



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

O papel dos metabólitos secundários em fitorremediação por *Pontederia parviflora*
(Alexander) e *Salvinia auriculata* (Aubl.)

Linha de Pesquisa: Fisiologia, Bioquímica e Fitoquímica.

Mestrando: Augusto César Rodrigues

Orientador: Carlos Alexandre Carollo

Coorientadora: Letícia Couto Garcia

Campo Grande – MS

Maio 2019



Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

O papel dos metabólitos secundários em fitorremediação por *Pontederia parviflora*
(Alexander) e *Salvinia auriculata* (Aubl.)

Augusto César Rodrigues

Dissertação apresentada ao
programa de pós-graduação em
Biologia Vegetal como um dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Vegetal junto ao
Instituto de Biologia.

Campo Grande – MS

Maio 2019



Resumo

O presente trabalho buscou investigar o papel dos metabólitos secundários encontrados no extrato hidroetanólico das espécies *Pontederia parviflora* (raízes, pecíolos/caules e folhas de maneira separada) e *Salvinia auriculata* (planta toda) em fitorremediação passiva utilizando a biomassa seca destas espécies. Amostras do material vegetal seco e triturado foram submetidas a uma extração exaustiva dos seus metabólitos, e os extratos obtidos caracterizados posteriormente por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com um Detector de Arranjo de Diodo e Espectrômetro de Massas tandem (CLAE-DAD-EM/EM). Foram avaliados o teor de metais acumulado no material vegetal e a capacidade de adsorção de cádmio pela biomassa seca das amostras de cada espécie, integrais e amostras com os metabólitos secundários extraídos, por Espectrometria de Emissão Óptica por plasma Acoplado Indutivamente (EEO-PAI). Após a digestão assistida por micro-ondas das amostras vegetais, foram avaliados os teores de As, Cd, Cr, Mg, Mn, Mo, Ni e Pb que já se encontravam acumulados nestes vegetais e testado o potencial de remoção de cádmio em soluções aquosas preparadas nas concentrações de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. A extração exaustiva por extrator de fluido pressurizado não removeu os metais pesados do material vegetal analisado, demonstrando, nos resultados de acúmulo de metais a partir do meio onde os esses vegetais se desenvolveram, que os metabólitos secundários não estão complexados com os metais acumulados pelo vegetal, uma vez que os teores de metais são maiores na ausência dos metabólitos. Nos ensaios de remoção de cádmio, onde havia o controle do teor de metal na solução aquosa preparada, houve uma redução expressiva na concentração de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ do meio, porém em concentrações mais altas o mesmo efeito não foi observado, constatando inclusive o aumento no teor de cádmio no residual aquoso destes ensaios, discussão abordada neste trabalho. Os metabólitos não apresentaram efeito significativo no mecanismo testado de fitorremediação passiva, foi observado também um rápido efeito da saturação do sistema de bioadsorção da biomassa dessas macrófitas, sendo uma limitação para aplicação desta técnica.

Palavras-chave: Metabólitos Secundários, *Salvinia auriculata*, *Pontederia parviflora*, fitorremediação, metais pesados.



Abstract

The present work investigated the effects of secondary metabolites in phytoremediation using *Pontederia parviflora* (roots, petioles/stems, and leaves separately) and *Salvinia auriculata* (whole plant). The samples were submitted to an exhaustive extraction of their metabolites, which were characterized by HPLC-DAD-MS/MS. The accumulated metals level of the vegetal material and the adsorption capacity of cadmium by the dry biomass of the whole samples and after the extraction process of the secondary metabolites were evaluated by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). The accumulated contents of As, Cd, Cr, Mg, Mn, Mo, Ni, and Pb were evaluated and the potential of cadmium removal in the concentrations of $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $3.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. The results for the accumulation of metals of the medium showed that the secondary metabolites do not have effective participation in the accumulated contents, since the contents of metals increase in the absence of them, it was also observed that the extraction by pressurized fluid extractor does not remove the heavy metals of the plant. In the cadmium removal trials, there was a significant reduction in the concentration of $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$, but in higher concentrations, the same effect was not observed. Also, we noted the increase in the cadmium content in the residual, discussed in this work. The metabolites did not present a significant effect on the passive phytoremediation mechanism, and a rapid saturation effect of the biomass biosorption system of these macrophytes was observed, this is a limitation for the application of this technique.

Keywords: Secondary Metabolites, *Salvinia auriculata*, *Pontederia parviflora*, Phytoremediation, Heavy metals.



Lista de abreviaturas, siglas e acrônimos

| | |
|----------------|--|
| As | Arsênio |
| Cd | Cádmio |
| CG | Cromatografia em fase Gasosa |
| | Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência acoplada |
| CLAE-DAD-EM/EM | a um Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas Sequencial |
| CLUE | Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Eficiência |
| Cr | Cromo |
| Desv. Pad. | Desvio Padrão |
| EM/EM | Espectrômetro de Massas Sequencial |
| EEO-PAI | Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente |
| | Do inglês <i>High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection tandem Mass Spectrometry</i> |
| HPLC-DAD-MS/MS | (Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos e Espectrômetro de Massas Sequencial) |
| | Do inglês <i>Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry</i> (Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente) |
| ICP-OES | |
| IES | Ionização por Eletrospray |
| IR | Do inglês <i>Infrared radiation</i> (radiação infra-vermelha) |
| kV | Quilovolt |
| LaPNEM | Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas |
| LD | Limite de Detecção |
| LQ | Limite de Quantificação |
| m/z | Relação Massa/Carga |
| Mg | Magnésio |
| mg/mL | Miligrama por Mililitro |
| Mn | Manganês |



| | |
|-----------|---|
| Mo | Molibdênio |
| Ni | Níquel |
| NID | Não identificado |
| Nm | Nanômetro |
| Pb | Chumbo |
| PPA-C sem | <i>Pontederia parviflora</i> pecíolos/caules com metabólitos secundários |
| PPA-C com | <i>Pontederia parviflora</i> Caule com metabólitos secundários |
| PPA-F sem | <i>Pontederia parviflora</i> Folha sem metabólitos secundários |
| PPA-F com | <i>Pontederia parviflora</i> Folha com metabólitos secundários |
| PPA-R sem | <i>Pontederia parviflora</i> Raiz sem metabólitos secundários |
| PPA-R com | <i>Pontederia parviflora</i> Raiz com metabólitos secundários |
| QqTOF | Quadrupole-quadrupole Time Of Flight – Quadrupolo e Tempo de Voo em Sequência |
| RMN | Ressonância Magnética Nuclear |
| SAL sem | <i>Salvinia auriculata</i> sem metabólitos secundários |
| SAL com | <i>Salvinia auriculata</i> com metabólitos secundários |
| UFLC | Ultra Fast Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida Ultrarrápida |
| UPC | Ponto de Maior Concentração da Curva |
| UV | Ultravioleta |
| v/v | Volume/Volume |



Lista de Tabelas

Tabela 1 – Parâmetros para o sistema de digestão.

Tabela 2 – Condições instrumentais da análise para EEO-PIA para análises dos elementos.

Tabela 3 – Rendimento da produção de extratos a partir da biomassa seca das macrófitas.

Tabela 4 – Teor (média \pm desvio padrão, n=5) de fenóis totais e taninos nas amostras avaliadas quanto ao potencial de fitorremediação. Resultados expressos em % de equivalente ácido gálico no extrato.

Tabela 5 – Concentração (média \pm desvio padrão, n=5) em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de fenóis tanantes e não tanantes em extratos de *P. parviflora* e *S. auriculata*.

Tabela 6 – Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Salvinia auriculata* no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

Tabela 7 – Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Pontederia parviflora* (folhas) no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

Tabela 8 – Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Pontederia parviflora* (pecíolo/caule) no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

Tabela 9 – Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Pontederia parviflora* (raízes) no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

Tabela 10 – Parâmetros de calibração obtidos, coeficiente de determinação (R^2) Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), usando EEO-PIA.

Tabela 11 – Concentração (média \pm desvio, n=3) dos teores em $\mu\text{g g}^{-1}$ de As, Cd, Cr, Mg, Mn, Mo, Ni e Pb encontrados nas amostras de *P. parviflora*-folhas (PPA-F), *P. parviflora*-pecíolos/caules (PPA-C), *P. parviflora*-raízes (PPA-R) e *S. auriculata*. Amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

Tabela 12 – Valores médios (\pm desvio padrão, n=3) da concentração no residual avaliado após os ensaios de remoção, os valores apresentados trata-se da concentração de cádmio residual após o tempo de contato da solução controle com as biomassas. A concentração de Cd em ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras



“sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

Lista de Figuras

Figura 1 – Realização de fitorremediação ativa x fitorremediação passiva em biomassa viva e biologicamente inativa.

Figura 2 – *Pontederia parviflora*, florida com folhas emersas, e *Salvinia auriculata*, em primeiro plano flutuante.

Figura 3 – Estrutura de compostos encontrados em espécies do gênero *Salvinia*.

Figura 4 – Imagem topográfica do local de coleta (Lagoa Comprida). O círculo vermelho marca o local do antigo aterro que havia nas proximidades da lagoa e em amarelo a lagoa, local de coleta das macrófitas.

Figura 5 – Etapas de preparação do material vegetal, (A) secagem, (B) trituração e (C) embalagem para armazenamento.

Figura 6 – Extrator por fluido pressurizado (A) e aspecto do extrato já liofilizado (B, C).

Figura 7 – Produção de extratos e amostras utilizadas na quantificação de metais na biomassa e nos ensaios de remoção de cádmio. Onde PPA-F, PPA-C, PPA-R referem-se respectivamente às amostras de *Pontederia parviflora*, folha, pecíolo/caule e raiz, e ainda SAL referindo-se às amostras de *Salvinia auriculata*.

Figura 9 – Design experimental dos ensaios de remoção de cádmio, concentrações em mg mL⁻¹, realizadas com amostras de *Pontederia parviflora* folhas (PPA-F), pecíolo/caule (PPA-C), raízes (PPA-R) e *Salvinia auriculata* (SAL), amostras seguidas de “com”, possuem em sua estrutura os metabólitos secundários, amostras seguidas de “sem” são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos.

Figura 10 – Cromatograma de *Pontederia cordata* e *Salvinia auriculata* obtidos por CLAE no modo de ionização negativo, em vermelho extrato de *Salvinia auriculata* (SAL), em verde *Pontederia parviflora*-folhas (PPA-F), em lilás *Pontederia parviflora*-pecíolo/caule (PPA-C) e em preto extrato de *Pontederia parviflora*-raízes (PPA-R). A identificação dos picos está descrita nas tabelas 6 (*Salvinia auriculata*), 7 (*Pontederia parviflora*-folha), 8 (*Pontederia parviflora*-pecíolo/caule) e 9 (*Pontederia parviflora*-raiz).



Figura 11 – Diferença entre a composição das amostras analisadas em EEO-PIA.

Figura 12 – Concentrações de metais encontrados nas amostras “com” e “sem” os metabólitos, onde as amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

Figura 13 – Concentrações de metais encontrados nas amostras “com” e “sem” os metabólitos, onde as amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

Figura 14 – Investigação da relação entre a concentração de Fenóis/Taninos vs concentração de metal na biomassa de *P. parviflora* e *S. auriculata*.

Figura 15 – Resumo dos procedimentos a partir da obtenção do material analisado até avaliação da eficiência biorremediativa da biomassa vegetal. Em 1 há o preparo e secagem do material vegetal para obtenção da biomassa seca, em 2 o processo de remoção de Cd onde a biomassa é posta em contato com a solução controle, contendo cádmio diluído em água acidificada, e removida em 3 após 15 minutos de contato e do residual aquoso é obtido um alíquota de 2 mL para análise em EEO-PAI.

Figura 16 – Remoção de cádmio em concentração de 0,2; 3,5 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do metal cádmio.

Figura 17 – Dinâmica do processo de remoção, esquema sugerido para elucidar as possíveis causas e os efeitos dos sítios de ligação (da biomassa vegetal) saturados.



Sumário

| | |
|---|----|
| 1 – Introdução | 11 |
| 2 – Revisão da Literatura | 14 |
| 2.1 – Fitorremediação | 14 |
| 2.2 – Metais pesados | 16 |
| 2.3 – Compostos Fenólicos | 17 |
| 2.4 – Macrófitas aquáticas | 18 |
| 2.4.1 – Metabolismo secundário de Pontederia parviflora e Salvinia auriculata | 19 |
| 3 – Objetivos | 22 |
| 3.1 – Geral | 22 |
| 3.2 – Específicos | 22 |
| 4 – Material e métodos | 23 |
| 4.1 – Descrição do local da coleta | 23 |
| 4.2 – Material vegetal | 24 |
| 4.3 – Produtos químicos e reagentes | 25 |
| 4.4 – Preparação dos extratos | 25 |
| 4.5 – Determinação de Fenóis Totais e Taninos | 27 |
| 4.6 – Avaliações dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas tandem (CLAE-DAD-EM/EM) | 28 |
| 4.7 – Digestão por Micro-ondas | 29 |
| 4.8 – Análise em EEO-PIA | 29 |
| 4.9 – Curva analítica | 30 |
| 4.10 – Quantificação de metais na biomassa e ensaios de remoção | 31 |
| 4.11 – Ensaios de remoção | 31 |
| 4.12 – Análise estatística | 32 |
| 5 – Resultados e discussão | 33 |
| 5.1 – Rendimento dos extratos produzidos | 33 |
| 5.2 – Determinação de fenóis totais e taninos | 33 |
| 5.3 – Avaliação dos extratos por cromatografia líquida (CLAE-DAD- | |



| | |
|---|----|
| EM/EM) | 35 |
| 5.4 – Determinação de metais na biomassa das macrófitas | 43 |
| 5.5 – Ensaios de remoção de cádmio | 51 |
| 6 – Conclusões | 56 |
| Agradecimentos | 57 |
| Referências | 58 |



1 – Introdução

Metais pesados tornaram-se uma grande preocupação nas últimas décadas, uma vez que o aumento da industrialização exigiu cada vez mais de nossas fontes minerais, causando grandes alterações em ciclos biogeoquímicos naturais (ALI et al., 2013). Estes compostos não são biodegradáveis, sua presença na superfície é recente, considerando os processos geoquímicos, e associada principalmente ao período de urbanização (DAVIS et al., 2006). A toxicidade destes elementos é algo importante a ser discutido, uma vez que o contato com esses metais afeta à saúde humana, pois muitos são carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos mesmo em baixas concentrações (SUN et al., 2013).

Há inúmeros fatores, do ponto de vista ecológico, que estão envolvidos na escolha da biorremediação, por exemplo, o fato de ser uma técnica menos agressiva com menores efeitos sobre os parâmetros físico-químicos ambientais tais como pH, temperatura e oxigenação da água, evitar, em casos extremos, a remoção de grandes quantidades de terra do solo, alterando as configurações e disponibilização de nutrientes do solo. Também temos que considerar o caráter econômico, pois os valores desembolsados com técnicas fitorremediativas são inúmeras vezes menores que em técnicas tradicionais adotadas pela indústria (PERELO, 2010).

Plantas, de maneira geral, são mais susceptíveis a alterações ambientais, devido à falta de mobilidade, e a constante manutenção de seu organismo pela homeostase confere a elas uma plasticidade fenotípica em relação ao seu metabolismo, que lhes dão maior resistência aos estresses ambientais, principalmente através da ativação de genes que levam a síntese de metabólitos secundários como resposta (FIEHN, 2002; MIZOI et al., 2012).

Estudos das adaptações fisiológicas/metabólicas de plantas em resposta à estresses ambientais contribuem para o desenvolvimento da técnica de fitorremediação, processos que correm de maneira natural nas plantas, tornando as mesmas resistentes a esses distúrbios, através da remoção ou estabilização dos poluentes, diminuindo sua toxicidade por interações iônicas e processos metabólicos (SALT et al., 1998; ALI et al., 2013).

Trabalhos anteriores demonstram peculiaridades importantes dos sistemas de fitorremediação, direcionando as pesquisas para o contexto fitoquímico, focado nos



processos metabólicos das plantas e alocando aos metabólitos secundários o protagonismo deste processo (ALI et al., 2013).

Em trabalhos preliminares de nosso grupo (dados não publicados), as espécies *Pontederia parviflora* (Alexander) e *Salvinia auriculata* (Aubl.) mostraram potencial fitorremediativo pela remoção de Cádmio (acima de 90%), sendo assim selecionadas para este estudo. Ao fazer uma relação entre o perfil químico desses vegetais com o desempenho nos processos de fitorremediação, espera-se obter um mecanismo para confirmar a ação fitorremediativa de outras espécies segundo seu perfil químico, seja na fixação ou no acúmulo de metais e outros contaminantes.



2 – Revisão da Literatura

2.1 – Fitorremediação

O termo "fitorremediação" é a junção de duas palavras de origens diferentes, uma do grego: *phyto*= planta e outra do latim: *remedium*= corrigir ou remover um mal (ALI et al., 2013). Esta é uma técnica derivada da biorremediação e como o próprio nome sugere, a mesma utiliza plantas como agentes despoluidores nos seus processos, podendo ser aplicada tanto em substrato, sólido, gasoso ou líquido (PILON-SMITS, 2005; RAJKUMAR et al., 2012). Remediação de ambientes contaminados com técnicas biorremediativas, além do apelo ecológico, destaca-se, também, devido ao aspecto econômico, técnicas tradicionais são muito caras, exigem mão de obra e aparelhagem especializada, além de gerar distúrbios ao ambiente onde são aplicadas em contraponto o custo total de um tratamento biorremediativo é muito menor que um tratamento convencional com a mesma eficiência, maior praticidade e menores efeitos colaterais (BHARGAVA et al., 2012); (PERELO, 2010; UNGUREANU et al., 2015).

O interesse por plantas como matéria-prima para substituir os agentes tradicionais de descontaminação, mobilização e remoção de metais por agentes quelantes naturais, vem guiando a comunidade acadêmica que desenvolve pesquisas com biorremediação que resultam no descobrimento de agentes hiperacumuladores de metais naturais (STINGU et al., 2012; MAHAR et al., 2016).

Podemos subdividir a técnica de fitorremediação em dois grupos de acordo com o gasto energético, onde fitorremediação ativa há gasto energético no sequestro de íons metálicos, e fitorremediação passiva quando o sequestro dos íons metálicos ocorre sem gasto energético pelo vegetal. Íons que possuem papel no metabolismo empenham gasto energético e maquinário metabólico no seu sequestro enquanto íons que não possuem papel biológico competem por sítios de ligação de outros íons e no tecido vegetal apenas por interações iônicas (ALI et al., 2013). Fitorremediação passiva é um processo que pode ser realizado tanto pela planta viva quanto pela biomassa seca (biologicamente inativa) enquanto a fitorremediação ativa só pode ser realizada pela planta viva, por conta de sua dependência energética e de maquinário metabólico (Figura 1).

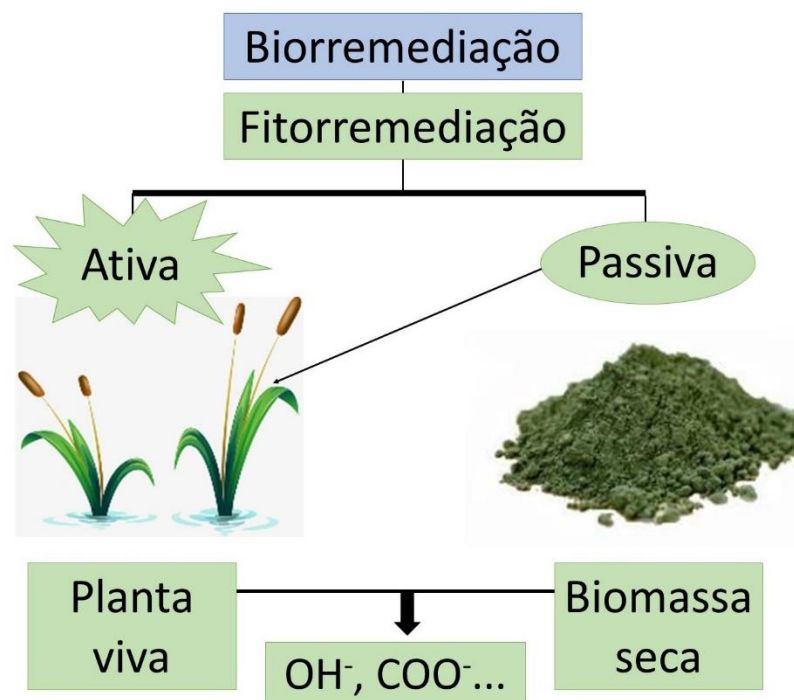


Figura 1: Realização de fitorremediação ativa x fitorremediação passiva em biomassa viva e biologicamente inativa.

Embora existam diferenças entre os mecanismos de ação e estado do material vegetal na fitorremediação ativa e passiva (Figura 1), os componentes envolvidos em ambos os processos, ativo ou passivo, são encontrados tanto nos componentes estruturais das células vegetais como as ligninas, como nos demais compostos do metabolismo primário e secundário, podem ser grupamentos de hidroxilas, carbonilas, entre outros (SYTAR et al., 2013).

Os atuais direcionamentos apontam para uma metabolização de metais pesados como mecanismo de desintoxicação reduzindo seus íons, oxidando ou complexando com outros agentes, possivelmente com seus metabólitos secundários, uma vez que os mesmos estão associados à defesa das plantas (BENNETT e WALLSGROVE, 1994; CHEYNIER et al., 2013; FAROOQ et al., 2016).



2.2 – Metais Pesados

O termo “metal pesado” é um termo ambíguo que se refere tanto ao grupo de elementos químicos tóxicos às plantas e organismos vivos em geral quando excedido as concentrações suportadas, incluindo alguns metaloides e semimetais como arsênio e boro, silício; mas também pela definição mais aceita, que compreende o grupo de elementos químicos com massa atômica maior que 20 ou que possuem uma densidade maior que 5 g/cm^3 (APPENROTH, 2010).

Metais pesados podem ser classificados em essenciais, quando há demanda metabólica por este metal (por exemplo, magnésio, ferro, Zinco), e não essenciais, quando não há demanda metabólica por ele (por exemplo, cádmio, mercúrio, chumbo), ou seja, sem fazer parte das atividades biológicas naturais (APPENROTH, 2010; ALI et al., 2013).

Nas últimas décadas cresceu o interesse por tratamentos alternativos para remoção de metais pesados, que são considerados um grande desafio devido a sua persistência no ambiente (AYANGBENRO e BABALOLA, 2017). Uma recente tragédia em Mariana, Minas Gerais, gerou prejuízos econômicos, sociais e ecológicos em larga escala, contaminando rios e solo da região (GARCIA et al., 2017), sendo um exemplo de caso onde é possível aplicar técnicas biorremediativas para amenizar danos ecológicos, visando a descontaminação causada pelo derrame dos dejetos contaminados com níveis de metais bem acima dos permitidos.

Por não serem biodegradáveis, metais pesados contaminam e afetam todos os níveis da cadeia alimentar, inevitavelmente chegando até os seres humanos, seu contato e acúmulo no organismo causa uma série de distúrbios que vão desde irritação cutânea até o desenvolvimento tumores, distúrbios crônicos e falência de órgãos vitais (BHARGAVA et al., 2012; ALI et al., 2013).

Por tanto a busca por metodologias ecológicas, menos agressivas, que diminuam os efeitos tóxicos desses contaminantes tanto para o ambiente onde são liberados os resíduos contaminados quanto em prol da saúde humana são necessárias.



2.3 – Compostos Fenólicos

Os metabólitos são divididos em dois grandes grupos, sendo eles primários, basicamente o mesmo em todos os seres vivos, diretamente relacionados crescimento, nutrição e desenvolvimento, e secundários, restrito, em certas classes, diferenciando muitos organismos que os sintetizam, associados também de forma indireta na manutenção do metabolismo da planta e às defesas vegetais, muitas vezes com funções e mecanismo de ação ainda desconhecidos (CHEYNIER et al., 2013; JHA et al., 2015). O número de novos metabólitos secundários cresce quase que diariamente com o aperfeiçoamento de técnicas analíticas como CLAE, CLUE, RMN, CG, entre outras ferramentas que auxiliam na determinação, quantificação e identificação.

A produção e armazenamento de metabólitos secundários ocorre em todo o reino vegetal, de maneira distinta e com diversa seletividade, sendo importantes na dinâmica da vida de um vegetal sendo a classe dos compostos fenólicos, presente em todas as espécies de vegetais superiores, a mais abundante e estudada no universo do metabolismo vegetal (TANASE et al., 2019).

Os fenóis são normalmente relacionados a mecanismos de defesa contra herbívoros e patógenos (DAI e MUMPER, 2010; ALI et al., 2013), sua estrutura caracteriza-se em apresentar ao menos uma hidroxila ligada a um átomo de carbono de um anel benzênico, normalmente são acumuladas na forma glicosilada, podendo variar desde os grupos com estruturas mais simples como os ácidos fenólicos até os grupos com arranjos mais complexos como os taninos (COWAN, 1999; CROZIER et al., 2009). Além disso, fenóis são compostos de grande interesse para indústria alimentícia, pela constante presença e benefícios na dieta, e na indústria farmacêutica, devido as propriedades antioxidante, anti-radicalar entre outras atividades biológicas envolvidas na prevenção ou combate a inúmeras doenças (DAI e MUMPER, 2010). Esses compostos fenólicos podem agir também na quelação de metais pesados, formando quelatos não tóxicos para transporte, armazenamento e/ou eliminação dessas substâncias em formas menos tóxicas pelo vegetal (MICHALAK, 2006; SYTAR et al., 2013).



2.4 – Macrófitas aquáticas

Do grego makros = grande e phyto = planta, este é um termo genérico geralmente usado para designar o conjunto de vegetais “superiores” adaptados à vida em ambiente aquático ou constantemente úmido. No contexto ecológico, plantas aquáticas desempenham um papel central na manutenção e no funcionamento dos ecossistemas em que ocorrem, estabelecendo uma forte ligação entre o sistema aquático e o ambiente terrestre. No Pantanal são responsáveis pela ciclagem de nutrientes do solo durante os períodos de seca, quando a superfície inundada diminui (POTT e POTT, 2000).

As macrófitas aquáticas são também as principais responsáveis pelos processos de estabilização em ecossistemas aquáticos contra agentes poluidores tanto orgânicos, quanto inorgânicos, através de seus processos metabólicos ou simples assimilação do contaminante.

Pontederia parviflora (Figura 2) é uma erva aquática emergente da família Pontederiaceae, rizomatosa, perene, de folha estreita ou larga que floresce praticamente o ano inteiro (POTT e POTT, 2000), ainda pouco usada em estudos de fitorremediação, teve seu desempenho comprovado em escala laboratorial na fitorremediação por bioacumulação de cobre (BALASSA et al., 2010), ou seja, no acúmulo de metal pela planta viva sem testar o desempenho com o material vegetal seco.

Salvinia auriculata (Figura 2) é uma erva aquática flutuante livre da família Salviniaceae, anual ou perene, possui folhas revestidas por tricomas, geralmente são associadas à problemas/prejuízos, principalmente para hidroelétricas e sistemas de piscicultura (POTT e POTT, 2000). A espécie é utilizada em estudos de fitorremediação, com resultados positivos no bioacúmulo de cádmio (VESELY et al., 2011), chumbo (ESPINOZA-QUINONES et al., 2009; VESELY et al., 2011), cromo e diversos outros metais colocando esta espécie em evidencia dentre as espécies mais eficientes no acúmulo e remoção de metais em amostras aquosas preparadas de caráter “multielementar”, mesmo estes em baixas concentrações, esta espécie teve seu desempenho comprovado tanto em ensaios com a planta viva como em ensaios com a biomassa seca, ou seja, absorção ou adsorção (SOARES et al., 2008; DHIR e SRIVASTAVA, 2011).



Figura 2: *Pontederia parviflora*, florida com folhas emersas, e *Salvinia auriculata*, em primeiro plano flutuante.

2.4.1 – Metabolismo secundário de *Pontederia parviflora* e *Salvinia auriculata*

Ambas as espécies, *Pontederia parviflora* e *Salvinia auriculata*, são espécies comuns na região do Pantanal. Estudos de fitorremediação associam algumas estruturas químicas, tais como grupamentos -OH- e -COO-, como agentes que contribuem no potencial de captação de contaminantes em solução, estruturas estas muito presentes nos metabólitos secundários que são encontrados nesses vegetais (DHIR et al., 2010; ALI et al., 2013).

O perfil químico dos metabólitos secundários dessas espécies até o presente momento é uma lacuna na literatura, análises qualitativas com espécies dos mesmos gêneros que as utilizadas neste estudo citam como principais classes de metabólitos encontradas nessas plantas os fenóis, tais como ácidos clorogênicos, flavonoides, taninos e também alguns alcaloides (GAYA et al., 2017). Algumas dessas classes podem ser sintetizadas em resposta à presença de metais pesados no ambiente; Bizzo e colaboradores relataram o aumento na produção de fenóis e antocianinas em *S. auriculata* na presença de altas concentrações de cobre, com redução nas concentrações de flavonoides após curto período de exposição (2014). Outro estudo relata a redução da atividade antioxidante, relacionada a compostos fenólicos encontrados nos metabólitos secundários, em amostras de *S. auriculata* e

Eichhornia crassipes (espécie da família Pontederiaceae) sob estresse do metal cádmio (VESTENA et al., 2011).

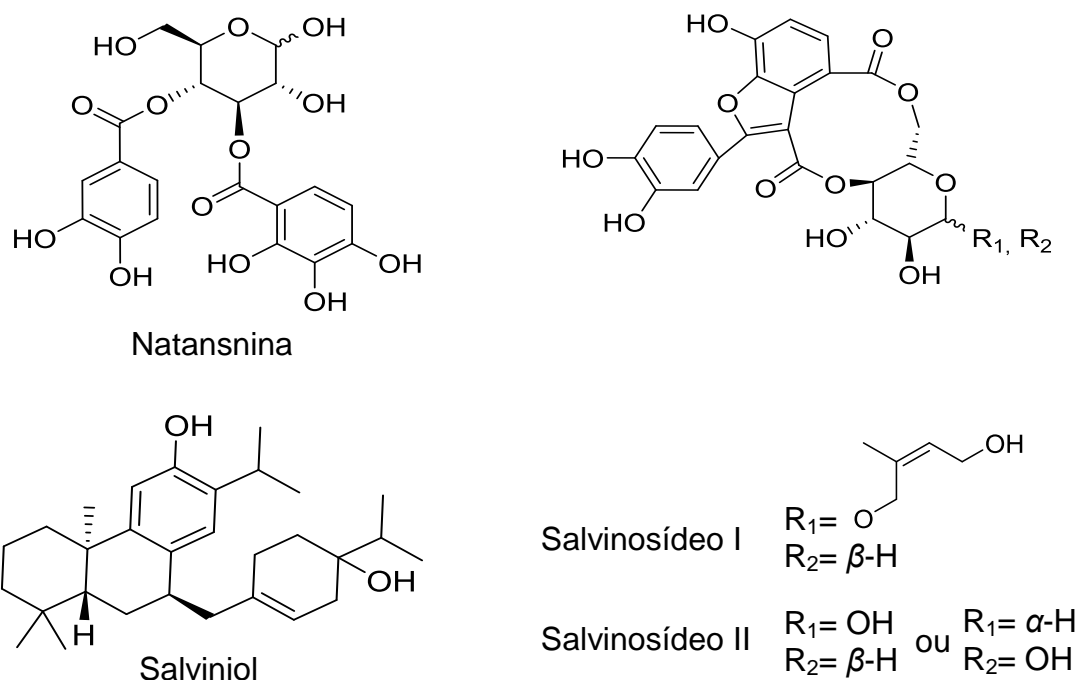


Figura 3: Estrutura de compostos encontrados em espécies do gênero *Salvinia*.

Recentemente, uma espécie da família Pontederiaceae (*Eichhornia crassipes*) e outra da família Salvinaceae (*Salvinia molesta*) foram comparadas quanto a quantidade de taninos, carotenoides, flavonoides e terpenoides, de acordo com os autores os maiores teores destes compostos estão em *E. crassipes*, já para metabólitos dos grupos dos alcaloides, saponinas e fenóis, foram maiores em *S. molesta* (GAYA et al., 2017). Frações de extratos de plantas do gênero *Salvinia* apresentaram atividades antimicrobiana, antiviral e antioxidante (GOSWAMI et al., 2016). Novos compostos, como natansnina, salviniol e salvinosídeos I e II (NARASIMHULU et al., 2010; LI et al., 2013), foram associados a estas atividades biológicas (figura 3).

O prospecto possível com as informações contidas na literatura atual favorecem estudos que visem à otimização da técnica de fitorremediação com a possibilidade de elucidação dos mecanismos que envolvem o trapeamento de metais pesados. O perfil químico das espécies, com os compostos descritos, sugerem algumas possibilidades para estes mecanismos de ação envolvidos na fitorremediação (trapeamento de metais), principalmente devido à presença de



grupamentos catecóis em muitas classes dos compostos descritos, esses grupamentos têm a característica de se complexar com metais pesados. A elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na fitorremediação possibilita, além do domínio da técnica, o desenvolvimento de métodos que permitam a disponibilização dos sítios de ligação na biomassa vegetal, aumentando assim a vida útil do material vegetal que poderá ser reutilizado em fitorremediação e possibilitando ainda o reaproveitamento do contaminante (metal), o que diminuiria ainda mais os custos da fitorremediação.



3 – Objetivos

3.1 – Geral

Identificar o papel dos metabólitos secundários, presentes no extrato hidroetanólico das espécies utilizadas, na remoção do metal pesado cádmio e fixação de As, Cd, Pb, Cr, Mg, Mn, Mo e Ni em processos de fitorremediação por *Salvinia auriculata* e *Pontederia parviflora*.

3.2 – Específico

- Realizar extração exaustiva hidroetanólica das amostras secas de *Salvinia auriculata* (planta toda) e *Pontederia parviflora* (raízes, pecíolos/caules e folhas de maneira separada);
- Analisar os extratos por CLAE-DAD-EM/EM tandem;
- Determinar a concentração dos metais As, Cd, Cr, Mg, Mn, Mo, Ni e Pb na biomassa das amostras de *Salvinia auriculata* e *Pontederia parviflora* com e sem a presença dos metabólitos;
- Avaliar a diferença entre amostras dos vegetais secos com e sem a presença de metabólitos secundários;
- Determinar a presença de fenóis totais e taninos nos extratos hidroetanólicos das espécies estudadas;
- Medir a eficiência da biomassa de amostras duas espécies na remoção de cádmio (biossorção);
- Avaliar a influência dos metabólitos secundários na fixação dos metais As, Cd, Cr, Mg, Mn, Mo, Ni e Pb na biomassa das amostras de *Salvinia auriculata* e *Pontederia parviflora*;
- Avaliar influência dos fenóis totais e taninos na fixação de cádmio e acúmulo de metais;
- Avaliar o potencial de remoção de cádmio no sistema de fitorremediação *ex situ*.

4 – Materiais e Métodos

4.1 – Descrição do local da coleta

As espécies vegetais (*Pontederia cordata* e *Salvinia auriculata*) foram coletadas na cidade de Aquidauana entre as latitudes: 20°23'36,8" e 20°23'28,8" e longitudes 55°48'51,5" e 55°47'04,9". O local se trata de parte da bacia hidrográfica do rio Aquidauana, dentro destas coordenadas está localizado o Parque Natural Municipal da Lagoa Comprida (Figura 4).

Aquidauana é uma cidade do interior de Mato Grosso do Sul, encontra-se inserida em um ecótono Cerrado/Pantanal, área com muita diversidade biológica e fácil acesso à ambientes com características dos dois ecossistemas. O Parque Natural Municipal da Lagoa Comprida é uma das poucas áreas verdes destinadas ao lazer e convívio da população nesta cidade, o mesmo possui cerca de 74 hectares distribuídos em: espelho d'água (27 hectares), área de lazer (12 hectares) e vegetação remanescente e secundária (35 hectares) (SILVA e JÓIA, 2001), o parque teve sua área de lazer revitalizada pela atual gestão municipal fato que aumenta o apelo social pela preservação do local pela população.

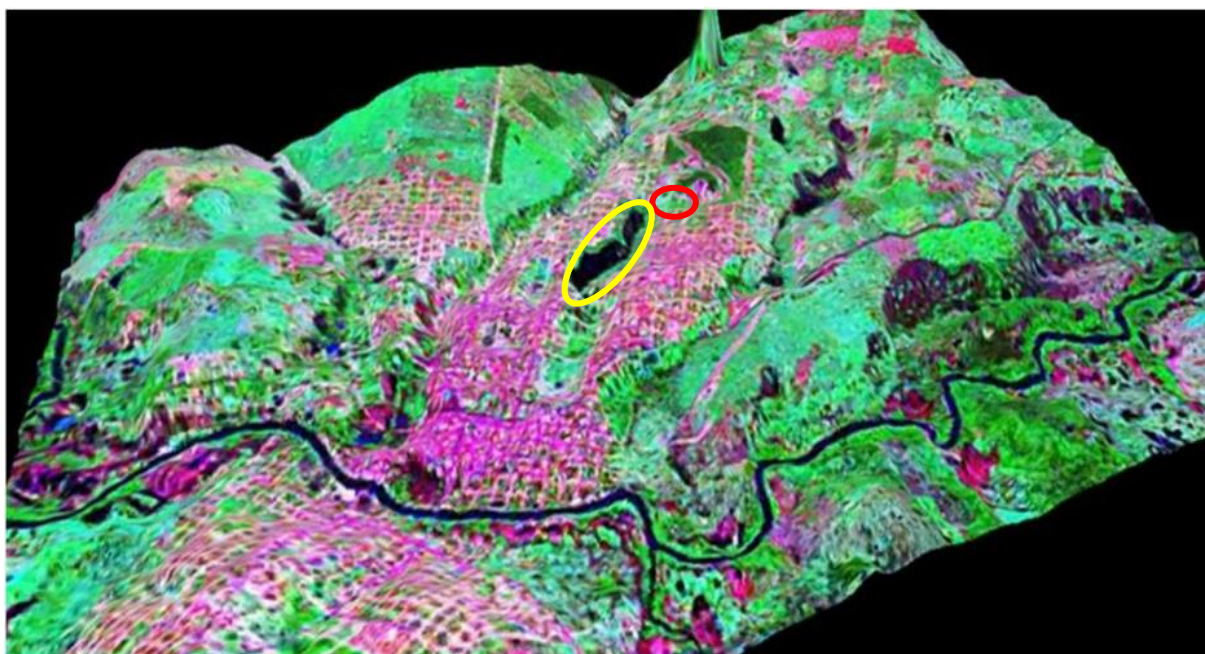


Figura 4: Imagem topográfica do local de coleta (Lagoa Comprida). O círculo vermelho marca o local do antigo aterro que havia nas proximidades da lagoa e em amarelo a lagoa, local de coleta das macrófitas.

Fonte: Departamento de Geociências de Aquidauana.

Trabalhos de investigação pela preservação do parque foram temas de estudos (Monografias e dissertações) nas últimas décadas pelos cursos de Ciências Biológicas e Geografia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, que geraram inclusive relatório sanitário do parque (SONTAG e MELLO, 2013).

O espelho d'água e vegetação remanescente são as áreas mais sensíveis devido ao desenvolvimento urbano e aumento da população circunvizinha. Há poucos anos o aterro municipal, que se localizava próximo ao parque, teve seu funcionamento suspenso, entretanto a população local não tomou consciência imediata dos riscos ambientais e ele tonou-se um local de depósito clandestino de resíduos.

4.2 – Material vegetal

As plantas coletadas foram lavadas em água corrente para remoção de sujeiras aderidas às raízes. Após a lavagem, levando em consideração seu modo de vida onde a raiz está aderida ao substrato, o pecíolo submerso e lâmina foliar emersa *Pontederia parviflora* foi separada em raízes, pecíolos/caules e folhas enquanto *Salvinia auriculata* foi utilizada a planta toda devido a seu porte e modo de vida onde toda a estrutura vegetal encontra-se uniformemente distribuída em contato com a água. As plantas limpas foram secas em estufa com circulação de ar à 50 °C por 72 horas até obtenção de peso constante. A biomassa seca foi triturada em moinho de facas e peneirada em tamis de 60 mesh, para obtenção de uma granulometria uniforme (Figura 5).



Figura 5: Etapas de preparação do material vegetal, (A) secagem, (B) trituração e (C) embalagem para armazenamento.



4.3 – Produtos Químicos e Reagentes

A utilização de aparelhagem de precisão e reagentes de grau analítico são essenciais tanto para a produção de extratos, quanto na constatação da presença dos metais propostos para as análises da biomassa das espécies selecionadas.

Para tanto foram usados na produção dos extratos os solventes etanol de grau P.A. e água ultrapura (Milli-Q[®]). Para quantificação de fenóis totais e taninos os extratos foram diluídos em solução contendo metanol de grau P.A. (Dinamica[®], BRASIL) e água ultrapura, para as análises foram utilizados ainda padrão de ácido gálico (Sigma[®], EUA) e os reagentes Folin-Ciocalteu (Sigma[®], EUA) e carbonato de sódio (Vetec[®], BRASIL), a quantificação de taninos conta ainda com etapa de precipitação com pó-de-pele (Sigma[®], EUA).

A diluição dos extratos e preparo para análises em CLAE, foram usados solventes metanol de grau CLAE (J.T. Baker SOLUSORB[®], MÉXICO) e água ultrapura; acetonitrila de grau HPLC e água ultrapura foram usados como eluentes. Para o preparo das amostras padrões, foram utilizadas as soluções padrões estoque monoelementares de 1000 mg L⁻¹ dos metais As, Cd, Cr, Pb, Mg, Mn, Mo e Ni (SpecSol[®], SRM-682, EUA).

Para a digestão das amostras vegetais secas e da solução aquosa residual dos ensaios de remoção do metal cádmio, foram utilizados ácido nítrico (Dinamica[®], BRASIL), peróxido de hidrogênio 30% (Merck[®], ALEMANHA) e água ultrapura.

4.4 – Preparação dos extratos

Uma parte do material triturado de cada amostra foi submetida ao extrator de fluido pressurizado, Dionex - modelo ASE 150, equipado com um cartucho de extração de 100 mL (Figura 6 A). O método de extração desenvolvido pelo Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas (LaPNEM), utilizando uma mistura de solventes Etanol e Água na proporção de 7:3 (v/v) sendo o processo de extração repetido por três vezes com a seguinte configuração; temperatura a 125 °C com ciclo estático de 15 minutos, 100% de lavagem e purga de 60 segundos em 5 ciclos. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo e liofilizados (Figura 6 B e C) em liofilizador da Martin Christ modelo Alpha 2-4 Ldplus acoplado a uma bomba de vácuo da VACUUBRAND modelo Hybrid RC6. O rendimento dos extratos foi calculado pela expressão:

$$\text{Rendimento (\%)} = (\text{massa do extrato} / \text{massa do material vegetal}) \times 100.$$

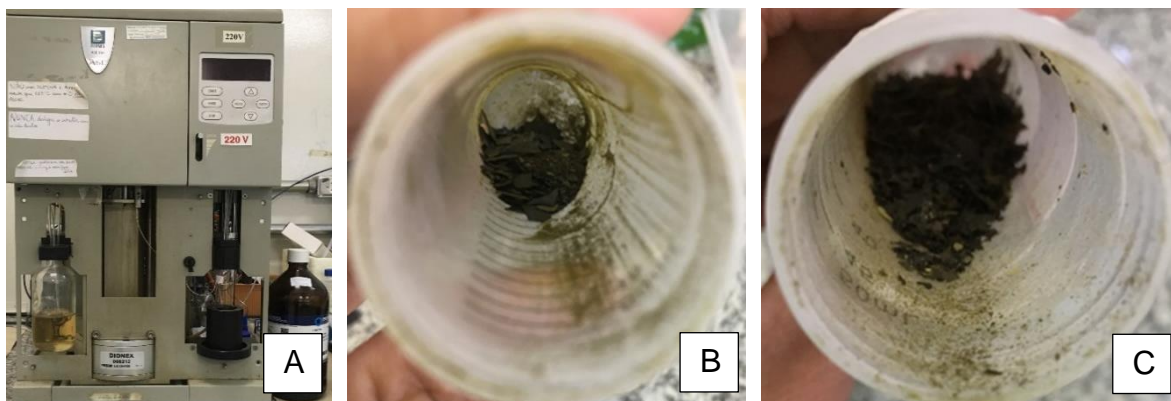


Figura 6: Extrator por fluido pressurizado (A) e aspecto do extrato já liofilizado (B, C).

Após a preparação dos extratos o material vegetal residual foi reservado tornando-se assim quatro novas amostras, como exemplificado no esquema da Figura 7 onde é possível compreender a designação de cada amostra.

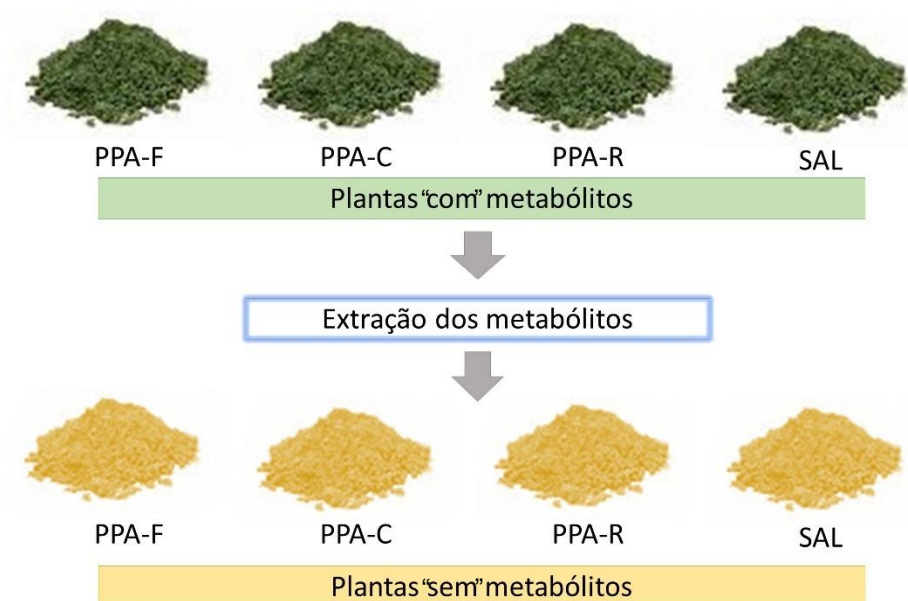


Figura 7: Produção de extratos e amostras utilizadas na quantificação de metais na biomassa e nos ensaios de remoção de cádmio. Onde PPA-F, PPA-C, PPA-R referem-se respectivamente às amostras de *Pontederia parviflora*, folha, pecíolo/caule e raiz, e ainda SAL referindo-se às amostras de *Salvinia auriculata*.

Após a extração dos metabólitos o material vegetal residual de cada amostra inicial recebeu a designação de amostras "sem" enquanto as amostras iniciais são



identificadas como “com”, em alusão a presença de metabólitos secundários, onde amostras “sem” tiveram seus metabólitos extraídos e amostras “com”, apresentam metabólitos em sua estrutura.

4.5 – Determinação de Fenóis Totais e Taninos

A determinação do teor de fenóis totais dos extratos seguiu a metodologia adaptada (HERALD et al., 2012). Água ultrapura (sem amostra ou padrão) foi utilizada como controle branco. O controle de amostra foi feito sem a adição dos reagentes Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. Ácido gálico foi utilizado para a obtenção da curva de calibração. Foi adicionado em placa de 96 poços, 75 µL de água ultrapura seguido pela adição de 75 µL de solução padrão de ácido gálico na concentração de 0,5 mg/mL, realizando diluição seriada a partir desta etapa, homogeneizando e transpassando 75 µL para o próximo poço obtendo ao final da placa 12 concentrações em diluição seriada.

Após a diluição, foi adicionado 75 µL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído em água ultrapura na proporção de 1:1 (v/v). As soluções foram homogeneizadas e após 6 minutos cada poço recebeu 100 µL de carbonato de sódio na concentração de 75 g L⁻¹ e homogeneizadas novamente, as soluções foram então cobertas e mantidas no escuro por 90 minutos. As leituras foram feitas em triplicata por um leitor espectrofotométrico de microplacas em 765 nm.

Adaptando metodologia proposta por Herald, Gadgil and Tilley (2012), as amostras foram preparadas diluindo 4 mg de cada extrato em solução de metanol: água ultrapura na proporção de 1:1 (v/v) resultando em uma concentração de 1 mg mL⁻¹ de extrato vegetal. Em paralelo para a quantificação de taninos, uma alíquota de 2 mL de amostras de cada extrato diluído foi postas em contato com 10 mg pó-de-pele e deixados em agitação mecânica por 45 min, centrifugados, a reação se baseia no fato dos taninos precipitarem junto as proteínas sendo coletado apenas os fenóis não tanantes no sobrenadante. Após estes procedimentos as amostras seguiram as mesmas etapas realizadas com a amostra controle, porém a diluição seriada com 5 concentrações ao final da placa.

Os teores de fenóis totais e taninos foram expressos em mg de equivalente ácido gálico/g de extrato bruto. Os cálculos para obtenção dos teores de fenóis totais e taninos nos extratos foram o seguinte:

Fenóis na amostra ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = Massa fenóis totais (μg)/Massa extrato usado (mg)

Taninos na amostra ($\mu\text{g}/\text{mg}$) = Massa fenóis totais (μg) - Massa fenóis não tanantes (μg)/Massa extrato usado (mg)

4.6 – Avaliações dos extratos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um Detector de Arranjo de Diodos e Espectrometria de Massas tandem (CLAE-DAD-EM/EM)

As amostras de cada extrato (descritos na seção 4.4) foram preparadas em escala analítica, diluindo os mesmos em solução de metanol: água na proporção de 1: 1 (v/v), na concentração de 1 mg mL^{-1} e filtradas em filtros de PTFE (Millex 0,22 mm x 13 mm, Millipore®). Foi injetado 3 μL de cada amostra no CLAE-DAD-EM/EM (UFLC, Shimadzu®) (Figura 8), com duas bombas LC-20AD, auto injetor SIL-20A, controlador CBM-20A, forno CTO-20A, detector de arranjo de diodos SPD-M20A (Shimadzu®) e espectrômetro de massas MicrOTOF-Q III com ionização por *eletrospray* (IES) e analisador QqTOF (quadrupolo e tempo de voo em sequência) (Bruker Daltonics®). A coluna cromatográfica empregada foi uma Kinetex C-18 ($2,6 \mu$, 100 Å, 150 x 2,1 mm, Phenomenex®).



Figura 8: Sistema de cromatografia líquida do *Laboratório de Produtos Naturais e Espectrometria de Massas* (LaPNEM).

O gradiente de eluição foi preparado com diferentes proporções de Acetonitrila (A) e água ultrapura (B), ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico v/v, fluxo de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, seguindo o gradiente: 0-2 min - 3% de B, 2-25 min – de 3 a 25% de B, 25-40 min – de 25 a 80% de B e 40-43 min - 80% de B, seguidos de 5



minutos para lavagem e reestabilização da coluna. A coluna cromatográfica foi mantida a 50 °C durante as análises cromatográficas. Todas as amostras foram analisadas nos modos de ionização positiva e negativa com faixa de 120 a 1200 Da. O gás de nebulização (4 Bar), de secagem (9 L min⁻¹) e de colisão utilizado foi o nitrogênio. A voltagem do capilar foi de 2.500 kV.

4.7 – Digestão por Micro-ondas

As amostras dos vegetais secos foram digeridas em micro-ondas da MARCA (MODELO) utilizando a metodologia com parâmetros para digestão de plantas aquáticas do manual do equipamento. 400 mg de cada amostra foi adicionada ao tubo digestor com adição de 3 mL de ácido nítrico, 2 mL de água ultrapura e 1 mL de peróxido de hidrogênio. Nos ensaios de remoção do metal cádmio foi realizado o experimento descrito no tópico 4.11 (p. 31), após os procedimentos, o material vegetal foi removido e o residual aquoso foi preparado para a análise em Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (EEO-PIA), seguindo os mesmos procedimentos descritos anteriormente. A programação utilizada para o digestor por micro-ondas é apresentada na tabela a seguir (Tabela 1).

Tabela 1: Parâmetros para o sistema de digestão

| Etapa | Potência (%*) | Temperatura (°C) | Tempo de rampa (min) | Tempo de retenção (min) | Pressão (Bar) |
|-------|---------------|------------------|----------------------|-------------------------|---------------|
| 1 | 80 | 150 | 5 | 10 | 80 |
| 2 | 90 | 190 | 2 | 20 | 80 |
| 3 | 0 | 50 | 1 | 10 | 60 |

*100% do poder corresponde a 1450 w.

4.8 – Análise em EEO-PIA e Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ)

Após a digestão, o volume de cada tubo digestor foi transferido para tubos Falcon e completado para 15 mL e avaliados quando ao seu teor de metais pesados por Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado (EEO-PIA), aparelho de espectrometria da marca Thermo modelo iCAP 6000. A programação utilizada para as leituras está apresentada na tabela a seguir (Tabela 2).



Tabela 2: Condições instrumentais da análise para EEO-PIA para análises dos elementos

| Parâmetros | Configurações |
|--|-------------------------|
| Potência RF (W) | 1250 |
| Fluxo de amostra (L min ⁻¹) | 0,35 |
| Fluxo de gás plasma (L min ⁻¹) | 12 |
| Tempo de integração (s) | 5 |
| Tempo de estabilização (s) | 20 |
| Tempo de nebulização (psi) | 30 |
| Vista de plasma | Axial |
| Gás (99,999%) | Ar |
| Analitos | Linha de emissão (nm) |
| | As 189,042; Cd 228,802; |
| | Cr 283,563; Mg 279,553; |
| | Mn 257,610; Mo 202,030 |
| | Ni 221,647; Pb 220,353 |

Foram feitas ainda doze leituras da amostra “Branco” e o desvio padrão calculado foi utilizado nas equações para obtenção do limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) como proposto pelo manual do equipamento:

$$LD = 3 \times (\text{Desv. Pad.} / b)$$

$$LQ = 10 \times (\text{Desv. Pad.} / b)$$

Onde: Desv. Pad. = desvio padrão das leituras do “Branco”

b = Coeficiente de ganho

A curva de calibração para cada metal analisado foi produzida com 7 pontos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µg mL⁻¹, com diluições simples a partir de padrões estoque monoelementares de 1000 mg L⁻¹ em água ultrapura acidificada com 1% de HNO₃. A equação da reta, cujos cálculos foram usados para obtenção da concentração dos metais presentes nas amostras e nos ensaios de remoção foram geradas pela plotagem da emissão IR (radiação infravermelha) vs. a concentração de metal em 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 µg mL⁻¹. A curva de calibração para a quantificação de Cd nos ensaios de remoção foi feita com 12 pontos nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg mL⁻¹. Todas as medidas foram feitas em triplicatas.

4.10 – Quantificação de metais na biomassa e ensaios de remoção



As quatro amostras iniciais de *Pontederia parviflora* (folhas, pecíolo/caule e raízes) e *Salvinia auriculata* (planta toda), foram submetidas a extração exaustiva dos seus metabólitos e após o processo de extração dos metabólitos, as amostras vegetais foram separadas em dois grupos classificados como “COM” e “SEM”, sendo “COM” as amostras *in natura*, ou seja, contendo ainda seus metabólitos, e “SEM”, como já dito, amostras sem a presença dos metabólitos secundários após a extração (extração exaustiva por extrator de fluido pressurizado). As amostras foram então analisadas para aferição dos teores de metais pré-existentes em sua estrutura e se a metodologia de extração dos metabólitos também seria capaz de remover estes metais.

Foram separadas 0,4 g de cada amostra, submetidas a digestão por micro-ondas e analisadas em EEO-PIA. O cálculo para quantificação de metais presentes na biomassa dessas macrófitas foi realizado com a seguinte fórmula:

$$\text{Conc. de metal na amostra } (\mu\text{g/g}) = \text{Massa metal } (\mu\text{g}) \text{ encontrada} / \text{Massa de amostra usada (g)}$$

4.11 – Ensaios de remoção de cádmio

Os ensaios de remoção de cádmio foram realizados utilizando amostras de biomassa das espécies com e sem a presença dos metabólitos. Em balança analítica foram pesadas 0,2 g de cada amostra do material vegetal seco e triturado, para ser usada nos ensaios de remoção de cádmio previamente diluído em um volume de 20 mL de solução controle (solução padrão de Cd + água deionizada acidificada com 1% de HNO), padronizando a proporção de 1 g de biomassa para cada 100 mL de solução, a biomassa foi mantida em agitação em contato com a solução controle por 15 minutos. O design experimental é exemplificado na Figura 9, foi adotada as concentrações de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a primeira bateria de ensaios, $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a segunda e $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a terceira.

Após o período de contato foi feita a filtração do conteúdo com papel filtro qualitativo para separação do residual aquoso e sólido. O residual aquoso foi preparado para digestão em micro-ondas, como descrito no tópico “Digestão por micro-ondas”, e analisado em aparelho de espectrometria do tipo EEO-PIA.

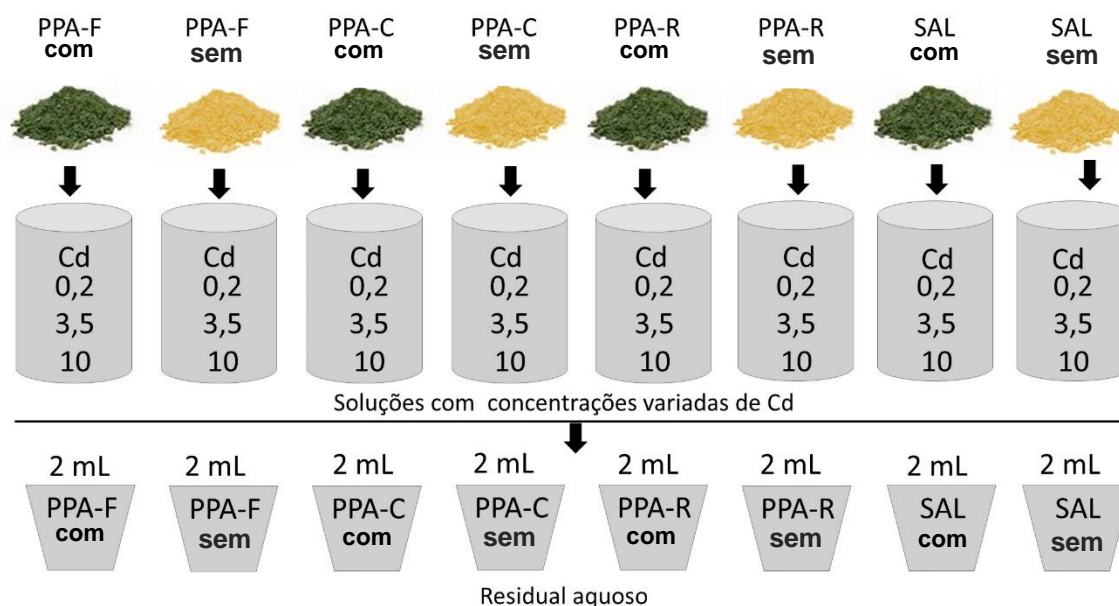


Figura 9: Design experimental dos ensaios de remoção de cádmio, concentrações em mg mL^{-1} , realizadas com amostras de *Pontederia parviflora* folhas (PPA-F), pecíolo/caule (PPA-C), raízes (PPA-R) e *Salvinia auriculata* (SAL), amostras seguidas de “com”, possuem em sua estrutura os metabólitos secundários, amostras seguidas de “sem” são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos.

As concentrações de metal, tanto das soluções controle, que continham apenas o metal cádmio diluído em água acidificada nas concentrações das respectivas etapas sem entrar em contato com o material vegetal, quanto de amostras do residual aquoso dos ensaios de remoção, obtidas com auxílio do EEO-PIA, foram usadas para obter da quantidade de metal removido com o seguinte cálculo:

$$\% \text{ de metal removido} = (\Delta C / \text{Concentração padrão}) \times 100$$

Onde: $\Delta C = \text{Concentração do controle} - \text{Concentração da amostra}$

A relação entre a presença de metabólitos secundários e a remoção de metal por fitorremediação passiva baseia-se nestes resultados.

4.12 – Análise estatística

Os resultados obtidos nas análises do perfil de metal das amostras e dos ensaios de remoção de cádmio foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (significância de 5 %) com auxílio do software SISVAR e os gráficos produzidos a partir dos softwares PAST e EXCEL.



5 – Resultados e Discussão

5.1 – Rendimento dos extratos produzidos

O maior rendimento do processo de extração dos metabólitos (Tabela 3) foi obtido para amostras das folhas e do pecíolo/caule de *Pontederia parviflora*, em contraste a isso, amostras de sua raiz obtiveram o pior resultado, podendo, esse fato, ser associado com a estrutura celular das raízes dessa planta, mais resistente que as demais amostras.

Tabela 3: Rendimento da produção de extratos a partir da biomassa seca das macrófitas.

| Amostra | Biomassa seca (g) | Extrato produzido (g) | Rendimento (%) |
|--------------------------------------|-------------------|-----------------------|----------------|
| <i>P. parviflora</i> (Folhas) | 11,7 | 3,4 | 29,4 |
| <i>P. parviflora</i> (Pecíolo/Caule) | 8,8 | 2,4 | 27,4 |
| <i>P. parviflora</i> (Raiz) | 28,0 | 0,7 | 2,6 |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 16,2 | 1,0 | 6,9 |

Vale ressaltar que não houve aprimoramento individualizado para potencializar a extração dos metabólitos dessas amostras em específico, trata-se uma metodologia “exaustiva”, sem uso de gradiente de polaridade para enriquecimento de compostos fenólicos no extrato.

5.2 – Determinação de fenóis totais e taninos

A porcentagem de fenóis totais e taninos, presentes na biomassa dessas macrófitas, apresentam valores promissores para o estudo, uma vez que estes são considerados os principais metabólitos com atividades antioxidante e anti-radicalar, consequentemente com maior desempenho no sequestro de metais por estes compostos fenólicos (ZHENG e WANG, 2001; DAI e MUMPER, 2010).

Os resultados demonstram que *Salvinia auriculata* (Tabela 4), possui a maior porcentagem desses compostos fenólicos, apresentando também a maior porcentagem de taninos dentre seus fenóis. Além do rápido ganho de biomassa, as concentrações de fenóis justificariam facilmente à escolha destas plantas em fitorremediação.



Taninos, por serem moléculas com alto peso molecular, possui um número maior de sítios de ligação para trocas iônicas e sequestro de metais contaminantes, em tese, aumentando o potencial de adsorção desses metais em amostras de biomassa com maior concentração desses compostos. É possível visualizar que, quando considerada a massa de fenóis produzidos a partir dessas macrófitas, amostras das raízes de *P. parviflora* apresentaram a maior concentração de taninos dentre os fenóis presentes no extrato produzido (tabela 4), porém possui o pior rendimento de extração como observado no tópico anterior e Tabela 3.

Tabela 4: Teor (média \pm desvio padrão, n=5) de fenóis totais e taninos nas amostras avaliadas quanto ao potencial de fitorremediação. Resultados expressos em % de equivalente ácido gálico no extrato.

| Amostra | Rendimento extrato (%) | % de fenóis (Desv. Pad.) | % de taninos dentre os fenóis (Desv. Pad.) |
|--|------------------------|--------------------------|--|
| <i>Pontederia parviflora</i> (Folhas) | 29,36 | 6,11 c (1,26) | 7,93 b (1,29) |
| <i>Pontederia parviflora</i> (Pecíolo/Caule) | 27,39 | 1,64 a (0,35) | 3,35 a (0,13) |
| <i>Pontederia parviflora</i> (Raiz) | 2,58 | 2,92 b (1,24) | 14,7 c (0,12) |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 6,38 | 6,25 c (1,24) | 9,85 b (0,46) |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância.

Os resultados demonstram que amostras das folhas de *P. parviflora* e *S. auriculata* não diferem quanto ao teor de fenóis totais. Em relação a presença de taninos, folhas e raízes de *P. parviflora* e *S. auriculata* folhas de *P. parviflora*, não diferem entre si. A diferença estatística em teor de fenóis totais entre as amostras pode estar associada às funções das estruturas analisadas, uma vez que os maiores teores de fenóis foram encontrados em estruturas fotossintetizantes (Tabela 5), o efeito fotoprotetor, devido à absorção UV pelos fenóis, favorece a hipótese de função protetora destes compostos nestas estruturas. Em relação ao aumento na proporção de taninos nas amostras de raiz de *P. parviflora* pode ser associado a atividade antimicrobiana desses compostos (WIJEKOON et al., 2011) uma vez que é uma estrutura subterrânea e submersa.

Tabela 5: Concentração (média \pm desvio padrão, $n=5$) em $\mu\text{g mg}^{-1}$ de fenóis tanantes e não tanantes em extratos de *P. parviflora* e *S. auriculata*.

| Amostra | Concentração (Desv. Pad.) Fenóis | Concentração (Desv. Pad.) Taninos |
|---|-------------------------------------|--------------------------------------|
| <i>Pontederia parviflora</i> (Folhas) | 61,12 c \pm 1,26 | 5,32 bc \pm 1,29 |
| <i>Pontederia parviflora</i> (Pecíolo/Caule) | 16,36 a \pm 0,35 | 0,56 a \pm 0,13 |
| <i>Pontederia parviflora</i> (Raiz) | 29,23 b \pm 1,24 | 4,24 b \pm 0,12 |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 62,56 c \pm 1,24 | 6,21 c \pm 0,46 |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância.

5.3 – Avaliação dos extratos por Cromatografia Líquida (CLAE-DAD-EM/EM)

Os extratos das macrófitas foram preparados e analisados por CLAE-DAD-EM/EM tiveram suas substâncias identificadas a partir dos dados de UV, EM e EM/EM. Para a identificação dos picos cromatográficos foram utilizados os dados gerados em duplicatas a partir de análises no modo de ionização positivo e negativo. Entretanto, os principais dados para confirmação dos compostos são do modo de ionização negativa devido à qualidade e intensidade dos picos.

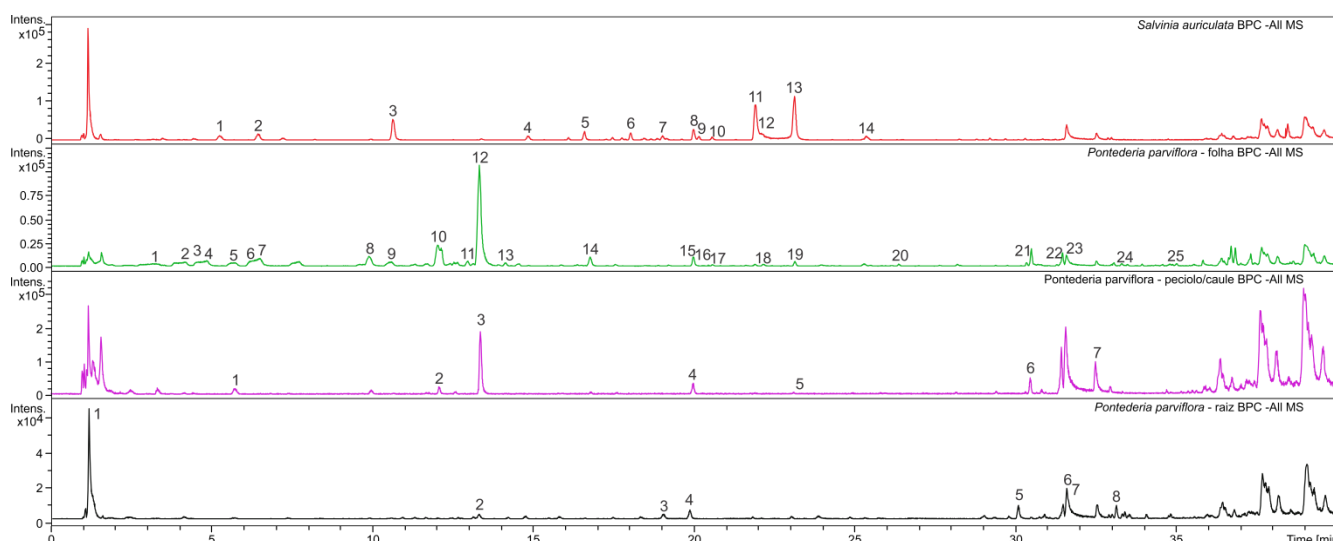


Figura 10: Cromatograma de *Pontederia cordata* e *Salvinia auriculata* obtidos por CLAE no modo de ionização negativo, em vermelho extrato de *Salvinia auriculata* (SAL), em verde *Pontederia parviflora*-folhas (PPA-F), em lilás *Pontederia parviflora*-pecíolo/caule (PPA-C) e em preto extrato de *Pontederia parviflora*-raízes (PPA-R). A identificação dos picos está descrita nas tabelas 6 (*Salvinia auriculata*), 7 (*Pontederia parviflora*-folha), 8 (*Pontederia parviflora*-pecíolo/caule) e 9 (*Pontederia parviflora*-raiz).



Os cromatogramas (Figura 10) apresentam os picos dos compostos analisados e as Tabelas 6-9 trazem os compostos identificados juntos com as respectivas informações de espectro de massa, fragmentação e UV usadas na identificação deles. Os compostos que não puderam ser identificados (Tabela 6) estão com a sigla NID (não identificado).

A maioria dos compostos identificados são derivados de flavonoides e fenilpropanoides como ácidos clorogênicos.

Dentre os picos encontrados (Figura 10), para *S. auriculata* foram encontrados 14 picos onde os compostos 11 e 13 apresentaram os picos com maior intensidade, esses compostos foram identificados como isômeros do salvinosídeo II com base em informações do íon principal com m/z 473,0732 e 473,0730, respectivamente, compatível com a fórmula química $C_{22}H_{18}O_{12}$, compatível com os dados apresentados por Li et al. (2013), 19 picos foram encontrados para *P. parviflora* (folhas) e 7 picos para *P. parviflora* (pecíolo/caule) onde os compostos 12 e 3, respectivamente, foram os compostos cujos picos apresentaram a maior intensidade, o pico 12 de PPA-F foi caracterizado com um derivado do ácido cafeico ligado a um grupo $C_5H_8O_4$ e o pico 3 como ácido clorogênico-O-pentosil, foram encontrados ainda 8 picos para *P. parviflora* (raiz) em que o composto 1 apresentou o pico com maior intensidade, com dados cromatográficos e espectrométricos compatíveis com um derivado do ácido quínico.

Os picos 7 de SAL e 12 e 15 de PPA-F apresentaram pesos moleculares de m/z 461,0731; 593,1525 e 679,1515 respectivamente. Apesar das massas diferentes os seus espectros de UV, apresentaram duas bandas centradas em 265 e 345 nm, característico de um esqueleto flavonol, e nos espectros EM-EM (energia de colisão 15 eV) o fragmento principal para os três compostos é o íon m/z 285, compatível com o flavonol kaempferol, sendo possível caracterizar estes picos como derivados do flavonol kaempferol, provavelmente glicosilado ou galactosilado. Foram ainda encontrados os picos 8, 9 e 12 nos tempos de retenção de 20,0, 20,6 e 22,1 min em *Salvinia auriculata* e 16, 17 e 18 nos tempos de retenção de 20,0, 20,6 e 22,2 min em *Pontederia parviflora* (Folhas) que apresentaram absorção no UV (duas bandas em 285 e 314 nm), formulas moleculares e padrões de fragmentação compatíveis com derivados do ácido dicafeoilquínico (CLIFFORD et al., 2003, 2005), os picos 9 e 12 de *S. auriculata* e 17 e 18 de *P. parviflora* (Folhas) foram identificados por



comparação com padrões autênticos como os ácidos 3,5-dicafeoilquínicos e 4,5-dicafeoilquínicos, respectivamente.

Os picos 8 de *S. auriculata* e 16 de *P. parviflora* (Folhas) foram analisados e seus fragmentos comparados com as chaves de identificação destes compostos propostas por Clifford et al. (2003, 2005), nestas chaves de identificação o fragmento m/z 173 ($M-2caf-H_2O$) é característico de derivados substituídos na posição 4, esta informação aliada a ausência de íons característicos de Ácido 1,4-dicafeoilquinico (m/z 299 e m/z 203), permitiram a identificação desta substância como o ácido 3,4-dicafeoilquínico.



Tabela 6: Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Salvinia auriculata* no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

| Pico | Tempo de Retenção (min) | Composto | Fórmula Molecular | Erro ppm | UV (nm) | Modo Negativo (m/z) | | Modo Positivo (m/z) | |
|------|-------------------------|------------------------------------|---|----------|-----------|---------------------|---|---------------------|--|
| | | | | | | EM | EM/EM | EM | EM/EM |
| 1 | 5,3 | NID | C ₁₄ H ₁₆ O ₉ | -2,4 | 260 - 297 | 327,0729 | 191,0635; 173,0485 | 329,0874 | - |
| 2 | 6,4 | derivado do ácido dicafeoilquínico | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | -2,8 | 297 - 325 | 353,0888 | 191,0548; 179,0277 173,0345; 161,0196 | 163,0386 | - |
| 3 | 10,7 | ácido clorogênico | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | -2,1 | 300 - 325 | 353,0885 | 191,0571; 179,0375; 173,0456; 161,0161 | 355,1037 | 163,0390; 145,0279 |
| 4 | 14,8 | NID | C ₁₀ H ₁₀ O ₃ | 2,8 | 304 - 334 | 177,0548 | 161,0244 | - | - |
| 5 | 16,6 | NID | C ₁₈ H ₂₄ O ₁₀ | 3,3 | 285 | 399,1284 | 153,0273 | - | - |
| 6 | 18,0 | NID | C ₃₁ H ₃₀ O ₁₅ | -0,7 | 283 - 329 | 641,1516 | 449,1000; 405,0954; 327,0566; 297,0419; 271,0588; 191,0570; 173,0441; 161,0223 | 643,1681 | 311,0581; 299,0575; 271,0578; 231,0693; 191,0350; 163,0403 |
| 7 | 19,0 | kaempferol-O-glucuronil | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂ | -1,2 | 266 - 346 | 461,0731 | 285,0388 | 463,0880 | 287,0569 |
| 8 | 20,0 | 3,4 ácido dicafeoilquínico | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | -2,1 | 297 - 325 | 515,1206 | 335,0795; 191,0562; 179,0344; 173,0477; 161,0250; 155,0380 | 517,1361 | 163,0399 |
| 9 | 20,2 | NID | C ₃₁ H ₃₀ O ₁₄ | -0,1 | 283 - 329 | 625,1564 | 433,0786; 281,0457; 191,0571; 161,0251 | 627,1737 | 283,0591; 163,0395 |
| 10 | 20,6 | 3,5 ácido dicafeoilquínico | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | -1,4 | 298 - 329 | 515,1202 | 191,0570; 179,0340; 161,0270 | - | - |
| 11 | 21,9 | derivado do salvinosídeo II | C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂ | -1,3 | 330 | 473,0732 | 413,0480; 285,0481; 241,0490 | 475,0890 | 313,0342; 295,0262; 267,0279 |



| Pico | Tempo de Retenção (min) | Composto | Fórmula Molecular | Erro ppm | UV (nm) | Modo Negativo (m/z) | | Modo Positivo (m/z) | |
|------|-------------------------|--------------------------------|--|----------|-----------|---------------------|--|---------------------|---------------------------------|
| | | | | | | EM | EM/EM | EM | EM/EM |
| 12 | 22,1 | 4,5 ácido dicafeoilquínico | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | -0,3 | 298 - 329 | 515,1197 | 325,0149; 191,0596; 179,0330; 173,0470; 161,0213 | 499,1243 | - |
| 13 | 23,1 | derivado do salvinosídeo II | C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂ | -1,0 | 330 | 473,0730 | 413,0548; 327,0514; 267,0216; 241,0516 | 475,0894 | 313,0362; 267,0297; 239,0362 |
| 14 | 25,3 | NID | C ₂₇ H ₂₃ NO ₁₃ | -1,9 | 284 - 329 | 568,1108 | 413,0473; 241,0603 | 570,1233 | 313,0331; 295,0226 |

Tabela 7: Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Pontederia parviflora* (folhas) no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

| Pico | Tempo de Retenção (min) | Composto | Fórmula Molecular | Erro ppm | UV (nm) | Modo Negativo (m/z) | | Modo Positivo (m/z) | |
|------|-------------------------|---|---|----------|-----------|---------------------|--------------------|---------------------|-------|
| | | | | | | EM | EM/EM | EM | EM/EM |
| 1 | 3,2 | derivado do ácido glucônico – ácido cafeico | C ₆ H ₁₀ O ₈ | -3,9 | 300 - 324 | 209,0311 | - | - | - |
| 2 | 4,2 | derivado do ácido glucônico – ácido cafeico | C ₆ H ₁₀ O ₈ | 0,1 | 300 - 324 | 209,0303 | - | - | - |
| 3 | 4,5 | derivado do ácido glucônico – ácido cafeico | C ₁₅ H ₁₆ O ₁₁ | -1,1 | 300 - 326 | 371,0624 | 191,0234 | - | - |
| 4 | 4,8 | derivado do ácido glucônico – ácido cafeico | C ₆ H ₁₀ O ₈ | -0,5 | 300 - 324 | 209,0304 | - | - | - |
| 5 | 5,7 | derivado do triptofano | C ₁₁ H ₁₁ N ₂ O ₂ | 1,2 | 280 | 203,0824 | - | - | - |
| 6 | 6,2 | derivado do ácido glucônico – ácido cafeico | C ₁₅ H ₁₆ O ₁₁ | -2,2 | 299 - 325 | 371,0628 | 209,0254; 191,0182 | - | - |



| Pico | Tempo de Retenção (min) | Composto | Fórmula Molecular | Erro ppm | UV (nm) | Modo Negativo (m/z) | | Modo Positivo (m/z) | |
|------|-------------------------|--|---|----------|-----------|---------------------|--|---------------------|----------|
| | | | | | | EM | EM/EM | EM | EM/EM |
| 7 | 6,5 | derivado do ácido glucônico – ácido cafeico | C ₆ H ₁₀ O ₈ | -0,9 | 300 - 324 | 209,0303 | - | - | - |
| 8 | 9,9 | derivado do ácido cafeico | C ₉ H ₈ O ₄ | 0,6 | 299 - 320 | 179,0349 | - | 163,0371 | - |
| 9 | 10,6 | ácido clorogênico | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 1,9 | 285 - 325 | 353,0871 | 191,0572; 161,0197 | 163,0375 | - |
| 10 | 12,1 | ácido cafeico-C ₅ H ₈ O ₄ | C ₁₄ H ₁₅ O ₈ | 3,6 | 299 - 324 | 311,0786 | 271,0942; 255,0767; 179,0354; 161,0316; 149,0488 | 625,1748 | 163,0377 |
| 11 | 12,9 | NID | C ₁₃ H ₁₂ O ₈ | -4,1 | 300 - 325 | 295,0471 | 179,0384 | - | - |
| 12 | 13,3 | ácido cafeico-C ₅ H ₈ O ₄ | C ₁₄ H ₁₅ O ₈ | 1,0 | 300 - 324 | 311,0787 | 311,0823; 271,0922; 243,0617; 179,0356; 161,0252; 149,0456 | 313,0898 | 163,0379 |
| 13 | 14,1 | NID | C ₁₆ H ₁₆ O ₈ | -4,8 | 285 - 320 | 335,0789 | 179,0434; 161,0292 | - | - |
| 14 | 16,8 | ácido cafeico-C ₅ H ₈ O ₃ | C ₁₄ H ₁₄ O ₇ | -3,0 | 298 - 324 | 293,0676 | 179,0378; 161,0228 | - | - |
| 15 | 20,0 | kaempferol-O-rutenosídeo | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | -2,2 | 269 - 346 | 593,1525 | 477,0882; 285,0415 | 595,1640 | 287,0549 |
| 16 | 20,0 | 3,4 ácido dicafeoilquínico | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | -0,9 | 269 - 346 | 515,1200 | 191,0603; 179,0335; 173,0407; 161,0183 | - | - |
| 17 | 20,6 | 3,5 ácido dicafeoilquínico | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | -1,5 | 280 - 320 | 515,1162 | - | - | - |
| 18 | 22,2 | 4,5 ácido dicafeoilquínico | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | -1,5 | 280 - 320 | 515,1202 | - | - | - |
| 19 | 23,1 | kaempferol-O-ramnosil-O-malonil-O-glucosídeo | C ₃₀ H ₃₂ O ₁₈ | 0,2 | 267 - 347 | 679,1515 | 635,1623; 489,1055; 285,0380 | 681,1630 | 287,0554 |
| 20 | 26,4 | derivado do kaempferol | C ₂₉ H ₃₂ O ₁₆ | -0,6 | 273-335 | 635,1622 | - | - | - |
| 21 | 30,4 | NID | C ₁₈ H ₃₂ O ₅ | -3,4 | 276 - 311 | 327,2188 | 171,1031 | - | - |
| 22 | 31,4 | NID | C ₁₈ H ₃₄ O ₅ | -3,5 | 276 - 311 | 329,2345 | 229,1431; 211,1313; 171,0995 | - | - |



| Pico | Tempo de Retenção (min) | Composto | Fórmula Molecular | Erro ppm | UV (nm) | Modo Negativo (m/z) | | Modo Positivo (m/z) | |
|------|-------------------------|----------|--|----------|-----------|---------------------|----------|---------------------|--|
| | | | | | | EM | EM/EM | EM | EM/EM |
| 23 | 31,6 | NID | C ₁₉ H ₁₂ O ₄ | 2,9 | 276 - 308 | 303,0654 | 274,0646 | 305,0817 | 277,0761; 259,0711; 249,0938; 231,0808; 213,0638; 203,0872 |
| 24 | 33,3 | NID | C ₁₉ H ₁₂ O ₃ | -4,3 | 276 | 287,0726 | 287,0773 | 289,0848 | 271,0725; 261,0924; 243,0786; 233,0945; 215,0837 |
| 25 | 35,0 | NID | C ₁₈ H ₃₀ O ₄ | -1,0 | 273 - 311 | 309,2075 | 183,0064 | - | - |

Tabela 8: Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Pontederia parviflora* (pecíolo/caule) no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

| Pico | Tempo de Retenção (min) | Composto | Fórmula Molecular | Erro ppm | UV (nm) | Modo Negativo (m/z) | | Modo Positivo (m/z) | |
|------|-------------------------|------------------------------|---|----------|-----------|---------------------|----------|---------------------|----------|
| | | | | | | EM | EM/EM | EM | EM/EM |
| 01 | 5,7 | derivado do triptofano | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 0,0 | 283 | 203,0826 | - | - | - |
| 02 | 12,1 | ácido clorogênico-O-pentósil | C ₁₄ H ₁₆ O ₈ | -5,0 | 294 - 329 | 311,0788 | - | - | - |
| 03 | 13,4 | ácido clorogênico-O-pentósil | C ₁₄ H ₁₆ O ₈ | -1,0 | 300 - 322 | 311,0775 | 179,0401 | 313,0921 | 163,0386 |
| 04 | 20,0 | NID | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅ | 0,2 | 285 - 330 | 593,1511 | - | 595,1664 | 287,0555 |
| 05 | 23,3 | NID | C ₃₀ H ₃₂ O ₁₈ | 1,2 | 290 - 345 | - | - | 681,1653 | 287,0550 |
| 06 | 30,5 | NID | C ₁₈ H ₃₁ O ₅ | -1,8 | 285 | 327,2197 | 211,1362 | - | - |
| 07 | 32,5 | NID | C ₁₄ H ₁₇ O ₄ | 1,8 | 283 | 249,1128 | - | - | - |



Tabela 9: Identificação dos constituintes de extrato hidroetanólico de *Pontederia parviflora* (raízes) no modo de ionização negativa e positiva por CLAE-DAD-EM/EM.

| Pico | Tempo de Retenção (min) | Composto | Fórmula Molecular | Erro Ppm | UV (nm) | Modo Negativo (m/z) | | Modo Positivo (m/z) | |
|------|-------------------------|---------------------------|----------------------|----------|-----------|---------------------|--|---------------------|--|
| | | | | | | EM | EM/EM | EM | EM/EM |
| 01 | 1,2 | derivado do ácido quínico | $C_{12}H_{22}O_{11}$ | -7,7 | - | 341,1116 | 191,0588 | 365,1092 | 203,0522 |
| 02 | 13,3 | ácido cumárico | $C_9H_8O_3$ | -0,1 | 280 - 310 | 163,0401 | - | - | - |
| 03 | 19,1 | NID | $C_9H_{10}O_4$ | -1,5 | 275 - 308 | 181,0509 | - | - | - |
| 04 | 19,9 | NID | $C_9H_{16}O_4$ | -12,7 | 276 - 310 | 187,1000 | - | - | - |
| 05 | 30,1 | NID | $C_{17}H_{14}O_7$ | -4,3 | 276 - 311 | 329,0681 | 299,0270; 271,0236; 227,0467; 199,0431; 161,0193 | 331,0822 | 315,0521; 302,0464; 287,0549; 270,0489; 258,0514; 242,0549 |
| 06 | 31,5 | NID | $C_{18}H_{34}O_5$ | -2,1 | 276 - 312 | 329,2340 | 211,1341; 171,1042 | 667,3233 | 433,2096; 389,1835; 261,1318; 217,1060; 173,0796; 155,0716 |
| 07 | 31,7 | NID | $C_{13}H_{18}O_3$ | -3,1 | 276 - 310 | 221,0663 | - | - | - |
| 08 | 33,1 | NID | $C_{18}H_{10}O_3$ | -1,7 | 276 - 312 | 273,0562 | 245,0636 | - | - |



5.4 – Determinação de metais na biomassa das macrófitas

Os dados a seguir (Tabela 10) apresentam os parâmetros de calibração obtidos para o EEO-PIA.

Tabela 10: Parâmetros de calibração obtidos, coeficiente de determinação (R^2) Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ), usando EEO-PIA.

| Metal | Equação | R^2 | LD ($\mu\text{g g}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g g}^{-1}$) |
|-------|------------------------|--------|-----------------------------|-----------------------------|
| As | $y = 63,329x - 0,0797$ | 1 | 0,09068 | 0,30229 |
| Cd | $y = 2931,9x + 15,943$ | 0,9998 | 0,00195 | 0,00652 |
| Cr | $y = 1436,5x - 3,912$ | 0,9999 | 0,00399 | 0,01332 |
| Mg | $y = 26292x + 450,16$ | 0,9992 | 0,00021 | 0,00072 |
| Mn | $y = 7396,6x - 13,393$ | 1 | 0,00077 | 0,00258 |
| Mo | $y = 414,67x - 4,7449$ | 0,9997 | 0,01385 | 0,04616 |
| Ni | $y = 622,07x + 1,2903$ | 0,9998 | 0,00923 | 0,03077 |
| Pb | $y = 152,76x - 0,298$ | 0,9999 | 0,03759 | 0,12532 |

Os resultados obtidos para a determinação de metais na biomassa de *P. parviflora* e *S. auriculata* (Tabela 11) permite a visualização da diferença entre a composição dos metais na biomassa e o efeito da intervenção (extração dos metabólicos). Esses resultados evidenciam um aumento na concentração do metal com a remoção dos metabólitos dessas macrófitas, uma vez que, com exceção de Ni e Mo em *P. parviflora* (C), nos demais casos houve um aumento nas concentrações de metal com remoção dos metabólitos dessas macrófitas.



Tabela 11: Concentração (média \pm desvio, $n=3$) dos teores em $\mu\text{g g}^{-1}$ de As, Cd, Cr, Mg, Mn, Mo, Ni e Pb encontrados nas amostras de *P. parviflora*-folhas (PPA-F), *P. parviflora*-pecíolos/caules (PPA-C), *P. parviflora*-raízes (PPA-R) e *S. auriculata*. Amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

| Amostra | Médias (Desvio padrão) | | | | | | | |
|-------------|------------------------|----------------------|--------------------|------|------|--------------------|----------------------|---------------------|
| | As | Cd | Cr | Mg | Mn | Mo | Ni | Pb |
| PPA-F – com | 0,331 a (0,013) | < LD | 0,179 a (0,001) | >UPC | >UPC | 0,419 c (0,001) | 0,1254 a (0,0003) | 0,256 a (0,010) |
| PPA-F – sem | 0,371 b (0,016) | < LD | 0,499 c (0,002) | >UPC | >UPC | 0,464 d (0,003) | 0,2108 c (0,0003) | 0,318 c (0,005) |
| PPA-C – com | 0,361 ab (0,006) | < LD | 0,434 b (0,008) | >UPC | >UPC | 0,267 b (0,004) | 0,2142 c (0,001) | 0,287 b (0,003) |
| PPA-C – sem | 0,425 c (0,013) | < LD | 0,519 c (0,012) | >UPC | >UPC | 0,192 a (0,001) | 0,1805 b (0,0008) | 0,385 d (0,006) |
| PPA-R – com | 0,835 d (0,005) | 0,0232 a (0,0002) | 1,026 d (0,004) | >UPC | >UPC | 0,186 a (0,001) | 0,2497 d (0,001) | 0,924 e (0,0005) |
| PPA-R – sem | 1,134 f (0,015) | 0,0318 b (0,0004) | 1,264 e (0,007) | >UPC | >UPC | 0,266 b (0,005) | 0,3034 e (0,0007) | 1,077 g (0,006) |
| SAL – com | 1,081 e (0,012) | 0,0402 c (0,0004) | 1,254 e (0,006) | >UPC | >UPC | 0,541 e (0,003) | 0,3660 f (0,002) | 1,054 f (0,008) |
| SAL – sem | 1,471 g (0,016) | 0,0459 d (0,0002) | 1,516 f (0,009) | >UPC | >UPC | 0,623 f (0,004) | 0,4506 g (0,0005) | 1,235 h (0,007) |

< LD: amostras com concentrações abaixo do limite de detecção do equipamento. Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância. >UPC: amostra com concentração acima do ponto de maior concentração da curva de calibração ($2\mu\text{g g}^{-1}$).

Determinação de metais por EEO-PIA demonstra que os metais pesados presentes na biomassa dessas macrófitas podem não estão complexados com os metabólitos secundários dessas plantas, ou ao menos, a maior parte não esta, isto é constatado levando em consideração o fato de que os níveis de metais são maiores nas amostras em que os metabólitos foram removidos (Figura 12 e 13).

Amostras que foram submetidas à extração possuem uma proporção maior de estruturas celulares em comparação as amostras *in natura*, não submetida à extração, ou seja, apresenta certa proporção dos compostos secundários na composição da massa que foi digerida para determinação do teor de metais (Figura 11), o que explica os teores mais elevados em amostras sem metabólitos secundários (Tabela 11).

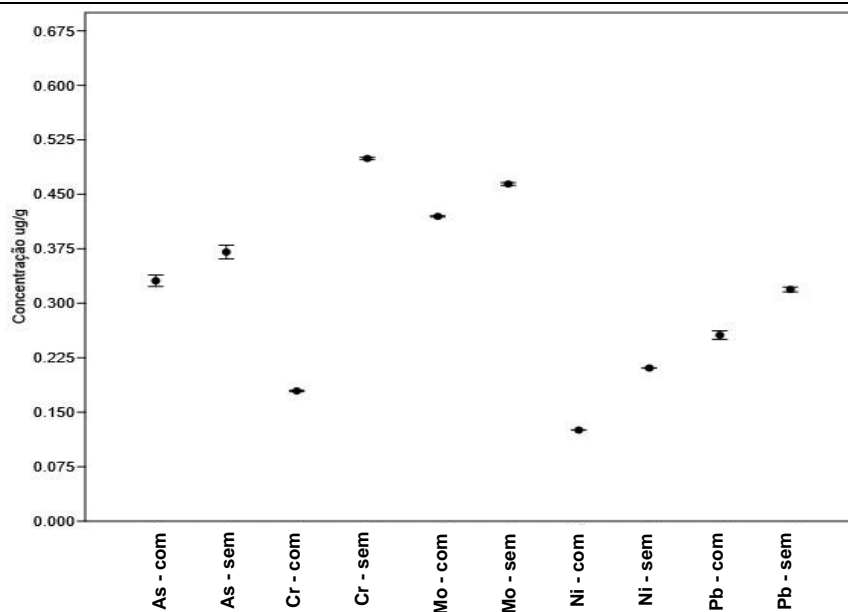


Figura 11: Diferença entre a composição das amostras analisadas em EEO-PIA.

*proporção meramente ilustrativa, fora da escala real

Os componentes estruturais das células vegetais (Parede celular e vacúolos) que, assim como os metabólitos secundários, possuem possibilidades de sítios de ligação para os metais, tais como os grupamentos $-OH^-$ e $-COO^-$, principalmente em celulose, agregam participação na retenção desses contaminantes nas estruturas celulares dessas amostras (SARASWAT e RAI, 2010; ALI et al., 2013). Por este motivo, com base nos resultados obtidos, acredita-se que esses metais bioacumulados estão associados em maior parte à estruturas que não são removidas na extração dos metabólitos secundários, como por exemplo, as estruturas citadas anteriormente.

A - *P. parviflora* – folhas



B - *P. parviflora* – pecíolo/caule

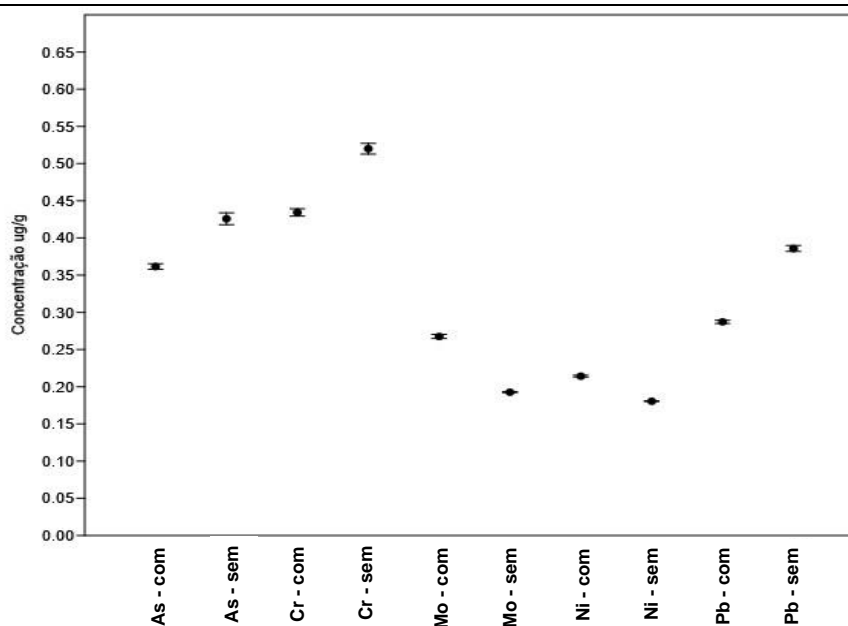
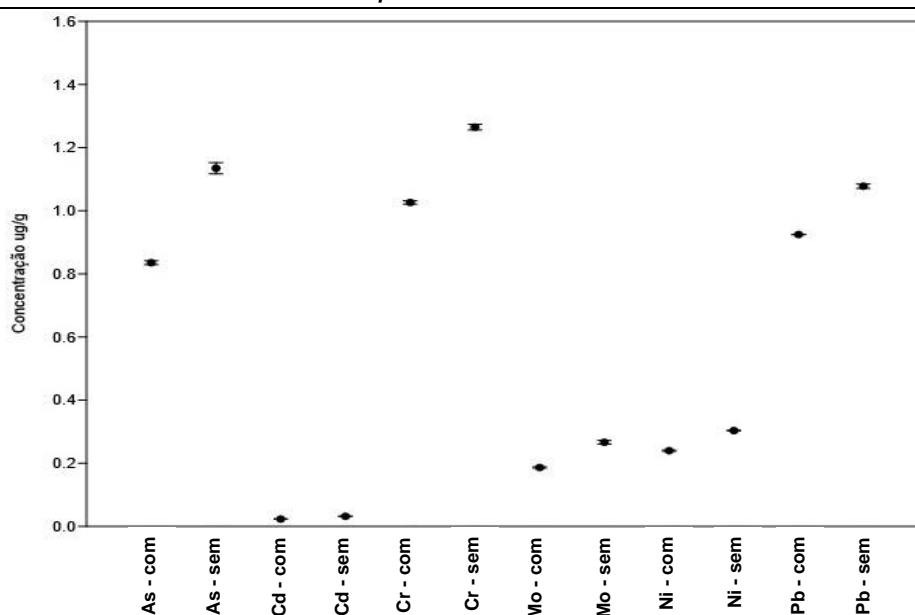


Figura 12: Concentrações de metais encontrados nas amostras “com” e “sem” os metabólitos, onde as amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

A - *P. parviflora* – Raízes



B - *S. auriculata*

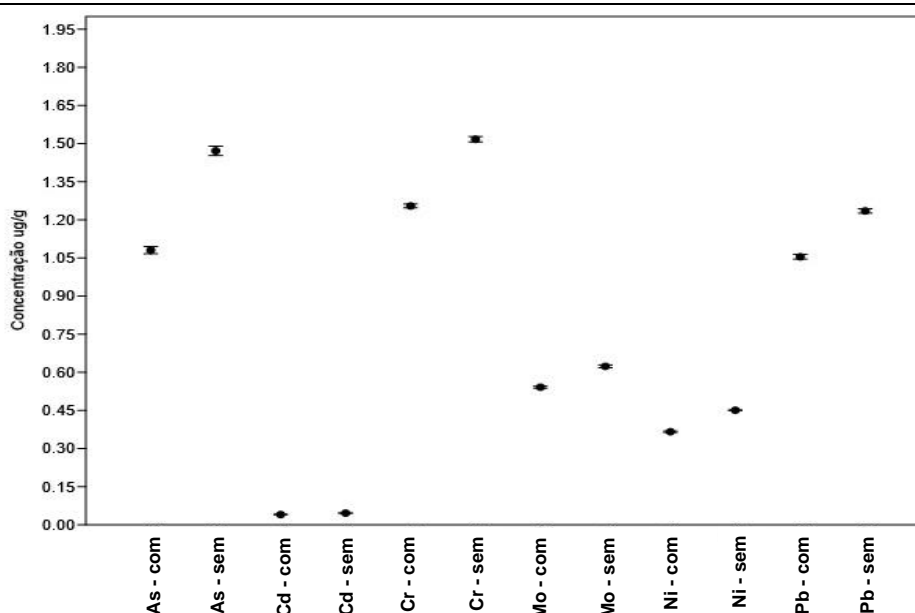


Figura 13: Concentrações de metais encontrados nas amostras “com” e “sem” os metabólitos, onde as amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

Dentre os metais determinados, alguns fazem parte do metabolismo desses vegetais, sendo considerados micronutrientes essenciais, tais como Mg e Mn.



Entretanto os demais metais apresentam níveis de contaminação da biomassa oriundos do ambiente onde foram coletados. O que pode ser observado também nos resultados obtidos é que os níveis de As, Cr, Pb e Ni foram maiores nas raízes de *P. parviflora* e em *S. auriculata*, e o Cd só foi encontrado dentro do limite de detecção nessas estruturas.

A principal estrutura para assimilação de contaminantes de *P. parviflora* são as raízes. O fato de ser uma macrófita fixa, ou seja, suas raízes fixam-se ao solo enquanto suas partes superiores estão fora da lâmina d'água, caracteriza essa estrutura como área de contato com o meio contaminado. A adsorção de metais pelas raízes e posterior transporte dos mesmos pelo metabolismo dessas plantas até seus membros superiores para fixação/imobilização é o mecanismo usado para diminuir os efeitos desses contaminantes, um dos mecanismos de fitorremediação (ALI et al., 2013). A área de contato de um vegetal com o contaminante caracteriza, no geral, a estrutura com os maiores níveis dele.

Em relação a *S. auriculata*, como não houve fragmentação de sua estrutura vegetal, os altos índices de metais podem estar associados ao fato de toda sua estrutura encontrar-se em contato constante com a água, de onde a mesma remove os metais contaminantes acumulando-os em seu organismo por interações iônicas e imobilização dos mesmos em seus tecidos e outras estruturas celulares.

As diferenças obtidas na concentração de metais para as amostras “com” e “sem” metabólitos demonstraram que a extração dos mesmos não diminui o teor de metal na biomassa. Somando-se a isso, não foi possível estabelecer uma relação entre altas concentrações de Fenóis e o aumento ou diminuição dos níveis desses contaminantes (Figura 14 A-J) facilmente observado pela falta de correlação entre a presença de fenóis e taninos, na biomassa da planta e os valores de metais encontrados também na biomassa.

Os gráficos (Figura 14 A-J) que apresentam a falta de correlação entre o teor de fenóis totais e taninos aos teores de As, Cd, Pb, Cr e Ni nas amostras demonstraram com clareza que não há interferência no acúmulo de metais em estruturas com **maior** concentração desses metabólitos, uma vez que as amostras com maiores concentrações de fenóis e taninos, no caso, folhas de *P. parviflora* e *S. auriculata* possuem concentrações opostas, enquanto amostras de *S. auriculata* acumulam os maiores teores desses metais, folhas de *P. parviflora* apresentam os

valores mais baixos para os mesmos. Estruturas intermediárias de *P. parviflora* (pecíolo/caule), por sua vez, apresentam os menores teores de metabólitos assim como os índices mais baixos de acúmulo de metais.

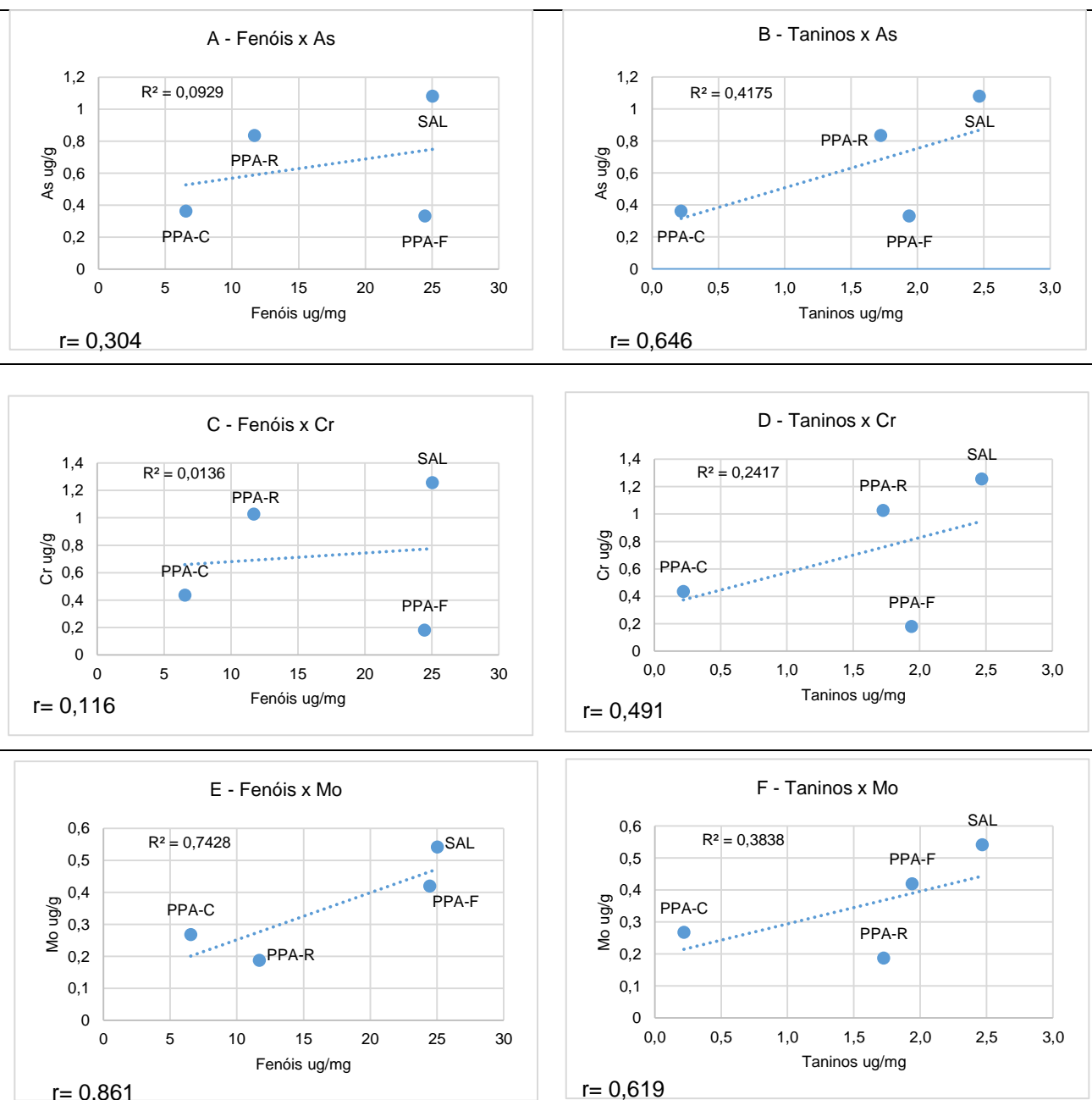


Figura 14: Investigação da relação entre a concentração de Fenóis/Taninos vs concentração de metal na biomassa de *P. parviflora* e *S. auriculata*.

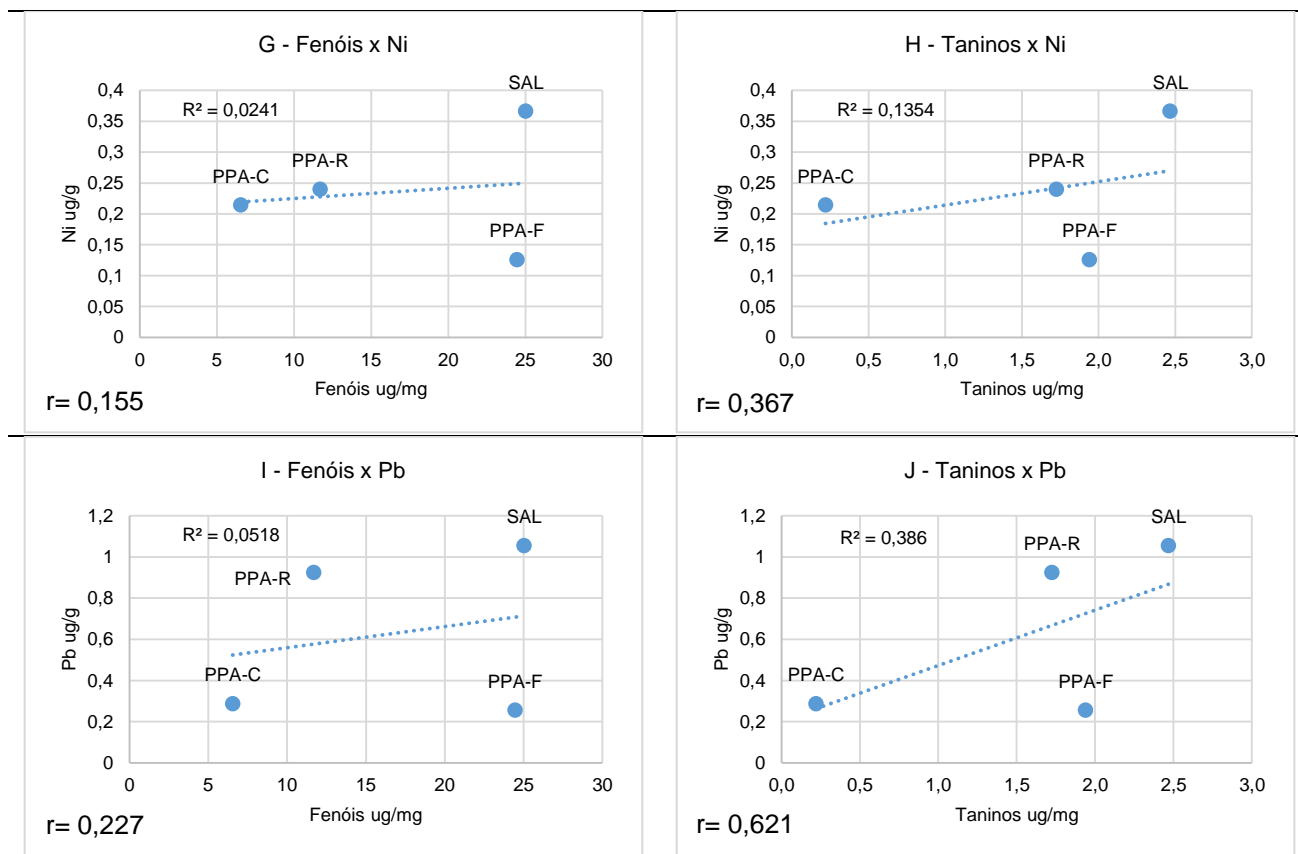


Figura 14: Investigação da relação entre a concentração de Fenóis/Taninos vs concentração de metal na biomassa de *P. parviflora* e *S. auriculata*.

Ao observar os resultados obtidos pode-se perceber que há acúmulo de metais pelo contato direto da estrutura vegetal com a fonte dos íons de metais contaminantes, neste caso, o contato com a água no ambiente aumenta o teor de metais na biomassa destas amostras. Fato observado no caso de *S. auriculata*, que se encontra constantemente em contato com a água, por ser uma macrófita flutuante livre, e as estruturas das raízes de *P. parviflora*, por serem estruturas submersas, porém aderidas ao substrato também.

Nos casos em que há elevadas concentrações de metais (Mg, Mn e Mo) nas folhas de *P. parviflora*, e *S. auriculata*, caracterizam-se como os casos onde possivelmente há transporte destes íons pelo metabolismo vegetal, com possível participação dos metabólitos secundários, uma vez que com a remoção dos metabólitos secundários nas estruturas intermediárias (PPA-C), que configuram a via entre as raízes (trapeamento e assimilação de micro e macro nutrientes) e as folhas (metabolização ou fixação) de *P. parviflora*, estruturas onde se dão as demandas metabólicas para esses metais, o teor desses metais diminui.

Embora a Farmacopeia Brasileira apresente níveis elevados para metais pesados (usando o termo genérico sem especificar quais metais) permitidos em fármacos comercializados no Brasil, entre 10 e 20 $\mu\text{g g}^{-1}$, é importante salientar que este é um cálculo em relação aos metais pesados “totais”, ou seja, o conjunto de metais pesados essenciais e não essenciais presentes nestes fármacos (ANVISA, 2010).

Por serem, no geral, arsênio, cádmio, cromo, molibdênio, níquel e chumbo, elementos com grande potencial tóxico, a presença destes nos ecossistemas aquáticos são também fontes de amplo debate, interesse e risco, não por menos que os seus níveis em águas naturais são também bastante restritivos. Mg e Mo não apresentam de imediato efeitos tóxicos a saúde humana, havendo, inclusive, níveis de ingestão diária, porém, há um “Decreto-Lei” de Portugal, n.º 152/2017, que sugere uma ingestão inferior a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ao dia.

5.5 – Ensaios de remoção de cádmio

Vale ressaltar o design experimental utilizado nestas análises assim como qual produto deste experimento foi analisado, esta esquematizado na figura 15, abaixo.

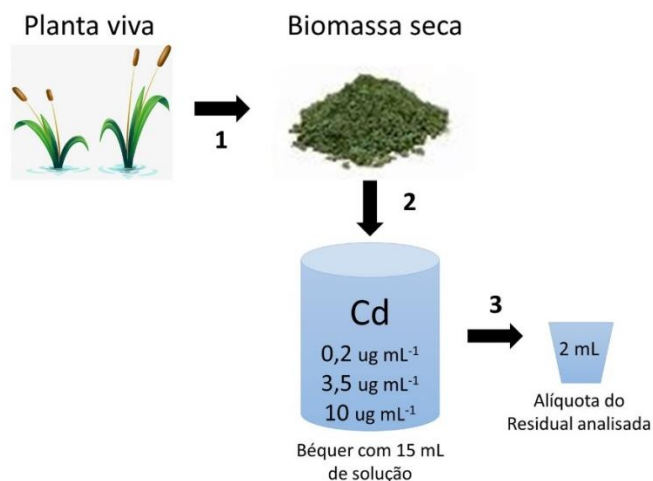


Figura 15: Resumo dos procedimentos a partir da obtenção do material analisado até avaliação da eficiência biorremediativa da biomassa vegetal. Em 1 há o preparo e secagem do material vegetal para obtenção da biomassa seca, em 2 o processo de remoção de Cd onde a biomassa é posta em contato com a solução controle, contendo cádmio diluído em água acidificada, e removida em 3 após 15 minutos de contato e do residual aquoso é obtido um alíquota de 2 mL para análise em EEO-PAI.

Os resultados apresentados para os ensaios de remoção de cádmio de meio aquoso (água deionizada e acidificada) contaminado (Figura 16 e Tabela 12) demonstram que para este metal o ponto de saturação da biomassa de *P. parviflora* e *S. auriculata* é baixo, a saturação desse sistema de trapeamento de metais com o aumento na concentração de cádmio no volume residual dos ensaios fica visível devido ao aumento dos níveis de metais no residual analisado.

Em concentrações de $0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cádmio há redução em todas as amostras do residual aquoso analisado. Entretanto, após o ensaio, elas ficaram todas abaixo do limite de quantificação de cádmio, que considerando as etapas da metodologia de análise (diluições), tem-se como valor de trabalho $0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou seja, 75% abaixo da concentração controle que se consistia na solução contendo água deionizada acidificada com cádmio diluído na concentração de cada ensaio.

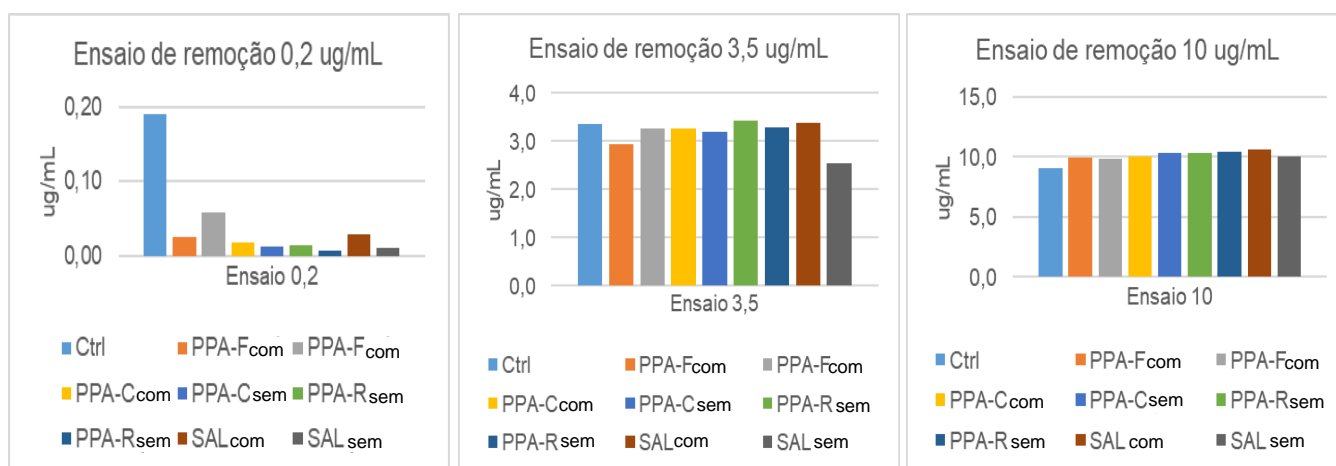


Figura 16: Residual de cádmio diluído em meio líquido (água acidificada + cádmio) da solução controle utilizada nos ensaios nas concentrações de 0,2; 3,5 e 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do metal em cada etapa, amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

A partir da concentração de $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ do metal, algumas amostras apresentam aumento nas concentrações do residual aquoso (Tabela 12), com teores do metal Cd mais altos que a amostra controle (*Pontederia parviflora* (PPA-R) e *Salvinia auriculata*, ambas amostras com metabólitos). No ensaio com concentração de $10,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cádmio todas as amostras aumentaram as concentrações acima da amostra controle.

Tabela 12: Valores médios (\pm desvio padrão, $n=3$) da concentração no residual avaliado após os ensaios de remoção, os valores apresentados trata-se da concentração de cádmio residual após o tempo de contato da solução controle com as biomassas. A concentração de Cd em ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Amostras “com”, são amostras do material vegetal seco sem ter passado pelo processo de extração e amostras “sem”, são amostras que tiveram seus metabólitos secundários removidos no processo de extração.

| Amostra | Ensaio 0,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Ensaio 3,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ | Ensaio 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ |
|-----------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Controle | 0,2 ($\pm 0,0001$) | 3,35 ($\pm 0,0024$) | 9,02 ($\pm 0,041$) |
| PPA-F com | 0,026 ($\pm 0,00008$) e | 2,94 ($\pm 0,011$) b | 9,97 ($\pm 0,316$) a |
| PPA-F sem | 0,058 ($\pm 0,00007$) c | 3,26 ($\pm 0,002$) c | 9,83 ($\pm 0,485$) a |
| PPA-C com | 0,019 ($\pm 0,00008$) g | 3,26 ($\pm 0,002$) c | 10,05 ($\pm 0,364$) a |
| PPA-C sem | 0,012 ($\pm 0,00014$) a | 3,2 ($\pm 0,001$) c | 10,3 ($\pm 0,382$) a |
| PPA-R com | 0,014 ($\pm 0,00017$) d | 3,43 ($\pm 0,001$) cd | 10,3 ($\pm 0,176$) a |
| PPA-R sem | 0,008 ($\pm 0,00006$) f | 3,3 ($\pm 0,001$) e | 10,4 ($\pm 0,116$) a |
| SAL com | 0,03 ($\pm 0,00001$) bc | 3,38 ($\pm 0,002$) e | 10,6 ($\pm 0,173$) a |
| SAL sem | 0,011 ($\pm 0,000005$) a | 2,53 ($\pm 0,0008$) a | 10,04 ($\pm 0,167$) a |

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey, considerando o valor nominal de 5% de significância.

Os resultados para o ensaio com concentração de 10,0 μg de Cd apresentam todas as amostras sem diferença estatística, a saturação do sistema ocorre de maneira mais visível neste caso, uma vez que o aumento da concentração de Cd após a intervenção da biomassa diminuí apenas o meio de diluição (água) sem remoção do contaminante, ficando a solução residual mais concentrada em comparação a solução controle.

O fato de os teores do metal cádmio aumentar após a intervenção da biomassa (ensaio de remoção de cádmio), em concentrações mais altas do metal, tem explicação sugerida com o esquema da Figura 17.

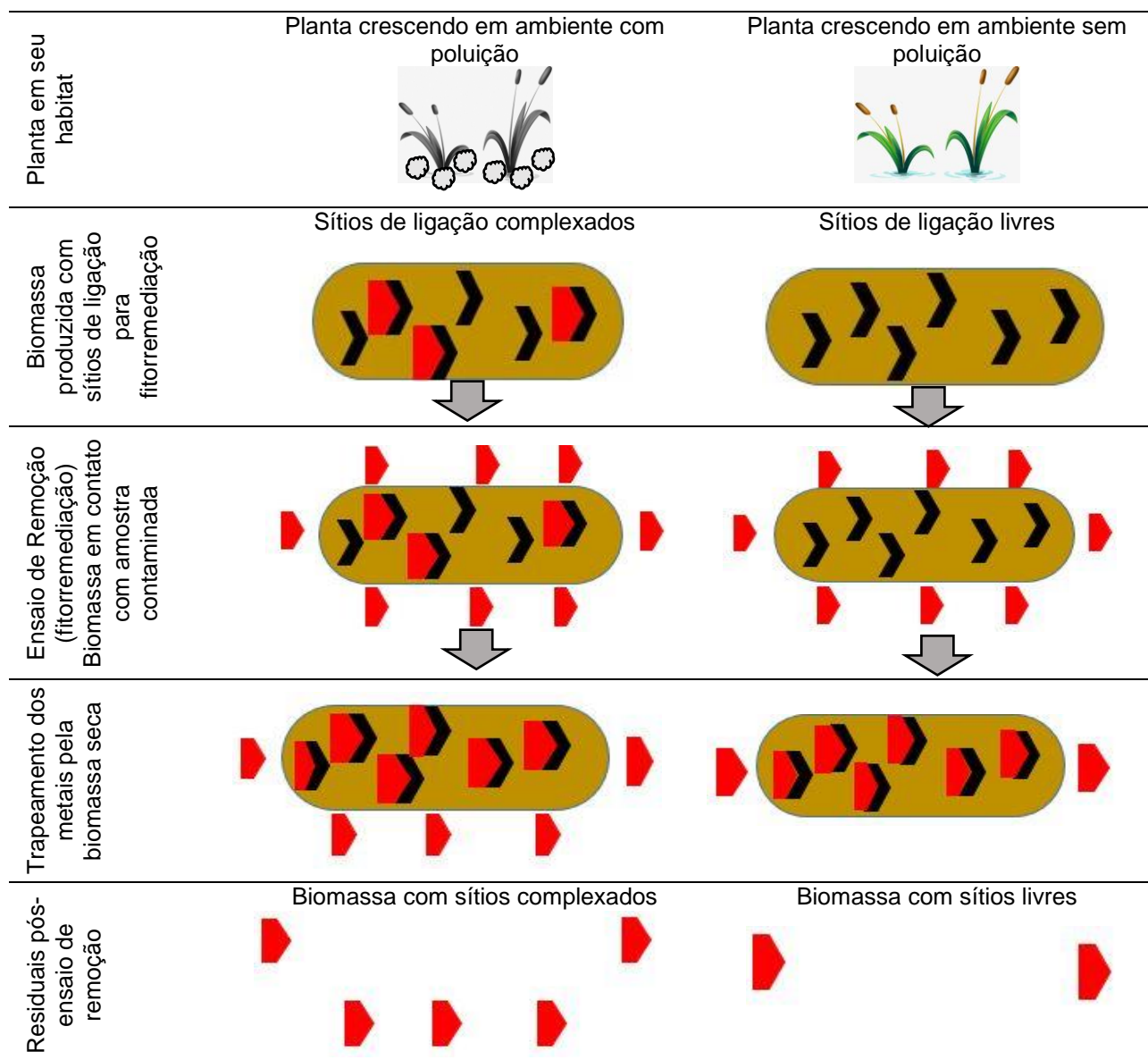




Figura 17: Dinâmica do processo de remoção, esquema sugerido para elucidar as possíveis causas e os efeitos dos sítios de ligação (da biomassa vegetal) saturados.

Legenda:  Metal  Sítios de ligação

A presença de outros íons pode interferir no potencial de remoção de metais contaminantes devido à disputa pelos sítios de ligação, por exemplo, Mg encontrado em altas concentrações. Devido a demanda metabólica por este metal, que compete por estes sítios de ligação com outros íons, especialmente Cd, o balanço iônico nas soluções contaminadas e na biomassa seca deve ser observado de maneira a potencializar a remoção do contaminante (SARASWAT e RAI, 2010).

O esquema representado apresenta as situações em que os sítios de ligação da biomassa estão saturados, complexados com outros íons derivados do ambiente de onde se desenvolveram, como é o caso das amostras utilizadas neste



estudo, crescidas em local urbanizado (ambiente antropizado), o que faz com que seu potencial para remoção de íons do contaminante fique comprometido. Porém, por se tratar de biomassa seca, a absorção de água continua ocorrendo, fazendo com que a solução residual (aquoso) continue com a mesma massa de metal, ou com pouca diminuição dela, porém com seu volume reduzido, aumentando assim a concentração de cádmio nessa solução residual.

Há a influência de outros fatores no potencial de remoção de metais por plantas e biomassa biologicamente inativa, que vão desde proporção de material por volume de água contaminada, até fatores como características físico/química da água (pH, temperatura, etc.)(ALI et al., 2013). Entretanto, para que a fitorremediação se torne uma opção em potencial para tratamento de ambientes contaminados, a mesma não pode interferir nesses fatores, nem mesmo ser dependente de alterações destes para remoção de contaminante, uma vez que causar efeitos contrários aos parâmetros naturais colocaria a técnica em igualdade aos métodos tradicionais de descontaminação, é a busca por métodos que contornam essas problemáticas que fomentam pesquisas por alternativas ecológicas.

Um fator importante para os resultados obtidos é a combinações das técnicas analíticas com as técnicas de preparo de amostra. A extração por fluido pressurizado possui uma alta eficiência na remoção dos metabólitos pois diminui a viscosidade do solvente facilitando sua permeabilidade e as interações físicas com a matriz da amostra. Esta é uma técnica de extração rápida (poucos minutos) com uma aplicabilidade em escala laboratorial muito grande pois demanda de poucas quantidades de solvente orgânico (SAINI e KEUM, 2018). A digestão por micro-ondas também é uma técnica de alta eficiência e baixa perda de compostos por volatilização, pois trata-se de um “sistema fechado”, combinada com análises em EEO-PIA, técnica com alta sensibilidade, os resultados possuem uma taxa de confiabilidade muito grande (BIZZU et al., 2017).



6 – Conclusões

O estudo demonstrou os efeitos da saturação dos sistemas de bioabsorção usando biomassa de *P. parviflora* e *S. auriculata* provenientes de um ambiente aparentemente contaminado, gerando efeitos indesejáveis, não reduzindo a concentração quando a acima de $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, ao contrário, aumenta ao diminuir o volume do meio de diluição (água) sem redução efetiva dos íons de cádmio. Porém é evidente o acúmulo de metais na biomassa dessas plantas por bioacumulação, ou seja, absorção de íons de metais pesados do meio onde a planta viva está inserida, fato observado nas análises de metais existente na biomassa.

Os resultados demonstram também, não haver interferência significativa dos teores de metabólitos nos processos de remoção de metal cádmio, assim como no bioacúmulo de metais, a participação dos mesmos por complexação, não foi observada uma vez que as amostras sem metabólitos possuem concentrações mais alta destes metais quando comparadas a amostras sem metabólitos. Essa lógica só não foi observada nas amostras de pecíolo/caule de *P. parviflora* (PPA-C).

Metodologias de avaliação da saturação dos sítios de ligação da biomassa para metais ou outros contaminantes é algo que deve ter espaço nas próximas atividades, uma vez que tendo o conhecimento dos mecanismos de saturação será possível obter conhecimento de metodologias de “redisponibilização” destes sítios de ligação aumentando a vida útil dessa biomassa, aumentando consequentemente o interesse pela fitorremediação.

Como abordado no trabalho, nos casos de Mo e Ni, a participação dos metabólitos pode estar associada ao transporte deste e outros metais considerados essenciais até as estruturas onde estes se fazem necessários ao metabolismo vegetal, é também este fato que associa a ideia de que a fitorremediação ocorre como um caminho encontrado pelo vegetal para sobreviver em ambientes contaminados pois íons de metais tóxicos competem pelos sítios de ligação, nos sistemas de transportes de íons destes vegetais, com íons de metais essenciais, fazendo com que haja também o transporte até estruturas onde ocorrerá a imobilização e diminuição dos efeitos tóxicos destes íons de metais pesados não essenciais.



Agradecimentos

Agradecimentos ao CNPq pela bolsa concedida, ao LAPNEM pelo suporte técnico para desenvolvimento da pesquisa, ao professor João Batista (INQUI/UFMS), pelo incentivo inicial neste trabalho ainda no ano de 2016, professor Jorge L. Raposo (INQUI/UFMS) pelo apoio técnico instrumental assim como ao professor Valter Aragão (FAMED/UFMS) pelo apoio nas análises em ICP-OES.



REFERÊNCIAS

ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869-881, 2013. ISSN 1879-1298 (Electronic)

0045-6535 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23466085> >.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 5ª Ed. Brasília, 2010b.

APPENROTH, K.-J. What are "heavy metals" in Plant Sciences? **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 4, p. 615-619, 2010/07/01 2010. ISSN 1861-1664. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0455-4> >.

AYANGBENRO, A. S.; BABALOLA, O. O. A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents. **International journal of environmental research and public health**, v. 14, n. 1, p. 94, 2017. ISSN 1660-4601

1661-7827. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28106848>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC5295344/> >.

BALASSA, G. C.; DE SOUZA, D. C.; BARBOSA DE LIMA, S. Evaluation of the potential of *Pontederia parviflora* Alexander in the absorption of copper (Cu) and its effects on tissues. **Acta Scientiarum, Biological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 311-316, 2010. ISSN 1679-9283.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994. ISSN 0028-646X.

BHARGAVA, A. et al. Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Journal of Environmental Management**, v. 105, p. 103-120, 2012. ISSN 0301-4797.

BIZZU, C. A. et al. Microwave-assisted digestion methods: towards greener approaches for plasma-based analytical techniques. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 32, n. 8, p. 1448-1466, 2017. ISSN 0267-9477.

BIZZO, A. L. T. et al. Short-term physiological responses to copper stress in *Salvinia auriculata* Aubl. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, n. 3, p. 268-277, 2014. ISSN 2179-975X.

CHEYNIER, V. et al. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, p. 1-20, 2013. ISSN 1873-2690.



COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-82, 1999. ISSN 0893-8512.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Natural Product Reports**, v. 26, n. 8, p. 1001-1043, 2009. ISSN 0265-0568.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313-7352, 2010. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/1420-3049/15/10/7313/pdf> >.

DAVIS, A. C. et al. Determination of cadmium in biological samples. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 41, n. 1, p. 35-75, 2006. ISSN 0570-4928.

DHIR, B. et al. Heavy metal removal potential of dried Salvinia biomass. **International Journal of Phytoremediation**, v. 12, n. 2, p. 133-141, 2010. ISSN 1522-6514.

DHIR, B.; SRIVASTAVA, S. Heavy metal removal from a multi-metal solution and wastewater by Salvinia natans. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 6, p. 893-896, 2011/06/01/ 2011. ISSN 0925-8574. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925857411000413> >.

ESPINOZA-QUINONES, F. R. et al. Study of the bioaccumulation kinetic of lead by living aquatic macrophyte Salvinia auriculata. **Chemical Engineering Journal (Amsterdam, Netherlands)**, v. 150, n. 2-3, p. 316-322, 2009. ISSN 1385-8947.

FAROOQ, M. A. et al. Arsenic toxicity in plants: Cellular and molecular mechanisms of its transport and metabolism. **Environmental and Experimental Botany**, v. 132, p. 42-52, 2016. ISSN 0098-8472.

GARCIA, L. C. et al. Brazil's worst mining disaster: Corporations must be compelled to pay the actual environmental costs. **Ecological Applications**, v. 27, n. 1, p. 5-9, 2017. ISSN 1051-0761.

GAYA, K. S.; MATHEW, L.; RAMESH, B. M. G. A preliminary quantitative phytochemical screening of five macrophytes, N. Paravur, Ernakulam, Kerala, India. **CIBTech Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 22-27, 2017. ISSN 2319-3891. Disponível em: < <http://www.cibtech.org/J-Pharmaceutical-Sciences/PUBLICATIONS/2017/VOL-6-NO-1/03-CJPS-MARCH-003-RAMESH-PRELIMINARY-INDIA.pdf> >.



GOSWAMI, H. K.; SEN, K.; MUKHOPADHYAY, R. Pteridophytes: evolutionary boon as medicinal plants. **Plant Genetic Resources**, v. 14, n. 4, p. 328-355, 2016. ISSN 1479-2621.

HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 11, p. 2326-2331, 2012/08/30 2012. ISSN 0022-5142. Disponível em: < <https://doi.org/10.1002/jsfa.5633> >. Acesso em: 2019/02/01.

JHA, P.; PANWAR, J.; JHA, P. N. Secondary plant metabolites and root exudates: guiding tools for polychlorinated biphenyl biodegradation. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 789-802, 2015. ISSN 1735-1472.

LI, S. et al. Cytotoxic compounds from invasive giant salvinia (*Salvinia molesta*) against human tumor cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 24, p. 6682-6687, 2013. ISSN 0960-894X.

MAATHUIS, F. J. M. Physiological functions of mineral macronutrients. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 250-258, 2009. ISSN 1369-5266.

MAHAR, A. et al. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 111-121, 2016. ISSN 0147-6513.

MICHALAK, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, n. 4, p. 523-530, 2006. ISSN 1230-1485.

NARASIMHULU, M. et al. An unusual novel anti-oxidant dibenzoyl glycoside from *Salvinia natans*. **Natural Product Research**, v. 24, n. 15, p. 1390-1394, 2010. ISSN 1478-6419.

PERELO, L. W. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1-3, p. 81-89, 2010. ISSN 0304-3894.

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

POTT, V. J.; POTT, A. **Plantas aquáticas do Pantanal**. Brasília, DF: Embrapa, 2000. ISBN 85-7383-091-3.



RAJKUMAR, M. et al. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phyto remediation. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 6, p. 1562-1574, 2012. ISSN 0734-9750.

SAINI, R. K.; KEUM, Y.-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. **Food Chemistry**, v. 240, p. 90-103, 2018. ISSN 0308-8146.

SARASWAT, S.; RAI, J. P. N. Heavy metal adsorption from aqueous solution using Eichhornia crassipes dead biomass. **International Journal of Mineral Processing**, v. 94, n. 3-4, p. 203-206, 2010. ISSN 0301-7516.

SILVA, J. F. da.; JOIA, R. P. **Territorialização e Impacto Ambiental: Um estudo da Zona Ribeirinha de Aquidauana-MS**. Revista Pantaneira, Aquidauana, volume 3, nº 1 p17-30,2001.

SMEDLEY, P. L.; KINNIBURGH, D. G. Molybdenum in natural waters: A review of occurrence, distributions and controls. **Applied Geochemistry**, v. 84, p. 387-432, 2017. ISSN 0883-2927.

SOARES, D. C. F. et al. Salvinia auriculata: Aquatic bioindicator studied by instrumental neutron activation analysis (INAA). **Applied Radiation and Isotopes**, v. 66, n. 5, p. 561-564, 2008. ISSN 0969-8043.

SONTAG, R.; MELLO, I. Diagnóstico sanitário do Parque Natural Municipal da Lagoa Comprida. **Revista Eletronica Gestão & Saúde**, v. 4, n. 1, p. 1248-1268, 01/08/2013 2013. ISSN 1982-4785.

STINGU, A. et al. New approaches concerning the utilization of natural amendments in cadmium phyto remediation. **Industrial Crops and Products**, v. 35, n. 1, p. 53-60, 2012. ISSN 0926-6690.

SUN, H. et al. Selection of aquatic plants for phyto remediation of heavy metal in electroplate wastewater. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 2, p. 355-364, 2013. ISSN 0137-5881.

SYTAR, O. et al. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 4, p. 985-999, 2013. ISSN 0137-5881.

TANASE, C.; CO, A. S.; MUNTEAN, D.-L. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. **Molecules**, v. 24, n. 6, 2019. ISSN 1420-3049.



UNGUREANU, G. et al. Arsenic and antimony in water and wastewater: Overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption. **Journal of Environmental Management**, v. 151, p. 326-342, 2015. ISSN 0301-4797.

VESELY, T.; TLUSTOS, P.; SZAKOVA, J. The Use of Water Lettuce (*Pistia Stratiotes* L.) for Rhizofiltration of a Highly Polluted Solution by Cadmium and Lead. **International Journal of Phytoremediation**, v. 13, n. 9, p. 859-872, 2011. ISSN 1522-6514.

VESTENA, S. et al. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative enzyme response in water hyacinth and salvinia. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 23, n. 2, p. 131-139, 2011. ISSN 1677-0420. Disponível em: <<http://www.scielo.br/bjpp/v23n2/a05v23n2.pdf>>.

WIJEKoon, M. M. J. O.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Effect of extraction solvents on the phenolic compounds and antioxidant activities of bunga kantan (*Etlingera elatior* Jack.) inflorescence. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 4-5, p. 615-619, 2011. ISSN 0889-1575.

YRUELA, I. Transition metals in plant photosynthesis. **Metallomics**, v. 5, n. 9, p. 1090-1109, 2013. ISSN 1756-591X.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001. ISSN 0021-8561.