃO

Metais pesados ocorrem naturalmente no solo, e alguns deles, como Mn, Fe, Cu, Zn, Mo e Ni, são essenciais como micronutrientes para vários microrganismos, plantas e animais, enquanto outros não possuem funções biológicas conhecidas, como Pb e Cd. As fontes de contaminação de metais nos solos resultam, principalmente, da deposição atmosférica, de resíduos sólidos industriais, urbanos e de aterros sanitários, além da combustão de combustíveis fósseis e do uso de fertilizantes e pesticidas na agricultura. A concentração elevada de metais pesados no solo pode afetar a produtividade, biodiversidade e sustentabilidade dos ecossistemas, constituindo-se em risco para a saúde dos seres humanos e animais (Sun et al., 2001).

A forma na qual os metais pesados são encontrados no solo constitui fator determinante para a remediação deste. Por esse motivo, as extrações químicas simples e seqüenciais são fundamentais para identificar as formas químicas nas quais esses elementos se encontram ou estão predominantemente associados. As extrações químicas simples têm sido extensivamente utilizadas para medir os teores de metais em solos, enquanto as extrações seqüenciais são úteis, para se inferir a biodisponibilidade de metais pesados em diferentes frações do solo (Oliveira et al., 1999).

As técnicas de recuperação de solos poluídos, como isolamento e retenção, separação mecânica, tratamento químico ou retirada do solo, têm demonstrado serem eficazes em pequenas áreas (Mulligan et al., 2001). No entanto, essas técnicas não são apenas caras, mas também causam perturbações no ecossistema, não sendo aceitas facilmente pela sociedade. A fitorremediação, o uso de plantas para restabelecer locais poluídos, recentemente se tornou uma alternativa viável em comparação às técnicas tradicionais (Chaney et al., 1997; Glass, 2000). Uma das estratégias mais eficientes de fitorremediação é a fitoextração, que envolve o cultivo de plantas tolerantes que concentram metais pesados do solo na parte aérea (Krämer, 2005). O sucesso da fitoextração depende da habilidade das plantas em acumular concentrações de metais pesados na parte aérea que sejam suficientemente elevadas, para reduzir a concentração de metais em níveis toleráveis no solo, em poucos cultivos.

Em pesquisa sobre fitoextração, duas estratégias principais foram identificadas. A primeira se refere ao uso de espécies hiperacumuladoras. Estas plantas são naturalmente capazes de acumular metais pesados, principalmente Ni, Zn, Cd, As ou Se, em seus tecidos da parte aérea, sem desenvolver quaisquer sintomas de toxicidade (Baker & Brooks, 1989). No entanto, as desvantagens no uso de hiperacumuladoras são as baixas produções de biomassa e as baixas habilidades em acumular diversos metais simultaneamente. A segunda estratégia envolve uso de espécies de alta produção de biomassa, que são quimicamente induzidas a aumentar a eficiência de remoção e translocação de metais para a parte aérea.

A adição de agentes quelantes sintéticos, como EDTA, DTPA e NTA, é utilizada para aumentar a mobilidade e a biodisponibilidade de metais no solo e, também, para elevar a concentração de metais pesados acumuladas na parte aérea das plantas (Huang & Cunningham, 1996; Blaylock et al., 1997; Huang et al., 1997; Ebbs & Kochian, 1998; Wu et al., 1999). No entanto, a principal desvantagem que restringe o uso de quelantes sintéticos, especialmente EDTA, é a sua baixa biodegradabilidade, resultando em alto risco ambiental (Meers et al., 2004) pela manutenção de elevados teores de metais solúveis no solo, prontos para lixiviar, por um longo período.

Uma alternativa para os quelatos sintéticos pode ser os agentes quelantes naturais. Ácidos húmicos, por exemplo, foram eficientes na fitoextração de metais pesados do solo (Evangelou et al., 2004). Ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como os exudatos radiculares liberados pelas plantas no solo, influenciam a solubilidade de metais e a sua absorção mediante formação do complexo metálico e têm sido amplamente estudados para fitoextração (Chen et al., 2003; Turgut et al., 2004; Quartacci et al., 2005; Nascimento et al., 2006). Ácidos orgânicos naturais apresentam vantagem sobre os quelantes sintéticos, visto que são mais rapidamente degradados no solo, evitando efeitos de contaminação de lençóis freáticos.

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi o de comparar a performance de ácidos orgânicos naturais (ácido gálico, ácido cítrico e ácido oxálico) com ácidos sintéticos (EDTA, DTPA e NTA) na fitoextração induzida dos metais Pb, Cu e Zn por Milho (*Zea mays*) e Mucuna Preta (*Stizolobium aterrimum*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta, caracterização e preparação do solo

O solo utilizado no experimento, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, foi obtido da camada subsuperficial (30 a 60 cm), no Campus da UFRPE. Amostras do solo (TFSA) foram utilizadas para a caracterização química e física (Quadro 1), conforme EMBRAPA (1999).

Quadro 1. Características químicas e físicas do solo utilizado no experimento

Características	Valor
pH (água 1:2,5)	4,3
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,82
Ca (cmol _c dm ⁻³)	0,55
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,50
P (mg dm ⁻³)	12,00
K (cmol _c dm ⁻³)	0,05
Na (cmol _c dm ⁻³)	0,14
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	4,95
N (g kg ⁻¹)	0,5
C.O. (g kg ⁻¹)	4,5
C/N	9,1
Fe (mg dm ⁻³)	99
Cu (mg dm ⁻³)	< LD
Zn (mg dm ⁻³)	1,45
Mn (mg dm ⁻³)	1,48
Cd (mg dm ⁻³)	< LD
Pb (mg dm ⁻³)	< LD
Areia (g kg ⁻¹)	566
Silte (g kg ⁻¹)	48
Argila (g kg ⁻¹)	386

<LD – abaixo do limite de detecção

O solo seco ao ar, destorroado e homogeneizado foi passado em peneira de 4 mm de abertura de malha. A acidez foi corrigida para pH na faixa de 6,5 – 7,0, utilizando-se carbonato de cálcio e magnésio (na proporção molar de 3:1), em quantidades previamente definidas em ensaio de incubação. Para simular a contaminação com metais pesados, foram acrescentadas em sacos plásticos, contendo 1 kg de solo, soluções preparadas com (PbCO₃)₂.Pb(OH)₂, CuCO₃.Cu(OH)₂ e ZnCO₃, de modo a elevar a concentração de metais no solo para 500, 200 e 300 mg kg⁻¹ de Pb, Cu e Zn, respectivamente. Após a adição das soluções, as

amostras de solo permaneceram incubadas durante 30 dias, com umidade mantida em 80 % da capacidade de campo.

2.2. Condução do experimento em casa de vegetação

Após o período de incubação, uma solução nutritiva foi aplicada para o fornecimento de nutrientes às plantas: 250, 240, 150 e 100 mg kg⁻¹ de N, P, K e S, respectivamente, a partir de NH₄SO₂, NH₄H₂PO₄ e KNO₃; e os micronutrientes Fe (FeSO₄.7H₂O), Mn (MnCl₂.4H₂O), B (H₃BO₃) e Mo (Na₂MoO₄.2H₂O) foram aplicados em concentrações de 2, 4, 1 e 0,2 mg kg⁻¹, respectivamente (Nascimento et al., 2006). As amostras foram transferidas para vasos com capacidade de 1 kg nos quais foram semeados milho (*Zea mays*) e mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*), deixando-se, após o desbaste, duas plantas por vaso que foram cultivadas por 35 dias. Durante o ensaio, as amostras foram mantidas com 80% da capacidade de retenção de água, mediante pesagem e irrigação diárias para complementação da água perdida por evapotranspiração. No 28° dia de cultivo foram aplicados seis diferentes agentes quelantes numa concentração de 10 mmol kg⁻¹.

2.3. Solubilidade dos metais no solo

A avaliação dos efeitos dos quelantes na solubilização dos metais foi realizada a partir de duas coletas da solução obtida por amostrador de solução do solo (Rhizon[®], SMS: Eijkelkamp, The Netherlands), colocado no centro de cada pote (Figura 1). As amostras da solução foram obtidas por pressão de sucção, utilizando seringas no 1° e no 7° dia, após aplicação dos ácidos.



Figura 1. Coletor da solução do solo.

2.4. Coleta das plantas e análise dos metais pesados Pb, Cu e Zn

Após a última coleta da solução, foram coletadas as raízes e a parte aérea das plantas. As raízes foram lavadas abundantemente, em água de torneira e depois, passadas em água destilada. Em seguida, juntamente com a parte aérea, foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 70° C até atingir o peso constante. Foram obtidas as massas da matéria seca da parte aérea e da raiz, as quais, em seguida, foram trituradas em moinho tipo Wiley e submetidas à digestão nitro-perclórica (EMBRAPA, 1999) para quantificação de metais pesados.

De posse da matéria seca da parte aérea e da raiz e da concentração dos metais pesados, foi estimado ainda, o conteúdo desses elementos nas diferentes partes dos vegetais, assim como a remoção desses elementos da seguinte maneira:

$$\text{Remoção} = \text{PA} \times \text{MS}$$

$$\text{PA} = \text{Concentração na parte aérea}$$

$$\text{MS} = \text{Produção de matéria seca}$$

2.5. Extração dos metais pesados Pb, Cu e Zn do solo

As amostras do solo foram secas, homogeneizadas e passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha. Subamostras do solo foram coletadas para determinação dos teores disponíveis dos metais (Pb, Cu e Zn) por cloreto de cálcio. Este extrator foi escolhido devido a sua capacidade para extrair metais, apenas, da fase prontamente disponível.

Para essa extração, foi utilizada uma solução, contendo 10 mmol L⁻¹, na relação solo:solução de 1:10, agitada por 2 horas, em um tubo de centrífuga com capacidade para 50 mL. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1600 x g, e o sobrenadante filtrado (Novozamsky et al., 1993).

2.6. Fracionamento de metais no solo

A extração seqüencial foi baseada no método de Shuman (1985), com exceção da fração óxido de ferro amorfo que foi obtida através do método de Chao e Zhou (1983). Esse fracionamento separa os metais nas frações trocável, ligados à matéria orgânica, óxido de ferro amorfo e óxido de ferro cristalino, como descrito abaixo:

Fração Trocável (Tr) – Cinco gramas de TFSA e 20 mL de $Mg(NO_3)_2$ 1 mol L⁻¹ foram agitados por duas horas, em um tubo de centrífuga, com capacidade para 50 mL. Em seguida, a amostra foi centrifugada, o sobrenadante filtrado e 20 mL de água destilada adicionada ao tubo. A amostra sofreu outra agitação por 3 min, sendo centrifugada e filtrada. Os dois sobrenadantes foram combinados para análise.

Fração Matéria Orgânica (MO) – Dez mililitros de NaClO 5-6 dag L⁻¹, pH 8,5 (ajustado imediatamente antes do uso em decorrência da sua alta instabilidade em relação ao pH), foram adicionados ao tubo de centrífuga, e a amostra, aquecida em banho-maria a 100° C, durante 30 min, ocasionalmente agitada. Em seguida, a amostra foi centrifugada, e o sobrenadante, filtrado. Esse procedimento foi repetido duas vezes, e os três filtrados combinados. Após adição de 10 mL de água destilada, a amostra no tubo de centrífuga foi agitada por 3 min, centrifugada, filtrada, e o filtrado, adicionado ao extrato de NaClO das extrações anteriores.

Fração Óxido de Ferro Amorfo (OxFeA) – Trinta mililitros de $NH_2OH.HCl$ 0,25 mol L⁻¹ + HCl 0.25 mol L⁻¹ pH 3,0 foram adicionados à amostra no tubo de centrífuga, seguindo-se agitação por 30 min. As amostras foram centrifugadas, filtradas e lavadas, como na extração anterior.

Fração Óxido de Ferro Cristalino (OxFeC) – Trinta mililitros de $(NH_4)_2C_2O_4$ 0,2 mol L⁻¹ + $H_2C_2O_4$ 0,2 mol L⁻¹ + ácido ascórbico 0,01 mol L⁻¹, pH 3,0 foram colocados em contato com a amostra de solo no tubo de centrífuga e aquecidos por 30 minutos a 100° C em banho-maria, sendo ocasionalmente agitados. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação e à filtração.

2.5. Delineamento experimental e análises estatísticas

O ensaio foi montado em um delineamento blocos casualizados em esquema fatorial, utilizando-se seis agentes quelantes, sendo três ácidos orgânicos (ácido gálico, ácido cítrico e ácido oxálico) e três agentes sintéticos (ácido etilenodiaminotetraacético, EDTA; ácido dietilenotriaminopentaacético, DTPA e ácido nitrilotriacético, NTA), um controle (solo contaminado sem a adição de ácido) e uma testemunha (vaso com solo não contaminado e sem a adição de ácido), em duas espécies vegetais, com 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média (Scott Knott a 5%), utilizando o software SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética) da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de matéria seca

A adição de metais pesados ao solo e as aplicações dos agentes quelantes tiveram forte influência sobre a produção de matéria seca de parte aérea e de raiz das duas espécies (Quadro 2). A produção de matéria seca foi significativamente menor no tratamento controle (sem adição de ácido) comparativamente àquela obtida no solo não contaminado. A fitotoxicidade dos metais provocou redução de 92 e 85 % no desenvolvimento radicular, e de 96 e 81 % na parte aérea das plantas de milho e mucuna, respectivamente.

Quadro 2. Matéria seca da raiz e parte aérea (g pote^{-1}) em milho e mucuna preta submetidas a aplicação de ácidos orgânicos (10 mmol kg^{-1}) em solo contaminado com Pb, Cu e Zn

Matéria Seca	Testemunha	Controle	Gálico	Cítrico	Oxálico	EDTA	DTPA	NTA
Milho								
Parte Aérea	8,38a	0,31b	0,41b	0,30b	0,30b	0,34b	0,32b	0,36b
Raiz	3,56a	0,28b	0,33b	0,29b	0,26b	0,23b	0,31b	0,24b
Mucuna Preta								
Parte Aérea	8,73a	1,63b	1,71b	1,76b	1,38c	1,59b	1,40c	1,23d
Raiz	3,51a	0,51d	0,68b	0,74b	0,59c	0,57c	0,63c	0,42d

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

Entre os ácidos orgânicos, o ácido oxálico foi quem mais induziu a toxicidade, reduzindo significativamente a produção de matéria seca da parte aérea da mucuna preta de 19 e 22 % em relação ao ácido gálico e o ácido cítrico. Para os quelantes sintéticos, o DTPA e o NTA reduziram a biomassa da parte aérea em 12 e 22% quando comparado com o EDTA. De modo geral, a menor produção de matéria seca da parte aérea foi encontrado no tratamento com NTA. Este resultado discorda de Wenger et al. (2003), que propôs a utilização do NTA na fitoextração induzida devido à baixa fitotoxicidade do quelante.

Para o milho, os ácidos naturais e sintéticos, não apresentaram diferença significativa na produção de matéria seca da parte aérea e da raiz quando comparadas com o controle. A redução da quantidade de matéria seca de raiz e parte aérea na mucuna foi menor do que no milho, principalmente nos tratamentos em solos contaminados (Quadro 2). Entre os ácidos orgânicos, o oxálico apresentou redução de 15 % na produção de biomassa da parte aérea da mucuna em relação

ao controle, devido ao efeito de toxicidade do ácido. Com a aplicação do EDTA, as produções de matéria seca da raiz e parte aérea não apresentaram redução quando comparadas com o controle, porém o DTPA e o NTA apresentaram reduções de 14 e 24 %, respectivamente, para a matéria seca da parte aérea.

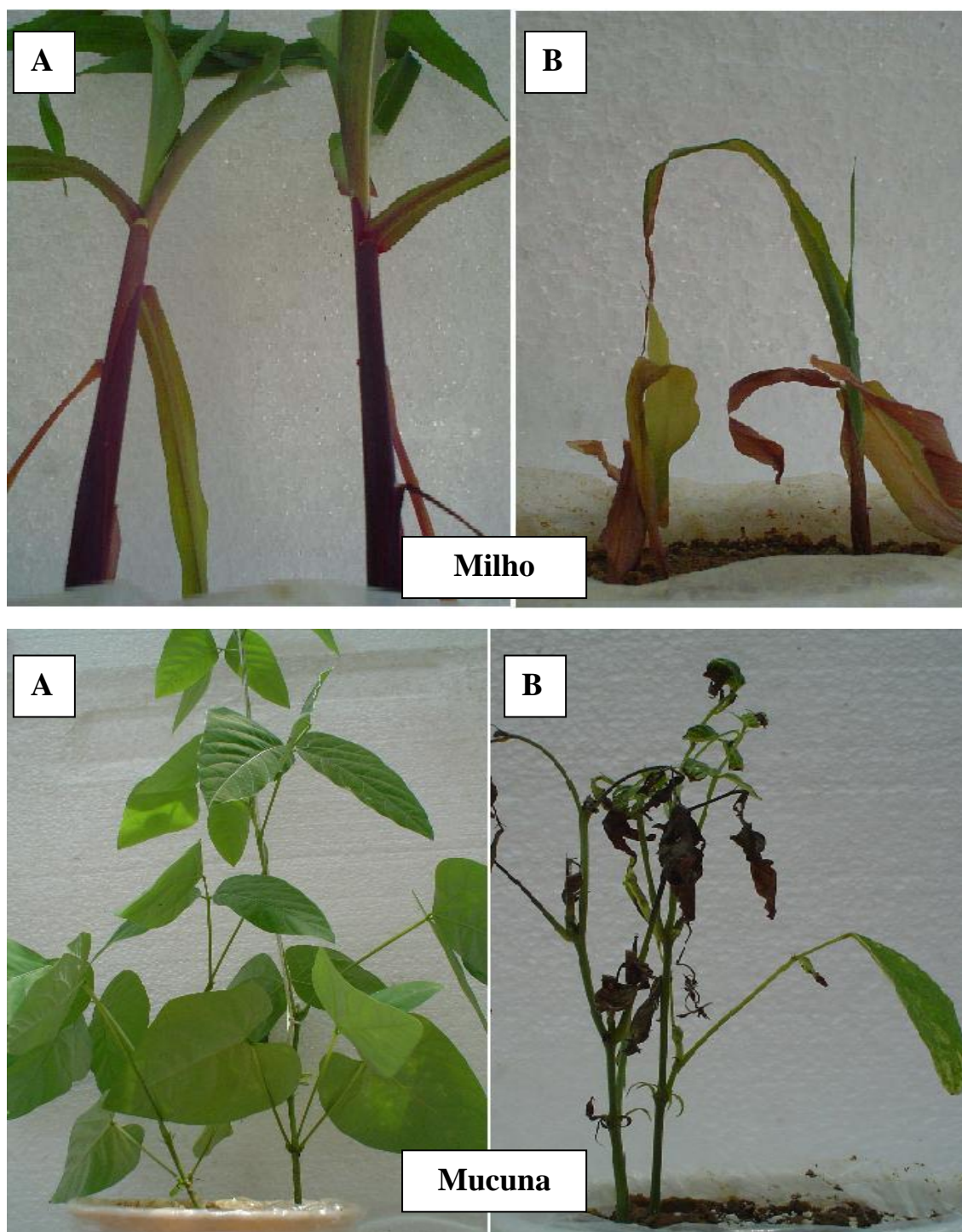


Figura 2. Plantas de milho e mucuna; A - testemunha (sem aplicação de metais ou ácidos) e B - controle (contaminado com metais sem adição de ácidos). Foto obtida no 28° dia de cultivo.

Sintomas de toxicidade, como clorose e necrose, foram observados durante o crescimento das plântulas em todos os tratamentos com o solo contaminado, mesmo antes da aplicação dos quelantes (Figura 2).

3.2 Efeitos dos quelantes na solubilização dos metais no solo

Os quelantes sintéticos (EDTA, DTPA e NTA) foram muito mais eficientes no aumento da concentração de Pb, Cu e Zn na solução do solo que os ácidos orgânicos (Figura 3). O EDTA foi o quelante que solubilizou maior quantidade de metais para a solução do solo. A aplicação de EDTA tem se mostrado altamente eficiente em aumentar as concentrações de metais pesados na solução (Blaylock et al., 1997; Barona et al., 2001; Chen & Cutright, 2001; Lai & Chen, 2004; Nascimento et al., 2006), no entanto, apresenta alta persistência no ambiente devido à baixa biodegradabilidade (Bucheli-Witschel & Egli, 2001; Greman et al., 2003).

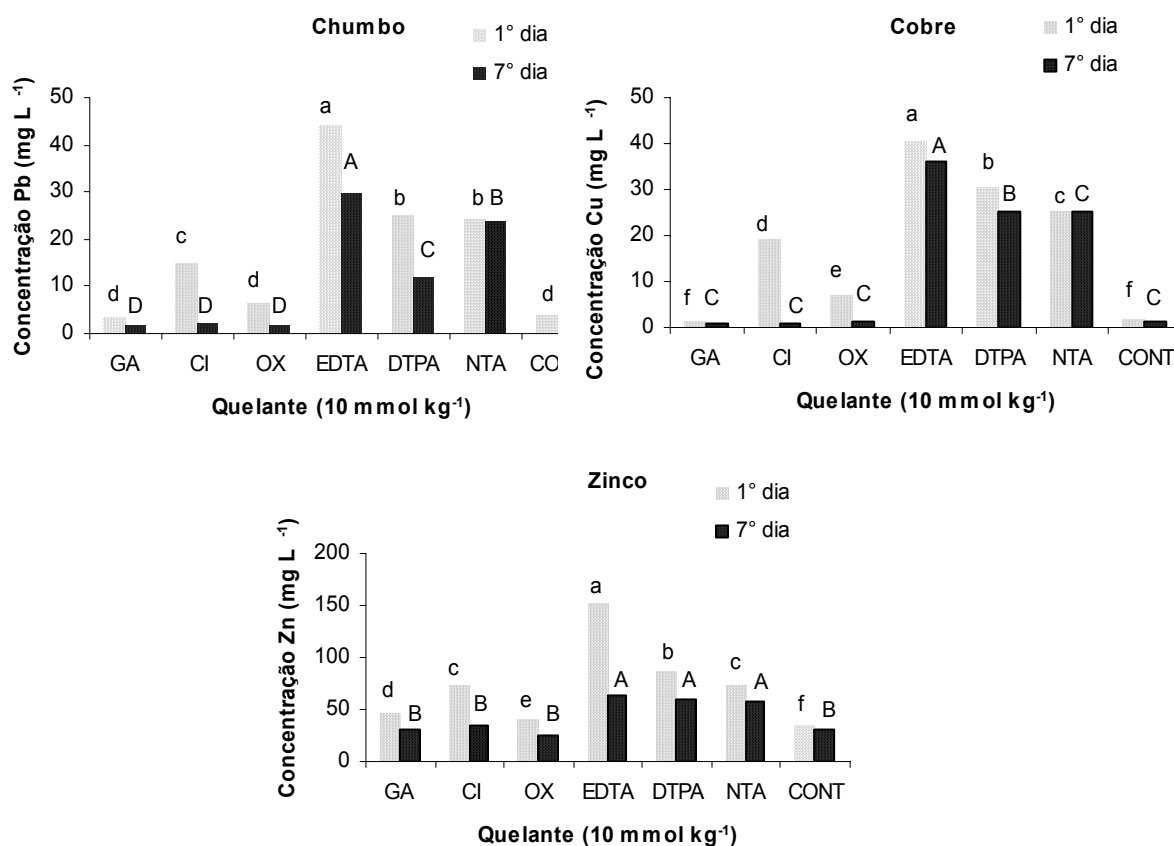


Figura 3. Concentração de Pb, Cu e Zn na solução do solo coletado no 1^o e 7^o dia após as aplicações dos quelantes. GA, ácido gálico; CI, ácido cítrico; OX, ácido oxálico; CONT, controle. As letras minúsculas comparam os tratamentos no 1^o dia e as maiúsculas comparam os tratamentos no 7^o dia. Letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, P<0,05).

A concentração de Pb na solução aumentou significativamente após a adição de EDTA, 92% e 94 % no 1° e 7° dia, respectivamente, após a aplicação do ácido ao solo em relação ao controle. Em média, o EDTA provocou um aumento de 97% e 64% de Cu e Zn na solução do solo.

O EDTA pode permanecer na solução solo por um período longo. Lombi et al. (2001) demonstraram que o quelante pode ser encontrado na solução do solo cinco meses depois de sua aplicação. Nossos dados mostram redução na solução entre o 1° e o 7° dia após a adição do EDTA de 32, 11 e 58% para o Pb, Cu e Zn, respectivamente. Mesmo assim, isso significa concentração na solução do solo tão elevadas quanto 30, 36 e 63 mg L⁻¹ de Pb, Cu e Zn, respectivamente.

O DTPA também apresentou eficiência no aumento da concentração de Pb, Cu e Zn na solução do solo. No entanto, a redução na solução do Pb, Cu e Zn entre o 1° e o 7° dia após sua aplicação foi de 53, 18 e 30%, respectivamente. Este resultado indica que o DTPA apresenta maior degradabilidade no solo quando comparado com o EDTA.

O NTA foi também eficiente na solubilização de Pb, Cu e Zn, e não apresentou redução significativa na concentração de Pb e Cu na solução do solo entre o 1° e o 7° dia após a adição do quelante. Este quelante aumentou as concentrações de Pb, Cu e Zn em 9, 18 e 2 vezes, respectivamente, em relação ao controle.

A aplicação do ácido cítrico apresentou um aumento de 75, 92 e 52% das concentrações de Pb, Cu e Zn para a solução do solo quando comparado com o controle. Embora tenha reduzido significativamente em 87, 96 e 53 % as concentrações de Pb, Cu e Zn, respectivamente, entre as coletas da solução. Os outros ácidos naturais, como o gálico, apresentaram redução de 52, 33 e 33% para Pb, Cu e Zn; e o oxálico, 71, 80 e 40% para Pb, Cu e Zn, respectivamente.

Chen et al. (2003), relataram que o efeito de ácido cítrico na adsorção de metais é provavelmente devido à variação do pH e a quantidade de complexos formados. Em seu experimento, a adição do ácido cítrico reduziu a adsorção de Pb e Cu pelo solo, mediante a diminuição do pH. Além do mais, o ácido cítrico pode reduzir a toxicidade dos metais e estimular o transporte da raiz para a parte aérea.

Segundo Ström et al. (2001), após 24 horas aproximadamente um terço do ácido cítrico foi mineralizado no solo. No entanto, o ácido oxálico provou ser mais persistente à biodegradação, pois somente 7% foi degradado após 24 horas (Ström

et al., 2001). Embora não haja dados disponíveis, o ácido gálico parece ter menor degradabilidade devido ao seu carácter aromático, mais resistente à decomposição.

Este resultado é de grande importância, devido o ácido cítrico ter demonstrado alta habilidade em mobilizar metais no solo (Figura 3). No entanto, estudos posteriores devem focar em estratégias visando diminuir a rápida biodegradação desse ácido à taxas adequadas para fitoextração.

O ácido oxálico, com exceção para o Pb, mobilizou mais metais no primeiro dia após sua aplicação, quando comparado com o controle. O ácido gálico não apresentou efeito significativo no aumento das concentrações dos metais na solução, provavelmente devido a sua baixa solubilidade.

Os ácidos orgânicos de baixo peso molecular podem ser rapidamente mineralizados pelos microrganismos, enquanto os ácidos sintéticos são dificilmente degradados (Hinck et al., 1997; Satroutdinov et al., 2000). Por este motivo, ocorreu rápida degradação dos ácidos naturais quando comparadas as concentrações dos metais na solução no 1º e 7º dia após a aplicação desses quelantes. Por isso, faz-se necessário continuar pesquisando formas de aplicações, concentrações e outros quelantes naturais visando encontrar uma alternativa eficiente e ambientalmente segura aos agentes quelantes sintéticos.

3.3 Efeitos dos quelantes na fitoextração de metais pelo Milho e Mucuna Preta

No milho, com exceção do ácido gálico para o Cu e do ácido oxálico para o Zn, a adição dos quelantes no solo aumentou significativamente a concentração de Pb, Cu e Zn na parte aérea quando comparado com o controle, principalmente para os quelantes sintéticos (Quadro 3).

Ao contrário do observado no milho, para mucuna preta os quelantes não aumentaram a concentração de Zn na parte aérea. No entanto, para Pb e Cu apenas os ácidos sintéticos apresentaram aumento significativo na concentração desses metais na parte aérea (Quadro 4).

De modo geral, entre os quelantes aplicados ao solo, o EDTA mostrou-se mais eficiente para a fitoextração de Pb, Cu e Zn para as duas espécies testadas. As concentrações na parte aérea do milho, em tratamentos com aplicação de EDTA, aumentaram aproximadamente 25, 10 e 1,3 vezes as concentrações de Pb, Cu e Zn respectivamente; e na mucuna 11 e 16 vezes, respectivamente, as concentrações de Pb e Cu.

Quadro 3. Concentração de metal ($\mu\text{g kg}^{-1}$) na parte aérea e raiz, e razão entre parte aérea e raiz, no Milho em solo aplicado 10 mmol kg^{-1} de quelantes

Controle	Gálico	Cítrico	Oxálico	EDTA	DTPA	NTA
Chumbo						
Parte aérea						
83,9f	174,4e	307,0d	357,4d	2115,9a	901,74c	1057,3b
Raiz						
721,9e	2108,8c	1262,1d	2035,6c	4959,3a	2704,0b	1958,4c
Parte aérea / raiz						
0,1e	0,1e	0,2d	0,2d	0,4b	0,3c	0,5a
Cobre						
Parte aérea						
310,2e	375,6e	1725,7b	657,6d	2974,9a	1284,5c	3218,9a
Raiz						
2256,8d	3740,0c	2699,6d	3238,2c	9610,6a	3983,8c	4826,2b
Parte aérea / raiz						
0,1c	0,1c	0,6a	0,2c	0,3b	0,3b	0,7a
Zinco						
Parte aérea						
18074,4c	24110,6b	33910,1a	17684,0c	22021,2b	20477,9b	21747,7b
Raiz						
23490,0b	27795,2a	22443,4b	21113,9b	22748,5b	19142,6c	13732,5d
Parte aérea / raiz						
0,8b	0,9b	1,5a	0,8b	1,0b	1,1b	1,6a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

Lasat (2000) cita que a adição de 10 mmol kg^{-1} de EDTA em solo contaminado, aumentou para 1,6% a acumulação de Pb na parte aérea de milho. E que *B. juncea* exposta a Pb e EDTA foi capaz de acumular mais de 1% de Pb na parte aérea. Wu et al. (2004) também relatam que a adição de 3 mmol kg^{-1} de EDTA aumentou as concentrações de Cu e Pb na parte aérea de *B. juncea*.

Na maioria dos casos, o tratamento com EDTA foi superior em termos de solubilidade do Pb do solo para absorção pela raiz e translocação para biomassa aérea devido provavelmente a sua forte afinidade química ($\log K_s = 17,88$) com o elemento (Luo et al., 2005), embora o DTPA apresente uma constante de estabilidade ($\log K_s = 18,7$) superior ao do EDTA (Martell and Smith, 1974). Mas, segundo Nascimento et al. (2006), a eficiência do DTPA em solubilizar Pb pode ser reduzida devido à competição desse elemento com outros metais pela ligação ao quelante.

O NTA aumentou 13, 10 e 1,2 vezes a concentração de Pb, Cu e Zn na parte aérea do milho. No entanto para mucuna, o quelante aumentou de 3 e 10 vezes a concentração de Pb e Cu na parte aérea, não apresentando alteração na

concentração do Zn. Kulli et al. (1999) observaram que as concentrações de Cd, Cu e Zn na parte aérea da alface e do centeio após a adição do NTA foram de 4 a 24 vezes maiores que nas plantas sem tratamento.

Quadro 4. Concentração de metal ($\mu\text{g g}^{-1}$) na parte aérea e raiz, e razão entre parte aérea e raiz, na *Mucuna Preta* em solo aplicado 10 mmol kg^{-1} de quelantes

Controle	Gálico	Cítrico	Oxálico	EDTA	DTPA	NTA
Chumbo						
Parte aérea						
37,8c	39,8c	38,5c	46,5c	415,4a	160,0b	100,7b
Raiz						
4566,9c	4574,4c	2318,3e	2336,3e	5047,7b	5971,3a	4123,4d
Parte aérea / raiz						
0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,1a	0,0b	0,0b
Cobre						
Parte aérea						
47,8c	75,1c	235,8c	72,8c	762,1a	1029,6a	464,5b
Raiz						
18427,3a	13388,6b	13253,9b	11306,5c	8190,4d	7901,3d	103256,7c
Parte aérea / raiz						
0,0b	0,0b	0,0b	0,0b	0,1a	0,1a	0,0b
Zinco						
Parte aérea						
11486,0a	9662,3a	8565,1a	7321,8a	11626,5a	11468,3a	9417,5a
Raiz						
20540,1b	25233,3a	20346,4b	20346,4b	14608,8c	13855,2c	13906,3c
Parte aérea com raiz						
0,5b	0,4b	0,4b	0,4b	0,8a	0,8a	0,7a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

Para milho (Quadro 3), o NTA, DTPA e o ácido cítrico mostraram-se eficientes na translocação do Zn devido apresentarem a razão parte aérea/raiz superior a unidade. Porém, para os outros metais, a razão parte aérea/raiz foi inferior a um para todos os tratamentos.

Para os elementos Pb, Cu e Zn, nenhum dos quelantes aplicado neste trabalho apresentou a razão parte aérea com raiz superior a um para mucuna (Quadro 4), apesar de diversos estudos demonstrarem que os ácidos sintéticos, principalmente o EDTA, apresentam alta eficiência de translocação dos metais para a parte aérea. Isso se deve a baixa produção de raízes (Quadro 2), o que diminui a absorção dos metais.

O sucesso da remoção de metais em solos contaminados deve ser visto como uma combinação de concentrações de metais suficientemente altos na parte aérea e

alta produção de biomassa, ao invés de apenas um destes fatores isoladamente (Nascimento et al., 2006). Portanto, a eficiência de cada espécie em retirar os metais pesados do solo pode ser avaliada pela remoção líquida dos metais.

Apesar do milho apresentar eficiência em concentrar metais pesados na parte aérea, os resultados mostram que a mais alta produção de biomassa da mucuna compensou a baixa concentração de Zn na parte aérea desta espécie, resultando em maior remoção deste metal do solo comparativamente ao milho (Figura 4).

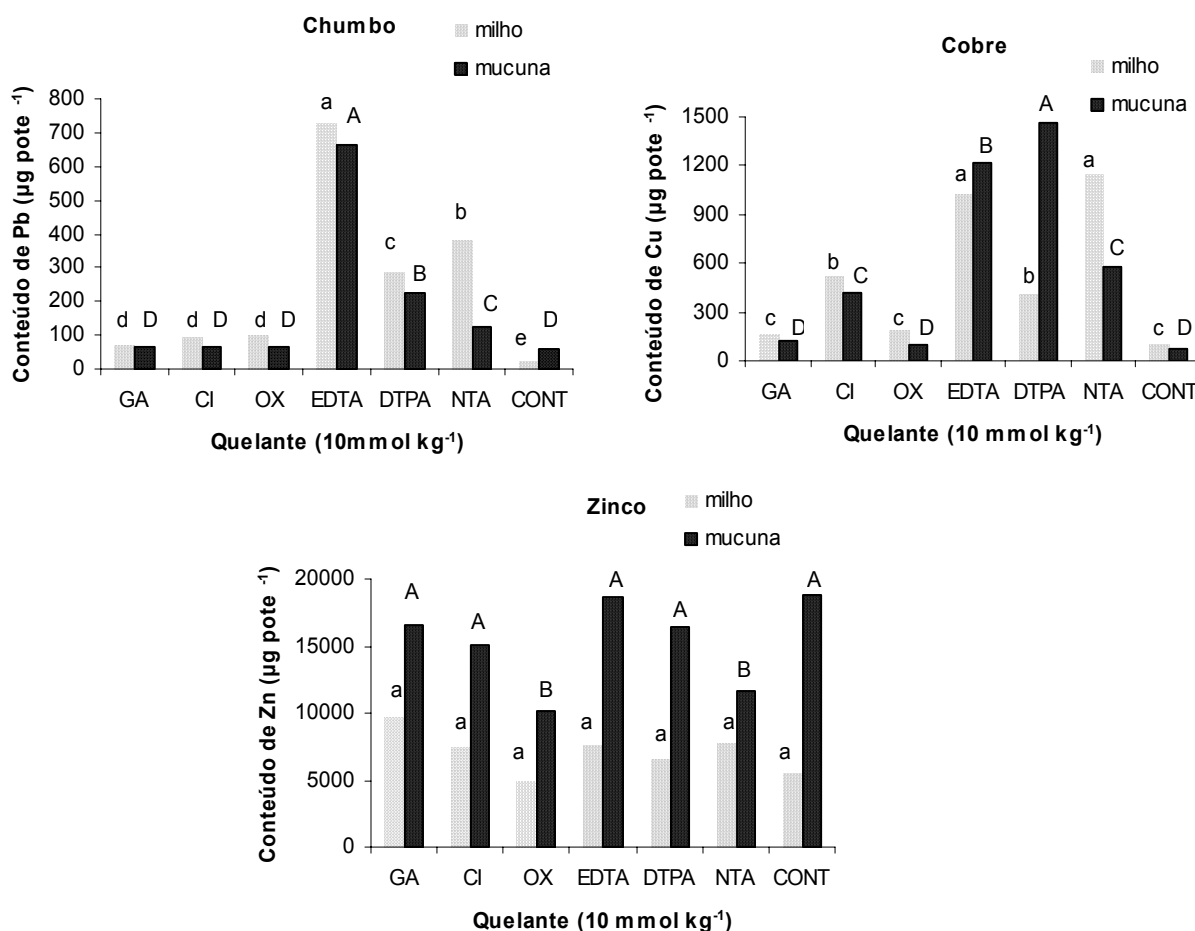


Figura 4. Remoção de Pb, Cu e Zn pela parte aérea do milho e da mucuna preta ($\mu\text{g pot}^{-1}$) em solo tratado com 10mmol kg^{-1} de quelantes. As letras minúsculas comparam os tratamentos no milho e as maiúsculas, os tratamentos na mucuna preta. Letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

A remoção de Pb e Cu no solo após a aplicação do EDTA, DTPA e NTA foi eficiente para ambas as plantas. No entanto, para o elemento Zn nenhum dos quelantes apresentou indução significativa para remoção deste metal do solo quando comparado com o controle. Isto se deve, possivelmente, a mais alta

disponibilidade no solo e maior translocação na planta deste metal em relação a Pb e Cu.

Os ácidos orgânicos não apresentaram resultado significativo para a remoção do Pb e Cu do solo pelas plantas (Figura 5). Apenas o ácido cítrico foi eficiente na remoção do Cu do solo quando comparado com o controle, corroborando os resultados encontrados por Nascimento et al. (2006) e a potencialidade deste quelante para futuros estudos sobre fitoextração de cobre.

3.4 Efeitos dos quelantes na disponibilidade e nas frações do solo

Os teores de Pb, Cu e Zn disponíveis extraídos por CaCl_2 aumentaram com a aplicação dos ácidos sintéticos no solo (Quadro 5). Esse resultado não foi verificado para os ácidos orgânicos provavelmente porque os metais inicialmente solúveis sofreram re-precipitação e/ou re-adsorção pelo solo devido à rápida biodegradação de tais compostos devido ao longo período entre o final do experimento até a obtenção da amostra para a realização da extração. Como observado em outros trabalhos (Blaylock et al. 1997; Wu et al. 1999), apenas agentes quelantes sintéticos solubilizaram Pb em quantidade suficiente para ser acessado pelo cloreto de cálcio (Quadro 5).

Quadro 5. Teores de metais extraído por CaCl_2 em solo contaminado após aplicação de 10 mmol kg^{-1} de agentes quelantes orgânicos (gálico, cítrico e oxálico) e sintéticos (EDTA, DTPA e NTA)

Metal	Controle	Gálico	Cítrico	Oxálico	EDTA	DTPA	NTA
	-----mg dm ⁻³ -----						
Pb	0,0d	0,0d	0,0d	0,0d	24,8a	7,3b	5,5c
Cu	3,5b	1,7b	1,5b	3,7b	54,2 a	57,4a	55,5a
Zn	74,1c	79,5c	72,5c	58,0d	85,51b	106,5a	87,2b

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott com $P < 0,05$).

A alta e significativa correlação entre os teores de metais extraídos por CaCl_2 e a solução do solo para as duas coletas indica que o extrator é eficiente em simular as concentrações de metais que estão disponíveis para serem absorvidos pela planta (Quadro 6), corroborando Pueyo et al. (2004), que utilizaram três diferentes extratores (CaCl_2 , NaNO_3 , NH_4NO_3) para determinar a mobilidade dos metais traços (Cd, Pb, Cu e Zn) no solo contaminado, dos quais, o CaCl_2 foi o método mais

apropriado para avaliar a biodisponibilidade destes metais. Além disso, este resultado indica que a solução de CaCl_2 pode ser útil, alternativamente aos amostradores de solução de custo elevado como o utilizado neste trabalho, para estimativa da concentração de metais na solução do solo.

Quadro 6. Correlações de Pearson entre o disponível e as frações do solo (mg dm^{-3}) com a solução do solo (mg L^{-1}) coletada no 1° e 7° dia após a aplicação de quelantes ao solo

	CaCl_2	Tr	MO	OxFeA	OxFeC
Chumbo					
CaCl_2	-	0,42*	0,44*	NS	NS
Sol. do 1° dia	0,87**	0,55**	NS	NS	NS
Sol. do 7° dia	0,86**	0,67**	NS	NS	NS
Cobre					
CaCl_2	-	0,95**	- 0,99**	- 0,82**	- 0,89**
Sol. do 1° dia	0,85**	0,74**	- 0,86**	- 0,79**	- 0,75**
Sol. do 7° dia	0,90**	0,80**	- 0,88**	- 0,75**	- 0,78**
Zinco					
CaCl_2	-	- 0,70**	- 0,84**	- 0,67**	- 0,83**
Sol. do 1° dia	0,47*	- 0,42*	- 0,40*	NS	NS
Sol. do 7° dia	0,77**	- 0,70**	- 0,80**	- 0,64**	- 0,58**

Trocável (Tr), matéria orgânica (MO), óxido de ferro amorfo (OxFeA) e óxido de ferro cristalino (OxFeC). P < 0,05; ** P < 0,01; NS – não significativo

Houve aumento significativo nos teores de Pb e Cu na fração trocável apenas com a adição de agentes quelantes sintéticos (EDTA, DTPA e NTA) (Quadro 7). No entanto, para o Zn trocável apenas o DTPA apresentou decréscimo significativo quando comparado com o controle. Este resultado indica que apenas os quelantes sintéticos são capazes de solubilizar altos teores de metais pouco solúveis, tais como Pb e Cu, por período de tempo suficiente para a absorção vegetal.

Deve-se ressaltar, no entanto, que o fracionamento das amostras de solo foi efetuado após o final do experimento (15 dias após aplicação dos quelantes). Portanto, o efeito dos ácidos orgânicos naturais sobre a solubilidade havia desaparecido, como visto na Figura 3. Isto sugere a necessidade de mais estudos sobre a cinética de solubilização e adsorção de metais em solos tratados com esses ácidos.

Quadro 7. Concentração de metal nas frações do solo (mg dm^{-3}): trocável (Tr), matéria orgânica (MO), óxido de ferro amorfo (OxFeA) e óxido de ferro cristalino (OxFeC) com 10 mmol kg^{-1} de quelantes

Fração	Controle	Gálico	Cítrico	Oxálico	EDTA	DTPA	NTA
Chumbo							
Tr	7,3c	9,7c	8,4c	5,9c	12,3b	16,1a	16,5a
MO	68,2c	79,2c	126,9b	182,0a	185,7a	106,7b	53,5c
OxFeA	8,6a	12,7a	3,9a	7,5a	13,2a	3,8a	3,3a
OxFeC	4,4b	6,3a	3,8b	5,6a	6,4a	4,0b	4,2b
Cobre							
Tr	10,0c	6,9e	7,0e	8,0d	14,0b	16,8a	14,6b
MO	79,6c	91,4a	80,3c	84,9b	19,2d	15,9d	14,6d
OxFeA	5,8a	2,7c	3,1c	5,2b	1,2d	1,2d	0,9d
OxFeC	4,4b	3,3d	4,0c	5,4a	2,0e	1,6f	1,6f
Zinco							
Tr	53,8c	86,3a	79,4b	78,8b	53,2c	39,8d	48,0c
MO	72,1b	98,2a	94,4a	97,7a	64,0c	26,0e	40,5d
OxFeA	1,1a	1,2a	1,4a	1,4a	0,8b	0,4b	0,3b
OxFeC	1,4b	1,2b	1,3b	1,7a	1,3b	1,0c	1,3b

Os valores com letras iguais, na linha, não diferem estatisticamente de acordo com Teste Scott-Knott com $P < 0,05$

O aumento do Pb trocável após a adição dos quelantes sintéticos foi provavelmente causado pela transferência desses metais da fração residual após a adição do EDTA (Sun et al., 2001), e no caso do Cu, além da fração residual, as frações de óxido de ferro amorfo e cristalino sofreram a ação do quelante que translocaram Cu para a fração trocável. É conhecido que o Pb forma ligações mais estáveis e o Cu, em geral, apresenta baixa solubilidade e apresenta uma alta afinidade pelos colóides do solo (Alloway, 1990).

A fração trocável apresentou altas correlações significativas positivas com o CaCl_2 e as soluções do solo para o Cu e baixas correlações para Pb (Quadro 6). No entanto, apresentou correlações negativas para o Zn.

A matéria orgânica foi a principal responsável pela retenção de Pb, Cu e Zn no solo. Os teores de Pb (exceto no tratamento com gálico), Cu (exceto no tratamento com cítrico) e de Zn ligados à fração matéria orgânica foram significativamente aumentados mediante a adição dos ácidos orgânicos (Quadro 7). Isto possivelmente se deve a esses ácidos terem se unido às substâncias húmicas em limitar as reações de precipitação de Cu e Zn no solo.

Foram observadas altas correlações inversas entre os teores de Cu e Zn ligados a matéria orgânica e a concentração desses elementos na solução (Quadro

6). Isso sugere que Cu e Zn ligados a esta fração não estão pronta e imediatamente em equilíbrio com a solução do solo. Ou seja, a matéria orgânica apresenta diversos grupos com diferentes labilidades em relação a esses metais.

As frações óxido de ferro amorfo e cristalino apresentaram os menores valores de retenção de Cu e Zn (Quadro 7). Os ácidos orgânicos e os ácidos sintéticos reduziram a concentração de Cu ligado à fração óxido de ferro amorfo. Apenas os ácidos sintéticos (EDTA, DTPA e NTA) reduziram o teor de Zn. Porém, para o Pb nenhum dos quelantes apresentou eficiência significativa. Este resultado demonstra que os quelantes retiraram Cu ligado à fração óxido de ferro amorfo.

Para a fração óxido de ferro cristalino, com exceção do ácido oxálico, os ácidos adicionados ao solo apresentaram significativa redução dos teores de Cu. No entanto, os teores de Pb (exceto ácido oxálico, ácido gálico e EDTA) e de Zn (exceto ácido oxálico) não apresentaram redução quando comparado com o controle.

Não houve correlação significativa entre o extrator pelo CaCl_2 e as soluções do solo com o teor de Pb da fração óxido de ferro amorfo e cristalino (Quadro 6). Por outro lado, os teores de Cu e Zn apresentaram correlações inversas, corroborando que o extrator é muito fraco para extrair os metais dessas frações.

O resultado do fracionamento deste trabalho não coincide com a hipótese de Elliott & Shastri (1999) de que a adição de EDTA remove apenas metais pesados das frações mais lábeis do solo (trocável, matéria orgânica e associadas a carbonato) e são ineficientes na remoção de metais das frações mais estáveis (óxidos de Fe/Mn e residual).

Agentes quelantes, como EDTA e DTPA, também são utilizados como extratores para determinação de teores disponíveis de metais pesados e agem no deslocamento dos íons metálicos dos sítios de troca do solo mediante a formação de complexos solúveis que reduzem a atividade dos íons em solução. Em resposta a essa diminuição de atividade, os íons são dissolvidos de fases sólidas para manter ou repor a atividade em solução (Norvell, 1991). A utilização do EDTA como quelante favorece o aumento da concentração de metais na solução do solo devido à alta capacidade do quelante em formar complexos com metais lábeis e a extração de formas não disponíveis dos metais inclusive pela dissolução de óxidos de ferro.

4. CONCLUSÕES

O EDTA, DTPA e NTA foram eficientes na solubilização dos metais pesados no solo.

Entre os ácidos orgânicos, apenas o ácido cítrico demonstrou eficiência na solubilidade dos metais nas primeiras vinte quatro horas após a sua aplicação.

Devido à baixa produção de biomassa nas espécies estudada oriunda da alta concentração de Pb, Cu e Zn no solo, nenhum quelante foi eficiente na fitoextração induzida de metais pesados no solo.

O CaCl_2 utilizado como extrator apresentou elevada correlação com a solução do solo para as duas coletas, estimando de forma significativa os teores lábeis dos metais estudados.

As concentrações dos metais apresentaram uma variação entre as frações, sendo associado na seguinte ordem o Pb: MO > OxFeA > Tr > OxFeC; o Cu: MO > Tr > OxFeC > OxFeA; e o Zn: MO > Tr > OxFeC > OxFeA.

De modo geral, a adição dos quelantes sintéticos provocou aumento nos teores trocáveis para o Pb e o Cu; e redução nas frações óxidos de ferro amorfo e cristalino para Cu e Zn.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLOWAY, B.J. The origins of heavy metals in soils. In: B. J. ALLOWAY (ed.) Heavy Metals in Soils. New York, 1990. p. 29-39.
- BAKER, A.J.M. & BROOKS, R.R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements — a review of their distribution, ecology and phytochemistry. *Biorecovery*, 1:81-126, 1989.
- BARONA, A.; ARANGUIZ, I. & ELÍAS, A. Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination: implications for the effectiveness of further clean-up procedures. *Environ. Pollut.*, 113:79–85, 2001.
- BLAYLOCK, M.J.; SALT, D.E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHAROVA, O.; GUSSMAN, C.; KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B.D. & RASKIN, I. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soilapplied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.*, 31:860–865, 1997.
- BUCHELI-WITSCHERL, M. & EGLI, T. Environment fate and microbial degradation of aminopolycarboxylic acids. *FEMS Microbiol. Rev.* 2:69-106, 2001.
- CHAO, T.T. & ZHOU, L. Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47: 224-232, 1983.
- CHANEY, R.L.; MALIK, M.; LI, Y.M.; BROWN, S.L.; BREWER, E.P.; ANGLE, J.S. & BAKER, A.J.M. Phytoremediation of soil metals. *Curr. Op. Biotechnol.*, 8:279–284, 1997.
- CHEN, H. & CUTRIGHT, T. EDTA and HEDTA effects on Cd, Cr, and Ni uptake by *Helianthus annuus*. *Chemosphere*, 45:21–28, 2001.
- CHEN, Y.X.; LIN, Q.; LUO, Y.M.; HE, Y.F.; ZHEN, S.J.; YU, Y.L.; TIAN, G.M. & WONG, M.H. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere*, 50:807-811, 2003.
- EBBS, S.D. & KOCHIAN, L.V. Phytoextraction of zinc by oat (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), and Indian mustard (*Brassica juncea*). *Environ. Sci. Technol.*, 32:802– 806, 1998.
- ELLIOTT, H. A. & SHASTRI, N. L. Extractive decontamination of metal-polluted soils using oxalate. *Water Air Soil Pollut.* 110: 335-346, 1999
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370 p.
- EVANGELOU, M.W.H.; DAGHAN, H. & SCHAEFFER, A. The influence of humic acids on the phytoextraction of cadmium from soil. *Chemosphere*, 57:207–213, 2004.

- GLASS, D.J. Economical potential of phytoremediation. In: Raskin, I., Ensley, B.D. (Eds.), *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean up the Environment*. John Wiley and Sons, New York, 2000. p. 15–31.
- GREMAN, H.; VODNIK, D.; VELIKONJA-BOLTA, S. & LESTAN, D. Ethlenediaminedisuccinate as a new chelate for environmentally safe enhanced lead phytoextraction. *J. Environ. Qual.*, 32:500-506, 2003.
- HINCK, M.L.; FERGUNSON, J. & PUHAAKAA, J. Resistance of EDTA and DTPA to aerobic biodegradation. *Water Science Technology*, 35: 25-31, 1997.
- HUANG, J.W. & CUNNINGHAM, S.D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *New Phytol.*, 134:75–84, 1996.
- HUANG, J.W.; CHEN, J.; BERTI, W.R. & CUNNINGHAM, S.D. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.*, 31:800–805, 1997.
- KRÄMER, U. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:1-9, 2005.
- KULLI, B.; BALMER, M.; KREBS, R.; LOTHENBACH, B.; GEIGER, G. & SCHULIN, R. The influence of nitrilotriacetate on heavy metal uptake of lettuce and ryegrass. *Journal of Environmental Quality*, 28:1699–1705, 1999.
- LAI, H. & CHEN, Z. Effects of EDTA on solubility of cadmium, zinc, and lead and their uptake by rainbow pink and vetiver grass. *Chemosphere*, 55:421-430, 2004.
- LASAT, M.M. Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. *Journal of Hazardous Substance Research*, 2: 1-25, 2000.
- LOMBI, E.; ZHAO, F.J.; DUNHAM, S.J. & McGRATH, S.P. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *J. Environ. Qual.* 30:1919–1926, 2001.
- LUO, C.; SHEN, Z. & LI, X. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 59: 1-11, 2005.
- MARTELL, W.E. & SMITH, W.M. *Critical stability constants*. Vol. 1. Amino acids. Plenum Press, New York. 1974.
- MEERS, E.; HOPGOOD, M.; LESAGE, E.; VERVAEKE, P.; TACK, F. M. G. & VERLOO, M. G. Enhanced Phytoextraction In: *Search of EDTA Alternatives*. *International Journal of Phytoremediation*, 6(2): 95–109, 2004.
- MULLIGAN, C.N.; YONG, R.N. & GIBBS, B.F. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Eng. Geol.*, 60:193–207, 2001.

- NASCIMENTO, C.W.A; AMARASIRIWARDENA, D. & XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environ. Pollut.*, 140:114-123, 2006.
- NORVELL, W.A. Reactions of metal chelates in soils and nutrient solutions. In: MORTVEDT, J.J.; COX, F.R.; SHUMAN, L.M. & WELCH, R.M., Eds. *Micronutrients in agriculture*, Madison, SSSA, 1991. p. 187-228.
- NOVOZAMSKY, I.; LEXMOND, T.M. & HOUBA, V.J.G. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 51: 47-58, 1993.
- OLIVEIRA, M. F. G.; NOVAIS, R. F.; NEVES, J. C. L.; VASCONCELOS, C. A. & ALVES, J. C. L. Relação entre o zinco “disponível”, por diferentes extratores, e as frações de zinco em amostras de solos. *R. Bras. Ci. Solo*, 23: 827-836, 1999.
- PUEYO, M.; RAURET, G.; LUCK, D.; YLI-HALLA, M.; MUNTAU, H.; QUEVAUVILLE, P.H. & LOPEZ-SANCHEZ, J.F. Assessment of CaCl_2 , $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ and NaNO_3 extraction procedures for the study of Cd, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Anal. Chim. Acta.*, 504:217– 226, 2004.
- QUARTACCI, M.F.; BAKER, A.J.M. & NAVARI-IZZO, F. Nitriolotriacetate- and citric acid-assisted phytoextraction of cadmium by Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czernj, Brassicaceae). *Chemosphere*, 59:1249-1255, 2005.
- SATROUTDINOV, A.D.; DEDYUKHINA, E.G.; CHISTYAKOVA, T.I.; WITSCHHEL, M.; MINKEVICH, I.G.; EROSHIN, V.K. & EGLI, T. Degradation of metal-EDTA complexes by resting cells of the bacterial strain DSM 9103. *Environ. Sci. Technol.*, 34, 1715-1720, 2000.
- SUN, B.; ZHAO, F. J.; LOMBI, E. & McGRATH, S.P. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environ. Pollut.*, 113:111-120, 2001.
- SHUMAN, L.M. Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.*, 140:11-22, 1985.
- STRÖM, L.; OWEN, A.G.; GODBOLD, D.L., & JONES, D.L. Organic acid behaviour in a calcareous soil: Sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biol. Biochem.*, 33: 2125–2133, 2001.
- TURGUT, C.; PEPE, M.K. & CUTRIGHT, T.J. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environ. Pollut.*, 131:147-154, 2004.
- WENGER, K.; GUPTA, S.K.; FURRER, G. & SCHULIN, R. The role of nitriolotriacetate in copper uptake by tobacco. *Journal of Environmental Quality*, 32: 1669–1676, 2003.

WU, J.; HSU, F.C. & CUNNINGHAM, S.D. Chelate-assisted Pb phytoremediation: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environ. Sci. Technol.*, 33:1898–1904, 1999.

WU, L.H.; LUO, Y.M.; XING, X. R. & CHRISTIE, P. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 102:307-318, 2004.

Capítulo II SOLUBILIZAÇÃO E ACÚMULO DE METAIS PESADOS POR MUCUNA PRETA (*Stizolobium aterrimum*) EM SOLO TRATADO COM ÁCIDOS ORGÂNICOS

RESUMO

Fitoextração, o uso de plantas para extrair contaminantes do solo, é uma técnica promissora de recuperação de solos contaminados. Como alternativa aos quelantes sintéticos, os ácidos orgânicos naturais estão sendo propostos para fitoextração por serem rapidamente degradados no solo, evitando risco de poluição secundária. O objetivo do trabalho foi comparar a eficiência potencial de aplicações sucessivas de dois ácidos naturais biodegradáveis, o ácido cítrico e o ácido gálico, na disponibilidade, absorção e acumulação de Cd, Pb, Cu e Zn por mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*). O solo foi contaminado com Cd, Pb, Cu e Zn nas doses 20, 150, 100 e 150 mg kg⁻¹, respectivamente, e cultivados por 35 dias. Os ácidos foram aplicados de três formas: uma aplicação de 5 mmol kg⁻¹ no 28° dia de cultivo da mucuna; duas aplicações de 5 mmol kg⁻¹ no 28° e 31° dia; e três aplicações de 5 mmol kg⁻¹ no 28°, 31° e 34° dia de cultivo. As amostras de solo foram submetidas à extração química e fracionamento. O ácido cítrico foi eficiente na solubilização dos metais pesados, principalmente no tratamento com três aplicações sucessivas. O ácido gálico apresentou baixa mobilização de metais pesados no solo. Em decorrência da baixa produção de biomassa da mucuna preta, os ácidos orgânicos não foram eficientes na fitoextração induzida de metais pesados. Os metais, exceto o Pb, foram retidos principalmente nas frações trocável e matéria orgânica. De modo geral, a adição dos ácidos orgânicos provocou aumento na fração trocável e redução na fração matéria orgânica para Cd, Cu e Zn e na fração óxidos de ferro amorfo e cristalino para todos os metais.

SUMMARY

SOLUBILITY AND ACCUMULATION OF HEAVY METALS BY VELVETBEAN (*Stizolobium aterrimum*) IN A SOIL TREATED WITH ORGANIC ACIDS

Phytoextraction, the use of plants to extract contaminants from soil, is a promising approach to clean up heavy metal polluted soils. As an alternative to synthetic chelates, natural organic acids have been proposed for phytoextraction due to high biodegradability. The work was carried out to compare the effectiveness of successive applications of citric and gallic acids on the availability, uptake and accumulation of Cd, Pb, Cu, and Zn by velvetbean (*Stizolobium aterrimum*). Soil samples were applied to 20, 150, 100, and 150 mg kg⁻¹ of Cd, Pb, Cu, and Zn, respectively, and cultivated for 35 days. The organic acids were added in three ways: 5 mmol kg⁻¹ in the 28th cultivation day; two doses of 5 mmol kg⁻¹ at the 28th and 31st day; and three applications at the same rate in the 28th, 31st, and 34th day of velvetbean cultivation. Soil samples were sequentially fractioned and extracted with CaCl₂. Citric acid was effective in solubilizing the heavy metals, notably for the three-application treatment. Gallic acid was not able to significantly solubilize metals from soil. Due to the low biomass production, organic acids were not capable to hasten phytoextraction of metals. Except for Pb, the metals were mainly retained in the exchangeable and organic matter fractions. In general the organic acids application increased the concentration of Cd, Cu, and Zn in the exchangeable fraction; on the other hand, such application reduced the concentration of these metals in the organic matter and iron oxides fractions.

1. INTRODUÇÃO

A poluição ambiental por metais pesados é resultado principalmente de fontes antropogênicas como mineração, atividades industriais, aplicação de fertilizantes e pesticidas, uso de lodo de esgoto na agricultura e presença de metais pesados em tintas e outros materiais.

O excesso de metais em solos contaminados pode resultar na degradação da qualidade do solo, redução dos rendimentos das colheitas e baixa qualidade dos produtos agrícolas (McGrath, 1998; Yang, et al., 2002). Para melhor avaliar os efeitos dos metais no solo, é fundamental o conhecimento da forma química em que se encontram, sendo avaliada por meio de extrações químicas simples, que determinam teores potencialmente disponíveis dos metais no solo, e por extrações seqüenciadas, que quantificam a concentração de metais em diferentes frações do solo.

Diversos procedimentos têm sido propostos para reduzir a concentração de metais no solo. As tecnologias convencionais de descontaminação são algumas vezes muito caras para serem usadas na recuperação de áreas contaminadas. Além disso, são freqüentemente prejudiciais para as propriedades do solo. Entre as técnicas de remediação, a fitorremediação pode ser definida como utilização de plantas que removem poluentes do ambiente ou os transformam em formas menos tóxicas (Raskin et al., 1997). Nas últimas décadas, esta técnica tem despertado grande interesse por ser mais segura ambientalmente e potencialmente de menor custo quando comparada com as técnicas de remediação tradicionais (Glick, 2003; Pulford & Watson, 2003). Entre as técnicas de fitorremediação, a fitoextração utiliza plantas para transportar metais do solo pelas raízes e concentrar na parte aérea.

O sucesso da aplicação de plantas na remediação de solos contaminados depende do fenótipo e genótipo das plantas, mas as interações entre os compostos orgânicos da rizosfera e os metais pesados também são de grande importância devido à baixa solubilidade e disponibilidade dos metais, devido a forte fixação dos metais pesados pela matéria orgânica, óxidos e argila do solo (Chen et al., 2003).

Existem duas estratégias básicas para fitoextração de metais pesados. A primeira é o uso de plantas hiperacumuladoras, que têm a capacidade de acumular naturalmente altas concentrações de metais pesados; a segunda é a fitoextração quimicamente induzida (Salt et al., 1998). Na fitoextração induzida, agentes

quelantes como EDTA, CDTA, EGTA e EDDHA têm sido utilizados para mobilizar metais da matriz para a solução do solo e facilitar o transporte pelo xilema, aumentando a translocação desses metais da raiz para a parte aérea em plantas com rápido crescimento e alta produção de biomassa (Blaylock et al., 1997; Huang et al., 1997; Copper et al., 1999; Wu et al., 1999; Shen et al., 2002). Porém, as aplicações desses quelantes apresentam risco potencial de poluição da água por descontrolada solubilização e lixiviação de metais (Shen et al., 2002).

A mobilização de metais pesados no solo não depende apenas das propriedades do solo e da irrigação, mas também do equilíbrio entre a quantidade de metais solúveis e a sua absorção pelas plantas (Shen et al. 2002). Para evitar a lixiviação de metais mediante a adição de quelantes, a quantidade, o tempo, e método de aplicação de quelantes devem ser cuidadosamente controlados.

Devido aos riscos de poluição, quelantes sintéticos não são indicados para a fitoextração quimicamente induzida de alguns metais. Ácidos orgânicos naturais podem ser secretados pelas raízes das plantas e aumentar a biodisponibilidade por acidificar o meio ou por formação de complexos com os íons metálicos (Garbisu & Alkorta, 2001). No entanto, a taxa de mineralização dos ácidos pode ser afetada por vários fatores, como a facilidade de decomposição, a formação de complexos organometálicos, as reações de adsorção à superfície dos minerais (Van Heers et al., 2002).

O ácido cítrico é um ácido orgânico tricarboxílico que pode ser utilizado como agente quelante natural, capaz de solubilizar componentes minerais do solo, tais como metais pesados (Wasay et al., 1998). O ácido gálico ($C_6H_2(OH)_3COOH$) é um composto orgânico ativo amplamente encontrado em plantas (Lee et al., 2000), com forte propriedade quelante e de elevada capacidade para formar complexos estáveis (Sroka et al., 1994; Li et al., 2000).

Segundo Chen et al. (2003), o ácido cítrico reduziu a toxicidade de Cd em rabanete, e estimulou a translocação das raízes até a parte aérea, convertendo o metal em formas mais fáceis de serem transportadas. O ácido cítrico e o ácido gálico foram capazes de aumentar a remoção de Cd, Zn, Cu e Ni em solo contaminado sem risco de lixiviação desses metais (Nascimento et al., 2006).

Ström et al. (2001) relataram que após 24 horas, aproximadamente um terço do ácido cítrico foi mineralizado no solo. Apesar de não existir dados disponíveis, o ácido gálico provavelmente tem menor degradabilidade devido ao seu caráter

aromático, sendo assim mais resistente à mineralização (Nascimento et al., 2006). Devido à rápida degradação dos quelantes naturais por microrganismos, aplicações sucessivas dos ácidos orgânicos podem melhorar a eficiência da solubilidade e acumulação de metais pesados em plantas com alta produção de biomassa quando comparadas com uma única aplicação.

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi comparar a eficiência potencial de aplicações sucessivas de dois ácidos naturais biodegradáveis, o ácido cítrico e o ácido gálico, na disponibilidade, absorção e acumulação de Cd, Pb, Cu e Zn por mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta, caracterização e preparação do solo

O solo utilizado no experimento, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, foi obtido da camada subsuperficial (30 a 60 cm) no Campus da UFRPE. Amostras do solo (TFSA) foram utilizadas para a caracterização química e física (Quadro 1), conforme EMBRAPA (1999).

Quadro 1. Características químicas e físicas do solo utilizado no experimento

Características	Valor
pH (água 1:2,5)	4,3
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,82
Ca (cmol _c dm ⁻³)	0,55
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,50
P (mg dm ⁻³)	12,00
K (cmol _c dm ⁻³)	0,05
Na (cmol _c dm ⁻³)	0,14
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	4,95
N (g kg ⁻¹)	0,5
C.O. (g kg ⁻¹)	4,5
C/N	9,1
Fe (mg dm ⁻³)	99
Cu (mg dm ⁻³)	< LD
Zn (mg dm ⁻³)	1,45
Mn (mg dm ⁻³)	1,48
Cd (mg dm ⁻³)	< LD
Pb (mg dm ⁻³)	< LD
Areia (g kg ⁻¹)	566
Silte (g kg ⁻¹)	48
Argila (g kg ⁻¹)	386

< LD – abaixo do limite de detecção

O solo seco ao ar, destorroado e homogeneizado foi passado em peneira de 4 mm de abertura de malha. A acidez foi corrigida para pH na faixa de 6,5 – 7,0, utilizando-se carbonato de cálcio e magnésio (na proporção molar de 3:1), em

quantidades previamente definidas em ensaios de incubação. Para simular a contaminação com metais pesados, foram acrescentadas em sacos plásticos contendo 1 kg de solo, soluções preparadas com CdCl_2 , PbCl_2 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$ e ZnCl_2 , de modo a elevar a concentração de metais no solo para 20, 150, 100 e 150 mg kg^{-1} de Cd, Pb, Cu e Zn, respectivamente. Após a adição das soluções, as amostras de solo permaneceram incubadas durante 30 dias, com umidade mantida em 80 % da capacidade de campo.

2.2. Condução do experimento em casa de vegetação

Após o período de incubação, uma solução nutritiva foi aplicada para o fornecimento de nutrientes às plantas, fornecendo: 250, 240, 150 e 100 mg kg^{-1} de N, P, K e S, respectivamente, a partir de NH_4SO_2 , $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e KNO_3 ; e os micronutrientes Fe ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Mn ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), B (H_3BO_3) e Mo ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) foram aplicados em concentrações de 2, 4, 1 e 0,2 mg kg^{-1} , respectivamente (Nascimento et al., 2006). As amostras foram transferidas para vasos com capacidade de 1 kg nos quais foi semeado Mucuna Preta (*Stizolobium aterrimum*), deixando-se, após o desbaste, duas plantas por vaso, as quais foram cultivadas por 35 dias. Durante o ensaio, as amostras foram mantidas com 80% da capacidade máxima de retenção de água, mediante pesagem e irrigação diárias para complementação da água perdida por evapotranspiração.

O experimento foi constituído por dois ácidos orgânicos naturais, ácido cítrico e ácido gálico, em três formas de aplicação: o primeiro constou de uma aplicação de 5 mmol kg^{-1} no 28° dia de cultivo da mucuna; o segundo, de duas aplicações de 5 mmol kg^{-1} no 28° e 31° dia; e o terceiro, de três aplicações de 5 mmol kg^{-1} no 28°, 31° e 34° dia de cultivo. Um controle (solo contaminado sem a adição de ácido) e uma testemunha (vaso com solo não contaminado e sem a adição de ácido) foram usados para avaliar o efeito dos metais e dos ácidos na produção da matéria seca das plantas.

2.3. Solubilidade dos metais no solo

A avaliação dos efeitos dos ácidos orgânicos na solubilização dos metais foi realizada a partir de três coletas da solução obtida por amostrador de solução do solo (Rhizon[®], SMS: Eijkelkamp, The Netherlands), colocado no centro de cada pote (Figura 1). As amostras da solução foram feitas por pressão de sucção utilizando

seringas no 29°, 32° e 35° dia. Após a quantificação dos metais pesados em cada coleta, foi feito o somatório dos resultados das concentrações de Cd, Pb, Cu e Zn na solução do solo.



Figura1. Coletor de solução do solo

2.4. Coletas das plantas e análise dos metais pesados Cd, Pb, Cu e Zn

Após a última coleta da solução, foram coletadas as raízes e a parte aérea das plantas. As raízes foram lavadas abundantemente em água de torneira e depois passada água destilada. Em seguida, juntamente com a parte aérea, foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 70° C até atingir o peso constante. Foram obtidas as massas da matéria seca da parte aérea e da raiz, as quais, e em seguida, foram trituradas em moinho tipo Wiley e submetidos à digestão nitro-perclórica (EMBRAPA, 1999) para quantificação de metais pesados.

De posse da matéria seca da parte aérea e da raiz e da concentração dos metais pesados, foi estimado ainda, o conteúdo desses elementos nas diferentes partes dos vegetais, assim como a remoção desses elementos da seguinte maneira:

$$\text{Remoção} = \text{PA} \times \text{MS}$$

PA = Concentração na parte aérea

MS = Produção de matéria seca

2.5 Extração dos metais pesados Pb, Cu e Zn do solo

As amostras do solo foram secas, homogeneizadas e passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha. Sub-amostras do solo foram coletadas para determinação dos teores disponíveis dos metais (Pb, Cu e Zn) por cloreto de cálcio. Este extrator foi escolhido devido a sua capacidade para extração de metais apenas da fase prontamente disponível.

Para essa extração foi utilizada uma solução contendo 10 mmol L⁻¹, na relação solo:solução de 1:10, agitada por 2 horas, em um tubo de centrífuga com capacidade para 50 mL. Em seguida, amostra foi centrifugada por 10 minutos a 1600 x g, o sobrenadante filtrado (Novozamsky et al., 1993).

2.6 Fracionamento do solo

A extração seqüencial foi baseada no método de Shuman (1985), com exceção da fração óxido de ferro amorfo que foi obtida pelo método de Chao & Zhou (1983). Esse fracionamento separa os metais nas frações trocável, ligados à matéria orgânica, óxido de ferro amorfo e óxido de ferro cristalino, como descrito abaixo:

Fração Trocável (Tr) – Cinco gramas de TFSA e 20 mL de Mg(NO₃)₂ 1 mol L⁻¹ foram agitados por duas horas em um tubo de centrífuga com capacidade para 50 mL. Em seguida, amostra foi centrifugada, o sobrenadante filtrado e 20 mL de água destilada adicionada ao tubo. A amostra sofreu outra agitação, por 3 min, e foi centrifugada e filtrada. Os dois sobrenadantes foram combinados para análise.

Fração Matéria Orgânica (MO) – Dez mililitros de NaClO 5-6 dag L⁻¹, pH 8,5 (ajustado imediatamente antes do uso em decorrência da sua alta instabilidade em relação ao pH), foram adicionados ao tubo de centrífuga e a amostra aquecida em banho-maria a 100° C, durante 30 min, ocasionalmente agitada. Em seguida, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante filtrado. Esse procedimento foi repetido duas vezes e os três filtrados combinados. Após adição de 10 mL de água destilada, a amostra no tubo de centrífuga foi agitada por 3 min, centrifugada, filtrada e o filtrado adicionado ao extrato de NaClO das extrações anteriores.

Fração Óxido de ferro amorfo (OxFeA) – Trinta mililitros de NH₂OH.HCl 0,25 mol L⁻¹ + HCl 0.25 mol L⁻¹ pH 3,0 foram adicionados à amostra no tubo de centrífuga, seguindo-se agitação por 30 min. As amostras foram centrifugadas, filtradas e lavadas como na extração anterior.

Fração Óxido de ferro cristalino (OxFeC) – Trinta mililitros de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,2 mol L^{-1} + $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,2 mol L^{-1} + ácido ascórbico 0,01 mol L^{-1} , pH 3,0, foram colocados em contato com a amostra de solo no tubo de centrifuga e aquecido por 30 minutos a 100° C em banho-maria, sendo ocasionalmente agitados. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação e à filtração.

2.5. Delineamento experimental e análises estatísticas

O ensaio foi montado em um delineamento blocos casualizados em esquema fatorial utilizando-se dois ácidos orgânicos e três aplicações seqüenciais, acrescidos de tratamento controle e testemunha, com 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e teste de média (Scott Knott a 5%) utilizando o software SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética) da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de matéria seca

A produção de matéria seca foi significativamente menor no tratamento controle (sem adição de ácido) comparativamente àquela obtida no solo não contaminado. A fitotoxicidade dos metais provocou redução de 79 % no desenvolvimento radicular e de 86 % na parte aérea da mucuna preta.

Para a produção de matéria seca da raiz o primeiro e o segundo tratamentos com ácido gálico foram estatisticamente diferentes do controle, apresentando maior produção de biomassa radicular do que os demais tratamentos (Quadro 2). Com relação à parte aérea, o terceiro tratamento com o ácido gálico apresentou redução de 17% na produção de biomassa em relação ao controle, enquanto esse aparente efeito tóxico cumulativo não foi observado para o ácido cítrico. Isto corrobora os resultados apresentados por Luo et al. (2005), onde a aplicação de ácido cítrico não reduziu a produção de matéria seca da parte aérea do milho e do feijoeiro.

Quadro 2. Matéria seca da raiz e parte aérea (g pote^{-1}) de mucuna preta submetida a 1, 2 e 3 aplicações de 5 mmol kg^{-1} de ácido cítrico e gálico em solo multi-contaminado

Testemunha	Controle	Ácido Cítrico			Ácido Gálico		
		1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.	1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.
Raiz							
3,41a	0,69c	0,66c	0,61c	0,67c	0,81b	0,81b	0,57c
Parte Aérea							
10,47a	1,42b	1,37b	1,50b	1,48b	1,56b	1,50b	0,99c

Médias seguidas de letras iguais, na linha, não diferem estatisticamente (Scott-Knott com $P < 0,05$).

Tal como observado no capítulo 1, sintomas de toxicidade como clorose e necrose foram observados durante o crescimento das plantas em todos os tratamentos com o solo contaminado, mesmo antes da aplicação dos quelantes (Figura 2).

Os resultados demonstram que os tratamentos com ácido cítrico apresentaram provavelmente baixa fitotoxicidade, devido não se observar redução de biomassa da parte aérea quando comparada com o controle, podendo assim ser utilizado em aplicações sucessivas. O ácido gálico, por outro lado, pode ser utilizado em até duas aplicações de 5 mmol kg^{-1} sem apresentar redução na produção de matéria seca da parte aérea.

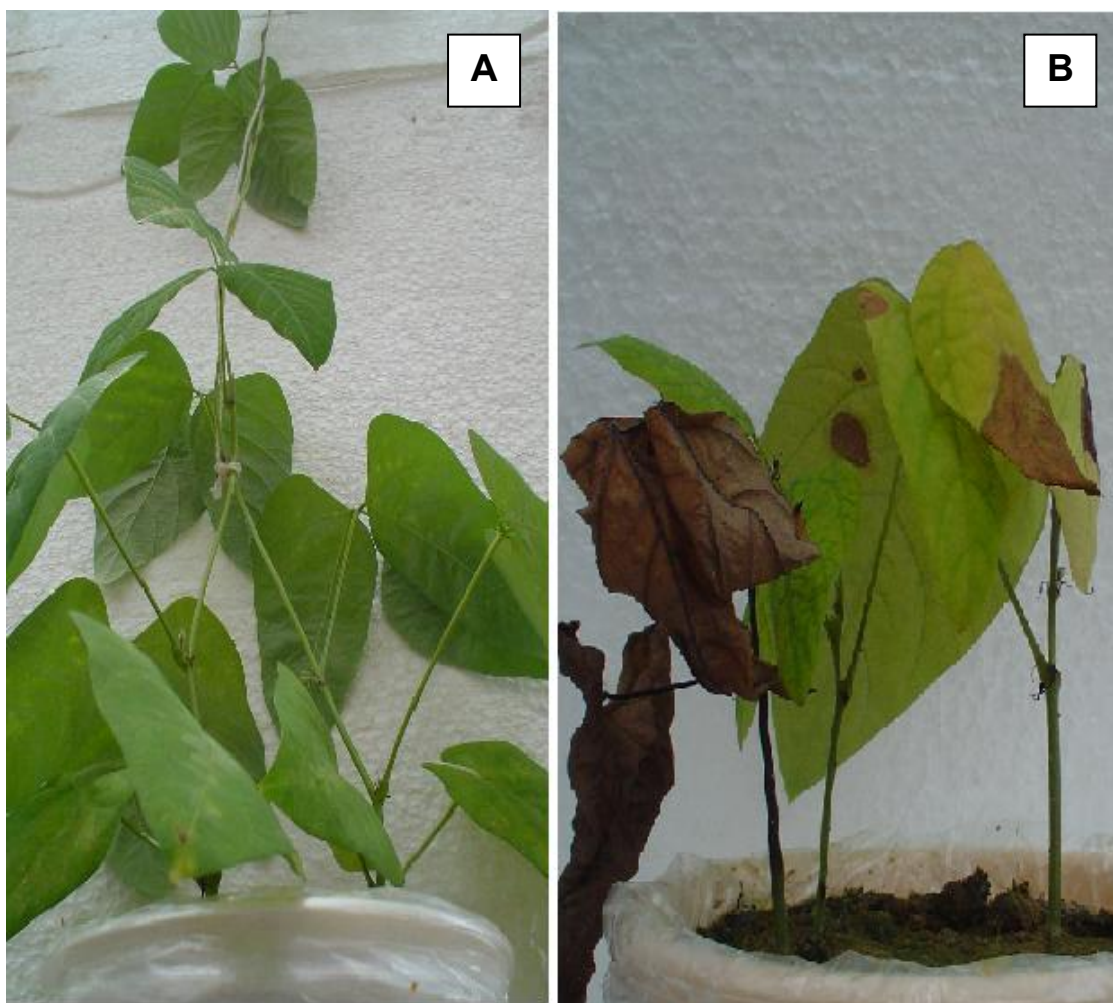


Figura 2. Plantas de mucuna, A - testemunha (sem aplicação de metais ou ácidos) e B - controle (sem adição de ácidos). Foto obtida no 28º dia de cultivo

3.2 Efeito dos ácidos orgânicos na solubilização dos metais no solo

Os ácidos cítrico e gálico aumentaram significativamente a concentração de metais na solução do solo (Figura 3). Devido provavelmente a sua menor solubilidade, o ácido gálico apresentou menor solubilização de metais pesados no solo em relação ao ácido cítrico.

Os resultados indicam que as concentrações de Cd, Zn e especialmente Pb e Cu na solução do solo aumentaram significativa e linearmente após as aplicações sucessivas de ácido cítrico (Figura 3). Nascimento et al. (2006), relataram que o ácido cítrico aumentou a solubilidade de Zn, Cu e Ni, em relação aos ácidos aromáticos vanílico e gálico.

Podemos observar que nos tratamentos onde não ocorreram sucessivas aplicações houve menor solubilização dos metais pesados (Figura 3), especialmente

para o ácido cítrico. Isto se deve, provavelmente, à rápida biodegradação de ácidos orgânicos naturais em solos. Este resultado indica que aplicações sucessivas de ácido cítrico podem sobrepujar o efeito negativo de sua rápida degradação sobre a eficiência da fitoextração.

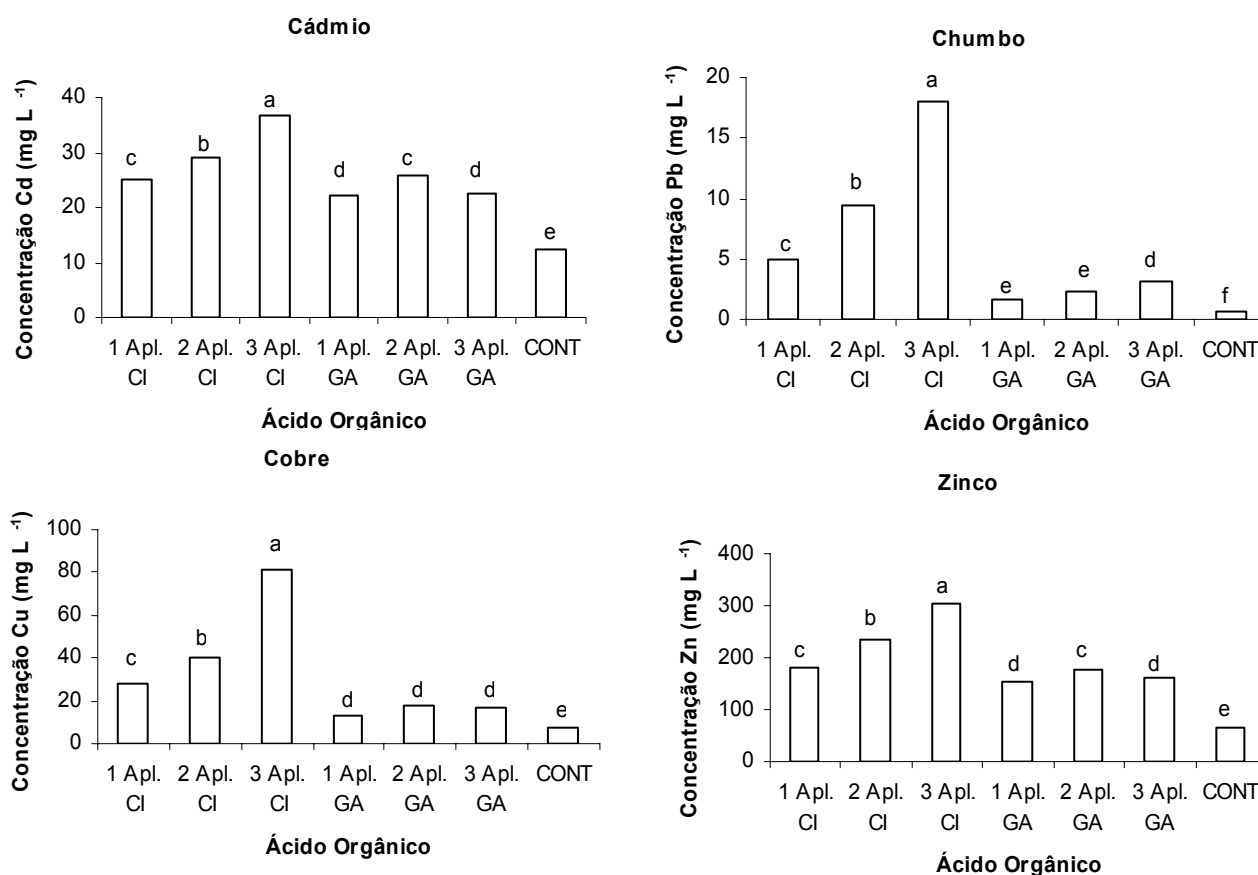


Figura 3. Efeitos dos agentes quelantes na concentração de Cd, Pb, Cu e Zn na solução do solo coletados após as aplicações dos quelantes (29°, 32° e 35° dia) de cultivo. GA, ácido gálico; CI, ácido cítrico; CONT, controle. As letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott com $P < 0,05$).

O ácido cítrico apresentou no tratamento com 3 aplicações a maior concentração de Cd na solução ($36,90 \text{ mg L}^{-1}$), e o mínimo de 25 mg L^{-1} para 1 aplicação, ou seja, aumento de 32% entre esses tratamentos (Figura 3). No entanto, o menor valor observado no ácido cítrico não apresentou diferença para a maior concentração de Cd ($25,92 \text{ mg L}^{-1}$) após a adição do ácido gálico. Este resultado demonstra que o uso do ácido cítrico pode ser vantajoso em solos com alta concentração de Cd, devido sua eficiência em solubilizar o elemento e a rápida degradação do composto. Chen et al. (2003), relataram que a adição de ácido cítrico

reduziu a adsorção de Cd e Pb no solo, tal efeito foi maior para Cd do que para Pb e pode explicar o resultado obtido neste trabalho.

A concentração de Pb na solução do solo aumentou 97 e 81% após 3 aplicações de ácido cítrico e ácido gálico, respectivamente quando comparado ao controle (Figura 3). Nos tratamentos com ácido cítrico, a menor concentração de Pb observada foi de 5 mg L⁻¹ e, a máxima, de 18 mg L⁻¹, aumento de 72% em 6 dias. Para o ácido gálico, a maior (3,15 mg L⁻¹) e a menor (1,7 mg L⁻¹) representaram redução de 46% em 6 dias

As três formas de aplicação do ácido gálico não apresentaram diferença significativa entre si na concentração de Cu na solução do solo (Figura 3), mas apresentaram aumento médio de 50% quando comparadas ao controle. Para o ácido cítrico, houve diferença entre as aplicações, com o 3º tratamento foi encontrado a maior concentração de Cu (81,53 mg L⁻¹), ou seja, aumento de 90% em relação ao controle. O aumento entre tratamentos com 1 e 3 aplicações foi de 66% em 6 dias. Como foi observado também no capítulo 1 (aumento de 92% da concentração de Cu na solução do solo), o ácido cítrico demonstra ter maior eficiência na solubilização do elemento quando comparado com os ácidos gálico e oxálico. Evangelou et al. (2005), avaliando os efeitos de ácidos orgânicos de baixo peso molecular (cítrico, oxálico e tartárico) na fitoextração, observaram alta mobilidade do Cu após a aplicação dos ácidos orgânicos, especialmente o cítrico.

O menor valor encontrado para a concentração de Zn na solução do solo com ácido cítrico foi 182 mg L⁻¹, que após 3 aplicações sucessivas apresentou aumento de 67%, chegando ao valor máximo de 304 mg L⁻¹. Semelhantemente ao encontrado para Cd, a menor concentração de Zn no tratamento com ácido cítrico foi equivalente a maior concentração com ácido gálico.

Este resultado é de grande importância, devido o ácido cítrico ter demonstrado alta eficiência em solubilizar metais no solo (Figura 3), principalmente com três aplicações. A aplicação sucessiva foi uma estratégia visando atenuar os efeitos da rápida biodegradação desse ácido, possibilitando a manutenção de uma concentração constante no solo para maximizar a fitoextração.

3.3 Efeitos dos ácidos orgânicos na fitoextração de metais

As adições dos ácidos orgânicos ao solo não promoveram o aumento significativo da concentração dos metais na parte aérea (Quadro 3). De acordo com

Römken et al. (2002) isto se deve a rápida degradação microbiana do complexo citrato-metal, dentro de alguns dias após a adição ácida cítrico. No entanto, a concentração do Pb nas raízes aumentou significativamente após as adições dos ácidos provavelmente devido à baixa mobilidade desse metal no solo.

Resultado semelhante foi encontrado por Chen et al. (2003), Turgut et al. (2004), Luo et al. (2005), Meers et al. (2005), que também observaram baixa eficiência do ácido cítrico na absorção e translocação para parte aérea de metais pesados. No entanto, Nascimento et al. (2006) observou que a adição de 10 mmol kg⁻¹ do ácido cítrico foi eficiente na acumulação de Cd, Pb, Cu e Zn na parte aérea da *B. juncea*, enquanto o ácido gálico mostrou-se eficiente apenas para o Cd e Zn.

Quadro 3. Concentração de metal (µg kg⁻¹) na parte aérea e raiz, e razão entre parte aérea e raiz, na Mucuna Preta em solo após aplicações de 5 mmol kg⁻¹ dos quelantes (1, 2 e 3 aplicações).

Metal	Controle	Ácido Cítrico			Ácido Gálico		
		1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.	1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.
Parte Aérea							
Cd	82,0a	80,7a	72,7a	80,6a	72,3a	86,3a	83,0a
Pb	11,5a	14,9a	12,1a	13,9a	10,2a	11,3a	7,8a
Cu	52,2a	52,6a	49,4a	51,0a	47,5a	51,1a	50,1a
Zn	670,4a	695,6a	701,5a	715,2a	704,7a	772,3a	823,7a
Raiz							
Cd	717,9a	709,5a	674,9a	666,4a	632,8a	660,8a	677,9a
Pb	975,3c	1650,6a	1294,4b	1698,1a	1393,5b	1478,4a	1735,9a
Cu	4287,8a	5049,5a	4287,1a	4616,1a	4451,7a	4225,4a	4648,7a
Zn	3686,5a	3742,9a	3514,2a	3669,1a	3565,9a	3818,9a	3974,0a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott com P<0,05).

É importante observar que embora a solubilização dos metais pelos ácidos orgânicos, especialmente o cítrico, tenha sido considerável, a baixa produção de raízes pela mucuna devido à fitotoxicidade dos metais pode ter limitado a eficiência da fitoextração. Teoricamente, a eficiência do quelato depende da constante de estabilidade da formação do complexo metal-quelato. A constante de estabilidade do complexo Cu-citrato (log K_s = 3.7) é muito mais baixa que as constantes de estabilidade correspondente aos complexos com EDTA, DTPA, e EDDS (Martell e Smith, 2003). Segundo Römken et al. (2002), o ácido cítrico tem uma baixa afinidade química pelo Pb (log K_s = 6,5) e é facilmente biodegradável em solo, apresentando baixa eficiência em acumular Pb na parte aérea.

Porém, a comparação de dados das constantes de estabilidade precisa ser considerada com cautela. O complexo quelato-metal é controlado pela concentração de todos os metais e quelatos, pelas constantes de estabilidade de todos os complexos e pelas cinéticas de reações de coordenação. Além de, outras reações de quelato, adsorção no solo, dissolução e degradação do quelato mineral, são substancialmente afetadas pelo metal-quelato (Nowack, 2002).

Kos & Lestan (2004), relataram que aparentemente as concentrações de Cu na solução de solo, aumentadas pela adição do ácido cítrico, não foram suficientes para aumentar a acumulação pela *Brassica rapa*.

A eficiência da espécie em absorver os metais pesados do solo pode ser avaliada pela remoção líquida dos metais. Os dados da Figura 3 mostram que os ácidos orgânicos apresentaram resultado significativo para remoção de Pb, Cu e Zn, com exceção de uma aplicação do ácido cítrico na remoção do Zn. A remoção do Cd pelas plantas não apresentou eficiência após diferentes aplicações dos ácidos orgânicos quando comparada com o controle, provavelmente pela alta solubilidade desse metal no solo.

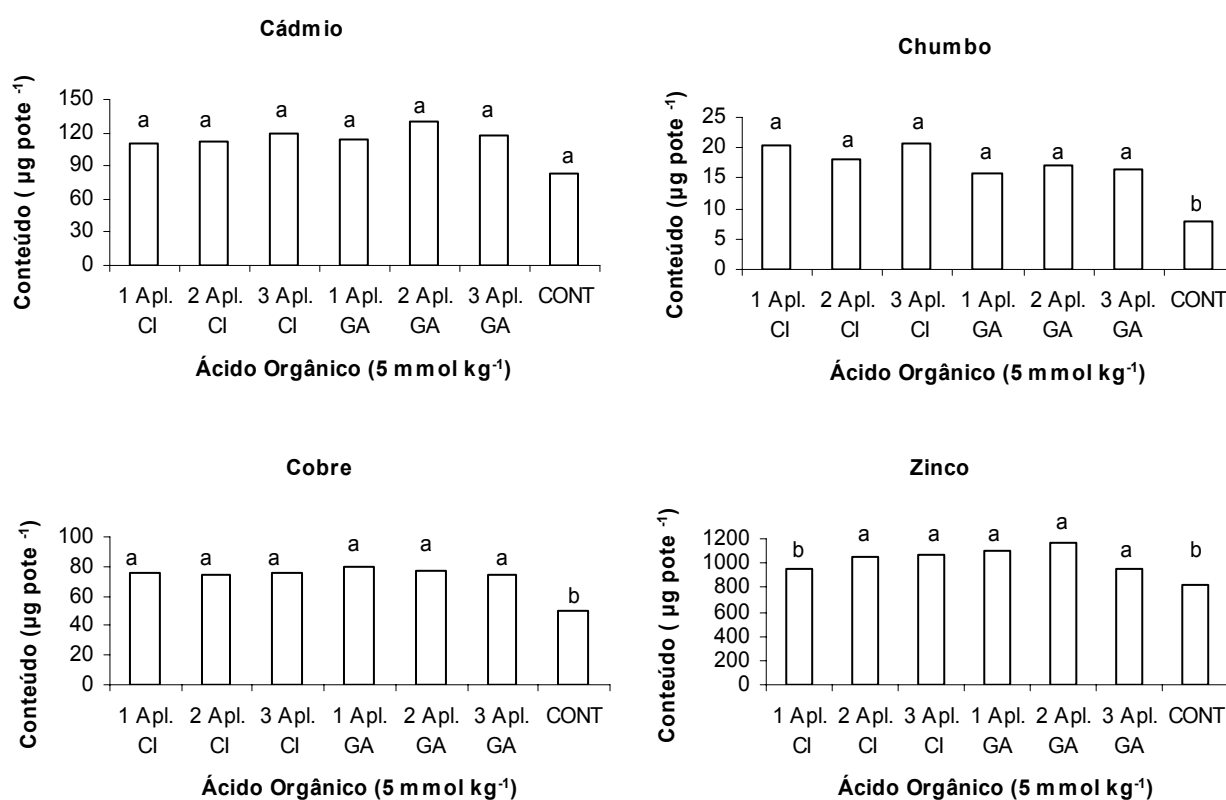


Figura 3. Remoção de Cd, Pb, Cu e Zn pela parte aérea da mucuna ($\mu\text{g pote}^{-1}$) após as diferentes aplicações 5 mmol kg^{-1} (1, 2 e 3 aplicações) dos quelantes. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

3.4 Efeitos dos ácidos orgânicos na disponibilidade e nas frações do solo

Os teores de Cd, Pb, Cu e Zn disponíveis extraídos por CaCl_2 aumentaram de acordo com aplicações sucessivas dos ácidos orgânicos no solo quando comparados com o controle (Quadro 4).

Quadro 4. Teores de metais (mg dm^{-3}) extraídos por CaCl_2 em solo contaminado após as diferentes aplicações 5 mmol kg^{-1} (1, 2 e 3 aplicações) dos quelantes.

Metal	Controle	Ácido Cítrico			Ácido Gálico		
		1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.	1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.
Cd	6,4d	6,8c	6,9c	7,6a	7,2b	7,3b	6,9c
Pb	2,4d	5,1b	4,5b	5,6a	4,0c	4,0c	4,5b
Cu	2,1d	3,0b	2,7c	3,2a	2,6b	3,3a	3,3a
Zn	13,5d	14,0c	13,0d	17,6a	15,9b	16,2b	14,7c

Os valores com letras iguais, na linha, não diferem estatisticamente de acordo com Teste Scott-Knott com $P < 0,05$

Os teores de Cd, Pb e Zn disponíveis foram maiores com 3 aplicações do ácido cítrico. No caso do Cu tanto o ácido cítrico como o gálico apresentaram valores significativamente iguais.

A baixa correlação entre os teores de metais extraídos pelo CaCl_2 e o somatório das três soluções do solo indica a influência da rápida degradação dos ácidos devido ao longo período entre o final do experimento até a obtenção da amostra para a realização da extração (Quadro 5), como foi observado também no capítulo 1.

Quadro 5. Correlações de Pearson entre o disponível e as frações do solo (mg dm^{-3}) com somatório das soluções do solo (mg L^{-1})

	CaCl_2	Tr	MO	OxFeA	OxFeC
Cádmio					
CaCl_2	-	0,58**	- 0,72**	NS	NS
Solução	0,69**	0,54**	- 0,92**	NS	0,42*
Chumbo					
CaCl_2	-	0,70**	NS	- 0,62**	NS
Solução	0,48*	0,40*	NS	- 0,37*	- 0,58**
Cobre					
CaCl_2	-	0,61**	NS	- 0,80**	- 0,84**
Solução	0,38*	NS	NS	- 0,67**	NS
Zinco					
CaCl_2	-	0,51**	- 0,77**	- 0,38*	- 0,53**
Solução	0,48*	0,53**	- 0,87**	- 0,89**	- 0,88**

Trocável (Tr), matéria orgânica (MO), óxido de ferro amorfo (OxFeA) e óxido de ferro cristalino (OxFeC). * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS – não significativo

Na fração trocável, houve aumento significativo nos teores de metais pesados com adição dos ácidos cítrico e gálico, exceto para Cu e Zn trocáveis para 1 aplicação de ácido gálico (Quadro 6). Este resultado demonstra que os ácidos foram capazes de solubilizar os metais por período de tempo suficiente para a absorção vegetal. Isto não se reverteu em eficiente fitoextração em decorrência da pequena produção de matéria seca da raiz (Quadro 2).

O fracionamento das amostras de solo foi realizado uma semana após a última aplicação dos ácidos (final do experimento). Portanto, não havia mais o efeito dos ácidos sobre a solubilidade dos metais. Isto sugere a necessidade de mais estudos sobre a cinética de solubilização e absorção de metais em solos tratados com ácidos biodegradáveis.

Quadro 6. Concentração de metal nas frações do solo (mg dm^{-3}): trocável (Tr), matéria orgânica (MO), óxido de ferro amorfo (OxFeA) e óxido de ferro cristalino (OxFeC) com 5 mmol kg^{-1} de quelantes (1, 2 e 3 aplicações)

	Controle	Ácido Cítrico			Ácido Gálico		
		1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.	1 Apl.	2 Apl.	3 Apl.
Cádmio							
Tr	1,4b	1,6a	1,6a	1,6a	1,6a	1,6a	1,4b
MO	0,6a	0,5b	0,5b	0,4c	0,5b	0,5b	0,5b
OxFeA	> LD	> LD	> LD	> LD	> LD	> LD	> LD
OxFeC	> LD	> LD	> LD	> LD	> LD	> LD	> LD
Chumbo							
Tr	0,5b	1,1a	1,0a	1,1a	1,0a	1,0a	1,1a
MO	1,3d	2,0a	1,4c	1,6b	1,4c	1,4c	1,3d
OxFeA	1,9a	1,6b	1,4b	1,5b	1,8a	1,5b	1,4b
OxFeC	2,5a	1,9c	1,8c	1,9c	2,0c	2,2b	2,2b
Cobre							
Tr	1,4c	1,7a	1,4c	1,5b	1,3c	1,5b	1,7a
MO	4,3a	4,1a	4,4a	3,8a	3,9a	4,3a	4,4a
OxFeA	1,7a	1,4c	1,4c	1,2d	1,5b	1,3d	1,4c
OxFeC	1,4a	1,2c	1,4a	1,3b	1,3b	1,2c	1,1d
Zinco							
Tr	7,7d	8,4c	8,9c	9,7b	7,7d	10,7a	8,4c
MO	65,2a	52,3c	54,37b	40,99e	54,79b	52,29c	49,77d
OxFeA	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a
OxFeC	0,3a	0,3a	0,2b	0,2b	0,3a	0,3a	0,3a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott com $P < 0,05$); LD – Limite de Detecção.

A matéria orgânica foi a principal responsável pela retenção de Cu e Zn no solo (Quadro 6). Os teores de Cd e Zn ligados à fração matéria orgânica foram significativamente reduzidos após adição dos ácidos orgânicos. No entanto, o teor

de Pb aumentou após a adição dos ácidos, diferentemente do teor de Cu que não apresentou alteração após os tratamentos. A matéria orgânica promove o deslocamento de metais de outros sítios de adsorção (McBride et al., 1997), possivelmente o Cu e o Pb foram facilmente adsorvidos nessa fração, pois esses elementos apresentam maior afinidade pela matéria orgânica.

Os teores de Cd e Zn na fração orgânica foram aparentemente remobilizados para a fração trocável (Quadro 6). A adição dos ácidos pode ter contribuído para reduzir a complexação das substâncias húmicas com os metais formando complexos solúveis, facilitando a translocação dos metais no solo.

Foram observadas altas correlações inversas entre os teores extraídos por CaCl_2 e a solução do solo para o Cd e o Zn ligados a matéria orgânica (Quadro 5). Isso sugere que o Cd e o Zn ligados a esta fração não estão em equilíbrio com a solução do solo, favorecendo formar ligações estáveis com a matéria orgânica.

As frações óxido de ferro amorfo e cristalino apresentaram os menores valores de retenção de Cd e Zn (Quadro 6), enquanto, os maiores valores de Pb e Cu foram retidos nessas frações. Segundo McBride et al. (1997), o elemento Pb apresenta afinidade por formas mais estáveis (óxidos de Fe/Mn e residual). Os ácidos orgânicos reduziram o teor de Pb e Cu ligado à fração óxido de ferro amorfo. Para a fração óxido de ferro cristalino, os ácidos adicionados apresentaram, em geral, significativa redução dos teores de Pb e Cu.

Na fração óxido de ferro amorfo houve uma correlação inversa significativa entre o CaCl_2 e a solução do solo com os teores de Pb, Cu e Zn. A fração óxido de ferro cristalino, apenas os teores de Cu e Zn apresentaram correlações inversas, indicando que o extrator é bastante fraco e não extrai metais dessas frações.

A redução das concentrações de metais nos óxidos de ferro, em resposta às doses dos ácidos orgânicos na solução do solo, indica que esses ácidos, principalmente o ácido cítrico, acarretam dissolução dos metais das estruturas cristalinas e, ou, pobremente cristalizada de minerais dos solos. Os grupos carboxílicos desses ácidos podem dissociar-se liberando facilmente prótons em ampla faixa de pH do solo, atacando os minerais do solo e promovendo sua dissolução; podendo os ânions orgânicos formar complexos solúveis com cátions metálicos (Sposito, 1989).

4. CONCLUSÕES

O ácido cítrico foi eficiente na solubilização dos metais pesados, principalmente no tratamento com três aplicações sucessivas.

O ácido gálico apresentou baixa mobilização de metais pesados no solo em relação ao ácido cítrico.

Em decorrência da baixa produção de biomassa da mucuna preta devido à toxicidade de Cd, Pb, Cu e Zn no solo, os ácidos orgânicos não foram eficientes na fitoextração induzidos de metais pesados.

Os metais pesados, exceto o Pb, foram retidos principalmente nas frações trocável e matéria orgânica.

De modo geral, a adição dos ácidos orgânicos provocou aumento na fração trocável e redução na fração matéria orgânica para Cd, Cu e Zn e na fração óxidos de ferro amorfo e cristalino para todos os metais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLAYLOCK, M.J.; SALT, D.E.; DUSHENKOV, S.; ZAKHAROVA, O.; GUSSMAN, C.; KAPULNIK, Y.; ENSLEY, B.D. & RASKIN, I. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil applied chelating agents. *Environ. Sci. Technol.*, 31:860–865, 1997.
- CHAO, T.T. & ZHOU, L. Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47: 224-232, 1983.
- CHEN, Y. X.; LIN, Q.; LUO, Y. M.; HE, Y. F.; ZHEN, S. J.; YU, Y. L.; TIAN, G. M. & WONG, M. H. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Chemosphere*, 50:807-811, 2003.
- COOPER, E. M.; SIMS, J. T.; CUNNINGHAM, S. D.; HUANG, J. W. & BERTI, W. R. Chelate-assisted phytoextraction of lead from contaminated soils. *J. Environ. Qual.*, 28:1709-1719, 1999.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 1ª ed. Brasília, 1999. 370p.
- EVANGELOU, M.W.H.; EBEL, M. & SHAEFFER, A. Evaluation of the effect of small organic acids on phytoextraction of Cu and Pb from soil with tobacco *Nicotiana tabacum*. *Chemosphere* (No prelo), 2005.
- GARBISU, C., & ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. *Bioresource Technology.*, 77:229-236, 2001.
- GLICK, B. R. Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv.*, 21:383– 393, 2003.
- HUANG, J.W.; CHEN, J.; BERTI, W.R. & CUNNINGHAM, S.D. Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction. *Environ. Sci. Technol.*, 31:800–805, 1997.
- KOS, B. & LESTAN, D. Chelator induced phytoextraction and in situ soil washing of Cu. *Environmental Pollution.*, 132: 333-339, 2004.
- LEE, M.W.; LEE, Y.A.; PARK, H.M.; TOH, S.H.; LEE, E.J.; JANG, H.D. & KIM, Y.H. Antioxidative phenolic compounds from the roots of *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. *Arch Pharm Res*, 23:455-458, 2000.
- LI, A.S.; BANDY, B.; TSANG, S.S. & DAVISON A.J. DNA-breaking versus DNA-protecting activity of four phenolic compounds in vitro. *Free Radic Res*, 33:551-566. 2000.
- LUO, C.; SHEN, Z. & LI, X. Enhanced phytoextraction of Cu, Pb, Zn and Cd with EDTA and EDDS. *Chemosphere*, 59:1-11, 2005.

- MARTELL, A.E. & SMITH, R.M. NIST Critically Selected Stability Constants of Metal Complexes, Version 7.0. NIST, Gaithersburg, 2003.
- McBRIDE, M.B.; SAUVÉ, S. & HENDERSHOT, W.H. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. *Europ. J. Soil Sci.* 48:337-346, 1997.
- McGRATH, S.P., Phytoextraction for soil reclamation. In: BROOKS, R.R. (Ed.), *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metal. Their Role in Phytoremediation. Microbiology, Archaeology, Mineral Exploration and Phytomining.* CAB International, Wallingford, 1998. p. 261–287.
- MEERS, E.; RUTTENS, A.; HOPGOOD, M.J.; SAMSON, D. & TACK, F.M.G. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Chemosphere.* 58: 1011-1022, 2005.
- NASCIMENTO, C.W.A; AMARASIRIWARDENA, D. & XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution*, 140:114-123, 2006.
- NOVOZAMSKY, I.; LEXMOND, T.M. & HOUBA, V.J.G. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 51:47-58. 1993.
- NOWACK, B. Environmental chemistry of aminopolycarboxylate chelating agents. *Environ. Sci. Technol.* 36:4009-4016, 2002.
- PULFORD I.D. & WATSON C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by tree—a review. *Environment International.* 29: 529–540, 2003.
- RASKIN, I.; SMITH, R.D. & SALT, D.E. Phytoremediation of Metals: Using Plants to Remove Pollutants from the Environment. *Current Opinion in Biology*, 8:221-226, 1997.
- RÖMKENS, P.; BOUWMAN, L.; JAPENGA, J. & DRAAISMA, C. Potentials and drawbacks of chelate-enhanced phytoremediation of soils. *Environmental Pollution*, 116:109-121, 2002.
- SALT, D.E.; SMITH, R.D. & RASKIN, I. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:643–668, 1998.
- SHEN, Z.G.; LI, X.D.; WANG, C.C.; CHEN H.M. & CHUA, H. Lead Phytoextraction from Contaminated Soil with High-Biomass Plant Species. *J. Environ. Qual.*, 31: 893-1900, 2002.
- SPOSITO, G. *The chemistry of soils.* New York, Oxford University, 1989. 277 p.
- SROKA, Z.; RZADKOWSKA-BODALSKA, H. & MAZOL, I. Antioxidative effect of extracts from *Erodium cicutarium* L. *Z Naturforsch [C]*, 49:881-884, 1994.

- SHUMAN, L.M. Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.*, 140:11-22, 1985.
- STRÖM, L.; OWEN, A.G.; GODBOLD, D.L. & JONES, D.L. Organic acid behaviour in a calcareous soil: Sorption reactions and biodegradation rates. *Soil Biol. Biochem.*, 33:2125–2133, 2001.
- TURGUT, C.; PEPE, M.K. & CUTRIGHT, T.J. The effect of EDTA and citric acid on phytoremediation of Cd, Cr, and Ni from soil using *Helianthus annuus*. *Environmental Pollution*, 131:147-154, 2004.
- VAN HEERS, P.A.W.; JONES, D.L. & GODBOLD, D.L. Biodegradation of low molecular weight organic acids in forest soils. *Soil Biol. & Biochem.*, 34:1261-1272, 2002.
- YANG, X.E.; LONG, X.X.; NI, W.Z.; HE, Z.L.; STOFFELLA, P.J. & CALVERT, D.V. Assessing copper thresholds for phytotoxicity and potential toxicity in selected crops. *J. Environ. Sci. Health B*, 37: 625–635, 2002.
- WASAY, S.A.; BARRINGTON, S. & TOKUNAGA, S. Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acid and chelating agents. *J. Environ. Technol.*, 19:369-380, 1998.
- WU, J.; HSU, F.C. & CUNNINGHAM, S.D. Chelate-assisted Pb phytoremediation: Pb availability, uptake, and translocation constraints. *Environ. Sci. Technol.*, 33:1898–1904, 1999.

Capítulo III DISPONIBILIDADE E FRACIONAMENTO DE Cd, Pb, Cu E Zn EM FUNÇÃO DO pH E TEMPO DE CONTATO COM O SOLO

RESUMO

A fitoextração tem sido proposta como uma tecnologia alternativa de remediação de solos contaminados com metais pesados. A acumulação de metais nos tecidos da parte aérea das plantas é uma condição prévia para essa técnica ser aplicável. O pH e o tempo de contato influenciam a distribuição dos metais entre frações do solo e a eficiência da fitoextração. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi estudar a disponibilidade dos metais Cd, Pb, Cu e Zn para a fitoextração, bem como suas redistribuições no solo, em função do tempo de incubação em solo com e sem calagem. O solo recebeu Cd, Pb, Cu e Zn nas doses 20, 150, 100 e 150 mg kg⁻¹, respectivamente. As amostras foram incubadas por 210, 180, 150, 120, 90, 60, 30 e 0,5 dia. Terminada a incubação, a mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*) foi cultivada por 30 dias. O EDTA (10 mmol kg⁻¹) foi aplicado 7 dias antes da coleta das plantas. As amostras de solo foram submetidas à extração química e fracionamento. A concentração de metais pesados e a calagem afetaram a produção de matéria seca da parte aérea e da raiz. Em solos sem calagem, o aumento da solubilidade dos metais aumentou a fitoextração de Cd e Zn, mesmo sem aplicação do EDTA. A aplicação do EDTA ao solo com calagem mostrou-se eficiente para a fitoextração de Pb e Cu. A calagem reduziu os teores disponíveis de Cd, Pb, Cu e Zn. A calagem provocou redução nos teores de Cd, Pb, Cu e Zn trocáveis e aumento nas frações matéria orgânica, óxidos de ferro amorfo e cristalino.

SUMMARY

AVAILABILITY AND FRACTIONATION OF Cd, Pb, Cu, AND Zn IN SOIL AS A FUNCTION OF INCUBATION TIME AND pH

Phytoextraction has been proposed as a viable technology to remediate heavy metal polluted soils. High accumulation of metals in shoots is needed to make such technique feasible. It is known that pH and incubation time influence the distribution of metals into soil fractions and therefore affect phytoextraction. Taking this in account, the objective of the work was to study the fractionation and availability of heavy metals for phytoextraction as a function of incubation period in soils with or without liming. The soil samples were applied to Cd, Pb, Cu, and Zn at concentrations of 20, 150, 100, and 150 mg kg⁻¹ respectively. The samples were kept incubated for high incubation periods: 210, 180, 150, 120, 90, 60, 30, and 0,5 day. After that, velvetbean (*Stizolobium aterrimum*) was cultivated for 30 days. EDTA at 10 mmol kg⁻¹ rate was applied 7 days before plants harvest. Soils samples were fractionated and extracted for the metals with CaCl₂ solution. The concentration of heavy metals in soil and the liming affected the dry matter production of roots and shoots. For not limed samples, the metals solubility increasing hastened the phytoextraction of Cd and Zn, even without EDTA addition. EDTA application to limed samples was effective for Pb and Cd phytoextraction. The liming reduced the available concentrations of Cd, Pb, Cu, and Zn as well as decreased the exchangeable contents of such metals. Liming also increased the Cd, Pb, Cu, and Zn concentrations in the organic matter and oxides fractions.

1. INTRODUÇÃO

A poluição do solo com metais pesados é um sério problema ambiental. Os metais acumulam em solos devido a processos como deposição atmosférica oriunda de atividades industriais, disposição de lodo de esgoto, rejeitos ou subprodutos domésticos e industriais, utilização de fertilizantes e agrotóxicos. A acumulação de metais no solo pode resultar em diminuição da atividade microbiana, da biodiversidade e da fertilidade, perdas de rendimento das colheitas e danos à saúde de seres humanos e animais pela contaminação da cadeia trófica (McLaughlin & Singh, 1999).

A determinação da concentração de metais no solo e as formas químicas nas quais esses elementos se encontram ou predominam associados provêm uma base racional para avaliar a sua disponibilidade e toxicidade potencial. O uso de técnicas de fracionamento permite deduções sobre a biodisponibilidade, mobilidade e transporte dos metais, dinâmica dos elementos-traços e transformações entre as diferentes formas químicas em solos poluídos (Miller et al., 1986; Araújo & Nascimento, 2005).

Numerosos esforços foram empreendidos no desenvolvimento de tecnologias para remediação de solos contaminados, incluindo práticas *ex situ*, como lavagens com métodos físico-químicos, e práticas *in situ*, como imobilização de poluentes metálicos. Esses métodos de remediação são geralmente muito caros e, freqüentemente, prejudiciais para as propriedades do solo (textura, matéria orgânica) e a fauna microbiana que são desejáveis para a restauração de locais contaminados. A fitorremediação de solos contaminados por metais pesados tem atraído atenção devido seu baixo custo de implementação e benefícios ambientais (Salt et al., 1998). A fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas para remover, conter, transferir, estabilizar e/ou degradar, ou tornar inofensivos os contaminantes, incluindo compostos orgânicos e metais tóxicos (Raskin & Ensley, 2000).

Entre as técnicas mais eficientes de fitorremediação, a fitoextração consiste no uso de plantas acumuladoras de poluentes para absorver, transportar e concentrar contaminantes do solo para a parte aérea (Garbisu & Alkorta, 2001). O processo de fitoextração pode ser conduzido de duas formas: contínua, onde se utilizam plantas hiperacumuladora ou induzida, na qual há indução da extração via aplicação de agentes químicos (Fitz & Wenzel, 2002). Na fitoextração induzida, o

emprego de agentes quelantes, como EDTA, HEDTA e ácido cítrico, aumentaram a mobilidade dos metais no solo e suas acumulações em plantas (Chen et al., 2003).

Outras técnicas de remediação de solo utilizam calcários, compostos orgânicos, fosfatos, óxidos de ferro e manganês para imobilizar metais pesados em solos contaminados e reduzir a concentração de metais na solução do solo, pela reação de precipitação, adsorção ou complexo como a matéria orgânica em alguns casos estudados (Kabata-Pendias & Pendias, 2001; Galindo et al., 2005). O processo de adsorção/dessorção de metais pesados é controlado pelo pH, potencial redox, força iônica, íons competidores, e pelos constituintes do solo (orgânicos e minerais), sendo a importância relativa desses fatores diferente para os diversos metais e condições físico-químicas do sistema (McBride, 1994).

A calagem é provavelmente o mais importante fator de controle da disponibilidade de metais pesados para as plantas, visto que esses elementos têm sua disponibilidade diminuída pela elevação do pH do solo. Segundo Knox et al. (2001), a aplicação de calcário em solo contaminado foi utilizado para elevar o pH do solo e reduzir a concentração do metal em forma disponível mediante a precipitação deste com o íon carbonato. Essa reação pode reduzir a biodisponibilidade de metais pesados no solo e também reduzir a absorção pela planta (Chlopecka & Adriano, 1996; Nascimento et al., 2006a).

Outro fator a ser considerado quanto à retenção de metais pesados pelos colóides é seu tempo de reação com o solo. Segundo Barrow (1993), um maior tempo de contato propicia que o Zn passe para formas mais estáveis, como óxidos cristalinos, uma vez que a reação pode continuar lentamente com a difusão dos íons adsorvidos para o interior das partículas, demonstrando a importância do tempo nas transformações do Zn adicionado aos solos. Oliveira et al. (1999) e André et al. (2003) afirmam que períodos curtos (30 dias) de incubação do solo com Zn são insuficientes para que ocorram todas as reações do solo que afetam a biodisponibilidade.

Assim, é essencial conhecer como o pH e o tempo de incubação influenciam a distribuição dos metais entre frações do solo. Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi verificar a disponibilidade dos metais Cd, Pb, Cu e Zn para a fitoextração, bem como suas redistribuições no solo, em função do tempo de incubação dos metais em solo com e sem calagem.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta, caracterização e preparação do solo

O solo utilizado no experimento, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico, foi obtido da camada subsuperficial (30 a 60 cm) no Campus da UFRPE. Amostras do solo (TFSA) foram utilizadas para a caracterização química e física (Quadro 1), conforme EMBRAPA (1999).

Quadro 1. Características físico-químicas do solo utilizado no experimento

Características	Valor
pH (água 1:2,5)	4,3
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,82
Ca (cmol _c dm ⁻³)	0,55
Mg (cmol _c dm ⁻³)	0,50
P (mg dm ⁻³)	12,00
K (cmol _c dm ⁻³)	0,05
Na (cmol _c dm ⁻³)	0,14
H+Al (cmol _c dm ⁻³)	4,95
N (g kg ⁻¹)	0,5
C.O. (g kg ⁻¹)	4,5
C/N	9,1
Fe (mg dm ⁻³)	99
Cu (mg dm ⁻³)	< LD
Zn (mg dm ⁻³)	1,45
Mn (mg dm ⁻³)	1,48
Cd (mg dm ⁻³)	< LD
Pb (mg dm ⁻³)	< LD
Areia (g kg ⁻¹)	566
Silte (g kg ⁻¹)	48
Argila (g kg ⁻¹)	386

< LD – abaixo do limite de detecção

O solo seco ao ar, destorroado e homogeneizado foi passado em peneira de 4 mm de abertura de malha. Para simular a contaminação com metais pesados, foram acrescentadas em sacos plásticos contendo 1 kg de solo, CdCl₂, PbCl₂, CuSO₄ 5(H₂O) e ZnCl₂, de modo a elevar a concentração de metais no solo para 20, 150, 100 e 150 mg kg⁻¹ de Cd, Pb, Cu e Zn, respectivamente. Após a adição das soluções, as amostras de solo permaneceram incubadas durante 210, 180, 150, 120, 90, 60, 30 e 0,5 dia mantidos a umidade em 80 % da capacidade de campo. Esses tempos de incubação foram iniciados em diferentes épocas de modo a se ter, em um mesmo dia os diferentes períodos de equilíbrio metal-solo satisfeitos.

2.2. Condução do experimento em casa de vegetação

Após o período de incubação, uma solução nutritiva foi aplicada para o fornecimento de nutrientes às plantas, fornecendo: 250, 240, 150 e 100 mg kg⁻¹ de N, P, K e S, respectivamente, a partir de NH₄SO₂, NH₄H₂PO₄ e KNO₃; e os micronutrientes Fe (FeSO₄.7H₂O), Mn (MnCl₂.4H₂O), B (H₃BO₃) e Mo (Na₂MoO₄.2H₂O) foram aplicados em concentrações de 2, 4, 1 e 0,2 mg kg⁻¹, respectivamente (Nascimento et al. 2006b). A acidez, de metade das amostras, foi corrigida para pH na faixa de 6,5 – 7,0, utilizando-se carbonato de cálcio e magnésio (na proporção molar de 3:1), em quantidades previamente definidas em ensaio de incubação. As amostras foram transferidas para vasos com capacidade de 1 kg nos quais foi semeado mucuna preta (*Stizolobium aterrimum*), deixando-se, após o desbaste, duas plantas por vaso, as quais foram cultivadas por 30 dias.

Durante o ensaio, as amostras foram mantidas com 80% da capacidade de retenção de água, mediante pesagem e irrigação diárias para complementação da água perdida por evapotranspiração. Sete dias antes da coleta do experimento foi aplicado um quelante sintético (EDTA) numa concentração de 10 mmol kg⁻¹. Os tratamentos foram constituídos por oito tempos de incubação em amostras com e sem aplicação de calagem.

2.3. Coletas das plantas e análise dos metais pesados Cd, Pb, Cu e Zn

Após a última coleta da solução, foram coletadas as raízes e a parte aérea das plantas. As raízes foram lavadas abundantemente em água de torneira e depois passada água destilada. Em seguida, juntamente com a parte aérea, foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 70° C até atingir o peso constante. Foram obtidas as massas da matéria seca da parte aérea e da raiz, as quais, e em seguida, foram trituradas em moinho tipo Wiley e submetidos à digestão nitro-perclórica (EMBRAPA, 1999) para quantificação de metais pesados.

De posse da matéria seca da parte aérea e da raiz e da concentração dos metais pesados, foi estimado ainda, o conteúdo desses elementos nas diferentes partes dos vegetais, assim como a remoção desses elementos da seguinte maneira:

$$\text{Remoção} = \text{PA} \times \text{MS}$$

$$\text{PA} = \text{Concentração na parte aérea}$$

$$\text{MS} = \text{Produção de matéria seca}$$

2.4 Extração dos metais pesados Cd, Pb, Cu e Zn do solo

As amostras do solo foram secas, homogeneizadas e passadas em peneira de 2 mm de abertura de malha. Sub-amostras do solo foram coletadas para determinação dos teores disponíveis dos metais (Cd, Pb, Cu e Zn) por cloreto de cálcio. Este extrator foi escolhido devido a sua capacidade para extração de metais apenas da fase prontamente disponível.

Para essa extração foi utilizada uma solução contendo 10 mmol L^{-1} , na relação solo:solução de 1:10, agitada por 2 horas, em um tubo de centrifuga com capacidade para 50 mL. Em seguida, amostra foi centrifugada por 10 minutos a $1600 \times g$, o sobrenadante filtrado (Novozamsky et al., 1993).

2.5 Fracionamento de metais no solo

A extração seqüencial foi baseada no método de Shuman (1985), com exceção da fração óxido de ferro amorfo que foi obtida pelo método de Chao e Zhou (1983). Esse fracionamento separa os metais nas frações trocável, ligados à matéria orgânica, óxido de ferro amorfo e óxido de ferro cristalino, como descrito abaixo:

Fração Trocável (Tr) – Cinco gramas de TFSA e 20 mL de $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 1 mol L^{-1} foram agitados por duas horas em um tubo de centrifuga com capacidade para 50 mL. Em seguida, amostra foi centrifugada, o sobrenadante filtrado e 20 mL de água destilada adicionada ao tubo. A amostra sofreu outra agitação, por 3 min, e foi centrifugada e filtrada. Os dois sobrenadantes foram combinados para análise.

Fração Matéria Orgânica (MO) – Dez mililitros de NaClO 5-6 dag L^{-1} , pH 8,5 (ajustado imediatamente antes do uso em decorrência da sua alta instabilidade em relação ao pH), foram adicionados ao tubo de centrifuga e a amostra aquecida em banho-maria a 100°C , durante 30 min, ocasionalmente agitada. Em seguida, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante filtrado. Esse procedimento foi repetido duas vezes e os três filtrados combinados. Após adição de 10 mL de água destilada, a amostra no tubo de centrifuga foi agitada por 3 min, centrifugada, filtrada e o filtrado adicionado ao extrato de NaClO das extrações anteriores.

Fração Óxido de ferro amorfo (OxFeA) – Trinta mililitros de $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$ $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ + HCl $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ pH 3,0 foram adicionados à amostra no tubo de centrifuga, seguindo-se agitação por 30 min. As amostras foram centrifugadas, filtradas e lavadas como na extração anterior.

Fração Óxido de ferro cristalino (OxFeC) – Trinta mililitros de $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,2 mol L^{-1} + $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 0,2 mol L^{-1} + ácido ascórbico 0,01 mol L^{-1} , pH 3,0, foram colocados em contato com a amostra de solo no tubo de centrifuga e aquecido por 30 minutos a 100° C em banho-maria, sendo ocasionalmente agitados. Em seguida, as amostras foram submetidas à centrifugação e à filtração.

2.6. Delineamento experimental e análises estatísticas

O ensaio foi montado em um delineamento blocos casualizados em esquema fatorial utilizando-se oito tempos em amostras com e sem aplicação de calagem, com 3 repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e a regressão. Embora não foi possível um ajuste significativo dos dados aos diferentes modelos de regressão, optou-se na realização do teste de média (Scott Knott a 5%) utilizando o software SAEG (Sistema de Análise Estatística e Genética) da Universidade Federal de Viçosa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de matéria seca

A adição de metais pesados em diferentes tempos ao solo e a aplicação de calagem influenciaram a produção de matéria seca da parte aérea e da raiz da mucuna preta (Quadro 2). A produção de matéria seca foi significativamente menor nos períodos de incubação (30 e 0,5 dia) quando comparado com 210 dias nas amostras com calagem. A fitotoxicidade dos metais provocou redução entre o primeiro e último tempo de 37 e 39% na raiz, e de 23 e 33% na parte aérea dos tratamentos sem e com calagem, respectivamente.

Sintomas de toxidez como clorose e necrose foram observados durante o crescimento das plantas em todos os tratamentos no solo contaminado (Figura 1). No solo sem calagem, em todos os tempos, foi observado morte de todas as plantas antes do 21° dia de cultivo (Figura 2). A aplicação de agente quelante (EDTA) foi realizada apenas nos tratamentos com calagem, devido a morte das plantas nos tratamentos sem calagem.

Quadro 2. Matéria seca da parte aérea e raiz (g pote^{-1}) em mucuna preta em solo contaminado sob diferentes períodos de incubação

	210 dias	180 dias	150 dias	120 dias	90 dias	60 dias	30 dias	0,5 dia
	Sem Calagem							
P. Aérea	0,83b	0,82b	0,80b	0,86b	0,88b	1,16a	0,73b	0,64b
Raiz	0,24b	0,24b	0,19b	0,22b	0,22b	0,32a	0,21b	0,15c
	Com Calagem							
P. Aérea	2,51a	2,00c	1,73d	1,97c	2,19b	2,14b	1,93c	1,69d
Raiz	0,57a	0,37c	0,43b	0,41b	0,58a	0,44b	0,44b	0,35c

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott com $P < 0,05$).

O emprego da calagem com o intuito de elevar o pH do solo, diminuiu a disponibilidade dos metais pesados, reduzindo levemente os efeitos de toxidez nas plantas, e aumentou a produção da biomassa, quando comparados aos tratamentos sem calagem. Segundo Punz & Sieghardt (1993), a variação do pH exerce importante influência, afetando não somente o suprimento de nutrientes, mas também a viabilidade das plantas.



Figura 1. Mucuna preta no 23° dia de cultivo em solo contaminado por metais pesados com calagem



Figura 2. Mucuna preta no 23° dia de cultivo em solo contaminado por metais pesados sem calagem

3.2 Efeitos do tempo de incubação e da calagem na disponibilidade e nas frações do solo

A calagem reduziu significativamente os teores de metais disponíveis extraídos por CaCl_2 no solo (Quadro 3). Em média, os teores de Cd, Pb, Cu e Zn decresceram 32, 100, 97 e 63%, respectivamente. O efeito da calagem sobre a disponibilidade dos metais catiônicos se deve, principalmente, ao aumento da capacidade de troca de cátions no solo devido à existência de cargas dependentes de pH (Alloway, 1990).

Quadro 3. Teores de metais (mg dm^{-3}) extraído por CaCl_2 em solo contaminado com metais pesados sob diferentes períodos de incubação

	210 dias	180 dias	150 dias	120 dias	90 dias	60 dias	30 dias	0,5 dia
	Sem Calagem							
Cádmio	10,2e	10,9b	12,3a	11,1b	10,6d	10,5d	10,8c	10,8c
Chumbo	19,2c	20,1c	23,7b	17,3d	15,5e	16,7d	15,9e	25,3a
Cobre	15,2c	16,3c	19,4b	16,0c	17,0c	15,9c	14,8c	24,7a
Zinco	59,3f	69,6d	78,4b	73,1c	63,8e	59,6f	58,8f	81,8a
	Com Calagem							
Cádmio	6,3f	7,1d	8,8a	7,7c	7,5c	7,4c	6,6e	8,2b
Chumbo	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a
Cobre	0,2d	0,3c	0,6b	0,5b	0,3c	0,8a	0,4c	0,9a
Zinco	23,1f	35,0e	52,6b	47,5c	42,9d	33,8e	32,1e	65,1a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

O maior tempo de contato diminuiu significativamente os teores disponíveis dos metais pesados no solo (Quadro 3). A diferença entre 0,5 e 210 dias de incubação representou decréscimos de 13, 24, 40 e 39 % nos teores disponíveis de Cd, Pb, Cu e Zn, respectivamente. Essa baixa redução do Cd evidencia o alto potencial de disponibilidade desse elemento, talvez pelo fato de ter sua adsorção ao solo reduzida provavelmente pelos outros metais que ocorre em elevadas concentrações no solo estudado.

A solução extratora CaCl_2 apresentou alta e significativa correlação com a concentração de metal na parte aérea, exceto para o Cu, e com a fração trocável (Quadro 4). No entanto, para a fração matéria orgânica, óxidos de ferro amorfo e cristalino, com exceção para o Cd, o CaCl_2 apresentou correlação inversa e significativa. Este resultado indica que o CaCl_2 foi capaz de discriminar satisfatoriamente o efeito da calagem sobre a disponibilidade dos metais no solo, principalmente o Cd e o Zn.

Nos solos sem calagem, os teores de Cd no solo foram encontrados apenas nas frações matéria orgânica e principalmente na trocável, pois os teores nos óxidos

de ferro ficaram abaixo do limite de detecção, indicando a baixa afinidade do elemento com ligações mais estáveis do solo (Quadro 5). Isto comprova a alta biodisponibilidade de Cd, provavelmente devido a sua ligação aos colóides do solo serem inibidas por outros íons metálicos, os quais possuem maior afinidade (Harter, 1991). O tempo de contato influenciou apenas o teor de Cd trocável, apresentando uma redução de 30% entre o 1° (210 dias) e o 8° tempo de incubação (0,5 dia).

Quadro 4. Correlações de Pearson entre o disponível e as frações do solo (mg dm^{-3}) e concentração de metais na parte aérea ($\mu\text{g kg}^{-1}$).

	Tr	MO	OxFeA	OxFeC	Parte aérea
Cádmio					
Disp	0,93**	- 0,91*	NS	NS	0,75**
Chumbo					
Disp	0,97**	- 0,94**	- 0,77**	- 0,30*	-0,70**
Cobre					
Disp	0,97**	- 0,96**	- 0,80**	- 0,86**	- 0,40**
Zinco					
Disp	0,81**	- 0,95**	- 0,77	- 0,79**	0,80**

Tr: fração trocável; MO: fração matéria orgânica; OxFeA: fração óxido de ferro amorfo; OxFeC: fração óxido de ferro cristalino. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; NS – não significativo.

Na presença da calagem, o Cd apresentou redução média de 60% na fração trocável resultando em um aumento de 40% na fração ligada à matéria orgânica (Quadro 6). Este resultado indica que a redução de Cd trocável foi resultado da imobilização desse elemento pela matéria orgânica. Segundo Alloway (1990), a adsorção/dessorção de Cd está relacionada principalmente ao pH, em comparação com o Cu e Pb. Neste tratamento, o tempo de incubação não apresentou diferença significativa.

O chumbo, em solo sem calagem, apresentou-se ligado às frações trocável, matéria orgânica e óxido de ferro cristalino (Quadro 5). O tempo de contato influenciou principalmente o teor de Pb na fração matéria orgânica, a qual apresentou redução de 33% entre 0,5 e 210 dias.

A aplicação de calagem resultou, em média, em redução de 71% do Pb na fração trocável, mediante a ligação com o carbonato, e um aumento de 40% na fração óxido de ferro cristalino, respectivamente (Quadro 6). A presença da matéria

orgânica promove o deslocamento de metais de outros sítios de adsorção (McBride et al., 1997), possivelmente o Pb foi facilmente adsorvido nessa fração, devido esse elemento apresentar afinidade pela matéria orgânica. O aumento do tempo de contato promoveu aumento de 61, 4, 32 e 21% de Pb nas frações trocável, matéria orgânica, óxidos de ferro amorfo e cristalino, respectivamente.

Quadro 5. Concentração de metal nas frações do solo (mg dm^{-3}) sem calagem: trocável (Tr), matéria orgânica (MO), óxido de ferro amorfo (OxFeA) e óxido de ferro cristalino (OxFeC)

	210 dias	180dias	150 dias	120 dias	90dias	60 dias	30 dias	0,5 dia
Sem Calagem								
Cádmio								
Tr	7,3a	6,5b	6,2b	6,5b	6,0c	5,3d	6,9a	5,1d
MO	3,0b	3,1b	3,1b	3,1b	3,3a	3,4a	3,2b	3,0b
OxFeA	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
OxFeC	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Chumbo								
Tr	51,1b	50,3b	53,4a	48,7c	44,6e	45,5e	46,6d	51,5b
MO	75,2a	69,6b	75,5a	66,0c	62,0d	61,4d	66,1c	50,7e
OxFeA	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
OxFeC	0,4b	1,2a	0,1c	0,5b	0,1c	0,8a	0,1c	1,0a
Cobre								
Tr	17,5e	19,4d	24,3a	20,4c	20,5c	19,2d	20,3c	21,4b
MO	37,4a	37,7a	37,9a	37,4a	35,7b	35,0b	35,6b	27,1c
OxFeA	3,7a	2,5c	3,1b	2,6c	2,4c	1,7d	2,6c	2,4c
OxFeC	0,5a	0,3c	0,4b	0,3c	0,3c	0,3c	0,4b	0,3c
Zinco								
Tr	35,7a	31,7b	32,8b	39,2a	33,2b	22,8c	39,9a	44,9a
MO	6,3a	6,1b	6,5a	6,1b	5,5c	5,2d	6,0b	4,9e
OxFeA	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a	0,1a
OxFeC	0,8b	1,0a	0,9b	0,8b	1,2a	1,2a	0,8b	1,1a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

Os teores de Cu encontrados no solo sem calagem estão ligados principalmente às frações trocável e matéria orgânica (Quadro 5). No entanto, a concentração de Cu em forma trocável foi inferior ao teor do elemento na matéria orgânica, indicando pouca afinidade dos sítios de troca catiônica pelo elemento, observado por outros autores (Atanossova & Okazaki, 1997; Nascimento et al., 2003). A matéria orgânica apresenta uma alta afinidade com o Cu, devido à formação de complexos de esfera interna com as substâncias húmicas (McBride, 1994). Em relação ao tempo de incubação, foi observado aumento de 18% da concentração de Cu na fração trocável e redução de 28, 37 e 43% na fração matéria

orgânica, óxidos de ferro amorfo e cristalino entre o maior e o menor tempo de contato.

Com a elevação do pH pela calagem, ocorreu um decréscimo médio de 71% na fração trocável e aumento de 54, 51 e 38% de Cu nas frações matéria orgânica, óxido de ferro amorfo e cristalino, respectivamente (Quadro 6). Provavelmente por um processo de adsorção específica, resultando na diminuição na disponibilidade do elemento. No entanto, o maior tempo de contato com o solo provocou redução na concentração de Cu em todas as frações, principalmente na trocável (63% entre 0,5 e 210 dias de incubação com o solo).

Quadro 6. Concentração de metal nas frações do solo (mg dm^{-3}) com calagem: trocável (Tr), matéria orgânica (MO), óxido de ferro amorfo (OxFeA) e óxido de ferro cristalino (OxFeC)

	210 dias	180dias	150 dias	120 dias	90dias	60 dias	30 dias	0,5 dia
Com Calagem								
Cádmio								
Tr	2,5c	2,6b	2,9a	2,7b	2,4c	2,2d	2,6b	2,3d
MO	5,7a	5,2b	5,4b	5,1b	5,1b	5,0b	5,0b	4,7c
OxFeA	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
OxFeC	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
Chumbo								
Tr	5,1e	16,1c	23,7a	17,0b	13,1d	15,5c	13,7d	13,0d
MO	60,2c	68,0a	63,3b	62,5b	62,5b	63,2b	63,7b	62,4b
OxFeA	1,1c	1,1c	0,6d	1,1c	0,7d	2,3a	1,3c	1,6b
OxFeC	0,5b	1,0a	1,0a	1,3a	0,1c	1,0a	1,3a	0,6b
Cobre								
Tr	2,1c	4,2b	5,6a	5,6a	5,1a	4,0b	5,0a	5,6a
MO	66,0e	75,8d	86,9a	75,7d	83,4b	74,6d	80,0c	76,4d
OxFeA	5,5a	7,0a	4,4b	6,1a	4,3b	5,2b	4,2b	6,2a
OxFeC	0,6a	0,6a	0,5b	0,6a	0,5b	0,6a	0,5b	0,6a
Zinco								
Tr	0,6c	7,1a	3,9b	3,9b	1,7c	1,7c	2,8b	9,2a
MO	67,1a	55,1b	46,5c	48,1c	49,7c	50,9c	50,9c	49,1c
OxFeA	0,3a	0,2b	0,2b	0,2b	0,2b	0,2b	0,2b	0,2b
OxFeC	1,5b	1,5b	1,3b	1,3b	1,7a	1,8a	1,4b	1,4b

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $<0,05$).

Nos solos sem calagem, o Zn foi retido principalmente em formas trocáveis e na matéria orgânica (Quadro 5), permanecendo lábil no período do experimento. Xiang et al. (1995) relatou que em solos ácidos a transformação da forma trocável para a fração orgânica pode ser importante para reduzir a toxicidade de Zn para as plantas. O tempo de incubação nesse tratamento influenciou principalmente a fração trocável, com redução de 21% aos 210 dias de contato com o solo.

Após a calagem, o teor de Zn sofreu brusca redução média de 89% na fração trocável com concomitante aumento de 89, 47 e 34 % na concentração do Zn retido pela matéria orgânica, óxidos de ferro amorfo e cristalino, respectivamente (Quadro 6). A matéria orgânica foi a principal responsável pela retenção de Zn nos solos submetidos à calagem. Segundo Isabelle & Alian (2001), a aplicação da matéria orgânica em solos contaminados pode eficientemente reduzir a concentração de Zn na solução do solo. Xiang et al. (1995) reportaram aumentos nos conteúdos de Zn ligado à óxidos de ferro cristalinos e amorfos em solos calcários comparativamente a solos ácidos. O menor tempo de incubação provocou redução em 27% a concentração de Zn na matéria orgânica quando comparado com o maior tempo de contato.

De modo geral, o tempo de incubação foi um fator de grande importância quanto à retenção dos metais pesados pelas frações do solo. No entanto, o tempo utilizado neste trabalho demonstrou ser insuficiente para verificar a transformação dos metais lábeis em não lábeis. Segundo Ma & Uren (1997), o Zn adicionado em ensaios de longa duração (5-20 anos) se encontrava, predominantemente, ligado às formas de óxidos de ferro e alumínio, enquanto que para o Zn recentemente adicionado (30 a 360 dias) os maiores teores foram encontrados nas formas mais reativas (trocável e solúvel em água).

3.3 Efeitos do tempo de incubação e da calagem na fitoextração induzida de metais pela mucuna preta

A aplicação do agente quelante (EDTA), sete dias antes do final do experimento, foi realizada apenas nos tratamentos com calagem. O EDTA mostrou-se eficiente para a fitoextração apenas do Pb e Cu, visto que as concentrações na parte aérea da mucuna aumentaram em média 68 e 26% , respectivamente, em relação ao solo sem calagem (Quadros 7 e 8).

Quadro 7. Concentração de metal ($\mu\text{g kg}^{-1}$) na parte aérea e raiz, na mucuna preta em solo contaminado sem calagem

	210 dias	180dias	150 dias	120 dias	90dias	60 dias	30 dias	0,5 dia
Sem Calagem								
Cádmio								
P. Aérea	215,7c	282,4b	290,9b	134,6d	141,2d	387,7a	294,6b	191,3c
Raiz	5853,6a	4461,0c	5231,7b	5050,1b	5067,1b	3305,9e	5137,2b	3781,6d
Chumbo								
P. Aérea	62,9a	70,3a	61,0a	38,9b	52,65b	76,2a	54,2b	75,1a
Raiz	1368,7c	1713,3b	3403,3a	1282,5c	1406,3c	1883,2b	1749,1b	1202,4c
Cobre								
P. Aérea	58,9b	132,6a	125,3a	59,3b	74,6b	134,8a	63,8b	83,4b
Raiz	6117,9d	6316,4d	9422,7a	8476,4b	7298,6c	5247,6e	6461,9d	9412,2a
Zinco								
P. Aérea	1532,6d	2006,2b	2941,3a	1459,6d	1764,0c	2241,9b	2135,6b	1445,7d
Raiz	15768,2a	12148,8c	13049,5b	15031,2a	15454,0a	10937,1d	13449,6b	15373,2a

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

Wu et al. (2004) relatam que a adição de 3 mmol kg^{-1} de EDTA aumentou as concentrações de Cu e Pb na parte aérea da *B. juncea*. Segundo Jarvis & Leung, (2002), a adição de EDTA aumentou a translocação de Pb em *Pinus radiata*, parecendo haver superação de barreiras à translocação e o Pb quelatado com EDTA apareceu em quantidades significativas nos tecidos vegetais, destacando-se a eficiência no aumento da solubilidade do Pb. Os dados corroboram os encontrados pelos autores citados acima, devido à eficiência da translocação do quelante, as concentrações de Pb e Cu na biomassa radicular reduziram 69 e 86%, respectivamente.

Quadro 8. Concentração de metal ($\mu\text{g kg}^{-1}$) na parte aérea e raiz em mucuna preta em solo contaminado com calagem

	210 dias	180dias	150 dias	120 dias	90dias	60 dias	30 dias	0,5 dia
Com Calagem								
Cádmio								
P. Aérea	127,6a	123,3a	99,8b	98,6b	68,2d	89,0c	55,4e	89,6c
Raiz	233,9f	472,5d	324,7e	535,4c	203,0f	855,2a	663,8b	347,5e
Chumbo								
P. Aérea	103,1d	186,3b	197,8b	170,7b	143,3c	203,5b	144,2c	402,5a
Raiz	493,6b	743,3a	530,8b	514,9b	576,7b	527,9b	533,1b	399,5c
Cobre								
P. Aérea	83,5c	138,9b	163,5a	111,3c	97,2c	131,0b	98,6c	160,3a
Raiz	877,3c	1130,6b	1141,0b	1079,0b	877,7c	879,4c	1031,2b	1312,5a
Zinco								
P. Aérea	759,4d	890,2c	887,8c	1009,0b	790,1d	910,5c	657,6c	1480,2a
Raiz	789,5e	1602,0c	1510,1c	1306,3d	2625,2a	2307,7b	1788,7c	1275,6d

Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott, $P < 0,05$).

O EDTA não foi eficiente no aumento da concentração de Cd e Zn na parte aérea da mucuna (Quadros 7 e 8) quando comparado com o solo sem a adição do quelante. Em geral, o pH do solo parece ter o maior efeito na solubilidade ou retenção de metais em solos, como indicado na literatura aquele que os metais catiônicos se tornam menos disponíveis para a planta em solo com pH elevado (Nascimento et al.,2006a), principalmente o Cd e o Zn que apresentam alta mobilidade. Além do mais, o Zn é um micronutriente altamente móvel na planta, e o Cd, apesar de não ser um elemento essencial, mas pela sua semelhança química com o Zn é facilmente absorvido e translocado no interior das plantas. Deste modo, no solo sem calagem, as concentrações médias do Cd e Zn na parte aérea foram 61 e 52 % maiores que no solo com calagem (Quadros 7 e 8). A concentração do Cd na raiz também foi influenciada pelo pH, pois foi reduzida 90 % da sua concentração após a calagem.

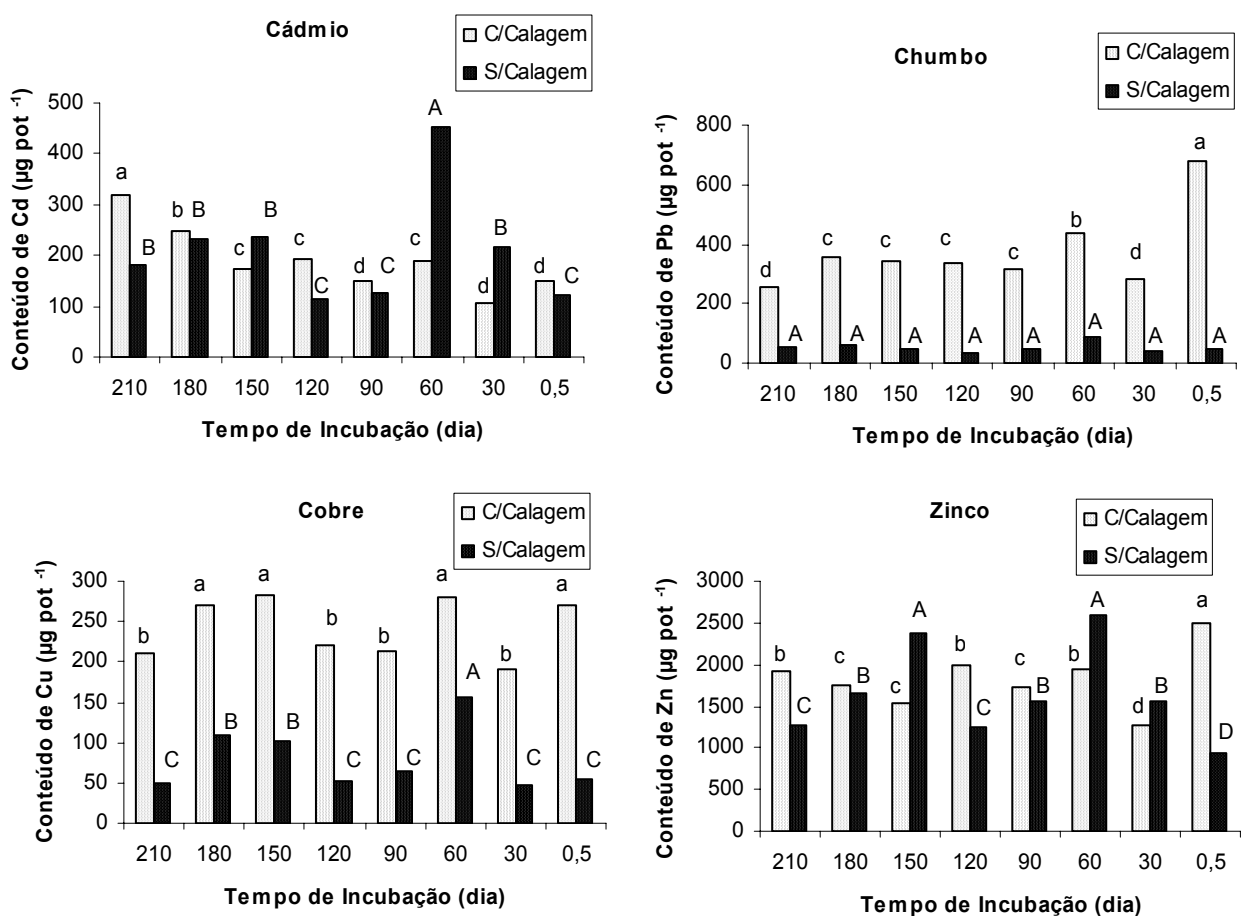


Figura 3. Remoção de Cd, Pb, Cu e Zn pela parte aérea da mucuna preta ($\mu\text{g pote}^{-1}$) dos solos contaminados. Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente (Teste Scott-Knott com $P < 0,05$).

A remoção do Cd e Zn no solo sem calagem foi influenciada principalmente pela acidez do solo (Figura 3), devido provavelmente à alta disponibilidade no solo desses elementos em pH baixo e a maior mobilidade na planta. A adição de EDTA em solo com calagem representou pouca diferença para o Cd e o Zn. Por outro lado, a remoção do Pb e Cu foi induzida pela adição deste quelante, pois esses elementos além da baixa mobilidade apresentam afinidade de formar ligações mais estáveis no solo (Alloway, 1990; McBride, 1997).

4. CONCLUSÕES

A concentração de metais pesados e a aplicação de calagem no solo afetaram a produção de matéria seca da parte aérea e da raiz da mucuna preta.

Em solos sem calagem, o aumento da solubilidade dos metais influenciou a fitoextração de Cd e Zn pela mucuna preta sem a necessidade da aplicação de agente quelante (EDTA).

A aplicação do EDTA no solo com calagem foi eficiente para a fitoextração induzida dos metais Pb e Cu.

O maior tempo de contato (210 dias) diminuiu significativamente os teores disponíveis dos metais pesados no solo.

A calagem reduziu significativamente os teores de Cd, Pb, Cu e Zn disponíveis extraídos por CaCl_2 no solo e provocou redução nos teores de Cd, Pb, Cu e Zn trocáveis e aumento nas frações matéria orgânica, óxidos de ferro amorfo e cristalino.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉ, E. M.; CRUZ, M.C. P.; FERREIRA, M.E. & PALMA, L.A.S. Fração de zinco em solo arenoso e suas reações com disponibilidade para *Cynodon spp.* CV. Tifton. R. Bras. Ci. Solo, 2: 645-629, 2003.
- ARAÚJO, J.C.T & NASCIMENTO, C.W.A. Redistribuição entre as frações e teores disponíveis de zinco em solos incubados com lodo de esgoto. R. Bras. Ci. Solo, 27: 451-459, 2005.
- ALLOWAY, B. J. Heavy metals in soils. New York. John Wiley. 1990. 339p.
- ATANASSOVA, I. & OKAZAKI, M. Adsorption-desorption characteristics of high levels of copper in soil clay fractions. Water, Air and Soil Poll., 98:213-228, 1997.
- BARROW, N.J. Mechanisms of sorption of zinc in soil and soil components. In: ROBSON, A.D., ed. Zinc in soils and plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1993. p.15-31.
- CHAO, T.T. & ZHOU, L. Extraction techniques for selective dissolution of amorphous iron oxides from soils and sediments. Soil Sci. Soc. Am. J., 47: 224-232, 1983.
- CHEN, Y. X.; LIN, Q.; LUO, Y. M.; HE, Y. F.; ZHEN, S. J.; YU, Y. L.; TIAN, G. M. & WONG, M. H. The role of citric acid on the phytoremediation of heavy metal contaminated soil. Chemosphere, 50: 807-811, 2003.
- CHLOPECKA, A. & ADRIANO, D. C. Mimicked in-situ stabilization of metals in a cropped soil: bioavailability and chemical form of zinc. Environ. Sci. Technol., 30:3294-3303, 1996.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes. 1ª ed. Brasília, 1999. 370p.
- FITZ, W.J. & WENZEL, W.W. Arsenic Transformations in the Soil-Rhizosphere-Plant System: Fundamentals and Potential Application to Phytoremediation. Journal of Biotechnology, 99:259-278, 2002.
- GALINDO, I.C.L.; BEZERRA, S.A.; NASCIMENTO, C.W.A. & ACCIOLY, A.M.A. Fertilizantes fosfatados e orgânicos e seus efeitos na imobilização de chumbo em solo contaminado. CAATINGA, v.18, n.1, p.58-65, 2005.
- GARBISU, C. & ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost-effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. Bioresource Technology, 77: 229-236, 2001.
- HARTER, R. D. Micronutrient adsorption-desorption reactions in soils. In: MORTVEDT, J. J.; COX, F. R.; SHUMAN, L. M. & WELCH, R. M., Eds. Micronutrients in the agriculture, Madison, SSSA. 1991. p. 59-88.

- ISABELLE, Y. & ALIAN, B. physical-chemical approach to assess the effectiveness of several amendments used for in situ remediation of trace metals-contaminated soils by adding solid phases. In: ISKANDER, I.K. (Ed.), Environmental Restoration of Metals-contaminated Soils. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, 2001. p. 3-20.
- JARVIS, M.D. & LEUNG, D.W.M. Chelated Lead Transport in *Pinus radiata*: an Ultrastructural Study. Environmental and Experimental Botany., 48:21-32, 2002.
- KABATA-PENDIAS, A. & PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. 3° ed. Boca Raton, CRC Press, Florida, USA. 2001. 413p.
- KNOX, A .S.; SEAMAN, J. C.; MENCH, M. J. & VANGRONSVELD, J. Remediation of metal and radionuclides contaminated soils by in situ stabilization techniques. In: ISKANDAR, L. K. (Ed.), Environment Restoration of Metals Contaminated Soils. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, USA, 2001. p. 21-60.
- MA, Y. B. & UREN, N. C. The fate and transformations of zinc added to soils. Aust. J. Soil Res. 35: 727-738, 1997.
- McBRIDE, M. B. Environmental chemistry of soil. New York, Oxford University, 1994. 406 p.
- McBRIDE, M.B.; SAUVÉ, S. & HENDERSHOT, W.H. Solubility control of Cu, Zn, Cd and Pb in contaminated soils. Europ. J. Soil Sci., 48:337-346, 1997.
- McLAUGHLIN, M.J. & SINGH, B.R. Cadmium in soils and plants. Developments in Plant and Soil Sciences. Kluwer Academic Publishers, London, 1999. 271 p.
- MILLER, W. P.; MARTENS, D. C. & ZELASNY, L. W. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metal. Anal. Chem., 50: 598-601, 1986.
- NASCIMENTO, C. W. A.; FONTES, R. L. F. & MELÍCIO, A. Copper availability as related to soil copper fractions in oxisols under liming. Scientia Agricola, Piracicaba, 60:167-173, 2003.
- NASCIMENTO, C. W. A.; MELO, E. E. C.; NASCIMENTO, R. M. P. & LEITE, P. V. V. Effect of liming on the plant availability and distribution of zinc and copper among soil fractions. Comm. Soil Sc. Pl. Analysis (No prelo), 2006.
- NASCIMENTO, C.W.A.; AMARASIRIWARDENA, D. & XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. Environmental Pollution, 140:114-123, 2006.
- NOVOZAMSKY, I.; LEXMOND, T.M. & HOUBA, V.J.G. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. Int. J. Environ. Anal. Chem., 51:47-58, 1993.

- OLIVEIRA, M.F.G.; NOVAIS, R.F.; NEVES, J.C.L.; VASCONCELOS, C.A. & ALVES, J.C.L. Relação entre o zinco “disponível”, por diferentes extratores, e as frações de zinco em amostras de solos. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:827-836, 1999.
- PUNZ, W.F. & SIEGHARDT, H. The Response of Roots of Herbaceous Plant Species to Heavy Metals. *Environmental and Experimental Botany*, 33:85-98, 1993.
- RASKIN, I., & ENSLEY, B.D. *Phytoremediation of toxic metals: Using plants to clean up the environment*. John Wiley & Sons, New York, 2000. 304p.
- SALT, D.E.; SMITH, R.D. & RASKIN, I. Phytoremediation. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49:643–668, 1998.
- SHUMAN, L.M. Fractionation method for soil microelements. *Soil Sci.*, 140: 11-22, 1985.
- XIANG, H.F.; TANG, H.A. & YING, Q.H. Transformation and distribution of forms of zinc in acid, neutral and calcareous soils of China. *Geoderma*, 66:121-135, 1995.
- WU, L.H.; LUO, Y.M.; XING, X. R. & CHRISTIE, P. EDTA-enhanced phytoremediation of heavy metal contaminated soil with Indian mustard and associated potential leaching risk. *Agriculture Ecosystems & Environment*, 102:307-318, 2004.