



**João Paulo Ferro Pelica**

Mestre em Water and Coastal Management

**Fitorremediação em solos contaminados  
com arsénio, por duas espécies de *Eucalyptus* (*Eucalyptus  
globulus* Labill e *Eucalyptus nitens* Deane & Maiden)**

Dissertação para obtenção do Grau de Doutor em  
Ambiente e Sustentabilidade

Orientador: Doutor Fernando Henrique da Silva Reboredo,  
Professor Auxiliar com Agregação, FCT  
Co-orientador: Doutora Maria Teresa Calvão Rodrigues,  
Professor Auxiliar, FCT  
Doutor Fernando José Cebola Lidon,  
Professor Associado com Agregação, FCT

Júri:  
Presidente: Prof. Doutora Maria Paula Baptista da Costa Antunes  
Arguentes: Prof. Doutora Paula Maria da Luz Figueiredo de Alvarenga  
Prof. Doutora Patrícia Alexandra Dias Brito Palma  
Vogais: Doutor José Domingos Cochicho Ramalho  
Prof. Doutor Francisco Manuel Cardoso de Castro Rego



### ***Copyright***

Copyright, em nome de João Paulo Ferro Pelica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



Para o meu pai e para a minha mãe.  
À minha esposa, aos manos e sobrinhos.  
Ao José Pelica e Margarida Fialho e ao João António e Emília Ferro.  
Ao Bob, à Popia, ao Migas, ao Piruças e aos demais.



# Agradecimentos

Quero agradecer, primeiro que tudo, e em jeito também de dedicatória, à professora Teresa Calvão, aos Professores Fernando Reboredo e Fernando Lidon, conseguimos!

Ao Doutor José Cochicho Ramalho um muito obrigado, pela sua ajuda, conhecimento e ensinamento na parte da fisiologia vegetal.

À Professora Vanda Lourenço, do Departamento de Matemática da FCT / UNL, por todas as dúvidas que me tirou sobre estatística.

Aos Professores Mauro Guerra, do Departamento de Física da FCT / UNL, pela colaboração e ajuda.

À Professora Maria Fernanda Pessoa e à Professora Sofia Barbosa, mais que tudo duas amigas sempre dispostas a ajudar e ensinar.

A todo o Departamento de Ciências da Terra, destacando o Professor Carlos Kullberg, que sempre me auxiliou e me deu todo o apoio, bem como à Dr<sup>a</sup> Fátima Silva por todas as brincadeiras que “aturou” e pela sua ajuda.

Ao meu sogro José Cordeiro.

A todas as pessoas que indiretamente me ajudaram neste trabalho.

Quero também agradecer à Professora Graça Martinho por nunca ter desistido de me ajudar e fazer de tudo para eu ter iniciado esta tese.





## Resumo

Nos últimos anos, com o aumento da população mundial e a sobre-exploração dos recursos naturais (devido à mineração, agricultura e indústria), a poluição dos solos (nomeadamente com arsénio) tem gradualmente aumentado. Neste enquadramento, neste estudo, caracterizou-se a deposição e o teor médio do arsénio nas zonas mineiras de Neves-Corvo e de São Domingos, para definição e implementação de um ensaio experimental de fitorremediação no Campus da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa. Após transplantação e aclimação das plantas da *Eucalyptus globulus* Labill e *E. nitens* Deane & Maiden, com 11 e 17 meses de idade, respetivamente, entre Janeiro e Julho de 2015, as plantas foram submetidas a 33 e 66 mg de As Kg<sup>-1</sup><sub>solo</sub>. Procedeu-se então a uma caracterização bimensal da cinética de absorção e translocação do arsénio para a parte aérea, aferindo-se ainda os parâmetros de crescimento e as taxas de síntese de fotoassimilados. Face ao aumento da concentração de arsénio no solo, verificou-se o aumento dos respetivos teores nas raízes (até 102,2 e 133,3 µg As g<sup>-1</sup><sub>peso seco</sub>, na *E. globulus* e *E. nitens*, respetivamente) e nas folhas (até 11,64 µg As g<sup>-1</sup><sub>peso seco</sub> na *E. nitens*). Constatou-se ainda que a *E. globulus* registou uma maior taxa de crescimento, produção de biomassa e maior tolerância ao arsénio. Paralelamente, na *E. nitens* o tratamento com 200 mg de As apresentou variações significativas, relativamente à parametrização fotossintética, evidenciando-se danos no fotossistema II. Não existindo nenhuma legislação europeia ou nacional que promova, ou impossibilite, a descontaminação de solos por fitorremediação, por ser de interesse público, discute-se, a implementação da *E. globulus*, como possível solução para a descontaminação de áreas poluídas com arsénio, nomeadamente na mina de Neves-Corvo.

**Palavras-chave:** Arsénio, Crescimento vegetal, Eucaliptos, Fitorremediação.



## Abstract

In recent years, with the increase of the world population and over-exploitation of natural resources (due to mining, agriculture and industry), soil pollution (including arsenic) is gradually rising. In this framework, in this study, the deposition of arsenic in the mining area of Neves-Corvo and São Domingos for definition and implementation of an experimental phytoremediation assay at the Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa Campus. After transplanting and acclimation of *Eucalyptus globulus* Labill and *E. nitens* Deane & Maiden plants, with 11 and 17 months old, respectively, between January and July 2015, plants were submitted to 33 and 66 mg of As Kg<sup>-1</sup> soil. The contents of arsenic in the roots and shoots, the growth parameters and the photoassimilate synthesis rates were measured. The increasing concentration of arsenic in the soil, triggered a higher levels of this element on the roots (up to 102.2 and 133.3 µg g<sup>-1</sup> dry weight of *E. globulus* and *E. nitens*, respectively) and leaves (up to 11.64 µg g<sup>-1</sup> dry weight of *E. nitens*). In this context, *E. globulus* showed higher growth rate, biomass production and tolerance to arsenic. Moreover, *E. nitens* treated with 200 mg of As displayed significant variations in the photosynthetic parameterization, pointing to damages in photosystem II. In the absence of European or national legislation, that might promote or prevent soil decontamination by phytoremediation, the implementation of *E. globulus*, as a possible solution for decontamination of polluted areas with arsenic, namely in the mining region of Neves-Corvo, is discussed.

**Keywords:** Arsenic, Eucalyptus, Plant growth, Phytoremediation



# Índice

Índice .....	v
Índice de Figuras .....	vii
Índice de Tabelas .....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1.Prefácio .....	1
2.Introdução.....	3
2.1. O solo .....	3
2.1.1. Definição e caracterização do conceito solo .....	3
2.1.2. Contaminação dos solos.....	4
2.1.2.1. Atividades potencialmente contaminantes .....	5
2.1.2.2. Modelo conceptual de contaminação .....	5
2.1.2.3. Avaliação da contaminação, análise de risco e plano de descontaminação ...	6
2.1.2.4. Avaliação e investigação <i>in situ</i> .....	9
2.2. Faixa Piritosa Ibérica - Contextualização.....	10
2.3. Arsénio no meio ambiente .....	11
2.3.1. Translocação, acumulação e toxicidade nos tecidos vegetais .....	12
2.3.2. O caso particular da região de Neves-Corvo.....	14
2.3.3. O caso particular da região de São Domingos .....	16
2.4. Fitorremediação – Uma síntese sobre mecanismos e aplicabilidade.....	16
2.5. <i>Eucalyptus spp.</i> – Integração geográfica, morfológica e parametrização nutricional.....	18
2.5.1. <i>Eucalyptus globulus</i> .....	18
2.5.2. <i>Eucalyptus nitens</i> .....	19
2.5.3. Eucaliptos em Portugal .....	20
2.5.4. Mobilização de elementos minerais em solos contaminados pelo género <i>Eucalyptus</i> .....	21
3.Materiais e Métodos .....	22
3.1. Seriação de zonas contaminadas e recolha de amostras de solos e material vegetal ..	22
3.2. Ensaio piloto com <i>Eucalyptus globulus</i> e <i>Eucalyptus nitens</i> .....	23
3.2.1. Implementação do ensaio.....	23
3.2.2. Análise de parâmetros de crescimento.....	25
3.2.3. Preparação e amostras de plantas para determinações analíticas.....	26
3.2.4. Quantificação de elementos minerais.....	27
3.2.5. Quantificação de pigmentos fotossintéticos .....	28
3.2.6. Determinação de parâmetros fotossintéticos .....	28
3.2.7. Determinação de parâmetros colorimétricos .....	29
3.2.8. Tratamento estatístico.....	30
4.Resultados e Discussão .....	31
4.1. Regiões mineiras - Contaminação em solos e plantas.....	31

4.1.1. Mina de Neves-Corvo .....	31
4.1.2. Mina de São Domingos.....	35
4.2. Ensaios de fitorremediação – Interações entre o arsénio e o <i>Eucalyptus spp.</i> .....	37
4.2.1. Aspectos fenológicos interespecíficos .....	37
4.2.2. Translocação e acumulação de arsénio .....	39
4.2.3. Acumulação total de arsénio.....	43
4.2.4. Índices de permeabilização seletiva foliar .....	43
4.2.5. Mobilização e acumulação de nutrientes e interação com o arsénio.....	44
4.2.5.1. Cálcio .....	45
4.2.5.2. Potássio .....	48
4.2.5.3. Zinco .....	50
4.2.5.4. Ferro.....	53
4.2.6. Desenvolvimento vegetativo .....	55
4.2.7. Acumulação de pigmentos fotossintéticos e conversão bioenergética .....	65
4.2.7.1. Parametrização cromática .....	65
4.2.7.2. O caso particular das clorofilas e carotenoides .....	66
4.2.7.3. Fase fotoquímica e bioquímica da fotossíntese .....	67
4.3. Transposição para regiões mineiras contaminadas .....	80
5.Considerações finais .....	89
6.Referências Bibliográficas.....	92

# Índice de Figuras

Figura 2.1 - Cadeia de responsabilidade, baseada nos princípios de poluidor-pagador (Adaptado de APA, 2016). .....	7
Figura 2.2 - Modelo esquemático do procedimento de avaliação e de remediação do solo (Adaptado de APA, 2016). .....	8
Figura 2.3 - Faixa Piritosa Ibérica (Adaptado de Moura, 2005). .....	10
Figura 2.4 - Localização das zonas contaminadas com arsénio na Europa ( <a href="http://eusoils.jrc.ec.europa.eu">http://eusoils.jrc.ec.europa.eu</a> – Acedido em Março 2016).....	11
Figura 2.5 - Localização de Neves-Corvo e zonas contaminadas com arsénio ( <a href="http://eusoils.jrc.ec.europa.eu">http://eusoils.jrc.ec.europa.eu</a> – Acedido em Março de 2016). .....	15
Figura 2.6 - Sistemas de fitorremediação e respetiva aplicabilidade (Adaptado de Pulford, 2003 e de Hettiarachchi et al., 2012). .....	17
Figura 2.7 – A - <i>Eucalyptus globulus</i> - planta adulta, B – Ramo com folhas e cápsulas, C – Flôr com androceu indefinido, D - Pseudocápsulas, E - Folha adulta falciforme (esquerda), folha jovem (direita).....	19
Figura 2.8 - Larvas (A) e inseto adulto (B) do escaravelho perfurador de eucaliptos ( <i>Phoracantha semipunctata</i> Fab.) ( <a href="http://www.cabi.org/isc/datasheet/40372">http://www.cabi.org/isc/datasheet/40372</a> - Acedido em Março de 2016). .....	20
Figura 2.9 - <i>Ctenarytaina eucaliptii</i> em folhas da <i>E. globulus</i> . .....	21
Figura 3.1 - Localização espacial da zona mineira de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19.1"O) (A) e da zona mineira de São Domingos (B) (37°40'6" N, 7°29'38"O) ( <a href="http://www.maps.google.com">www.maps.google.com</a> - Acedido em Abril de 2016).....	22
Figura 3.2 - Perspetiva geral relativa às condições de crescimento da <i>E. globulus</i> e da <i>E. nitens</i> nos viveiros Altri Florestal S.A., Portugal. ....	23
Figura 3.3 – Ensaio piloto da <i>Eucalyptus globulus</i> (A) e <i>Eucalyptus nitens</i> (B) na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (38°66'06.07"N, 9°20'71.12"O).....	24
Figura 3.4 - Exemplo de um espectro eletromagnético na gama dos raios - X realizado numa amostra de solo.....	27
Figura 3.5 - Representação de um modelo de espaço colorimétrico CIE L*a*b* ((A) <a href="http://www.colourcoil.com/enews/vol3issue2/enews.htm">http://www.colourcoil.com/enews/vol3issue2/enews.htm</a> .- Acedido em Abril de 2016, (B) adaptado de <a href="http://www.techbriefs.com/component/content/article/ntb/tech-briefs/bio-medical/13285">http://www.techbriefs.com/component/content/article/ntb/tech-briefs/bio- medical/13285</a> - Acedido em Abril, 2016). .....	30
Figura 4.1- Imagem da área mineira com indicando as 44 pontos de amostragem, na zona mineira de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O).....	31
Figura 4.2.- Mapa do complexo mineiro de Neves-Corvo, com as localidades de A-do-Corvo e Neves da Graça ( <a href="http://www.maps.google.com">www.maps.google.com</a> - Acedido em Abril de 2016).....	33
Figura 4.3 - Teor de As, Cu, Pb e Zn no solo circundante da mina de São Domingos. ....	36

Figura 4.4 - Estado fenológico da <i>E. globulus</i> (A) e da <i>E. nitens</i> (B), em Dezembro de 2014, nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa. ....	37
Figura 4.5 - <i>E. globulus</i> (A) e <i>E. nitens</i> (B), em Março de 2015 (T1), apresentando um estado fenológico característico da época do ano ( <i>i.e.</i> , novas folhas e ramos), nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa. ....	38
Figura 4.6 – Alguns aspetos relativos ao estado fenológico da <i>E. globulus</i> (A) e da <i>E. nitens</i> (B), no final de Maio de 2015 (T2), nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa. ....	38
Figura 4.7 – Estado fenológico da <i>E. globulus</i> (A) e da <i>E. nitens</i> (B) no final de Julho de 2015 (T3), nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa. ....	39
Figura 4.8 - Teor médio de arsénio no solo da <i>E. globulus</i> (A) e da <i>E. nitens</i> (B), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), ao longo do período experimental. O solo das plantas controlo não apresentou arsénio, não tendo sido, por este motivo, incluído nos gráficos. ....	40
Figura 4.9 - Teor médio de arsénio na raiz da <i>E. globulus</i> (A) e da <i>E. nitens</i> (B), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %) ao longo do período experimental. O solo das plantas controlo não apresentaram arsénio, não tendo sido, por este motivo, incluído nos gráficos. ....	41
Figura 4.10 - Análises espectralométrica, utilizando o sistema $\mu$ – EDXRF, na raiz da <i>E. nitens</i> , em amostras do tratamento 200, colhidas em T3. As figuras A, B, C correspondem à raiz parcialmente isenta de súber, com a suberização e na forma de pastilha, respetivamente. ....	41
Figura 4.11 - Análise por espectrometria (com recurso ao sistema $\mu$ – EDXRF), de uma folha da <i>E. nitens</i> , do tratamento 200, em T3. ....	42
Figura 4.12 - Acumulação total de arsénio nas raízes da <i>E. globulus</i> (A) e da <i>E. nitens</i> (B) ( $\pm$ Erro Padrão); ( <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %) ao longo do período experimental. As plantas de controlo não apresentaram arsénio na raiz, não tendo, por este motivo, sido incluídas nos gráficos. A acumulação total nas raízes resulta da multiplicação da biomassa total pela concentração de arsénio. ....	43
Figura 4.13 - Teor médio de cálcio na raiz (1), no caule (2) e nas folhas (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	47
Figura 4.14 - Teor médio de potássio na raiz (1), no caule (2) e nas folhas (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	49
Figura 4.15 - Teor médio de zinco na raiz (1), no caule (2) e nas folhas (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do ensaio do período experimental. ....	52



Figura 4.16 - Teor médio de ferro nas raízes, (1) ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %) na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	54
Figura 4.17 – Crescimento apical médio na parte aérea (1), peso seco total (2), razão peso seco aéreo / raiz (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	56
Figura 4.18 - Pesos secos da raiz (1), caule (2) e foliar (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	58
Figura 4.19 – Racio foliar relativo - LWR (1), número de folhas por planta (2) e diâmetro do caule (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	60
Figura 4.20 - Área foliar (1) e Área foliar específica - SLA (2), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	62
Figura 4.21 - Razão da área foliar - LAR (1), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), Taxa líquida de assimilação - NAR (2) e Taxa de crescimento relativo - RGR (3), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	64
Figura 4.22 - Teores de clorofila total (1) e carotenoides totais (2) nas folhas, ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %) na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	67
Figura 4.23 – Condutância estomática - $g_s$ (1), Transpiração - $Tr$ (2) e Taxa fotossintética líquida - $P_n$ (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	69
Figura 4.24 - $F_0$ (1) e $F_v/F_m$ (2), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	71
Figura 4.25 - $\phi_E$ , $Y_{(NPQ)}$ e $Y_{(NO)}$ , ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	73
Figura 4.26 - $q_p$ (1), NPQ (2) e $q_N$ (3), ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	75
Figura 4.27 - $q_L$ (1) e ETR (2) ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	77
Figura 4.28 - $F_v'/F_m'$ (1) e $F_s/F_m'$ (2) ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %) na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	78
Figura 4.29 - Fotoinibição total ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %) na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B), ao longo do período experimental. ....	79
Figura 4.30 – A - Localização das 44 amostras de solo analisado; B - Mapa morfológico da zona mineira de Neves-Corvo. Vermelho = Zona contaminada, Verde = Zonas de incerteza, Azul = Zonas não contaminadas, a partir das 44 amostras. ....	85



## Índice de Tabelas

Tabela 2.1 - Teores médios de arsénio em <i>Cistus ladanifer</i> na área da mina de Neves-Corvo (Adaptado de Batista, 2003)..	16
Tabela 3.1 - Análise estatística das temperaturas médias (°C) registadas nas medições in vivo (trocas gasosas e fluorescência da clorofila <i>a</i> nas <i>E. globulus</i> e <i>E. nitens</i> . Cada valor corresponde à média das temperaturas efetivamente medidas ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %).	25
Tabela 3.2 - Tipos de preparação das amostras para determinações analíticas.	26
Tabela 4.1 - Teores de arsénio relativos a 44 pontos de recolha de solo na região da mina de Neves-Corvo.	32
Tabela 4.2 - Teores médios de arsénio referentes a duas zonas urbanas circundantes à mina de Neves-Corvo.	32
Tabela 4.3 - Limites passíveis de intervenção e monitorização, de acordo com a APA (2015).	32
Tabela 4.4 - Teores de As, Cu, Pb e Zn em folhas de diversas espécies recolhidas a cerca 600 metros da mina de Neves-Corvo.	33
Tabela 4.5 - Teores de As, Cu, Pb e Zn na parte edível de frutos recolhidos a cerca de 600 metros da mina de Neves-Corvo (n.d. – abaixo do limite de deteção).	34
Tabela 4.6 - Teores de As, Cu, Pb e Zn em folhas de diversas espécies localizadas a 3 km da mina de Neves-Corvo (n.d. – abaixo do limite de deteção).	34
Tabela 4.7 - Teores de As, Cu, Pb e Zn na parte edível de frutos de diversas espécies localizadas cerca de 3 km da mina de Neves-Corvo (n.d. – abaixo do limite de deteção).	34
Tabela 4.8 - Teores de alguns elementos contaminantes em folhas de espécies vegetais localizadas na zona de São Domingos (n.d. – abaixo do limite de deteção do aparelho).	36
Tabela 4.9 - Valores de arsénio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos vários pontos da raiz.	42
Tabela 4.10 - Teores médios de arsénio no caule e nas folhas da <i>E. nitens</i> , aos 6 meses (T3), no tratamento 200 (determinação por espectrofotometria efetuada com o sistema portátil de XRF).	42
Tabela 4.11 - Teores de As na folha da <i>E. nitens</i> , do tratamento 200, em T3 (determinação por espectrofotometria efetuada com o sistema $\mu$ – EDXRF).	42
Tabela 4.12 - Condutância eletrolítica nas folhas da <i>E. globulus</i> e da <i>E. nitens</i> , ao longo do período experimental.	44
Tabela 4.13 - Parâmetros colorimétricos na 2ª folha mais jovem das ramificações mais desenvolvidas, a um metro do solo e com exposição a sudeste (coordenadas $L^*$ , $a^*$ , $b^*$ , $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %) na <i>E. globulus</i> (A) e na <i>E. nitens</i> (B) ao longo do período experimental.	66

Tabela 4.14 - Fotoinibição crónica, fotoinibição dinâmica, ( $\pm$ Erro Padrão; <i>p-value</i> , no intervalo de confiança de 95 %), na <i>E. globulus</i> e na <i>E. nitens</i> , ao longo do período experimental. 79	
Tabela 4. 15 - Valores de arsénio, cobre, chumbo e zinco em zonas mineiras que estão mencionadas como sítios de potencial risco de contaminação ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). ..... 82	

## Lista de Abreviaturas

APA	- Agência Portuguesa de Ambiente
Car	- Carotenoides
Chl	- Clorofila
ETR	- Taxa de transporte de eletrões
$F_0$	- Fluorescência mínima basal
$F_m$	- Fluorescência máxima
FPI	- Faixa Piritosa Ibérica
FRX	- Fluorescência de Raio X
$F_s/F_m'$	- Indicador da taxa de inativação do PSII
$F_v/F_m$	- Eficiência quântica máxima do PSII
$F_v'/F_m'$	- Eficiência fotoquímica de converção de energia do PSII à luz
$g_s$	- Condutância estomática
LAR	- Razão da área foliar ( <i>Leaf Area Ratio</i> )
LWR	- Racio foliar relativo ( <i>Leaf Weight Ratio</i> )
NAR	- Taxa líquida de assimilação ( <i>Net Assimilation Rate</i> )
NPQ	- Dissipação não fotoquímica
PAR	- Radiação fotossintética ativa
PF	- Peso Fresco
$P_n$	- Taxa fotossintética líquida
PS	- Fotossistema
$q_L$	- <i>Non-photochemical extinction coefficient</i>
$q_N$	- <i>Quenching</i> não fotoquímico
$q_p$	- <i>Quenching</i> fotoquímico
RGR	- Taxa de crescimento relativo ( <i>Relative Growth Rate</i> )
SLA	- Área foliar específica ( <i>Specific Leaf Area</i> )
$T_r$	- Transpiração
USEPA	- <i>United States Environmental Protection Agency</i>
V	- Volume
$\phi_e$	- <i>Estimate of Quantum Yield of Photosynthetic Noncyclic Electron Transport</i>
$Y_{(NO)}$	- <i>Yield of non-regulated quantum energy dissipated in PSII</i>
$Y_{(NPQ)}$	- <i>Yield of regulated quantum energy dissipated in PSII</i>



# 1.Prefácio

Estima-se que aproximadamente há 10000 anos o ser humano iniciou a descoberta dos metais e terá adquirido a capacidade para fabricar objetos para utilização quotidiana. Julga-se que, por acaso, ao colocar certas “pedras” (agora entendidos como minérios) perto de fogueiras, o calor desenvolvido terá sido suficiente para provocar a respetiva fusão e produzir um material com aspeto metálico que poderia ser moldado, originando formas que permitiriam a sua utilização rotineira. Assim, com a generalização do uso de alguns metais, a humanidade entrou na “Idade do Bronze”, sendo o cobre, em 5000 a.C., um dos mais utilizados. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico, a exploração mineira vem adquirindo um acentuado impacto nas sociedades humanas (Weindorf *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014), proliferando enormes escombreliras, que apresentam concentrações elevadas de metais e metalóides, que contaminam os solos em redor das minas (Abreu *et al.*, 2009, 2012a) e são responsáveis pela dispersão dos metais, muitas vezes até áreas situadas a quilómetros de distância dos locais de exploração. A contaminação de solos, linhas de água e lençóis de água subterrâneos, podem causar acentuados problemas no ambiente e na saúde pública (Austruy *et al.*, 2013). Os metais e metalóides tendem a acumular-se nas camadas superficiais do solo, sendo posteriormente arrastados e lixiviados por escorrência das águas da chuva, ou absorvidos pelas plantas, passando eventualmente para a cadeia alimentar (Austruy *et al.*, 2013; Weindorf *et al.*, 2013). Usualmente, a maior parte dos terrenos que circundam as zonas mineiras são solos com aptidão agrícola. Eventualmente poderá ainda existir alguma urbanização que tende a ser afetada pela contaminação decorrente da mineração (Acosta *et al.*, 2011). De facto, nas áreas industriais e densamente povoadas, onde os solos e a biota ficaram contaminadas, essa ação poluente pode ser particularmente intensa (Reboredo, 1981, 1985, 1992,1993; Reboredo e Ribeiro, 1984). Neste contexto, os solos, a par das massas de água superficiais e subterrâneas, são caracterizados por uma elevada acidez, associada ao teor de metais e metalóides (Márquez - García *et al.*, 2012; Olías *et al.*, 2016).

A remoção de contaminantes do solo, nomeadamente metais pesados, com técnicas convencionais, a saber processos térmicos, lavagens e métodos eletroquímicos, é geralmente dispendiosa e apresenta efeitos nefastos na diversidade microbológica. Neste contexto, estas técnicas vêm sendo progressivamente substituídas pela descontaminação dos solos, aplicando tecnologias de fitorremediação (Pulford, 2003).A fitorremediação é um processo que utiliza plantas vasculares *in situ*, recuperando solos contaminados ( King *et al.*, 2008; Vamerali *et al.*, 2009), como é o caso de alguns existentes na Península Ibérica (Márquez - García *et al.*, 2012; Quispe *et al.*, 2013).

A extração de minério na Península Ibérica faz-se desde o período Calcolítico (aproximadamente entre 2500 - 1800 a.C.). No século I a.C. surgiram os primeiros escritos sobre a riqueza mineral da Península Ibérica, tendo Estrabão, na sua grande obra *Geografia*, feito referência a testemunhos oculares de alguns relatos, ainda que muitas vezes misturando

realidade e lendas (Martins, 2008). Posteriormente, já na Península Ibérica islâmica, e na Idade Média, com a Península já cristianizada, continuaram a surgir obras que falam da existência e da extração de minério (Martins, 2008). Uma das áreas mineiras mais relevantes da Península Ibérica, porventura a mais importante, é a denominada *Iberian Pyrite Belt* (em português, “Faixa Piritosa Ibérica”). A sua exploração começou no Calcolítico, abrangendo o sul de Portugal e o sudoeste de Espanha (com cerca de 250 km de comprimento e 25 - 70 km de largura, com mais de 80 depósitos de minério), sendo porventura a faixa com a maior área de extração de sulfuretos do mundo (Leistel *et al.*, 1998). Ao longo dos séculos, os depósitos superficiais desta faixa piritosa ficaram esgotados, prevalecendo atualmente a prospeção a grandes profundidades. Em Portugal, a mina de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O), aberta em 1977, apresenta atualmente um elevado potencial na extração de zinco. No entanto, a área envolvente desta mina, assim como outras áreas da Faixa Piritosa Ibérica, estão contaminadas por metais e metalóides, sendo o arsénio um dos principais contaminantes (Sarmiento *et al.*, 2009; Márquez - García *et al.*, 2012). Adicionalmente, também na mina de São Domingos (37°67'59,02"N, 7°50'16,96"O), de onde se extraiu cobre, ouro e prata até 1965, verificou-se que a pirite apresentava teores médios de enxofre, cobre e zinco de 46 %, 1,25 % e 3 %, respetivamente (CEMSD, 2016). Nestas zonas de exploração mineira também se produziram elevadas quantidades de resíduos não confinados, ou depositados em aterros nas imediações das minas, contendo elevadas contaminações, devido aos métodos de extração e processamento de oxidação de minério (Moura, 2005; Sarmiento *et al.*, 2007; Abreu *et al.*, 2009; Alvarenga *et al.*, 2012; Márquez - García *et al.*, 2012). Estes resíduos, ricos em sulfuretos e metais tóxicos, sofreram ao longo dos anos lixiviação devido à precipitação atmosférica, assim como oxidação promovida pelo oxigénio atmosférico e pela água, efeitos que se tornaram nefastos no meio envolvente (Márquez - García *et al.*, 2012).

Este estudo tem por objetivo caracterizar a contaminação, nomeadamente por arsénio, nas imediações das minas de Neves-Corvo e São Domingos, e desenvolver / propor uma metodologia para fitorremediação dos solos recorrendo ao *Eucalyptus spp.*. O mesmo, após prefação subdivide-se em quatro capítulos principais. O primeiro capítulo pretende abordar trabalhos de referência de outros autores, para fundamentar os objetivos deste estudo. O segundo capítulo apresenta um descritivo dos materiais e métodos utilizados. O terceiro capítulo reporta resultados, circunscrevendo a respetiva discussão essencialmente em dois itens principais das Minas de Neves-Corvo e de São Domingos: avaliação das contaminações por arsénio no solo e em espécies vegetais que o colonizam (como é o caso de *Cistus ladanifer*, *Eucalyptus globulus* e *Pinus pinaster*); caracterização dos índices de mobilização / translocação e armazenamento de arsénio, por *Eucalyptus globulus* Labill e *Eucalyptus nitens* Maiden, assim como dos respetivos efeitos fisiológicos, equacionando-se ainda a utilização destas espécies para fitorremediação dos solos contaminados por arsénio. No quarto capítulo efetuam-se algumas considerações finais com fundamentação no trabalho desenvolvido.



## 2.Introdução

### 2.1. O solo

#### 2.1.1. Definição e caracterização do conceito solo

A palavra solo provém do Latim *solum*, que significa, suporte, superfície ou base. A definição de solo adquire diferentes conceitos, de acordo com a atividade humana para que é utilizado, e pelas diferentes ciências que o estudam. Porém, como premissa histórica, o solo surge como substrato agrícola. Mais tardiamente surgiu uma visão mais alargada, que centra o solo como uma componente vital de processos e ciclos ecológicos. Com o aumento da população humana surgiram novas utilizações do solo, que por vezes ameaçam a respetiva qualidade, nomeadamente o caso da subexploração dos recursos (mineração e agricultura) e a capacidade para suportar infraestruturas e acomodar resíduos. No entanto, o solo é um recurso natural com elevado potencial económico e não renovável à escala humana (Gerim, 2012).

Na União Europeia, foram identificados mais de meio milhão de locais contaminados, que agregam riscos com elevados impactes ambientais, económicos e sociais (AEA, 2017). Neste enquadramento, surgiu um compromisso a nível Europeu para a proteção e conservação do solo, visando uma gestão sustentável do território e a sua proteção adequada, para além de uma intervenção nas regiões contaminadas (AEA, 2017).

No caso da República Portuguesa, a Lei n.º 19/2014, de 14 de Abril, define as bases da política para o ambiente a nível nacional, que tem como objetivo: “a efetivação dos direitos ambientais através da promoção do desenvolvimento sustentável, suportada na gestão adequada do ambiente, em particular dos ecossistemas e dos recursos naturais, contribuindo para o desenvolvimento de uma sociedade de baixo carbono e uma «economia verde», racional e eficiente na utilização dos recursos naturais, que assegure o bem-estar e a melhoria progressiva da qualidade de vida dos cidadãos“. Tendo como princípios materiais para o ambiente, (artigo 3º) a prevenção e a precaução “que obrigam à adoção de medidas antecipatórias com o objetivo de obviar ou minorar, prioritariamente na fonte, os impactes adversos no ambiente, com origem natural ou humana, tanto em face de perigos imediatos e concretos como em face de riscos futuros e incertos, da mesma maneira como podem estabelecer, em caso de incerteza científica, que o ónus da prova recaia sobre a parte que alegue a ausência de perigos ou riscos“. Mas, de acordo com o artigo 4º, as políticas públicas de ambiente estão ainda subordinadas ao conhecimento e à ciência “que obrigam a que o diagnóstico e as soluções dos problemas ambientais devam resultar da convergência dos saberes sociais com os conhecimentos científicos e tecnológicos, tendo por base dados rigorosos, emanados de fontes fidedignas e isentas”.

Toda a sociedade surge envolvida nos deveres ambientais, nomeadamente o “de o proteger, de o preservar e de o respeitar, de forma a assegurar o desenvolvimento sustentável a longo prazo, nomeadamente para as gerações futuras” assim como “de contribuir para a criação de um

ambiente sadio e ecologicamente equilibrado e, na ótica do uso eficiente dos recursos e tendo em vista a progressiva melhoria da qualidade de vida, para a sua proteção e preservação”. Acresce que para a gestão do solo e do subsolo, o artigo 10º, alínea e), reporta que “A gestão do solo e do subsolo impõe a preservação da sua capacidade de uso, por forma a desempenhar as respetivas funções ambientais, biológicas, económicas, sociais, científicas e culturais, mediante a adoção de medidas que limitem ou que reduzam o impacto das atividades antrópicas nos solos, que previnam a sua contaminação e degradação e que promovam a sua recuperação”.

No entanto, a Legislação Portuguesa ainda carece de legislação complementar para acautelar, de forma integrada e consistente, a proteção do solo, na vertente preventiva, antecipativa e de remediação. Aponte-se contudo que, para o caso de solos contaminados, em que a solução acordada seja a remediação do solo, o Projeto do Decreto de Lei de Solos Contaminados, na sua Secção II – Processo de remediação do solo, artigo 13º - Princípios e objetivos da remediação (APA, 2015), tem como principais alíneas:

“a) Selecionar a melhor ou as melhores técnicas de remediação disponíveis, considerando o objetivo da minimização dos impactos ambientais e da exposição à contaminação, quer dos indivíduos quer dos ecossistemas, tendo em conta o uso atual ou futuro aprovado do solo;

b) Procurar a máxima eficácia das possíveis técnicas de remediação do solo contaminado, tendo em consideração o período necessário à sua implementação e à obtenção dos resultados pretendidos, bem como a prevenção de outras potenciais contaminações delas resultantes;

c) Reduzir e, sempre que possível, eliminar os focos de contaminação, quando as condições ambientais, hidrológicas e geológicas do local o permitam, acautelando a minimização dos recursos naturais despendidos para a sua execução;

d) Ponderar a viabilidade das técnicas de remediação do solo contaminado, suportadas por uma análise custo-benefício”.

Note-se contudo, que o objetivo de remediação também pode ser alcançado através da inibição significativa da migração dos contaminantes, do controlo das vias de exposição dos recetores, do confinamento e gestão dos solos contaminados, ou de uma regeneração natural controlada. Porém, estes objetivos terão de ser suportados por análises custo-benefício, prazos adequados e salvaguarda da saúde humana e do ambiente.

### 2.1.2. Contaminação dos solos

A formação do solo é um processo lento e um recurso não renovável à escala humana, sendo a sua qualidade constantemente ameaçada por diferentes fatores envolvendo o aumento populacional, nomeadamente a erosão, salinidade, acidificação, diminuição de matéria orgânica e a perda de biodiversidade (Gerim, 2012). No entanto, um solo considera-se contaminado quando as suas características naturais se alteram, devido à adição antropogénica (direta ou indireta) associada a compostos químicos que lhe modificam as características naturais. O aumento de substâncias químicas, podendo exceder os limites de referência, limitam a utilização

do solo, degradam a qualidade das águas (superficiais e subterrâneas) e constituem um risco para a saúde pública (Brito, 2005).

Na União Europeia cada estado-membro é responsável pela implementação de estratégias nacionais de reabilitação, baseadas numa lista comum sobre atividades potencialmente contaminantes. Aponte-se contudo que países como Holanda e Alemanha têm normas a nível nacional, enquanto que a Catalunha e o País Basco têm normas regionais. No caso de Portugal, a Agência Portuguesa do Ambiente (APA, 2015) recomenda a adoção das normas constantes no *Guidelines for Use at Contaminated Sites in Ontario* (Ontario, Ministry of the Environment, 2011).

#### 2.1.2.1. Atividades potencialmente contaminantes

Consideram-se atividades potencialmente contaminantes do solo, aquelas que decorrem do manuseamento de substâncias, cujas características físico-químicas, biológicas e toxicológicas possam ocasionar danos. Estas atividades podem ter origens industriais, comerciais e agrícolas quando se observam as seguintes particularidades (Brito, 2005):

- Existência de processos que possam provocar o aumento da concentração de substâncias poluentes no solo e nas águas subterrâneas;
- Presença de substâncias que possuem potencial para causar danos em bens a proteger, via solos e águas subterrâneas;
- Atividade industrial e comercial com histórico decorrente do manuseio, armazenamento e deposição inadequada de matérias-primas, produtos e resíduos;
- Atividade industrial e comercial com histórico associado à ocorrência de derrames e acidente.

#### 2.1.2.2. Modelo conceptual de contaminação

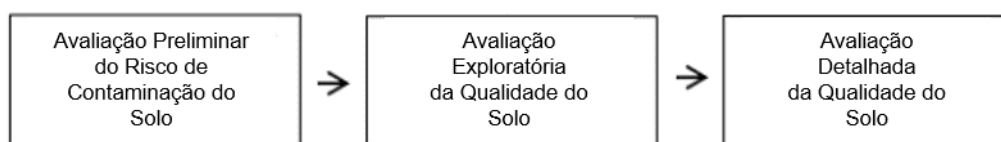
A abordagem da análise de risco deverá então ter como base um modelo conceptual do tipo Fonte (ou origem) → Trajeto → Alvo (Petts, 1997, *in* Brito, 2005), em que (Brito, 2015):

- A origem, ou fonte de contaminação, ocorre se os valores das concentrações dos poluentes ultrapassam os teores considerados de referência;
- O trajeto, ou meio de transferência de contaminação, assume a dupla condição de transmissor / barreira e recetor primário;
- O alvo, ou recetor secundário é, não somente o meio biofísico, mas ainda o meio antropogénico.

### 2.1.2.3. Avaliação da contaminação, análise de risco e plano de descontaminação

Em qualquer ambiente, torna-se essencial implementar uma metodologia adequada para avaliação do grau de contaminação existente numa determinada área, visando a minimização de riscos para a saúde pública e ambiente. Este conjunto de medidas deverá ter por base o conhecimento das características do local, bem como os danos provocados pelo excesso de elementos poluentes. Com base nesta avaliação deverá então proceder-se a uma tomada de decisão sobre as formas de intervenção mais adequadas para o local.

A APA desenvolveu um projeto de avaliação e remediação dos solos, elaborado pelo operador (responsável pela fonte de contaminação), onde prevê a realização da etapa 1 acima mencionada (APA, 2015). Esta 1ª Etapa divide-se em três sub-etapas progressivamente mais detalhadas, que integram sequencialmente:



A avaliação preliminar do risco de contaminação do solo é realizada pelo operador, que submete à APA um formulário. Desta avaliação preliminar, resulta a atribuição de uma menção qualitativa do risco de contaminação do solo - “risco potencial mínimo”, “risco potencial baixo”, “risco potencial médio” ou “risco potencial elevado”, sendo emitida uma Declaração do Risco de Contaminação do Solo em conformidade (APA, 2015).

A APA encontra-se ainda a elaborar um projeto legislativo relativo à prevenção da contaminação e remediação de solos – PRoSOLOS - (APA, 2015). Neste contexto, os desafios do projeto legislativo visam:

- Suprir uma importante lacuna no quadro legislativo nacional;
- Contribuir para o compromisso do crescimento verde;
- Cumprir compromissos assumidos por o / a:
  - i) Roteiro para uma Europa eficiente no uso dos recursos;
  - ii) Resolução das Nações Unidas *The Future We Want*, resultante da Cimeira Rio+20;
  - iii) 7º Programa geral de ação da União para 2020 em matéria de ambiente “Viver bem dentro dos limites no nosso planeta”.

Este diploma estabelece a cadeia de responsabilidade, considerando a avaliação da qualidade do solo e a sua eventual remediação baseada nos princípios do poluidor-pagador e da sua responsabilidade associada (Figura 2. 1).



Figura 2. 1 - Cadeia de responsabilidade, baseada nos princípios de poluidor-pagador (Adaptado de APA, 2016).

Apresenta-se na Figura 2. 2 o modelo que a APA preconiza como procedimento de avaliação e de remediação do solo. O diploma menciona os valores de referência para os contaminantes mais comuns que no futuro serão usados na avaliação exploratória, ou para efeitos de remediação do solo contaminado.

A segunda fase de investigação (*i.e.*, investigação exploratória da qualidade do solo), com base nos valores de referência previamente estabelecidos, pretende confirmar a hipótese de contaminação, assim como determinar a natureza e concentração dos elementos contaminantes, identificar um padrão de distribuição espacial da contaminação dos terrenos (solo e águas subterrâneas) e determinar o grau de contaminação.

A terceira e última fase (*i.e.*, avaliação detalhada da qualidade do solo), pretende finalizar o modelo de contaminação, com a determinação do volume dos solos e águas para a sua respetiva descontaminação. Nesta fase, pretende-se a elaboração de uma Análise de Risco, para uma futura ocupação dos terrenos, a qual deve determinar se os riscos são aceitáveis, para a saúde pública e para o ambiente. Uma monitorização e controlo adequados do local, têm que manter e garantir uma manutenção de um nível de risco aceitável a médio e longo prazo (Brito, 2005).

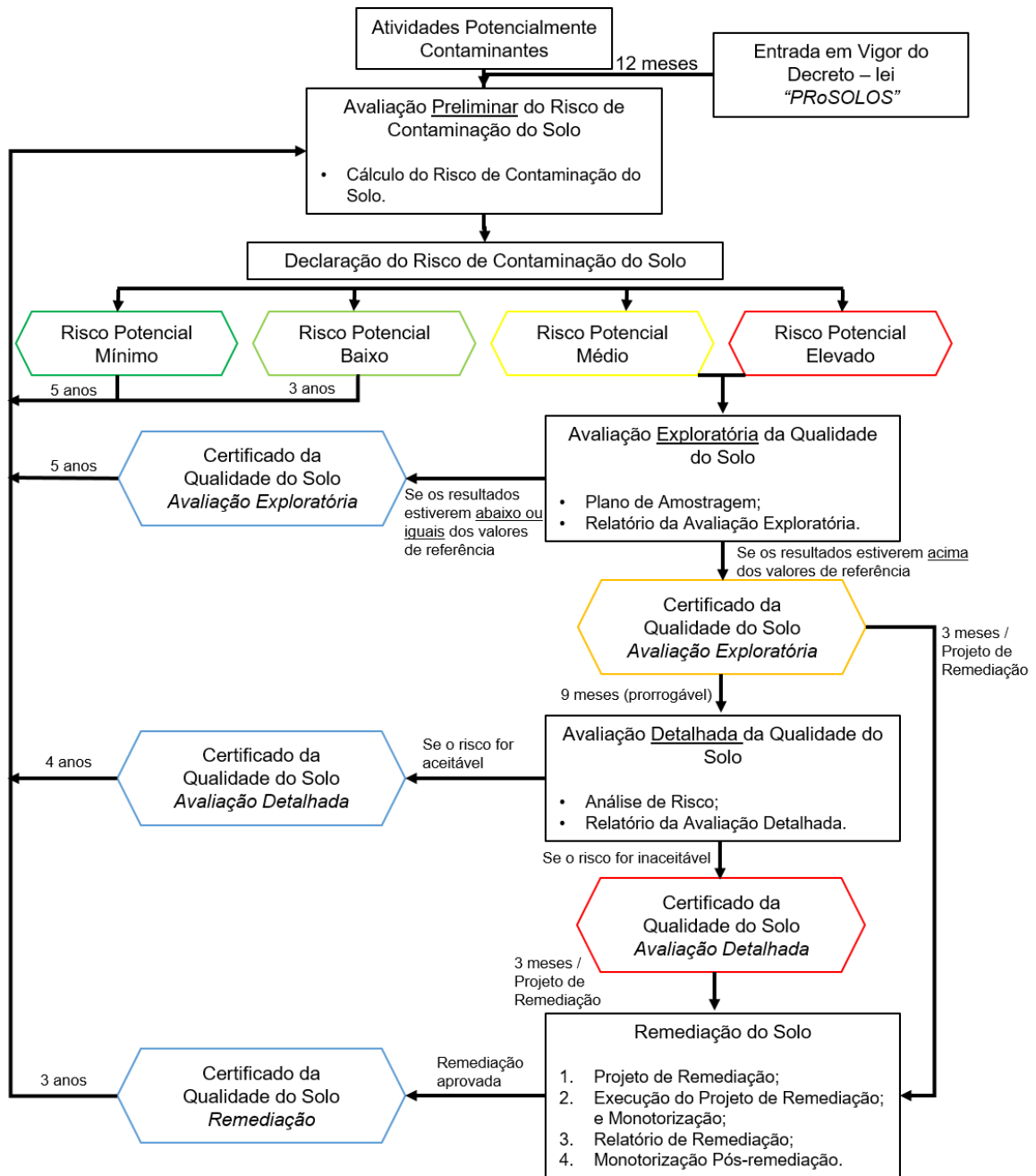


Figura 2. 2 - Modelo esquemático do procedimento de avaliação e de remediação do solo (Adaptado de APA, 2016).

#### 2.1.2.4. Avaliação e investigação *in situ*

A avaliação preliminar do risco de contaminação do solo, permite assegurar a obtenção de informação das atuais características dos terrenos, incluindo a distribuição dos contaminantes. Neste contexto, toda a caracterização das condições dos terrenos contaminados é essencial na tomada decisão para as medidas de remediação a implementar no local.

A avaliação exploratória de contaminantes poderá ser realizada através de um zonamento superficial dos locais pretendidos, com recurso a equipamentos que possibilitem a deteção de metais. O espectrómetro NITON (*Thermo Fisher Scientific*, Germany), que permite a deteção de um vasto conjunto de elementos químicos no solo, por fluorescência de Raios X é, neste enquadramento, uma possibilidade. O modo de operação deste aparelho encontra-se em conformidade com o método 6200 da USEPA (*Field Portable XRF Spectrometry for the determination of elemental concentrations in Soil and Sediment - EPA 6200*) (Brito, 2015).

Não menos importante é a recolha de dados históricos (histórico de atividades e processos industriais), consulta de relatórios técnicos e trabalhos académicos, bem como mapas e todo o tipo de informação que caracterize o local. O estudo dos dados existentes permite uma avaliação, e um ponto de partida para novas análises, que podem ser comparadas a outras pré-existentes.

No formulário do projeto de avaliação e remediação dos solos, fornecido pela APA (ponto 7- Atividades e ocorrências históricas) nada se menciona sobre o histórico da contaminação difusa do solo das zonas envolventes. A contaminação difusa envolve a deposição atmosférica como maior potencial de contaminação do solo por metais pesados (*i.e.*, arsénio e chumbo) (Silva, 2008). Note-se que a hipótese de contaminação poderá ser confirmada nesta etapa, se a caracterização do grau de contaminação ficar acima dos valores de referência previamente estabelecidos. No entanto, os valores de referência nem sempre são os que estão estabelecidos por lei, pois existem casos onde os valores de referência são ao nível local, regional ou de objetivo, dependendo de anomalias naturais geoquímicas. As concentrações de elementos contaminantes nestas áreas estão acima dos valores considerados de base (*i.e.*, indicados na legislação utilizado pela APA). Assim, antes de considerar o local contaminado e de possível intervenção, é necessário saber o valor de fundo para o local (*local geochemical background*) para cada elemento em causa. Estipulado esse valor para cada contaminante (*threshold values*), este servirá de base (ou de corte) e todos os valores acima serão denominados como “contaminantes derivados das atividades humanas”. Numa posterior fase de remediação, são estes valores acima do índice de corte que serão alvo de intervenção (Barbosa, 2002, Ferreira *et al.*, 2016, Pelica *et al.*, 2018).

Neste enquadramento destaca-se a zona da Faixa Piritosa Ibérica, que apresenta valores de base superiores aos estabelecidos pela legislação utilizada pela APA.

## 2.2. Faixa Piritosa Ibérica - Contextualização

A Faixa Piritosa Ibérica (FPI) (Figura 2.3) constitui uma importante província metalogénica, localizada no sudoeste da Península Ibérica (Batista *et al.*, 2007), que forma um arco com cerca de 250 km de comprimento e 25 - 70 km de largura. A sua importância decorre da grande quantidade de depósitos de minério (algumas estimativas aponta para mais de 80 mil toneladas) e da elevada concentração de sulfuretos metálicos (Leistel *et al.*, 1998).

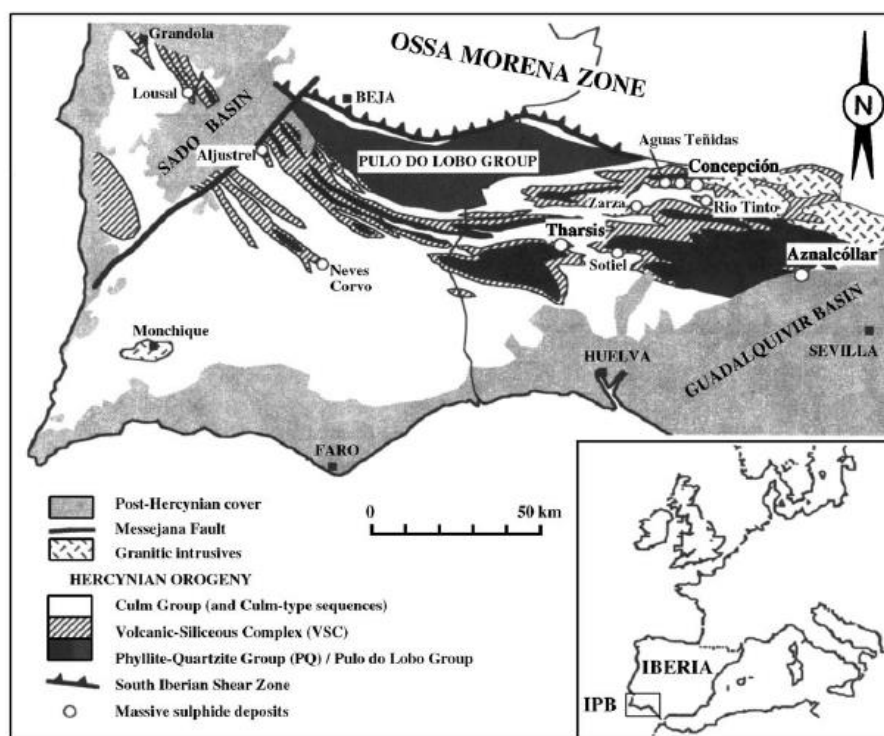


Figura 2.3 - Faixa Piritosa Ibérica (Adaptado de Moura, 2005).

Subsiste nesta área uma longa história sobre a exploração de pirite (Batista *et al.*, 2012a). A mineração tem ocorrido desde o período Calcolítico, encontrando-se os depósitos superficiais atualmente esgotados. Assim, a prospeção vem ocorrendo a maiores profundidades (Leistel *et al.*, 1998; Batista *et al.*, 2012a; Olías *et al.*, 2016). Acresce que a exploração intensiva de longa duração causou impactos ambientais prolongados e profundos nesta zona (Batista *et al.*, 2007).

Atualmente, a maior parte da atividade mineira cessou na FPI, essencialmente devido à exaustão do minério e à baixa rentabilidade (Santos Oliveira *et al.*, 2002; Santos *et al.*, 2011). Apenas duas minas se encontram em atividade, a mina de Neves-Corvo e a mina de Aljustrel. Na mina de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O), o primeiro filão de cobre foi descoberto em 1977, e a produção iniciou em 1988. Nesta mina, a taxa de produção de cobre e estanho é a mais elevada da Europa (Moreira *et al.*, 2011), sendo ainda um dos depósitos de cobre mais importantes do mundo, com mais de 300 milhões de toneladas de sulfuretos (Batista *et al.*, 2007). Adicionalmente, a mina de São Domingos (37°67'59,02"N, 7°50'16,96"O), com cerca de 10 000 m<sup>2</sup> é rica em sulfuretos (com teores elevados de cobre, arsénio, zinco e chumbo), porém,



encontra-se atualmente inativada, detendo os solos circundantes uma elevada contaminação por esses elementos.

### 2.3. Arsénio no meio ambiente

O arsénio na crosta terrestre ocupa a 52ª posição em termos de concentração (Adriano, 1986). Este elemento tem sido apontado como mutagénico, citotóxico e genotóxico, estando associado ao cancro da pele, rins, pulmão e bexiga (Otones *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Bolan *et al.*, 2013; Rahman *et al.*, 2014). Atualmente estima-se que afeta mais de 150 milhões de seres humanos, devido à concentração elevada na água destinada ao respetivo consumo, em particular no Sudeste asiático (Rahman *et al.*, 2014). Nos solos da Europa reconhecem-se vastas áreas onde o arsénio ocorre com níveis elevados, não só como contaminante mas ainda como constituinte das rochas (Figura 2.4).

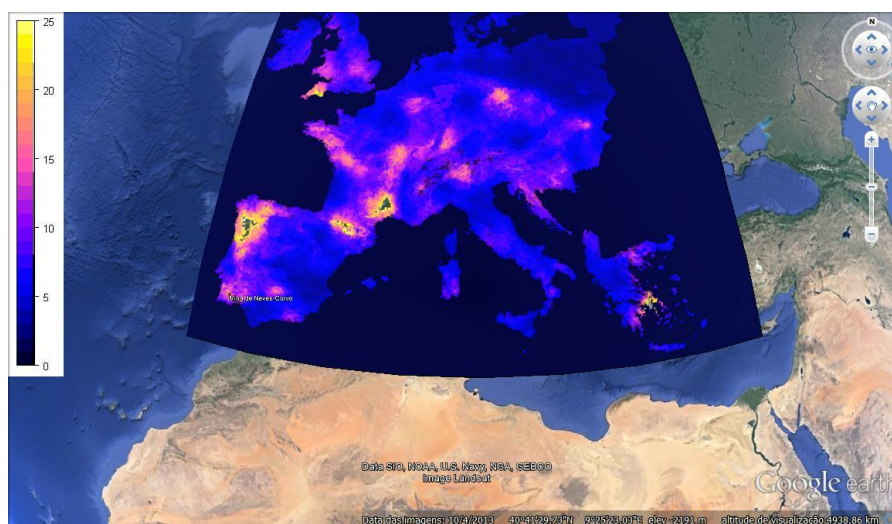


Figura 2.4 - Localização das zonas contaminadas com arsénio na Europa (valores em  $\mu\text{g As g}^{-1}$ ). (<http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu> – Acedido em Março 2016).

O arsénio está associado a vários tipos de mineralização de sulfuretos metálicos de Cu, Pb e Zn (para além dos acessórios - Au e Ag), sendo um semi-metal indicador na prospeção destes elementos. A sua mobilidade em ambiente primário (rochas, mineralizações, etc.) está relacionada com as fases finais de recristalização em veios ou fraturas. As associações geoquímicas do arsénio com outros elementos são várias, destacando-se (Batista, 2003): calcopirites; ouro em fraturas hidrotermais; prata em fraturas; Cu, Ni, Co, Fe e Ag em jazigos de sulfuretos maciços de Cu e Ni; U, em alguns depósitos; Cu, V, U e Ag em depósitos sedimentares de Cu; rochas ricas em fosfatos.

O arsénio está associado a substituições isomórficas na apatite, pirite, galena, esfalerite e outros sulfuretos. Em ambientes secundários (*i.e.*, solos, água e sedimentos) a mobilidade é mais

fraca, contudo persiste em presença de oxidantes, óxidos e oxi-hidróxidos de ferro e em pirites (Batista, 2003).

A distribuição do arsénio pelos principais tipos de rocha é, de uma forma geral, uniforme, variando a concentração entre 0,5 - 2,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Tavares *et al.*, 2009). Em solos não contaminados, a concentração total de arsénio raramente excede 10  $\mu\text{g g}^{-1}$ , no entanto se o solo for sujeito a tratamentos agrícolas (nomeadamente com agroquímicos), o respetivo valor pode aumentar (Batista, 2003). De acordo com a Agência Portuguesa do Ambiente (APA, 2015), os limites máximos para o arsénio, em solos agrícolas, ou para outros usos particulares da propriedade, devem situar-se em 11  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Em solos alocados a uso residencial, institucional, comercial, propriedade comunitária, esses teores poderão ascender a 18  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Paralelamente, para águas subterrâneas e sedimentos, os valores indicados são 13  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 6  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente. Aponte-se ainda que em solos argilosos os teores de arsénio usualmente oscilam entre 4,8 - 12,8  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Kabata-Pendias e Pendias, 1985; Adriano, 1986).

Dos parâmetros que afetam a mobilidade e a disponibilidade do arsénio (Adriano, 1986; Batista, 2003; Tripathi *et al.*, 2007; Márquez - García *et al.*, 2012), destacam-se os fatores inerentes ao solo (nomeadamente pH, óxidos, hidróxidos de ferro e alumínio, textura do solo, minerais argilosos e potencial redox). Os solos arenosos têm maior disponibilidade de arsénio, devido há menor presença de óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, comparativamente com os solos argilosos. Adicionalmente, verifica-se ainda que o potencial redox do arsenato é, em aerobiose, a nível termodinâmico, mais estável, contudo a respetiva mobilidade nos solos é geralmente baixa (Zhao *et al.*, 2009). Porém, verifica-se que a respetiva capacidade para ser adsorvido por solos argilosos, óxidos e hidróxidos de ferro, alumínio e manganês, carbonatos, fosfatos e matéria orgânica é muito elevada (Abreu *et al.*, 2009). Por oposição, o arsenito é, em condições de anaerobiose, a espécie mais abundante e mais solúvel, comparativamente ao arsenato apresenta maior mobilidade e fitotoxicidade (Abreu *et al.*, 2009). O arsenito reage com os grupos sulfidrilo de enzimas e proteínas tecidulares, inibindo as funções celulares e contribuindo para a necrose celular (Webb *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2013). Por oposição, nas espécies vegetais o arsenato compete com o fósforo pelos mesmos centros de absorção radicular, sendo as concentrações relativas destes elementos factores determinantes para a acumulação na raiz e subsequente translocação para a parte aérea das espécies vegetais.

### 2.3.1. Translocação, acumulação e toxicidade nos tecidos vegetais

O arsénio pode induzir toxicidade nas espécies vegetais, interferindo com o crescimento e com a performance fotossintética, em especial das folhas mais jovens (Regvar e Vogel-Mikus, 2008; Arriagada *et al.*, 2009). A absorção de arsénio, a nível radicular, depende essencialmente das formas químicas presentes no substrato (especificação), da profundidade e do potencial redox do solo (Mascher *et al.*, 2010; Márquez - García *et al.*, 2012). Zhao *et al.* (2009) referem que este elemento só é captado do solo nas formas inorgânicas de arsenato e arsenito, sendo as mesmas interconvertíveis em função do potencial redox do solo. O arsenato, tal como o fosfato, é

transportado até às folhas através da membrana plasmática, podendo interferir com os processos celulares essenciais (Meharg e Macnair, 1994; Arriagada *et al.*, 2009; Lei *et al.*, 2013). No caso do arsenito, este reage com os grupos sulfídricos das enzimas e dos tecidos das proteínas, induzindo a inibição da função celular e a subsequente necrose (Webb *et al.*, 2003; Lei *et al.*, 2013).

Segundo Wang *et al.* (2002), a absorção de arsenito pela *Pteris vittata* não é influenciada mesmo na presença ou ausência de fosfato. Contrariamente a presença de fosfato na solução nutritiva diminui acentuadamente a absorção de arsenato. Ma *et al.* (2011) referem que o arsenato é uma molécula sem carga, semelhante ao ácido silícico, e que partilha com este o mesmo transportador (Lsi 1), para a entrada na raiz do arroz (sendo transportado através do xilema, via efluxo de Si 'Lsi2'). Um mecanismo alternativo é o transporte via aquaporos (Zhao *et al.*, 2010). Destaca-se contudo que estes autores referiram que a translocação do arsénio da raiz para o caule é um processo com baixo grau de eficiência. Uma explicação poderá residir na redução rápida de arsenato para arsenito na raiz, seguido pela síntese de complexos com grupos sulfídrico, e o possível sequestro do arsenito nos vacúolos da raiz. A mobilidade do arsénio no xilema varia ainda no plano interespecífico, subsistindo espécies que o transportam muito rapidamente e em grandes quantidades, como é o caso da *P. vittata* (uma espécie que se reconhece ser hiperacumuladora de arsénio na forma de arsenito). Aponte-se contudo que a distribuição interna do arsénio nos tecidos dos diferentes órgãos das plantas ainda não está completamente identificada (Zhao *et al.*, 2010).

O arsénio, em especial na forma reduzida de arsenito, está fitodisponível, sendo fitotóxico para muitas espécies vegetais, porém algumas destas são tolerantes / resistentes a graus muito elevados de contaminação, nomeadamente em zonas mineiras (King *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2014). Destacam-se algumas espécies arbóreas, nomeadamente eucaliptos - *Eucalyptus cladocalyx*, *E. melliodora*, *E. polybractea*, *E. viridis*, *E. urophylla*, *E. saligma* (King *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2012), choupo - *Populus alba* (Madejón *et al.*, 2004) e salgueiro - *Salix spp.* (Tlustoš *et al.*, 2007). Note-se contudo que a acumulação de arsénio numa espécie vegetal pode variar, em função de parâmetros inerentes ao próprio solo e de fatores edafoclimáticos, ou ainda face à adequação da espécie vegetal para as formas de arsénio disponíveis (King *et al.*, 2008; Ozturk *et al.*, 2010; Hoffmann e Schenk, 2011; Austruy *et al.*, 2013).

Equacionando os efeitos do arsénio nas taxas de crescimento relativo em espécies vegetais, alguns autores (Cedergreen, 2008; Ozturk *et al.*, 2010) verificaram que pequenas concentrações de arsénio estimulam o crescimento, enquanto que outras mais elevadas revelam um efeito antagónico, que poderá resultar da síntese de formas reativas de oxigénio. Este efeito estimulante, descrito por Schulz (1888) como "efeito homeostático", foi utilizado, posteriormente, por Southam e Erlich (1943). Acresce que a acumulação de arsénio tende a prevalecer essencialmente ao nível radicular, podendo apontar-se, a título de exemplo, o caso dos salgueiros - *Salix spp.* (Tlustoš *et al.*, 2007) e do sargaço manso - *Cistus salvifolius* (Abreu *et al.*, 2012a). De facto, em média, comparativamente ao caule, as concentrações de arsénio na raiz podem ser 20 - 100 vezes superiores, diminuindo o índice de translocação quando o teor de

arsenito aumenta (Hoffmann e Schenk, 2011). Aponte-se ainda que, no caso particular dos eucaliptos, a concentração de arsénio é, comparativamente aos teores no caule, usualmente 5 a 10 vezes superior nas folhas (King *et al.*, 2008). Acresce ainda que Austruy *et al.* (2013) também referiram que, comparativamente ao caule, a raiz é mais sensível à ação de contaminantes. Aponte-se contudo que, face à idade das folhas, a acumulação de arsénio parece não obedecer a um padrão único.

King *et al.* (2008) relataram que os teores de arsénio nas folhas jovens e adultas de *E. cladocalyx*, *E. melliodora*, *E. polybractea*, *E. viridis* não apresentam variações significativas. Por oposição, Chang *et al.* (2005) encontraram, em folhas jovens de *Populus davidiana*, valores mais elevados de arsénio. A acumulação de arsénio nas folhas é também referenciada por Madejón *et al.* (2004), em espécimes de choupos (*Populus spp.*), numa zona similar à de Neves-Corvo em Espanha, onde ocorreu um derrame mineiro, que envolveu uma região de 55 km<sup>2</sup>. Kabata-Pendias (1985) apontou um limite máximo entre 5 - 20 µg g<sup>-1</sup> como limite de toxicidade nas estruturas foliares. Assim, porque no plano interespecífico subsistem diferentes capacidades das estruturas vegetais para reter, captar e translocar contaminantes nos diferentes órgãos, algumas espécies poderão ser utilizadas para fitoestabilizar solos contaminados (Abreu *et al.*, 2009; Abreu, *et al.*, 2012a,b; Chen *et al.*, 2014).

Em solos contaminados com arsénio, os limites de toxicidade sobre o metabolismo fotossintético variam de forma significativa no plano interespecífico (Austruy *et al.*, 2013), subsistindo ou não espécies hiperacumuladoras de arsénio.

Em plantas não hiperacumuladoras de arsénio, a nível foliar, o aumento dos teores desse elemento tende a inibir a acumulação de clorofila (Chl) (Ozturk *et al.*, 2010; Caporale *et al.*, 2013), sendo esta entidade química a mais sensível ao arsenito (Chen *et al.*, 2014). Neste contexto, vários autores (Ozturk *et al.*, 2010) têm indicado que estes efeitos decorrem da oxidação das membranas dos cloroplastos envolvendo, formas reativas de oxigénio, disfunções nutricionais (associados a défices nos teores de Mn, Cu, Fe e P) e acréscimos na atividade das clorofilases. Teores crescentes de arsénio provocam ainda uma inibição progressiva da condutividade estomática, na concentração intercelular de dióxido de carbono e da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase (Ahsan *et al.*, 2010; Hoffmann e Schenk, 2011). Assim, a inibição da condutância estomática e da actividade da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase, a par da peroxidação dos lípidos acilo das membranas do cloroplasto, poderão provocar a desintegração dos grana, bloqueando a síntese de pigmentos e, conseqüentemente, minimizar o correspondente rendimento quântico do fotossistema (PS) II. Face a esta inibição, a taxa de transporte electrónico da fase fotoquímica fica então afetada de forma significativa.

### 2.3.2. O caso particular da região de Neves-Corvo

A região de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O) possui um dos mais importantes depósitos de cobre de Portugal, sendo ainda um dos maiores do mundo (Batista *et al.*, 2012b). Situada a 15 km de Castro Verde, no Baixo Alentejo, esta mina produz essencialmente Cu, Sn e

Zn, sendo atualmente explorada pela Somincor – Sociedade Mineira de Neves-Corvo, S.A., grupo subsidiário da *Ludín Mining Corporation* (Ludín Mining Corporation, 2014).

Nas rochas da região de Neves-Corvo (Figura 2.5), em 1994, foram detetados concentrações médias de arsénio que oscilaram em torno de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ , com teores mínimos / máximos variando entre  $0,3 - 270 \mu\text{g g}^{-1}$  (Grimes e Carvalho, 1994).

No minério de Neves-Corvo verificou-se ainda que o arsénio se encontrava em concentrações que oscilavam entre  $15,3 \text{ g kg}^{-1}$  (na pirite do minério de cobre rico em Zn, Hg, Ag, Sb e As) e  $6 \text{ mg kg}^{-1}$  (na cassiterite das mineralizações do tipo maciço e rubané de estanho) (Gaspar, 2002; Batista, 2003).

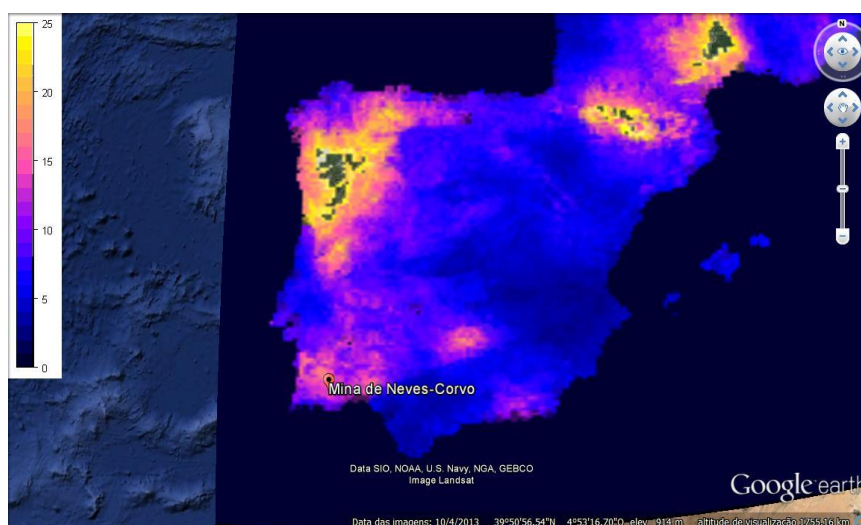


Figura 2.5 - Localização de Neves-Corvo e zonas contaminadas com arsénio (valores em  $\mu\text{g As g}^{-1}$ ). (<http://eusoiils.jrc.ec.europa.eu> – Acedido em Março de 2016).

Análises ao solo, na zona da mina de Neves-Corvo, entre 1970 e 1971, apresentavam uma concentração média de arsénio de  $17,3 \mu\text{g g}^{-1}$ . Contudo, em 1998, novas análises mostraram um incremento dos teores de arsénio para  $20,3 \mu\text{g g}^{-1}$  (Batista, 2003).

A APA (2015) considera existir uma contaminação com arsénio no solo quando os teores ultrapassam  $18 \mu\text{g g}^{-1}$ , para zonas residenciais, industriais e comerciais, e  $11 \mu\text{g g}^{-1}$  em solos agrícolas. Assim, em alguns locais, predominantemente agrícolas, em redor da mina, as concentrações de arsénio no solo ultrapassam o valor de referência, devendo considerar-se contaminados.

A esteva (*Cistus ladanifer*), planta não hiperacumuladora de arsénio, típica de ambientes mediterrânicos, ocorre na região envolvente da mina de Neves-Corvo. Este arbusto, muito frequente em matos e matagais xerofíticos, em solos pobres e ácidos com origem em xistos, arenitos, pode formar populações densas denominadas estevais. Neste contexto, interessa avaliar os níveis de acumulação de arsénio observados por Batista (2003), ainda que se considere serem as folhas o principal órgão de acumulação desde contaminante (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Teores médios de arsénio em *Cistus ladanifer* na área da mina de Neves-Corvo (Adaptado de Batista, 2003).

As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Folhas	Raiz	Solo
Média Aritmética	9,11	1,14	56,3
Média Geométrica	2,7	0,86	31,3
Mediana	1,81	0,78	28,0
Mínimo	0,45	0,18	8,0
Máximo	48,17	6,67	297,0

### 2.3.3. O caso particular da região de São Domingos

As concentrações de arsénio na região que circunscreve a mina de São Domingos (37°67'59,02"N, 7°50'16,96"O) oscilam entre 71 – 20 x 10<sup>2</sup>  $\mu\text{g g}^{-1}$ . No entanto, a fração geodisponível varia apenas entre 0,02 - 0,41  $\mu\text{g g}^{-1}$ , ficando assim limitada a fitodisponibilidade, ou a possibilidade de lixiviação (Batista *et al.*, 2012b; Alvarenga *et al.*, 2013, 2014a). A vegetação dominante nesta zona, engloba as *Cistus ladanifer* L., *Lavandula sampaiana* L., *Erica andevalensis* Cabezudo e Rivera e a *Erica australis* L., ocorrendo ainda exemplares de *Eucalyptus camaldulensis* e *Eucalyptus globulus* (Tavares *et al.*, 2009; Márquez - García *et al.*, 2012; Alvarenga *et al.*, 2012, 2014b). Note-se, contudo, que Márquez - García *et al.* (2012), constataram que a *E. australis* acumula mais arsénio na forma de arsenito, enquanto que a *E. andevalensis* acumula mais na arsénio na forma de arsenato. Também Alvarenga *et al.* (2014a) verificaram que nos solos das hortas e quintas, em redor de São Domingos (que não o couro mineiro), as concentrações de arsénio variavam entre 86,7 - 1851  $\mu\text{g g}^{-1}$  (com uma fração disponível oscilando entre 0,40 - 16,9  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Contudo, nas espécies com interesse alimentar aí cultivadas (nomeadamente, as *Lactuca sativa*, *Coriandrum sativum* e a *Brassica oleracea*), a contaminação por arsénio foi muito baixa ou nula, não representando perigo para a saúde humana.

## 2.4. Fitorremediação – Uma síntese sobre mecanismos e aplicabilidade

Em áreas contaminadas, de pequena dimensão, uma solução rápida pode envolver a selagem da área com uma cobertura de solo, porém tal não impede a lixiviação do contaminante em profundidade. Em alternativa, nestes casos, a introdução de um coberto vegetal pode constituir uma estratégia eficiente, barata e amiga do meio ambiente, detentora de elevada estabilidade temporal e geofísica (Pratas *et al.*, 2005, 2013; Chang *et al.*, 2005; Mains *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2014). Neste contexto, nem só as camadas superiores ficam abrangidas por este biosistema de descontaminação, mas também horizontes mais profundos do solo podem ser visados, devido à ação das raízes profundas de lenhosas, nomeadamente, salgueiros ou eucaliptos (Tlustoš *et al.*, 2007; King *et al.*, 2008).

Este processo (*i.e.*, fitorremediação) extrai elementos minerais, nomeadamente semi-metals e metais pesados, sem alterar de forma significativa os solos e a respetiva atividade microbiana (Rajkumar *et al.*, 2012). É um processo económico, que utiliza plantas vasculares *in situ*, restaurando total ou parcialmente os solos (Vamerali *et al.*, 2009). Note-se, contudo, que no âmbito da fitorremediação subsistem diferentes subgrupos ou mecanismos (Figura 2.6) que dependem da matriz, propriedades e nível de contaminação dos solos (Pulford, 2003; Hettiarachchi *et al.*, 2012).

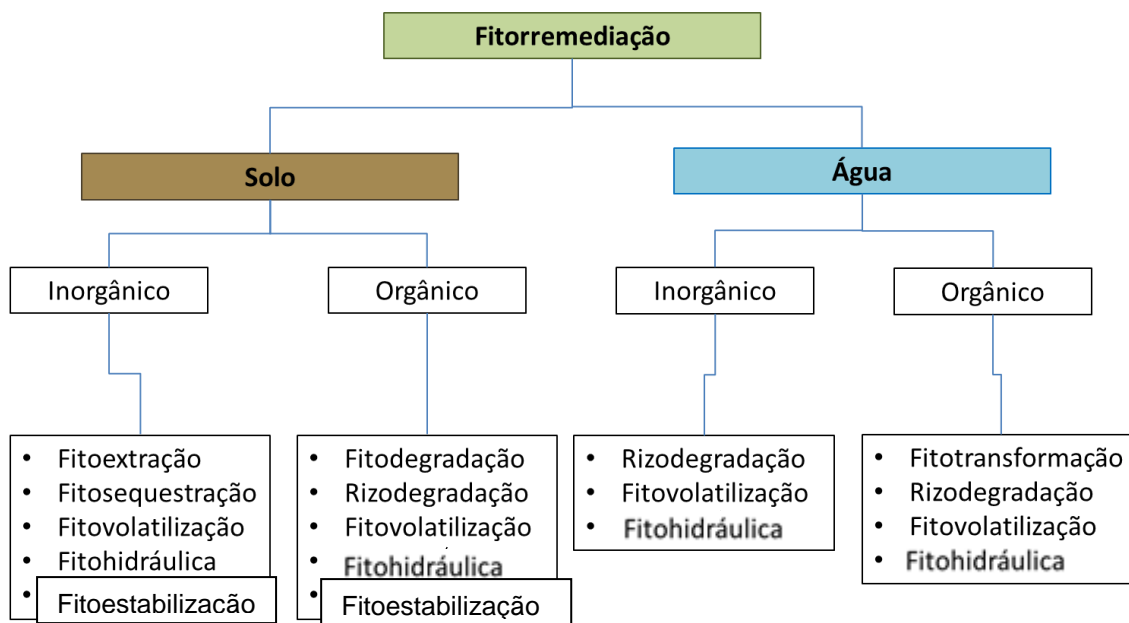


Figura 2.6 - Sistemas de fitorremediação e respetiva aplicabilidade (Adaptado de Pulford, 2003 e de Hettiarachchi *et al.*, 2012).

Aponte-se ainda que a eficiência da fitorremediação depende da fisiologia de cada espécie vegetal, e do seu potencial face a um eventual *stress* causado por uma significativa acumulação de metais pesados na biomassa. De facto, a dinâmica da acumulação desses elementos, face aos índices de produção da biomassa da espécie, será o fator determinante na garantia de uma elevada eficiência na minimização da lixiviação dos metais / metalóides, e na remoção dos contaminantes do solo (Mertens *et al.*, 2007; Vamerali *et al.*, 2009). Portanto, neste enquadramento, o processo de fitorremediação também apresenta limitações (Hettiarachchi *et al.*, 2012), destacando-se que:

- i) Níveis elevados de contaminação podem limitar o crescimento das plantas;
- ii) A biodisponibilidade de metais nos solos da rizosfera pode ser outro fator crítico que determina o sucesso da translocação do metal e da própria fitoestabilização (Ma *et al.*, 2010; Otones *et al.*, 2011; Moreno-Jimenez *et al.*, 2012; Rajkumar *et al.*, 2012);
- iii) A profundidade das raízes pode limitar o nível de fitorremediação, pois a planta, no limite absorve os poluentes apenas na área da respetiva rizosfera.

## 2.5. *Eucalyptus* spp. – Integração geográfica, morfológica e parametrização nutricional

As espécies integradas no género *Eucalyptus* são originárias do continente Australiano, ocupando uma grande fração da respetiva floresta, embora sendo escassas nas regiões mais secas. Existem mais de 600 espécies que se adaptaram a quase todos os ambientes (FAO, 1981). Segundo a *Encyclopedia of Australian Science* (2015), julga-se que as espécies *Eucalyptus alba* e *Eucalyptus urophylla* foram as primeiras espécies introduzidas fora do seu habitat natural, em Timor, pelos portugueses, no século XVI. É provável que o aparecimento do eucalipto no Brasil se desse pelo mesmo motivo e na mesma altura, embora não subsistam registos fidedignos. No entanto, só em 1788 o eucalipto entra oficialmente na história, quando o botânico L'Héritier de Brutelle, descreve pela primeira vez o género *Eucalyptus* e atribui ao primeiro espécime de eucalipto o nome de *Eucalyptus obliqua* (*Encyclopedia of Australian Science*, 2015).

### 2.5.1. *Eucalyptus globulus*

A espécie *Eucalyptus globulus* Labill é vulgarmente conhecida como eucalipto comum (ou eucalipto-da-Tasmânia). É uma espécie com folha perene, que pode atingir 55 metros de altura, sendo, eventualmente, a mais conhecida das 600 espécies do género *Eucalyptus*. A sua distribuição original resumia-se à Tasmânia e ao sul do Estado de Victoria (Austrália). Ocorre ainda em pequenos grupos isolados nas Ilhas de King e Flinders (Goes, 1977). Possui tronco ereto e esguio, com ramificações apenas na parte terminal. O tronco é recoberto por um ritidoma cinzento claro, liso, que ao secar se liberta em largas tiras para o solo. Quando a árvore é cortada, esta regenera rapidamente a partir da toixa, produzindo fortes turhões recobertos por folhas juvenis, que quando desbastados rapidamente reconstituem a árvore.

As plantas juvenis apresentam uma folha diferente das plantas adultas (Figura 2.7). As folhas da planta juvenil são sésseis, com 6 - 15 cm de comprimento e recobertas por um tegumento ceroso de cor azulada, surgindo em pares alternados em caules de secção quadrangular. As folhas das árvores adultas são estreitas e falciformes, podendo atingir 35 cm de comprimento com tegumento verde acinzentado, surgindo alternadamente ao longo de caules arredondados (Goes, 1977).



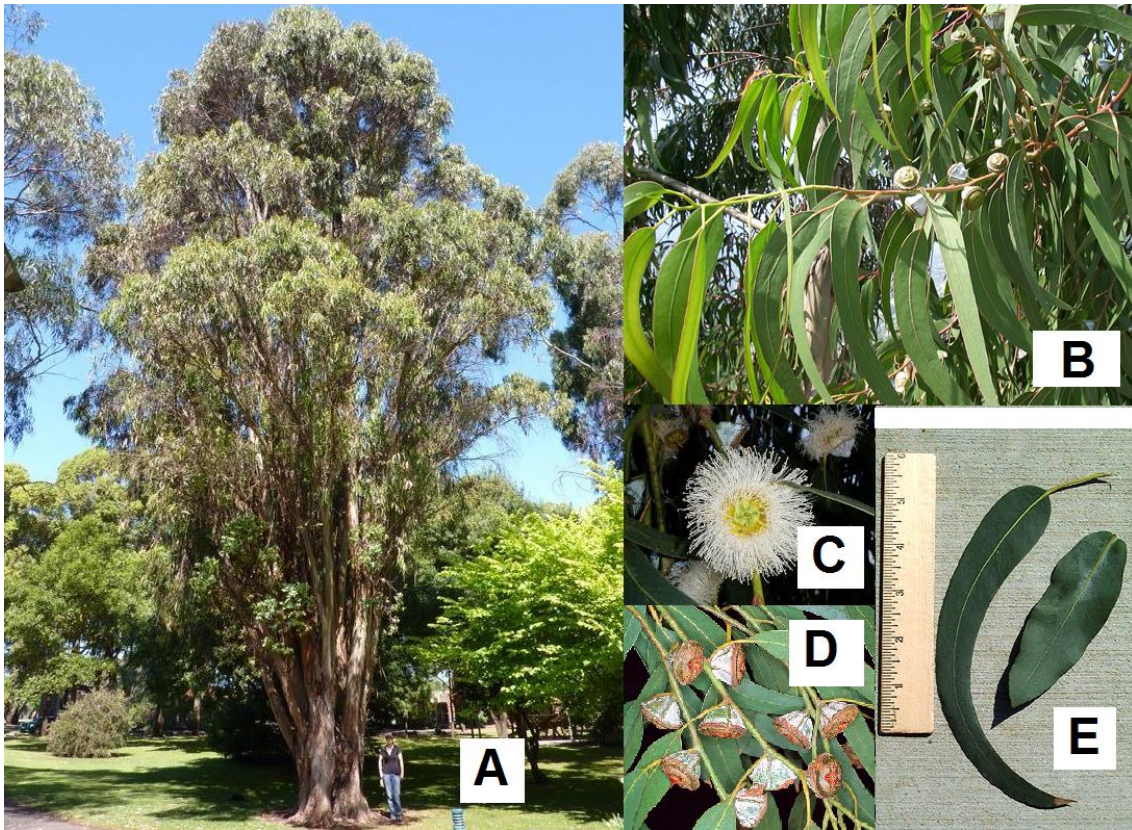


Figura 2.7 – A - *Eucalyptus globulus* - planta adulta, B – Ramo com folhas e pseudocápsulas, C – Flôr com androceu indefinido, D - Pseudocápsulas, E - Folha adulta falciforme (esquerda), folha jovem (direita).

A flor com androceu indefinido, esbranquiçada ou cremosa, floresce entre Setembro e Outubro. Os frutos são pseudocápsulas lenhosas, com 2,5 cm de diâmetro, reproduzindo a forma do botão da flor. Esta espécie de eucalipto tem uma raiz que pode atingir 10 metros de profundidade (Goes, 1985).

### 2.5.2. *Eucalyptus nitens*

A espécie *Eucalyptus nitens* Deane & Maiden é originária da Austrália, predominando nos estados de Victoria e Nova Gales do Sul, ocorrendo em áreas geográficas com altitude variando entre os 600 - 1600 metros. Esta espécie, pode atingir mais de 60 metros de altura. A casca é lisa e caduca, persistente na base, mas no tronco e ramos desprende-se em fitas. A *E. nitens* é ainda das espécies mais tolerantes a geadas, conseguindo sobreviver a -12 °C, contudo prefere um clima temperado frio, em zonas pluviais médias. O seu desenvolvimento é maior em solos férteis e profundos com textura média.

Nos anos 80 esta espécie foi introduzida em vários países mediterrâneos, nomeadamente em França, Espanha e Portugal (Goes, 1985). Em 2011 estimou-se que a área plantada com esta espécie correspondia a 340 mil ha, predominando na Austrália, Chile, Nova Zelândia, África do Sul e Espanha. Se a altitude é baixa esta espécie apresenta uma taxa de crescimento médio

e inferior à da *E. globulus* (Pérez-Cruzado e Rodríguez-Soalleiro, 2011; Pérez-Cruzado *et al.*, 2011).

### 2.5.3. Eucaliptos em Portugal

Entre 1966 - 2010, em Portugal, a área cultivada de *E. globulus* Labill aumentou de 100 000 ha para 812 000 ha (*i.e.*, 8 % da área de Portugal e cerca de 26 % da área florestal portuguesa). Acresce que estes 812 000 ha de eucaliptos conseguem transformar 66 462 quilotoneladas de dióxido de carbono em biomassa (Reboredo, 2014), aspeto que decorre da combinação de temperaturas médias e de precipitação elevada, a par de uma estação de crescimento prolongada. De facto, neste contexto, a produtividade desta espécie de eucalipto pode atingir (exceccionalmente) 40 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> ano<sup>-1</sup>, em locais selecionados em Portugal Continental (Pinho, 2014), embora consoante a região do país prevaleça uma grande variação na produtividade, sendo predominante a norte do Tejo (Reboredo, 2014).

A nível fitopatológico, apenas nos anos 80 do século passado, surgiu o escaravelho perfurador (*Phoracantha semipunctata* Fab.) (Figura 2.8), que causou a morte de inúmeras árvores e quedas acentuadas de produtividade.

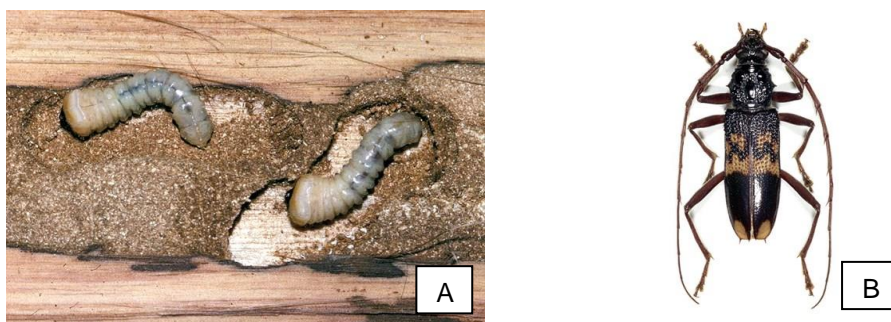


Figura 2.8 - Larvas (A) e inseto adulto (B) do escaravelho perfurador de eucaliptos (*Phoracantha semipunctata* Fab.) (<http://www.cabi.org/isc/datasheet/40372> - Acedido em Março de 2016).

Note-se contudo que, em Portugal, a *Ctenarytaina eucalyptii* Maskell terá sido o primeiro inseto invasor nos eucaliptos, tendo sido detetado nos anos 70 do século passado. O mesmo alimenta-se da seiva das folhas da *E. globulus* (Figura 2. 9), não causando muito impacto pois sofre predação intensa (Azevedo e Figo, 1979, *cf.* Branco *et al.*, 2014).



Figura 2. 9- *Ctenarytaina eucaliptii* em folhas da *E. globulus*.

No âmbito das doenças provocadas por fungos no eucalipto, destacam-se as causadas por *Botryosphaeria* spp. e *Mycosphaerella* spp. (Branco *et al.*, 2014). Neste contexto, as *Mycosphaerella* spp., provocam a doença da folha *Mycosphaerella*, que envolve uma grande e severa desfolhação das folhas mais jovens. A *Teratosphaeria nubilosa* é igualmente considerada uma das mais agressivas, propagando-se pelo vento com grande facilidade (Silva *et al.*, 2009, 2012, *cf.* Branco *et al.*, 2014). Contudo, o fungo potencialmente mais perigoso será, porventura, a *Teratosphaeria cryptica*, pois, embora não mate a planta, afeta o crescimento normal dos espécimes mais jovens (Branco *et al.*, 2014). Apontam-se ainda, pela sua ação patológica sobre o eucalipto, as espécies *Neofusicoccum* spp., *Cytospora* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Phytophthora* spp., *Sporothrix* spp., *Phoma* sp., *Harknessia* sp. e *Cylindrocarpon* sp. (Slippers *et al.*, 2004; Rodas *et al.*, 2009; Iturrity *et al.*, 2011, *cf.* Branco *et al.* 2014).

#### 2.5.4. Mobilização de elementos minerais em solos contaminados pelo género *Eucalyptus*

Alguns estudos (Guo *et al.*, 2002) têm demonstrado que o eucalipto detém uma elevada taxa de absorção de nutrientes em solos contaminados, destacando-se a *E. globulus*. Asensio *et al.* (2013) verificaram nos solos envolventes da mina de cobre situada em Touro / Galiza / Espanha (42°52'46.18"N, 8°20'12.06"O), que a plantação da *E. globulus* incrementou a extração radicular de Cr e Cu. Na *Eucalyptus torcoata*, Pyatt (2001) demonstrou que o Fe, Mn e S se acumulam nas folhas, enquanto que o Cu predomina nos caules e o Pb nas cápsulas. Adicionalmente, Nenman *et al.* (2012) verificaram que o Pb, Zn e Cr se acumulam predominantemente nas folhas de *E. camaldulensis*, enquanto que o Cu, Ni e Sn ocorrem preferencialmente nos caules (ainda que em concentrações muito baixas). Tal como Pyatt (2001), também King *et al.* (2008) estudaram a fitoestabilização do solo de uma mina de sulfuretos rica em arsénio, localizada no continente Australiano (37°03'59"S, 142°48'15"E), tendo verificado que, nas *E. cladocalyx*, *E. melliodora*, *E. polybractea*, *E. viridis*, a maior concentração de arsénio ocorreu nas folhas (0,29 – 5,14  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), em detrimento do caule (0,61  $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Constataram ainda estes autores que a espécie de menor crescimento foi a *E. cladocalyx* (com um índice de crescimento variando entre os 69,5 - 103 cm de altura e folhagem densa; por oposição às restantes espécies com 36 – 313 cm de altura), tendo recomendado todas as espécies para fitoestabilização de solos.



Nas minas de Au e U da Urgeiriça / Portugal (40°51'33.43"N, 7°89'50.55"O), Madruga *et al.* (2001) constataram ainda que *E. globulus* possui uma elevada eficiência para mobilização do Ra - 226 do solo para a parte aérea.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Seriação de zonas contaminadas e recolha de amostras de solos e material vegetal

Para aferir o nível médio de arsénio nos solos na FPI, consideraram-se as zonas mineiras de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O) e São Domingos (37°67'59,02"N, 7°50'16,96"O). Com recurso ao software ArcGis (ESRI, The Redlands, CA) definiram-se aleatoriamente 44 pontos de amostragem na zona envolvente ao couto mineiro de Neves-Corvo (Pelica *et al.*, 2018) e junto da zona mineira de São Domingos (Figura 3.1).



Figura 3.1 - Localização espacial da zona mineira de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O) (A) e da zona mineira de São Domingos (B) (37°40'6" N, 7°29'38"O) (www.maps.google.com - Acedido em Abril de 2016).

Amostras de solo (entre 0 - 10 cm de profundidade) e de material vegetal, foram recolhidas nas zonas mineiras de Neves-Corvo e São Domingos. Para subsequente análise efetuaram-se ainda recolhas de espécies hortícolas, ou frutos, em Neves-Corvo (*Citrus sinensis* L. – Laranja, *Ficus sycomorus* L. – Figueira, *Solanum lycopersicum* L. – Tomateiro, *Cucurbita pepo* L. – Courgette e *Phaseolus vulgaris* L. – Feijoeiro). Paralelamente, em São Domingos, procedeu-se à recolha de folhas de *Cistus ladanifer*, *Eucalyptus globulus* e *Pinus pinaster*.

As amostras de solo foram desidratadas numa estufa (Jeio Tech OF-02P Forced Convection Oven - 60L, Program type, Seul, Coreia-do-Sul), a 60° C, com ventilação, durante 3 dias (até peso constante). As mesmas foram então peneiradas (índice granulométrico de 2 mm) para obtenção de uma fração de solo homogénea. O material vegetal recolhido nas zonas mineiras foi colocado em tabuleiros e desidratado numa estufa (Jeio Tech OF-02P Forced Convection Oven - 60L, Program type, Seul, Coreia-do-Sul), a 60°C, com ventilação, durante 5 dias (*i.e.*, até peso constante). Após secagem, as amostras foram separadas por diferentes órgãos da planta (raiz, caule, folhas) e trituradas num moinho (M-450/SM-450C,MRC,Israel), obtendo-se uma granulometria homogénea. As amostras foram então armazenadas em ambiente desidratado.

## 3.2. Ensaio piloto com *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens*

### 3.2.1. Implementação do ensaio

As plantas da *E. globulus* (com cinco meses), e de *E. nitens* (com 11 meses) foram cedidas pela empresa Altri Florestal S.A. (Figura 3.2) em Setembro de 2014. Os exemplares foram então aclimatados ao ar livre, na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (38°66'06.07"N, 9°20'71.12"O), durante 4 meses, tendo sido expostos às condições climáticas do local, ainda que com dotação de rega artificial.



Figura 3.2 - Perspetiva geral relativa às condições de crescimento da *E. globulus* e da *E. nitens* nos viveiros Altri Florestal S.A., Portugal.

Os eucaliptos foram plantados em vasos de 5 litros, contendo 3 litros de substrato universal SIRO (pH - 5,5 - 6,5, humidade – 50 – 60 %, condutividade - 0,6 - 1,2 CE, N – 80 - 150 mg L<sup>-1</sup>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - 80-150 mg L<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>O - 300-500 mg L<sup>-1</sup>, matéria orgânica > 70 %).

Após aclimação, entre Setembro de 2014 e Janeiro de 2015 (Figura 3.3), nos vasos procedeu-se à contaminação do solo com uma solução de 100 mL de arsenito de sódio

(NaAsO<sub>2</sub>), usando para o efeito, duas concentrações distintas de arsénio (100 mg As L<sup>-1</sup> ou 200 mg As L<sup>-1</sup>), para além dos respetivos controlo (*i.e.*, sem aplicação de arsénio).



Figura 3.3 – Ensaio piloto da *Eucalyptus globulus* (A) e *Eucalyptus nitens* (B) na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa (38°66'06.07"N, 9°20'71.12"O).

Cada lote era constituído por 24 plantas, enquanto que no caso das plantas controlo cada lote tinha apenas 12 plantas.

Estes lotes foram designados: Plantas controlo (sem arsénio), Tratamento 100 (100 mg de arsénio) e Tratamento 200 (200 mg de arsénio). Nos momentos T1 (Março de 2015), T2 (Maio de 2015) e T3 (Julho de 2015), foram efetuadas recolhas de material (em triplicado) para posterior análise. Após a 1ª colheita (T1), procedeu-se a nova contaminação do solo com as mesmas concentrações de arsénio e o mesmo volume de solução.

Durante o ensaio as plantas estiveram submetidas às condições climatológicas locais. Segundo o Boletim Climatológico Anual de 2015 para Portugal Continental (Instituto Português do Mar e da Atmosfera, 2016), o ano de 2015 foi seco e quente. O valor médio da temperatura média do ar foi de 15,99 °C, sendo o valor médio das temperaturas máximas e mínimas de 21,85 °C e 10,12 °C, respetivamente. A precipitação total anual foi 599,6 mm, tendo os valores de precipitação sido inferiores aos valores médios dos anos anteriores. Para os valores médios de temperatura, registou-se um aumento da carga térmica (comparativamente aos anos anteriores).

As temperaturas medidas nas durante o período matinal (antes e depois das medições das trocas gasosas) apresentam-se na Tabela 3.1, tendo ocorrido um aumento significativo das temperaturas nos meses de Maio e Julho.

Sempre que necessário, procedeu-se à rega de cada vaso com 300 mL de água destilada, usando para aferição da humidade, uma sonda com um elétrodo específico.

Tabela 3.1 - Análise estatística das temperaturas médias (°C) registadas nas medições *in vivo* (trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* nas *E. globulus* e *E. nitens*. Cada valor corresponde à média das temperaturas efetivamente medidas (n=3; ± Erro Padrão; *p-value*, no intervalo de confiança de 95 %).

	Janeiro	Março	Maio	Julho
°C	23,3 ± 1,70 <sup>b</sup>	23,7 ± 1,03 <sup>b</sup>	32,9 ± 2,51 <sup>a</sup>	32,5 ± 1,35 <sup>a</sup>

### 3.2.2. Análise de parâmetros de crescimento

A determinação dos parâmetros de crescimento consideram a segunda folha mais jovem das ramificações mais desenvolvidas, a um metro do solo e com exposição a sudeste. As folhas foram seccionadas no pecíolo de 5 plantas de cada um dos tratamentos, por norma dois dias antes da recolha, para determinação de parâmetros que implicam a destruição de material vegetal.

O denominado LWR (*Leaf Weight Ratio*), considera a razão entre peso seco foliar e peso seco total, para determinar o investimento que a planta fez em biomassa foliar (face à biomassa das estruturas caulinares e radiculares). Aferiu-se ainda a razão da área foliar (LAR) que corresponde à razão da área foliar e o peso. Para avaliação da capacidade fotossintética das plantas e das respetivas taxas de crescimento, efetuou-se ainda a determinação da área foliar. Adicionalmente, foi ainda determinada a área foliar específica (SLA), que corresponde à relação entre o aumento de superfície foliar e o respetivo ganho em peso, e que se expressa pela razão entre a área foliar e o peso foliar.

A taxa líquida de assimilação (NAR) e a taxa de crescimento relativo (RGR) consideraram as seguintes equações:

$$RGR = (\ln \text{Peso Seco}_{\text{Total}2} - \ln \text{Peso Seco}_{\text{Total}1}) / (t_2 - t_1)$$

$$NAR = (\text{Peso Seco}_{\text{Total}2} - \text{Peso Seco}_{\text{Total}1} / t_2 - t_1) (\ln A_2 - \ln A_1 / A_2 - A_1)$$

Considera-se que a NAR resulta da interceção dos fatores ambientais (nomeadamente luz, CO<sub>2</sub>, temperatura, disponibilidade de água e nutrientes, idade das folhas), e traduz a eficiência da planta na captura da luz, assimilação de CO<sub>2</sub> e armazenamento de fotoassimilados. Assume-se ainda que a variação da NAR pode diferir, nomeadamente, na arquitetura da copa e na interceção da luz, atividade fotossintética das folhas e na respiração ou transporte de fotoassimilados.

### 3.2.3. Preparação e amostras de plantas para determinações analíticas

Na preparação das amostras adotaram-se três tipos de procedimentos, tal como indicado na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Tipos de preparação das amostras para determinações analíticas.

Preparação	Métodos
Tipo I	- Condutância eletrolítica das folhas
Tipo II	- Quantificação do teor em clorofilas e carotenoides totais - Parâmetros fotossintéticos
Tipo III	- Doseamento de elementos minerais - Parâmetros colorimétricos

Na preparação das amostras tipo I (para determinação da condutividade eletrolítica), utilizaram-se as segundas folhas mais jovens (com cerca de 0,20 g) de cada tratamento e efetuou-se a respetiva inserção em 20 mL de água destilada. Os valores da condutividade foram registados durante 3 horas, após a implementação do ensaio, recorrendo a um condutímetro (Portable Meters ProfiLine Cond 3110, Alemanha).

Na preparação das amostras tipo II, efetuou-se uma rega nas 24 horas antecedentes para a hidratação plena das plantas. Selecionou-se a segunda folha mais jovem das ramificações mais desenvolvidas, a um metro do solo e com exposição a sudeste. As folhas foram seccionadas no pecíolo.

No caso da preparação das amostras do tipo III, antes da separação procedeu-se à determinação da altura, contagem foliar e aferição do diâmetro do caule. Efetuou-se então a separação das folhas, ramos / caule e raiz, com pesagem subsequente (*i.e.*, para determinação do peso fresco) numa balança de precisão de 300 g / 0.001 g (Series 5153 Nahita, Auxilab, Espanha); para as amostras superiores a 300 g utilizou-se uma balança de 1200 g x 0.01 g de auto calibração (PS 1200/C2 Precision Scale Lab Radwag, Polónia). As raízes foram lavadas para remoção das partículas de solo. O peso seco foi então determinado, mediante desidratação prévia, num forno com ventilação (Jeio Tech OF-02P Forced Convection Oven - 60L, Program type, Seul, Coreia-do-Sul), a 60 °C, durante 5 dias (até peso constante). Seguiu-se a moagem das amostras num moinho M-450/SM-450C - MRC (Israel).



### 3.2.4. Quantificação de elementos minerais

O doseamento de elementos minerais em amostras de solo e de estruturas vegetais (folhas de : *Citrus x sinensis* L. – Laranja, *Ficus sycomorus* L. – Figueira, *Solanum lycopersicum* L. – Tomateiro, *Cucurbita pepo* L. – Courgette e *Phaseolus vulgaris* L. – Feijoeiro e *Cistus ladanifer*, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus nitens* e *Pinus pinaster*, bem como, as raízes e caules de *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus nitens*) foi efetuado segundo o modelo atômico de Bohr, através da detecção energética de elétrons, segundo o espectro eletromagnético na gama dos raios-X, com correspondência a uma base de dados, fornecida pela Niton Thermal Scientific. A análise foi efetuada com um analisador de raio - X (Niton Thermal Scientific, modelo XL3t, Alemanha). A leitura ocorreu, após emissão de radiação, durante 120 segundos, em atmosfera enriquecida em hélio. Para cada amostra efetuaram-se três leituras. Os resultados (quantificação e análises espectrais – Figura 3.4) foram tratados com recurso ao *software* NITON Data Transfer – XL 3t-36653.

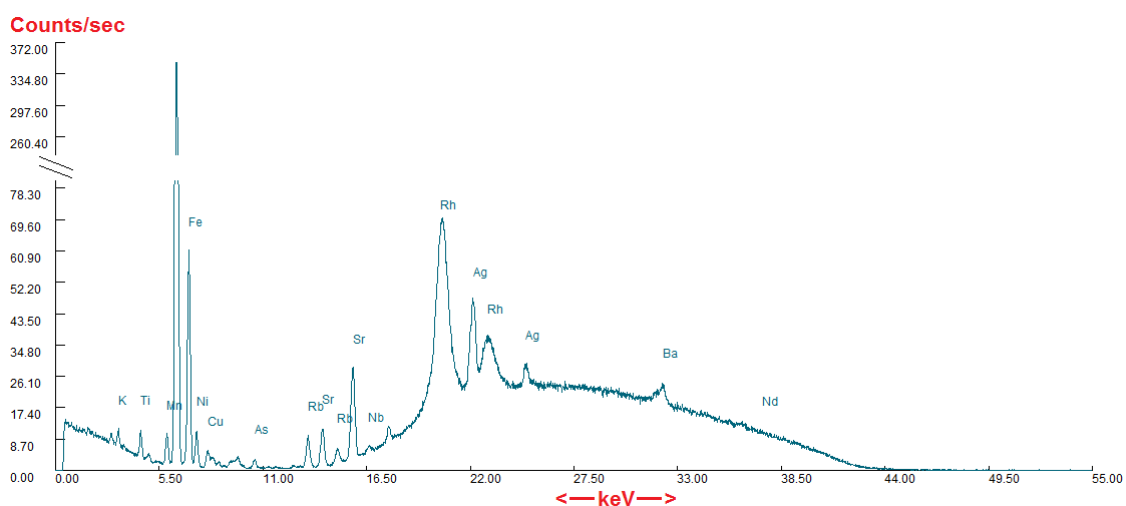


Figura 3.4 - Exemplo de um espectro eletromagnético na gama dos raios - X realizado numa amostra de solo.

Foram ainda realizadas análises qualitativas e quantitativas às folhas detentoras de arsénio, utilizando um sistema  $\mu$  - EDXRF (M4 TornadoTM, Bruker, Alemanha). Este espectrómetro é constituído por um tubo de raios - X, alimentado por um gerador HV de baixa potência, e por um policapilar que faz com que o feixe de raios - X seja focado na amostra com um diâmetro de feixe de 25  $\mu$ m e, portanto, com uma elevada intensidade de radiação de excitação. A detecção da radiação foi realizada com um detetor dispersivo em energia SDD, XFlash TM, com uma área sensível de 30 mm<sup>2</sup> e uma resolução de energia de 142 KeV para as linhas K $\alpha$  do manganês (Mn).

### 3.2.5. Quantificação de pigmentos fotossintéticos

A quantificação dos teores em Chl foi efetuada em amostras de folhas (ca. 30 mg em peso fresco), mediante extração em acetona a 80 % em água (v/v), de acordo com o método de Lichtenthaler (1987). Após centrifugação, a 5000 rpm, durante 10 min, a 25 °C, (com uma centrífuga Hettich Universal 1200, Inglaterra), as absorvências dos sobrenadantes foram lidas a 663, 646,8 e 470 nm, recorrendo a um espectrofotómetro SPECORD® 50 PLUS (Analytik Jena, Alemanha). As concentrações dos diferentes pigmentos foram determinadas mediante aplicação das seguintes fórmulas:

$$\text{Chl } \underline{a} \text{ } \mu\text{g g}^{-1} = [(12,25 \times \text{Abs } 663 \text{ nm}) - (2,79 \times \text{Abs } 646,8 \text{ nm})] \times [V/(1000 \times \text{PF})]$$

$$\text{Chl } \underline{b} \text{ } \mu\text{g g}^{-1} = [(21,50 \times \text{Abs } 646,8 \text{ nm}) - (5,10 \times \text{Abs } 663 \text{ nm})] \times [V/(1000 \times \text{PF})]$$

$$\text{Car } \mu\text{g g}^{-1} = [((1000 \times \text{Abs } 470 \text{ nm}) - (1,82 \times \text{Chl } \underline{a}) - (85,02 \times \text{Chl } \underline{b}))/198] \times [V/(1000 \times \text{PF})]$$

Onde: Chl a, Chl b e Car são, respetivamente, os teores de clorofila a, b e carotenoides totais; V corresponde ao volume utilizado (mL) e PF ao peso seco do material homogeneizado (g).

### 3.2.6. Determinação de parâmetros fotossintéticos

A taxa fotossintética líquida ( $P_n$ ), condutância estomática ( $g_s$ ), e a transpiração ( $Tr$ ), foram determinadas nas condições climáticas dominantes (entre as 10:00 - 11:00 h, em 5 plantas), com um porómetro portátil  $\text{CO}_2/\text{H}_2\text{O}$  (Ciras-1, PP Systems, Hitchin, Inglaterra), com fornecimento externo de  $\text{CO}_2$  de  $390\text{-}400 \mu\text{LCO}_2 \text{ L}^{-1}$  e irradiação natural (ca.  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

A par das trocas gasosas, determinaram-se os parâmetros de fluorescência da clorofila a nas mesmas folhas e condições climáticas, recorrendo um fluorímetro PAM 2000 (H. Walz, Effeltrich, Alemanha). A fluorescência mínima da antena ( $F_0$ ) e a eficiência fotoquímica máxima do PSII ( $F_v/F_m$ ) foram determinados em folhas adaptadas ao escuro. Considera-se que  $F_0$  é a emissão de fluorescência da molécula de Chl a excitada, antes do evento fotoquímico, com a quinona A num estado oxidado, sendo determinado mediante a aplicação de luz com registo espectral completo ( $<0,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ). Assume-se que  $F_m$  corresponde à redução completa dos aceitadores primários do PSII e ao total encerramento das “armadilhas” fotoquímicas do PSII. Considera-se também que  $F_v/F_m$  representa a máxima eficiência fotoquímica do PSII, sendo aferida com um impulso de luz actínica de 0,8 s, com ca.  $6500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  (previamente determinado como sendo saturante) (Ramalho *et al.*, 2014).

Desta forma avaliaram-se: o  $q_p$ ,  $q_N$  (Van Kooten e Snel, 1990),  $q_L$  (Kramer *et al.*, 2004), NPQ (Adams *et al.*, 1995),  $Y = \phi_e$ ,  $Y_{(NPQ)}$ ,  $Y_{(NO)}$  (Klughammer e Schreiber, 2008),  $F_v'/F_m'$  (Krupa *et al.*, 1993) e  $F_s/F_m'$  (Stirbet e Govindjee, 2011).  $F_0'$ , parâmetro necessário para determinação de diversos parâmetros ( $q_p$ ,  $q_L$ ,  $q_N$ ), foi obtido imediatamente após se desligar a luz actínica, com uma radiação fotossintética ativa (PAR) de  $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , em condições de estado estacionário, anteriormente à primeira fase rápida da cinética de fluorescência de relaxamento

no escuro.  $F_v'/F_m'$  representa a eficiência na conversão energética no PSII à luz;  $q_p$  e  $q_L$  estima a proporção de energia capturada e canalizada para os eventos fotoquímicos, com base no conceito de antenas do PSII isoladas ( $q_p$ ) ou interligados ( $q_L$ ); ETR representa a taxa de transporte de electrões, NPQ representa o *quenching* não fotoquímico, isto é, a dissipação térmica fotoprotetora;  $\phi_e$  é a estimativa de rendimento quântico de transporte fotossintético de electrões não-cíclico;  $Y_{(NO)}$  consiste na estimativa do rendimento quântico associado à dissipação de energia não regulada, sob a forma de calor e fluorescência;  $Y_{(NPQ)}$  representa o rendimento quântico de dissipação de energia regulada no fotossistema II (Kramer *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2011) e  $F_s/F_m'$  é um indicador da taxa de inativação do PSII (Stirbet e Govindjee 2011). A fotoinibição crónica foi calculada como sendo a percentagem da redução de  $F_v/F_m$  no início da manhã, relativo ao máximo anual de  $F_v/F_m$ , para cada espécie, a fotoinibição dinâmica foi calculada ao final da manhã, com a diminuição de  $F_v/F_m$ , correspondendo a fotoinibição total ao somatório das fotoinibições crónica e dinâmica (Werner *et al.*, 2002).

### 3.2.7. Determinação de parâmetros colorimétricos

A determinação dos parâmetros colorimétricos nas folhas da *E. globulus* e da *E. nitens* foi realizada com um colorímetro CR – 400 (Konica, Minolta, Japão), colocando as amostras moídas e homogeneizadas numa cápsula, até completo preenchimento da mesma. A leitura foi efetuada em triplicado e utilizando o iluminante D<sub>65</sub>. O equipamento foi previamente calibrado utilizando as coordenadas  $Y = 85,50$ ;  $x = 0,3185$ ;  $y = 0,3356$ .

A leitura foi realizada, recorrendo ao sistema CIE Lab, e considerando as coordenadas cromáticas  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , que correspondem às cores visíveis ao olho humano, e separam a luz ambiente ou luminosidade ( $L^*$ ) no eixo vertical, e a cromaticidade no eixo horizontal  $x / y$  (Figura 3.5.).

As diferenças de cor entre duas amostras,  $\Delta E$ , foram definidas através da avaliação da distância euclidiana entre dois pontos no CIE  $L^* a^* b^*$  de espaço de cores.

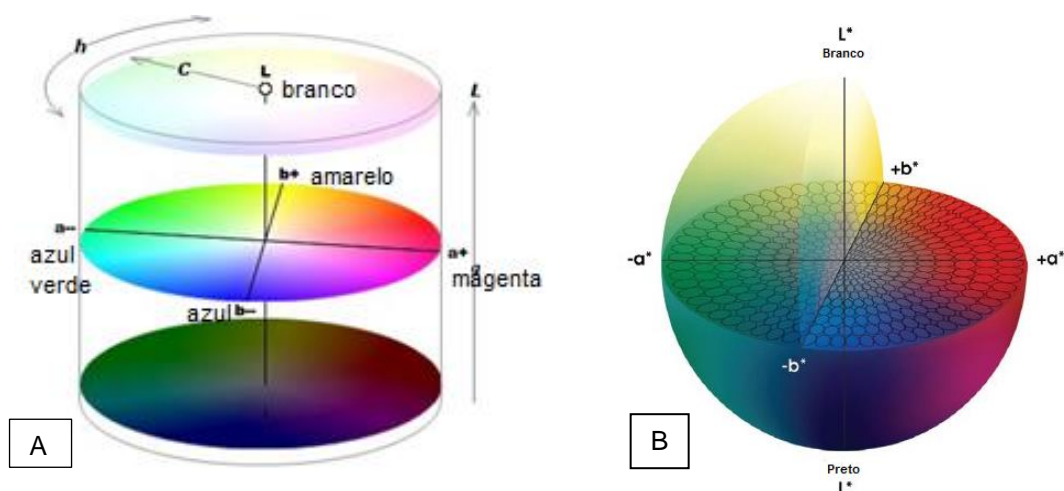


Figura 3.5 - Representação de um modelo de espaço colorimétrico CIE  $L^*a^*b^*$  ((A) <http://www.colourcoil.com/enewsvol3issue2/enews.htm>.- Acedido em Abril de 2016, (B) adaptado de <http://www.techbriefs.com/component/content/article/ntb/tech-briefs/bio-medical/13285> - Acedido em Abril, 2016).

Estes três parâmetros representam a luminosidade da cor ( $L^*$ ,  $L^* = 0$  rendimentos negros e  $L^*=100$  indicam branco), a posição entre o encarnado e o verde ( $a^*$ , valores negativos indicam verde, enquanto que valores positivos de  $a^*$  indicam encarnado) e a posição entre o amarelo e o azul ( $b^*$ , valores negativos indicam azul e valores positivos indicam amarelo).

### 3.2.8. Tratamento estatístico

Utilizou-se o software IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) para efetuar o tratamento estatístico dos dados. O teste paramétrico utilizado foi a ANOVA *two ways* e para verificar e comparar as médias recorreu-se ao teste de Tukey. Os pressupostos utilizados para os testes estatísticos foram sempre idênticos ao longo do trabalho: a influência do arsénio ao longo do tempo (a, b ou c) e a influência do arsénio entre os diferentes grupos de tratamentos (r, s ou t). A letra "a" ou "r" corresponde ao maior valor. O coeficiente de correlação de Pearson, também chamado de "coeficiente de correlação produto - momento", foi usado para aferir o grau da correlação (e a direção dessa correlação - se positiva ou negativa) entre duas variáveis de escala métrica. O grau de confiança utilizado foi de 95%.

## 4.Resultados e Discussão

### 4.1. Regiões mineiras - Contaminação em solos e plantas

#### 4.1.1. Mina de Neves-Corvo

Os teores médios de arsénio nos diferentes locais de amostragem (42 locais em solo agrícola e 2 locais de utilização residencial), na zona envolvente ao couto mineiro de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O) (Figura 4.1), oscilaram entre 6,8 - 87,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , com mediana e média das amostras de solo agrícola (n = 42) correspondendo a 23,2 e 28,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente (Tabela 4.1). A percentagem de amostras de solo agrícola que excederam o limite adotado pela APA (2015) correspondeu a 86 % (n = 42). Adicionalmente, considerando os 44 pontos, verificou-se que a mediana e a média correspondem a 26,2 e 29,6  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente (Tabela 4.1).

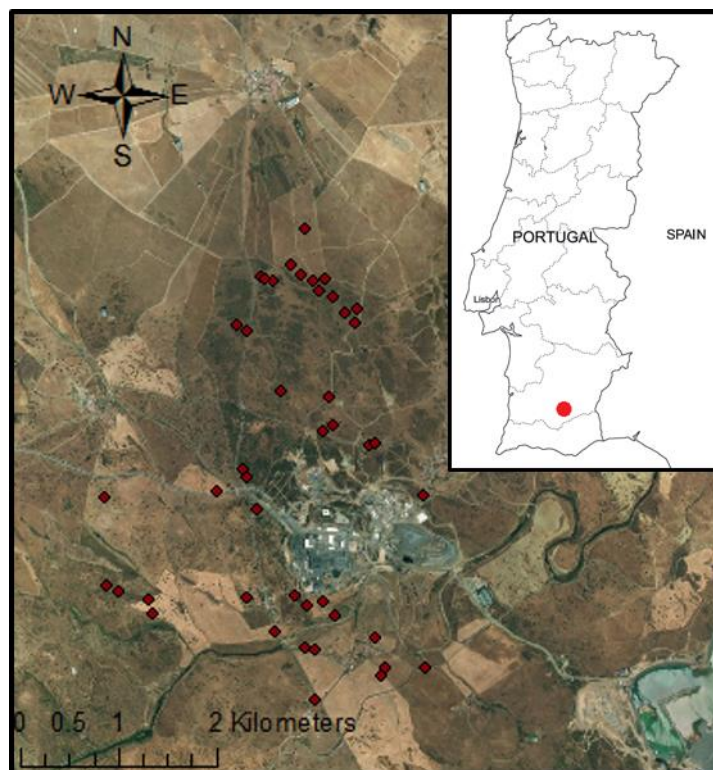


Figura 4.1- Imagem da área mineira com indicando as 44 pontos de amostragem, na zona mineira de Neves-Corvo (37°34'13,5"N, 7°58'19,1"O).

Tabela 4.1 - Teores de arsénio relativos a 44 pontos de recolha de solo na região da mina de Neves-Corvo.

Amostragem As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Mínimo	Máximo	Média	Mediana
44 pontos / Total	6,80	87,0	29,6	26,2
42 pontos / solo agrícola			23,2	28,3

No caso de solos de zonas urbanas, ou residenciais ( $n = 2$ ), as concentrações de arsénio (Tabela 4.2), estão acima do valor limite fixado pela regulamentação de Ontário (Ontario Ministry of the Environment, 2011) para uso residencial, industrial ou comercial (Tabela 4.3), regulamentação que é igualmente adotada pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA, 2015).

Tabela 4.2 - Teores médios de arsénio referentes a duas zonas urbanas circundantes à mina de Neves-Corvo.

Elemento	A-do-Corvo	Neves-da-Graça
As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	87,0	27,3

O solo recolhido na aldeia de A-do-Corvo, localizada a nordeste da mina ( $37^{\circ}57'87.91''\text{N}$ ,  $7^{\circ}96'44.05''\text{O}$ ), e a cerca de 100 m da rede que delimita o complexo mineiro (Figura 4.2), ultrapassa, em cerca de 5 vezes, o limite máximo indicado para o uso residencial (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Limites passíveis de intervenção e monitorização, de acordo com a APA (2015).

Elemento	Uso agrícola	Uso residencial, industrial, comercial, propriedade comunitária
As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	11	18

O solo recolhido na aldeia de Neves-da-Graça, a sudoeste da mina ( $37^{\circ}56'91.12''\text{N}$ ,  $7^{\circ}98'13,21''\text{O}$ ), que se encontra a 500 metros, também excede o limite máximo, em cerca de 1,5 vezes. Aponte-se, contudo, que estes valores são superiores aos registados anteriormente por Batista (2003) e Grimes e Carvalho (1994).



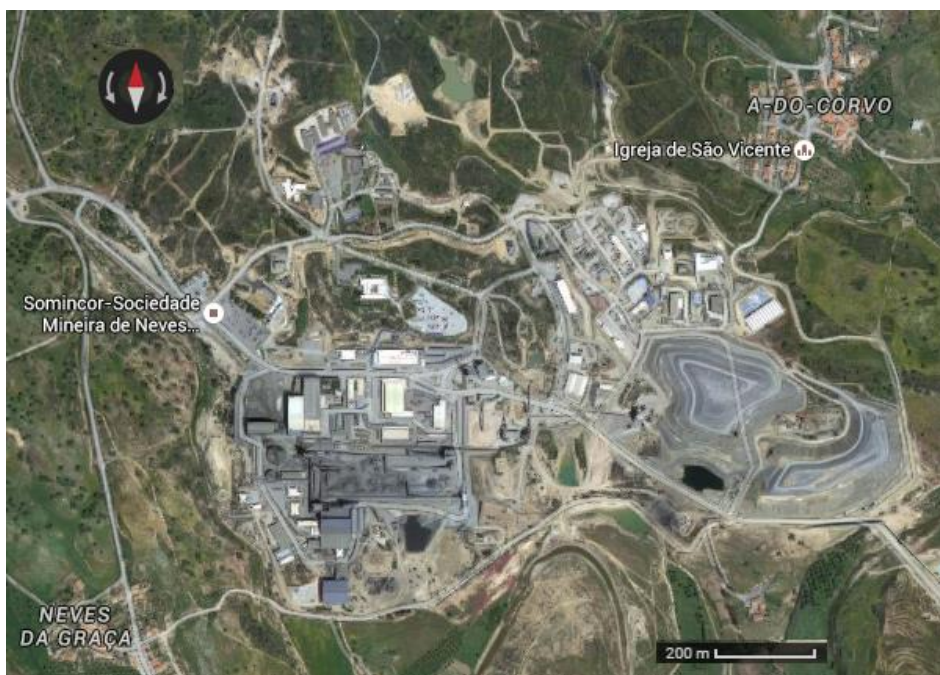


Figura 4.2.- Mapa do complexo mineiro de Neves-Corvo, com as localidades de A-do-Corvo e Neves da Graça (www.maps.google.com - Acedido em Abril de 2016).

Para avaliar o possível risco para a saúde pública, decorrente da ingestão de produtos hortícolas ou frutos recolhidos em solos com valores de metais acima do valor limite fixado pela regulamentação de Ontario (Ontario Ministry of the Environment, 2011) (As –  $27,4 \pm 1,53 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Cu –  $166 \pm 6,09 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Pb –  $29,6 \pm 3,03 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Zn –  $115,8 \pm 5,97 \mu\text{g g}^{-1}$ ; pH –  $6,43 \pm 0,10$ ; EC –  $414 \pm 1,15 \mu\text{S/cm}$ ; carbonatos – 17,6 %; matéria orgânica – 5,75 %; areia - 43,4 %; argilas – 11,5 %; silte – 21,75 %), determinou-se a concentração média de arsénio, cobre, chumbo e zinco em produtos hortofrutícolas recolhidos a 600 metros a sul da mina de Neves-Corvo (Tabela 4.4, Tabela 4.5) ( $37^{\circ}39'36.2''\text{N}$ ,  $7^{\circ}30'18.9''\text{O}$ ).

Tabela 4.4 - Teores de As, Cu, Pb e Zn em folhas de diversas espécies recolhidas a cerca 600 metros da mina de Neves-Corvo.

Folhas	As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Laranjeira	$17,5b \pm 2,27$	$97,3b \pm 9,87$	$31,5b \pm 6,36$	$362a \pm 43,0$
Laranjeira *	$9,61a \pm 1,07$	$74,9ab \pm 10,3$	$15,7a \pm 2,23$	$291a \pm 35,7$
Figueira	$18,1b \pm 2,17$	$76,7b \pm 5,72$	$33,7b \pm 2,14$	$371b \pm 6,96$
Figueira *	$11,7a \pm 1,53$	$44,7a \pm 4,38$	$14,1a \pm 1,43$	$377a \pm 6,16$
Tomateiro	$12,6a \pm 1,50$	$103a \pm 13,1$	$18,4a \pm 3,06$	$441a \pm 40,2$
Tomateiro *	$12,4a \pm 2,77$	$102a \pm 5,85$	$17,8a \pm 2,41$	$427a \pm 79,3$
Courgette	$7,68a \pm 1,68$	$40,5b \pm 5,87$	$10,5a \pm 1,64$	$275b \pm 6,57$
Courgette *	$5,12a \pm 1,64$	$32,3ab \pm 5,89$	$10,3a \pm 1,68$	$281b \pm 6,72$
Feijoeiro	$7,63a \pm 1,69$	$46,3a \pm 6,04$	$10,5a \pm 1,67$	$308b \pm 6,96$
Feijoeiro *	$9,17a \pm 1,86$	$44,3a \pm 6,91$	$9,07a \pm 1,77$	$286a \pm 7,37$

\* Folha previamente lavada por água bidestilada.

Tabela 4.5 - Teores de As, Cu, Pb e Zn na parte edível de frutos recolhidos a cerca de 600 metros da mina de Neves-Corvo (n.d. – abaixo do limite de deteção).

Frutos	As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Laranja		21,2 $\pm$ 3,85		6,38 $\pm$ 1,42
Figo		27,2a $\pm$ 5,21		52,4b $\pm$ 5,77
Tomate	n.d.	10,6 $\pm$ 5,10	n.d.	25,8 $\pm$ 3,18
Courgette		21,7a $\pm$ 6,38		41,9a $\pm$ 4,76
Feijão-verde		36,0 $\pm$ 4,36		57,6 $\pm$ 5,10

Para análise comparativa e de retrocontolo, a 3 Km a sul (37°54'92.12"N, 7°96'32.81"O), procedeu-se à recolha de folhas e frutos de laranjeira, figueira e courgette (Tabela 4.6 Tabela 4.7).

Tabela 4.6 - Teores de As, Cu, Pb e Zn em folhas de diversas espécies localizadas a 5 km da mina de Neves-Corvo (n.d. – abaixo do limite de deteção).

Folhas Controlo	As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Laranjeira		21,5a $\pm$ 4,95		28,3a $\pm$ 5,58
Laranjeira *		28,0a $\pm$ 7,46		37,3a $\pm$ 3,46
Figueira	n.d.	31,8a $\pm$ 4,06	n.d.	54,1a $\pm$ 5,30
Figueira *		35,4a $\pm$ 6,43		54,4a $\pm$ 5,23
Courgette		24,2a $\pm$ 8,74		107a $\pm$ 8,00
Courgette *		25,0a $\pm$ 6,02		109a $\pm$ 10,7

\* Folha previamente lavada por água bidestilada.

Tabela 4.7 - Teores de As, Cu, Pb e Zn na parte edível de frutos de diversas espécies localizadas cerca de 5 km da mina de Neves-Corvo (n.d. – abaixo do limite de deteção).

Frutos / Vegetais Control	As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Laranja		n.d.		n.d.
Figo	n.d.	29,8a $\pm$ 5,03	n.d.	40,9a $\pm$ 5,68
Courgette		25,0a $\pm$ 7,79		40,5a $\pm$ 6,42

Nas amostras foliares recolhidas 600 metros a sul da mina de Neves-Corvo (Tabela 4.4), foram detetados elevados níveis de arsénio. Contudo, a simples lavagem com água bidestilada das folhas de laranjeira e figueira removeu quantidades consideráveis de arsénio (45 e 35 %, respetivamente). Por oposição, após lavagem com água bidestilada, as folhas do tomateiro, courgette e feijoeiro apresentaram teores de arsénio próximos da pré-lavagem. Estes dados apontam, para a dispersão do contaminante a nível da atmosfera e, conseqüente, deposição superficial na biota, que no caso das folhas da laranjeira e figueira pode ser facilmente lixiviado pela água da chuva. Porém, as folhas das plantas anteriormente citadas, também contêm no respetivo mesófilo / vasos xilémicos e floémicos concentrações de arsénio resultantes da absorção e posterior translocação para esse órgão. Ressalve-se ainda que os tricomas foliares



podem dificultar a remoção do contaminante por lixiviação, pois poderão constituir um obstáculo à análise de potenciais diferenciações entre a concentração superficial e estrutural. Note-se ainda que, não foi possível detetar arsénio ou chumbo na parte edível dos frutos, não subsistindo assim um risco de saúde pública. Contudo, os teores de chumbo nas folhas do feijoeiro e da figueira na fase de pré-lavagem situaram-se entre 10,5 e 33,7  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente. Aponte-se ainda que o teor de chumbo removido das folhas após lavagem com água bidestilada, correspondeu a 50 % e 58 % nas folhas da laranjeira e figueira, respetivamente. Nas folhas das restantes espécies não subsistiram diferenças substanciais nas concentrações de chumbo (nas fases pré e pós lavagem). No caso do cobre constatou-se uma lixiviação de 23 % e 42 % nas folhas de laranjeira e figueira, respetivamente. Considerando os teores de zinco, entre folhas lavadas ou não, a maior diferença foi de 20 % na laranjeira.

Por oposição, a 5 km da mina, em solos de referência (As –  $7,81 \pm 1,35 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Cu –  $12,9 \pm 3,22 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Pb –  $5,0 \pm 1,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ; Zn –  $39,8 \pm 3,0 \mu\text{g g}^{-1}$ ; pH -  $6,30 \pm 0,06$ ; EC -  $347 \pm 7,45 \mu\text{S/cm}$ ; carbonatos – 8,75 %; matéria orgânica – 9,90 %; areia - 17,7 %; argilas – 25,8 %; silte – 37,85 %), não se detetou arsénio e chumbo nas folhas ou frutos da laranjeira, figueira e courgette. Neste caso, a acumulação de cobre e zinco nas folhas lavadas ou não, da laranjeira, figueira e courgette não variaram de forma substancial. Kabata-Pendias e Pendias (1985) estipula limites de toxicidade para o arsénio, cobre, chumbo e zinco nas folhas das plantas a partir de 5, 20, 30 e 300  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente. Assim, considera-se que após estes valores as espécies vegetais poderão sofrer danos, porventura irreversíveis na maquinaria fotossintética, evoluindo então défices na mobilização de fotoassimilados para a planta, que no limite poderão determinar a sua senescência (*i.e.*, face ao ponto de compensação fisiológico). Neste contexto, aponte-se que no caso de vegetais e frutos cultivados na zona mineira de Baia Mare (Roménia), a excessiva concentração de cádmio, chumbo, cobre e zinco, considerando os limites máximos admitidos, determinaram uma restrição no consumo para evitar um risco potencial para saúde pública (Roba *et al.*, 2016). Acresce ainda que Zhuang *et al.* (2009), face à zona mineira de Dabaoshan na China, também referiram que concentrações elevadas dos mesmos contaminantes em campos e jardins, e que ultrapassaram os limites máximos estipulados para solos agrícolas na China, teriam implicações diretas na respetiva acumulação em culturas, especificamente no arroz, que tem tendência para acumular cádmio e chumbo ao nível do grão.

#### 4.1.2. Mina de São Domingos

Na zona mineira de São Domingos (37°67'59.02"N, 7°50'16.96"O) recolheram-se amostras de solo, em 2 estratos distintos (0 - 5 e 5 - 10 cm de profundidade), em plantas do género *Cistus spp.*, *Pinus spp.* e *Eucalyptus spp.*, presentes nesses locais (Figura 4.3; Tabela 4.8).

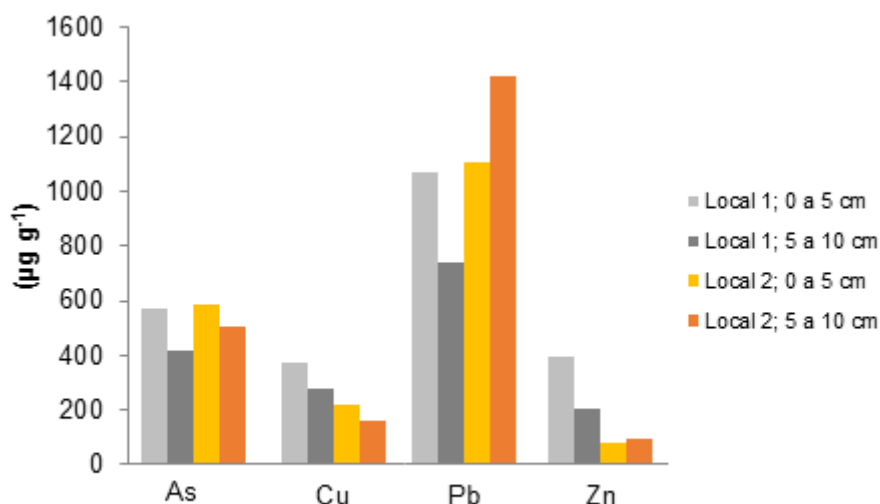


Figura 4.3 - Teor de As, Cu, Pb e Zn no solo circundante da mina de São Domingos.

Verificou-se que na zona mineira de São Domingos os teores de arsénio são muito superiores aos de Neves-Corvo, situando-se dentro dos limites anteriormente apontados ( $71 - 2000 \mu\text{g g}^{-1}$ ) por Batista *et al.* (2012a) e Alvarenga *et al.* (2014a). Nas folhas de várias espécies vegetais da região da mina de São Domingos, a quantificação dos teores de arsénio, cobre, chumbo e zinco também revelou variações apreciáveis (Tabela 4.8). No caso das folhas da esteva (*Cistus ladanifer*) e do pinheiro bravo (*Pinus pinaster*), os teores de arsénio superaram o limiar máximo de toxicidade apontado por Kabata-Pendias e Pendias (1985), situação que também foi apontada por Tavares *et al.* (2009) e Márquez - García *et al.* (2012). Nas folhas da esteva, em se obtiveram maiores valores de arsénio, os teores de cobre e chumbo foram também superiores ao limiar máximo referido por Kabata-Pendias e Pendias (1985). As folhas das duas *E. globulus* analisadas, apresentaram também valores de cobre acima dos referidos com máximos. Em todas as espécies, os níveis de zinco registados na folhas ficaram abaixo do limite de toxicidade considerando por Kabata-Pendias e Pendias (1985).

Tabela 4.8 - Teores de alguns elementos contaminantes em folhas de espécies vegetais localizadas na zona de São Domingos (n.d. – abaixo do limite de deteção do aparelho).

Folhas	As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Pb ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
<i>Cistus ladanifer</i>	$8,86 \pm 1,74$	n.d.	$13,3 \pm 1,67$	$202 \pm 5,56$
<i>Pinus pinaster</i>	$22,3 \pm 1,67$	n.d.	n.d.	$56,2 \pm 3,49$
<i>Eucalyptus globulus</i>	n.d.	$38,5 \pm 4,90$	n.d.	$121 \pm 4,16$
<i>Cistus ladanifer</i>	$17,1 \pm 2,26$	$22,3 \pm 5,27$	$32,7 \pm 2,17$	$246 \pm 5,98$
<i>Eucalyptus globulus</i>	n.d.	$30,9 \pm 4,99$	n.d.	$69,2 \pm 3,54$

## 4.2. Ensaios de fitorremediação – Interações entre o arsénio e o *Eucalyptus* spp.

### 4.2.1. Aspectos fenológicos interespecíficos

A aferição da capacidade das espécies do género *Eucalyptus*, para eventual utilização em sistemas de fitorremediação, nomeadamente em regiões mineiras contaminadas com arsénio, deve considerar não só os níveis deste elemento no substrato, mas também as condições edafoclimáticas das regiões. Neste enquadramento, procedeu-se à instalação de um sistema piloto na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, em que se assumiram como referenciais de contaminação, os níveis de arsénio quantificados nos solos da região mineira de Neves-Corvo. Assim, obteve-se um valor médio de  $29,6 \mu\text{g g}^{-1}$  de arsénio que serviu de base para a definição da concentração deste elemento a utilizar por Kg de solo em ambiente confinado (Tabela 4.1).

Durante o período de aclimação do sistema piloto, implementado na Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa (entre Setembro de 2014 e Janeiro de 2015 - Figura 3.3), as plantas (*E. globulus* e *E. nitens*) apresentaram um crescimento substancial (Figura 4.4).



Figura 4.4 - Estado fenológico da *E. globulus* (A) e da *E. nitens* (B), em Dezembro de 2014, nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa.

Nestes ensaios, após contaminação com arsénio, (Janeiro de 2015), as plantas, independentemente das concentrações de arsénio aplicadas, em T1 (Março de 2015) ainda não revelavam qualquer sintomatologia visível (Figura 4.5).

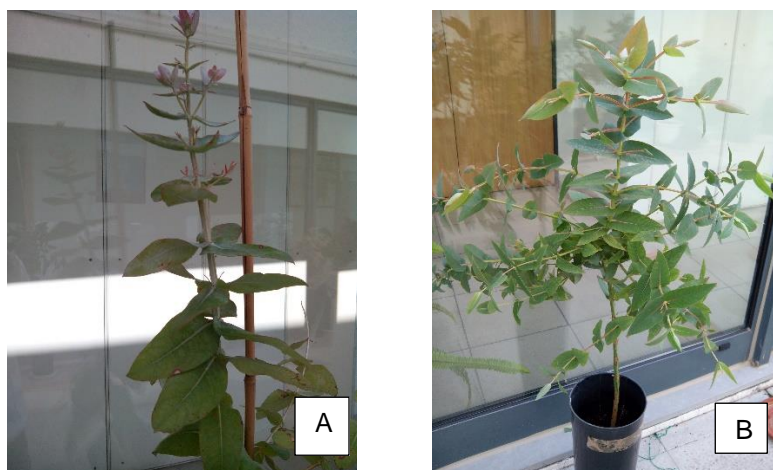


Figura 4.5 - *E. globulus* (A) e *E. nitens* (B), em Março de 2015 (T1), apresentando um estado fenológico característico da época do ano (*i.e.*, novas folhas e ramos), nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa.

Em T2 (Maio de 2015), independentemente das concentrações de arsénio aplicadas no solo, a coloração das folhas jovens das plantas distinguia-se facilmente e já não surgiram novos ramos. Paralelamente, as folhas mais velhas começaram a sofrer abscisão (Figura 4.6).

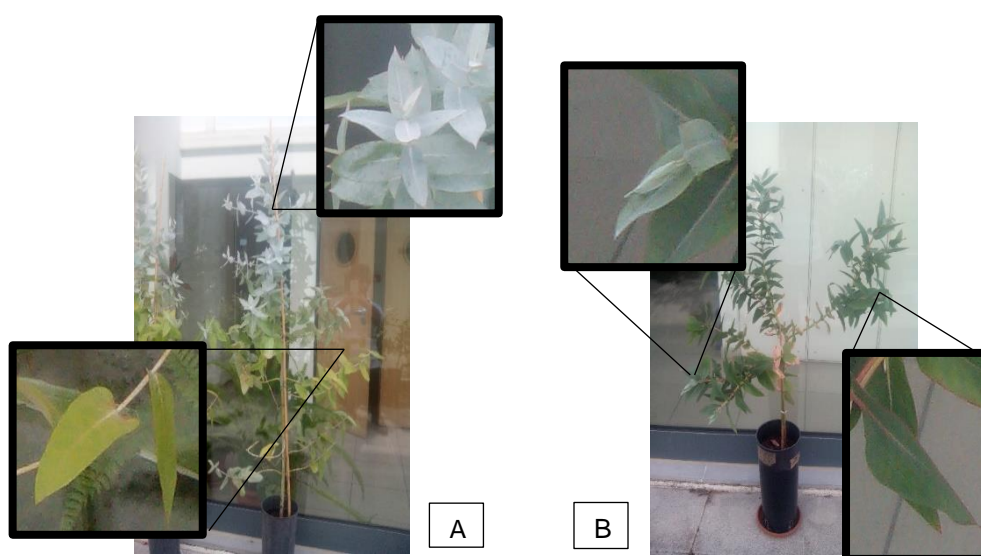


Figura 4.6 – Alguns aspetos relativos ao estado fenológico da *E. globulus* (A) e da *E. nitens* (B), no final de Maio de 2015 (T2), nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa.

Os sintomas detetados em Maio de 2015 persistiram até ao final de Julho de 2015 (T3) (Figura 4.7), tendo cessado por completo o crescimento das duas espécies, independentemente da concentração de arsénio aplicada no solo.



Figura 4.7 – Estado fenológico da *E. globulus* (A) e da *E. nitens* (B) no final de Julho de 2015 (T3), nas instalações da Faculdade de Ciências e Tecnologia / Universidade Nova de Lisboa.

#### 4.2.2. Translocação e acumulação de arsénio

No decurso do período experimental, nas instalações piloto da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, não ocorreram alterações significativas nas concentrações de arsénio no solo dos vasos contendo *E. globulus*. No entanto, foram detetadas diferenças significativas na concentração de arsénio no solo entre tratamentos para esta espécie (Figura 4.8 - A). Verificou-se ainda uma correlação de Pearson muito significativa entre os tratamentos e os níveis de arsénio no solo (0,89; *p-value* no intervalo de confiança de 99 %).

No solo das plantas *E. nitens*, em T2, observou-se um aumento significativo nas concentrações de arsénio, para os dois tratamentos. Porém, estes teores diminuíram de modo significativo em T3, nos solos contaminados com 100 mg de arsénio (Figura 4.8.- B). O aumento significativo dos valores de arsénio em T2 poderá ter decorrido de uma retificação da concentração e nova aplicação de arsénio no solo. Embora se tenham evidenciado diferenças de concentrações entre tratamentos, apenas em T3 estas foram significativas. Aponte-se contudo que as amostras de solo retiradas dos vasos para análise, foram colhidas no respetivo estrato superficial, aspeto que decorreu da necessidade de não afetar as raízes das plantas.



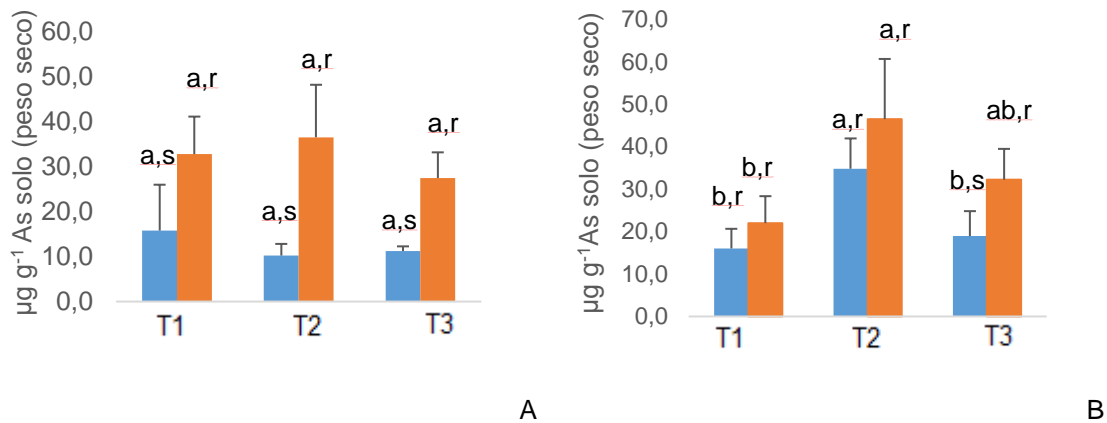


Figura 4.8 - Teor médio de arsénio no solo da *E. globulus* (A) e da *E. nitens* (B), ( $\pm$  Erro Padrão; *p-value*, no intervalo de confiança de 95 %), ao longo do período experimental. O solo das plantas controlo não apresentou arsénio, não tendo sido, por este motivo, incluído nos gráficos.

Tratamentos: ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

No decurso do ensaio piloto, as raízes de *E. globulus*, no tratamento 200, apresentaram um aumento significativo em T2, face a T1, ainda que apenas após a retificação dos níveis de arsénio no solo. As diferenças de concentração de arsénio nas raízes entre tratamentos foram significativas (Figura 4.9 - A) predominando no tratamento 200. Verificou-se ainda uma correlação de Pearson muito significativa entre os tratamentos e os níveis de arsénio na raiz (0,90; *p-value*, no intervalo de confiança de 99 %) e os níveis de arsénio no solo (0,76; *p-value*, no intervalo de confiança de 99 %).

Observou-se, ao longo do ensaio, que as raízes da *E. nitens* não apresentaram diferenças significativas na concentração de arsénio. No entanto, entre os dois tratamentos subsistiram diferenças significativas na concentração de arsénio nas raízes (Figura 4.9 - B), com predomínio no tratamento 200. Verificaram-se ainda correlações de Pearson muito significativas entre a concentração de arsénio nas raízes da *E. nitens* e os diferentes tratamentos (0,72; *p-value*, no intervalo de confiança de 99 %), bem como entre os teores de arsénio no solo e as concentrações nas raízes (0,80; *p-value*, no intervalo de confiança de 99 %). Considerando o delineamento experimental da instalação piloto, os resultados apontam para um sinergismo entre o teor de arsénio no solo e a subsequente mobilização pelas raízes das plantas. Resultados semelhantes foram apresentados com arsénio por Ozturk *et al.* (2010), Hoffmann e Schenk (2011) e Austruy *et al.* (2013). King *et al.* (2008) também relataram que as espécies *E. cladocalyx*, *E. melliodora*, *E. polybractea* e *E. viridis* apresentam igualmente um sinergismo entre a retenção de arsénio na zona da rizosfera e o teor de arsénio no solo.

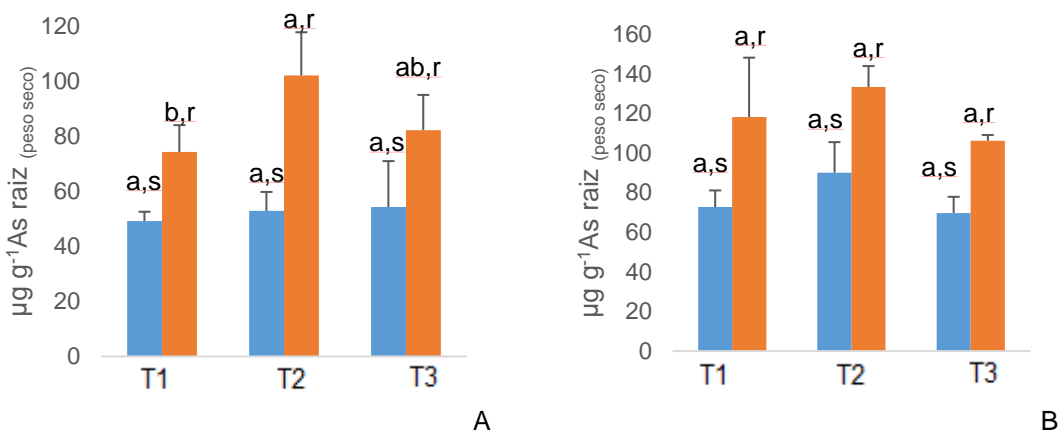


Figura 4.9 - Teor médio de arsênio na raiz da *E. globulus* (A) e da *E. nitens* (B), ( $\pm$  Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %) ao longo do período experimental. O solo das plantas controle não apresentaram arsênio, não tendo sido, por este motivo, incluído nos gráficos.

Tratamentos: ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

Análises feitas por espectrofotometria (sistema  $\mu$  – EDXRF) em três pontos da raiz de *Eucalyptus spp.*, no tratamento 200, em T3, e também no formato de pastilhas compactada (Figura 4.10), confirmam que o arsênio se encontrava na raiz desta espécie (Tabela 4.9). No caule, tal como verificado por Hoffmann e Schenk (2011), constatou-se que os teores de arsênio foram residuais (*i.e.*, inferiores a  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ) para a *E. globulus*, em todas as amostras e ao longo de todo o período do ensaio (ainda que na *E. nitens* os teores de arsênio tenham excedido esses limites) (Tabela 4.10). Tal como apontado por King *et al.* (2008), também os teores de arsênio nas folhas revelaram uma tendência similar à do caule, em todos os tratamentos e ao longo do período de ensaio (Figura 4.11; Tabela 4.11). Portanto na *E. globulus*, os valores obtidos foram inferiores aos limites de toxicidade ( $5 - 20 \mu\text{g g}^{-1}$ ) referenciados por Kabata-Pendias e Pendias (1985). Paralelamente, nas folhas da *E. nitens* também se verificaram teores de arsênio acima do limite de toxicidade, no tratamento 200, em T3 (Figura 4.11; Tabela 4.10, Tabela 4.11).

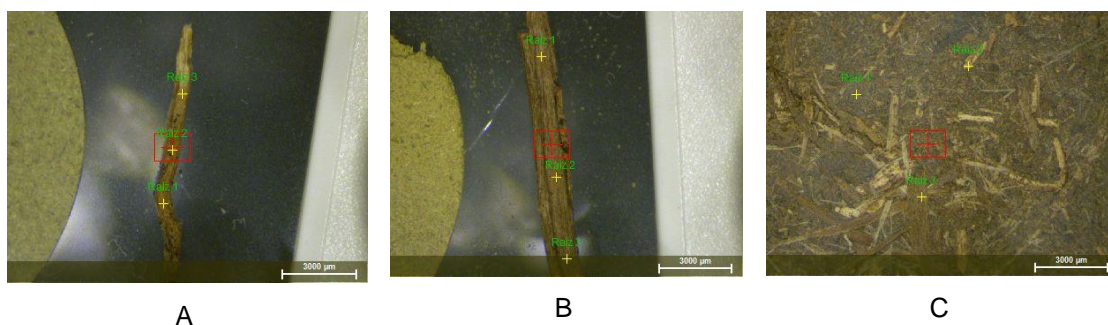


Figura 4.10 - Análises espectrofotométrica, utilizando o sistema  $\mu$  – EDXRF, na raiz da *E. nitens*, em amostras do tratamento 200, colhidas em T3. As figuras A, B, C correspondem à raiz parcialmente isenta de súber, com a suberização e na forma de pastilha, respectivamente.

Tabela 4.9 - Valores de arsênio ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) nos vários pontos da raiz da *E. nitens*.

	Imagem A	Imagem B	Imagem C
Ponto 1	10,6	19,4	44,8
Ponto 2	28,3	11,4	23,1
Ponto 3	16,2	10,2	5,80

Tabela 4.10 - Teores médios de arsênio no caule e nas folhas da *E. nitens*, aos 6 meses (T3), no tratamento 200 (determinação por espectrofotometria efetuada com o sistema portátil de XRF).

<i>E. nitens</i>	Caule	$7,22 \pm 1,11 \mu\text{g As g}^{-1}$
	Folhas	$9,48 \pm 2,22 \mu\text{g As g}^{-1}$

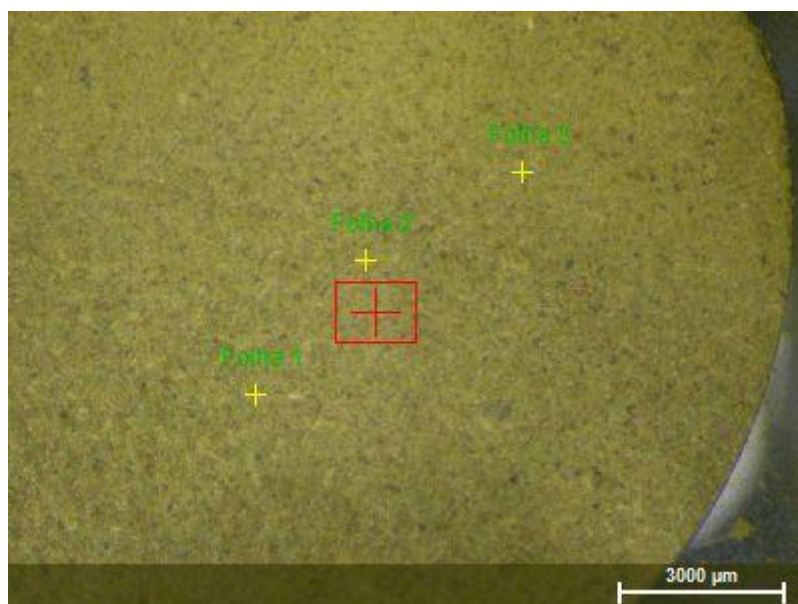


Figura 4.11 - Análise por espectrometria (com recurso ao sistema  $\mu$  – EDXRF), de uma folha da *E. nitens*, do tratamento 200, em T3.

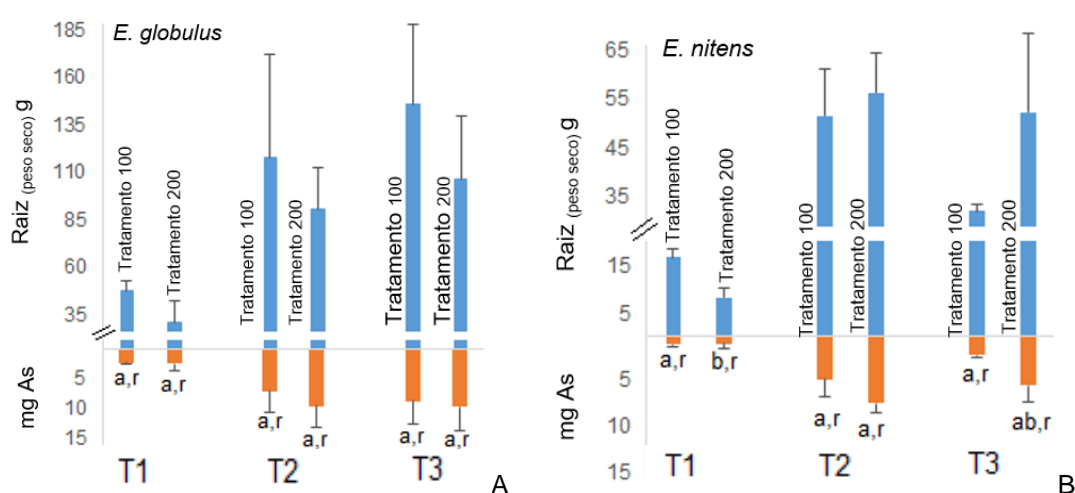
Tabela 4.11 - Teores de As na folha da *E. nitens*, do tratamento 200, em T3 (determinação por espectrofotometria efetuada com o sistema  $\mu$  – EDXRF).

As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
Ponto 1	8,89
Ponto 2	9,90
Ponto 3	7,00



#### 4.2.3. Acumulação total de arsénio

O produto entre os teores de arsénio aferidos na raiz de uma estrutura vegetal e o respetivo peso seco traduzem a acumulação total de arsénio deste órgão. Neste enquadramento aponte-se ainda que os teores de arsénio no caule e nas folhas foram residuais (exceto na *E. nitens*, tratamento 200). Constatou-se assim, nas duas espécies, um aumento da acumulação total de arsénio nas raízes entre T1 e T2. Porém, na *E. globulus* não subsistiram diferenças significativas entre tratamentos, assim como ao longo do tempo, (Figura 4.12 - A). No entanto, no tratamento 200, na *E. nitens* o aumento da acumulação de arsénio na raiz foi significativamente diferente entre T1 e T2, não existindo diferenças significativas entre tratamentos (Figura 4.12 - B).



#### 4.2.4. Índices de permeabilização seletiva foliar

A nível tecidual, numa espécie vegetal, a condutância eletrolítica correlaciona-se diretamente com a seletividade membrana dos eletrólitos (Ketchie *et al.*, 1972), permitindo aferir a ação direta ou indireta de um fator de *stress*. Neste enquadramento, na *E. globulus* verificou-se, um aumento da taxa da condutância eletrolítica nas plantas controlo e no tratamento 100 de T1 para T2, diminuindo após este período (Tabela 4.12). No tratamento 200, registou-se o comportamento inverso. Os valores mínimos e máximos foram registados no tratamento 100 e 200, ambos em T3, respetivamente. Aponte-se ainda que no tratamento 200, em T3, registaram-se valores 5,6 vezes superiores face aos obtidos nas plantas do controlo.

Na *E. nitens*, denotou-se, em todos os tratamentos, uma diminuição da taxa de condutância eletrolítica de T1 para T3 (com exceção do tratamento 200). Os valores mínimos e máximos foram registados no tratamento 100 (em T3) e 200 (em T1), respetivamente. De salientar também as diferenças do tratamento 200 relativamente ao controlo, em T1 e T3, que registaram aumentos 1,5 e 2,8 vezes, respetivamente (Tabela 4.12). Refira-se ainda que os decréscimos na condutância eletrolítica da *E. nitens*, ao longo do tempo, eventualmente também poderão ter decorrido do fator sazonal. No entanto, as diferenças entre o tratamento 200 e o controlo poderão evidenciar alguns sinais da acumulação de arsénio nas folhas.

Tabela 4.12 - Condutância eletrolítica nas folhas da *E. globulus* e da *E. nitens*, ao longo do período experimental.

Tratamentos		$\mu\text{Sm cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ (peso fresco)		
		T1	T2	T3
<i>E. globulus</i>	0	0,422	1,452	0,283
	100	0,397	0,722	0,164
	200	0,566	0,320	1,576
<i>E. nitens</i>	0	0,576	0,247	0,197
	100	0,662	0,185	0,183
	200	0,895	0,467	0,554

#### 4.2.5. Mobilização e acumulação de nutrientes e interação com o arsénio

A cinética de mobilização e acumulação de alguns elementos minerais ocorre de forma diferenciada ao longo do desenvolvimento vegetativo das plantas. No âmbito dos macronutrientes, reconhece-se a interação antagónica relativa à acumulação do cálcio, e do arsénio (Chou *et al.*, 2016). Equacionando a acumulação de micronutrientes, destaca-se a interação do ferro com o arsénio. Neste caso, pode ocorrer a precipitação deste elemento, envolvendo a formação de placas nas raízes e, subsequentemente, a diminuição da absorção de arsénio (Garnier *et al.*, 2010). Acresce ainda que alguns estudos também sugerem que os níveis elevados de arsénio no solo podem afetar a cinética e a acumulação de outros micronutrientes, nomeadamente do zinco (Jung *et al.*, 2015).

#### 4.2.5.1. Cálcio

As concentrações de cálcio quantificadas neste estudo, independentemente dos tratamentos e períodos experimentais são superiores à concentração reportada por Raven *et al.* (2005) para tecidos vegetais (*i.e.*, 0,5 %), aspetos que poderão decorrer de variações edafoclimáticas e / ou de características específicas dos genótipos.

Na *E. globulus*, o tratamento controlo a apresentou teores mínimos e máximos de cálcio, no caule em T1 (2,51 %) e nas folhas em T3 (4,29 %), respetivamente. No tratamento 100, os valores mínimos e máximos de cálcio foram encontrados no caule (em T1 – 3,01 %) e nas raízes (em T3 4,29 %). Relativamente ao tratamento 200, os teores variaram entre 2,07 % (no caule, em T1) e 4,35 % (nas folhas, em T3) (Figura 4.13 - 1A, 2A, 3A). Na *E. nitens*, as folhas (em todos os tratamentos) apresentaram os teores mais baixos em T1 (1,33 %, 1,23 % e 1,33 %, para controlo, tratamento 100 e 200, respetivamente). Ainda nesta espécie, o tratamento controlo e 200 apresentaram os teores máximos de Ca na raiz (em T1 – 3,89 % e T3 – 3,41 %, respetivamente), enquanto que no tratamento 100, os teores mais elevados ocorreram no caule (em T2 – 4,19 %) (Figura 4.13 - 1B, 2B, 3B).

Nas duas espécies, as concentrações de cálcio estão acima dos intervalos definidos por Foelkel (2011), para o género *Eucalyptus*, que reporta teores nas folhas e raízes oscilando entre 0,4 – 1,0 %, e entre 0,08 – 0,15 %, respetivamente. Este autor salienta ainda que é no ritidoma do eucalipto que se encontram habitualmente as concentrações mais elevadas (com valores que poderão oscilar entre 0,8 – 3,5 %).

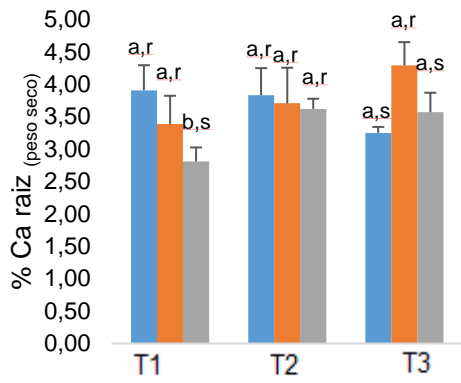
O cálcio é essencial para a construção da parede celular de novas células, principalmente na lamela média, assegurando ainda o normal funcionamento da membrana celular, e atuando como mensageiro da planta, face a diferentes variações do meio ambiente (Zeiger e Taiz, 1998).

O solo utilizado para as diferentes culturas apresentou concentrações de cálcio que variavam entre um mínimo de 4,27 % e um máximo de 5,65 %, tendo-se assim garantido uma eficiente absorção de arsénio pelas raízes da *E. globulus* e da *E. nitens*. De facto aponte-se que a imobilização do arsénio em solos contaminados pode ser conseguida através da aplicação de peróxido de cálcio (Chou *et al.*, 2016). Como exemplo refira-se ainda, a correção de solos da planície do sudoeste de Taiwan com diferentes concentrações de CaO<sub>2</sub> (0,38, 0,76 e 1,52 mg ha<sup>-1</sup>), que permitiu reduzir significativamente as concentrações de arsénio nas raízes de diferentes espécies integrantes da dieta alimentar. A aplicação de 1,52 mg CaO<sub>2</sub> ha<sup>-1</sup> foi a que obteve melhores resultados tendo-se verificado uma redução de 49,4 %, 75,4 %, 69 % e 69,5 % nas raízes de *Raphanus sativus*, *Lactuca sativa*, *Brassica rapa* e *Lactuca sativa*, respectivamente. Acresce que tratamentos com arsénio parecem ter um efeito sinérgico na acumulação de cálcio nas raízes de *Wrightia arborea* (Kumar *et al.*, 2015) e nas raízes e folhas de *Zea mays* (Mallick *et al.*, 2011). Contudo, na raiz da *E. globulus*, no tratamento 200 µg As g<sup>-1</sup>, prevaleceu um efeito antagónico na absorção de cálcio em T1 (Figura 4.13 -1A). Situação semelhante foi verificada em relação às raízes da *E. nitens*, embora neste caso particular se tenha detetado uma diminuição nas concentrações de cálcio nas raízes no momento T1 (para ambos os

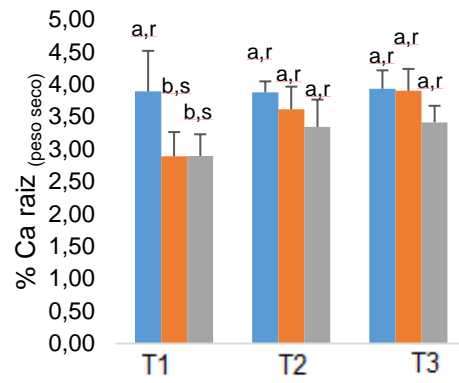
tratamentos), seguida de um incremento nos momentos T2 e T3. Aliás, na *E. nitens*, as concentrações de cálcio em T2 e T3 não foram significativamente diferentes para um nível de significância de 95 % (Figura 4.13 - 1B).

No caule, da *E. globulus*, os teores de cálcio não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo. No entanto, entre o controlo e o tratamento 100 em T1, as diferenças significativas detetadas, são insuficientes para justificar o efeito antagónico do arsénio sobre o cálcio no caule (Figura 4.13 - 2A). Na *E. nitens*, as diferenças significativas entre tratamentos em T1 e T2 também não se confirmaram em T3 (Figura 4.13 - 2B).

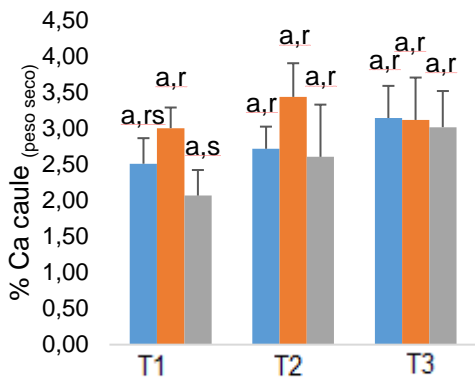
Equacionando cumulativamente a acumulação de cálcio nos diferentes órgãos (raiz, caule e folhas) da *E. globulus* e da *E. nitens* constatou-se que a taxa de absorção radicular em todos os tratamentos persiste sistematicamente inferior à taxa de translocação para a parte aérea, o que parece sugerir uma ausência de qualquer tipo de interação entre os mecanismos associados à regulação da absorção e translocação envolvendo o cálcio e o arsénio.



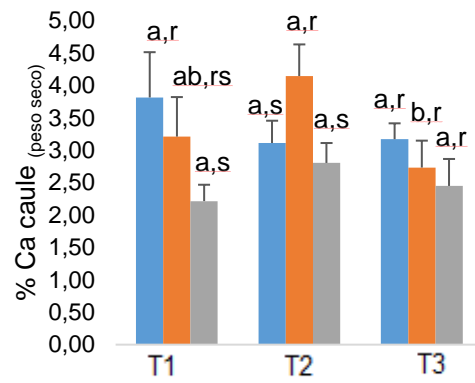
1A



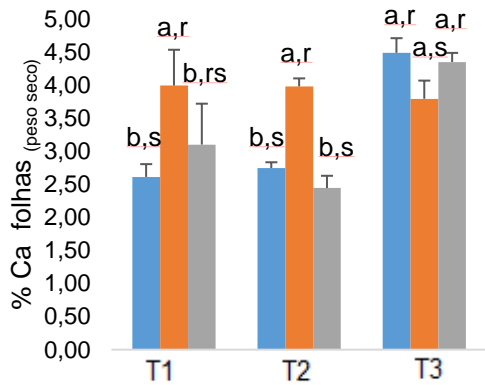
1B



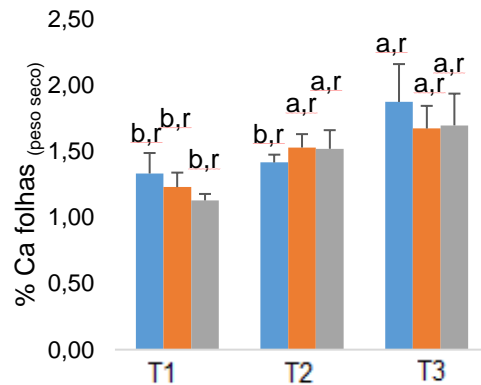
2A



2B



3A



3B

Figura 4.13 - Teor médio de cálcio na raiz (1), no caule (2) e nas folhas (3), ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental. Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As

#### 4.2.5.2. Potássio

Nas raízes da *E. globulus* e da *E. nitens*, e nos tratamentos 100 e 200, em T3, não se evidenciou qualquer efeito antagónico na absorção de potássio com as concentrações do arsénio nas plantas, embora se tenha observado que ao longo do período experimental as concentrações nas raízes decresceram entre T1 e T3 (exceto no tratamento 200 e no controlo da *E. globulus* e *E. nitens*, respetivamente). Aponte-se ainda que na *E. nitens*, em T3, se detetaram os valores mais baixos (0,92 %, 0,87 % e 0,93 %, para as plantas controlo, tratamento 100 e 200 respetivamente), na *E. globulus*, no mesmo período os valores foram ainda mais baixos (0,53 %, 0,64 % e 0,73 % para plantas controlo para as plantas controlo, tratamento 100 e 200, respetivamente) (Figura 4.14 -1A, 1B).

Na maioria dos casos, as concentrações nos caules da *E. globulus* e da *E. nitens* não variaram significativamente ao longo do tempo; os valores médios dos caules foram superiores aos observados nas raízes, mas inferiores aos das folhas (Figura 4.14 – 2A, 2B).

Em todos os tratamentos, as folhas de *E. nitens* apresentaram teores de potássio superiores a 2 % (mas inferiores a 3 %), muito acima dos valores definidos por Foelkel (2011), para o género *Eucalyptus*, que propõe oscilarem entre 0,5 – 1,2 %, ou ainda a concentração considerada adequada (1 %) para tecidos vegetais (numa base de peso seco) por Raven *et al.*, (2005) (Figura 4.14 - 3B). Assim, considerando a ação do potássio no balanço iónico, os nossos resultados tal como antes sugerido por Tu e Ma (2005) sugerem que, o aumento da absorção radicular tenderá a equilibrar a entrada de aniões resultante da excessiva absorção de arsénio. De facto, potássio é um elemento fundamental na ativação de muitas enzimas para além do envolvimento no balanço iónico, osmose e abertura e fecho estomático (Raven *et al.*, 2005).

Acresce que Rahimi *et al.* (2013) observaram que a aplicação de fertilizantes contendo fosfato e potássio podem reduzir a concentração de arsénio nas partes edíveis a *Ocimum basilicum* L. e reduzir a toxicidade deste elemento. Observaram ainda estes autores que teores mais baixos de fosfato e potássio no solo aumentavam a absorção do arsénio, enquanto teores elevados a reduziam, provavelmente devido a interação entre o fósforo e o arsénio durante o mecanismo de absorção.

Ao estudarem os efeitos conjugados da salinidade e do arsénio na *Nasturtium officinale* (planta aquática de crescimento rápido), Ebrahimi *et al.* (2016) também verificaram que crescentes concentrações de arsénio (sob a forma de arsenato de sódio) diminuía significativamente a absorção de potássio, mesmo na ausência de salinidade. De facto, a concentração de potássio foi de 1,90 % nas plantas tratadas com 5 mg L<sup>-1</sup> de arsénio, enquanto que com concentrações de arsénio cinco vezes superiores se obteve apenas 1,65 %. Teores de potássio oscilando em torno de 1,55 % foram determinados utilizando a concentração mais elevada - 160 mg L<sup>-1</sup> de arsénio. O respetivo controlo (sem arsénio) para salinidade zero foi de 2,08 %.

Colateralmente, Kumar *et al.* (2015) ao, estudarem os efeitos do arsénio (sob a forma de arsenato de sódio) na distribuição de macronutrientes nas raízes e parte aérea de *Wrightia arborea*, verificaram que a acumulação dos macronutrientes (Ca, K, Mg, P, e S) é diferenciada, variando em função da exposição ao arsénio. Assim, observou-se que as concentrações de

arsênio (0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mM) induziram um aumento significativo do teor de potássio nas raízes, não afetando contudo, a concentração na parte aérea.

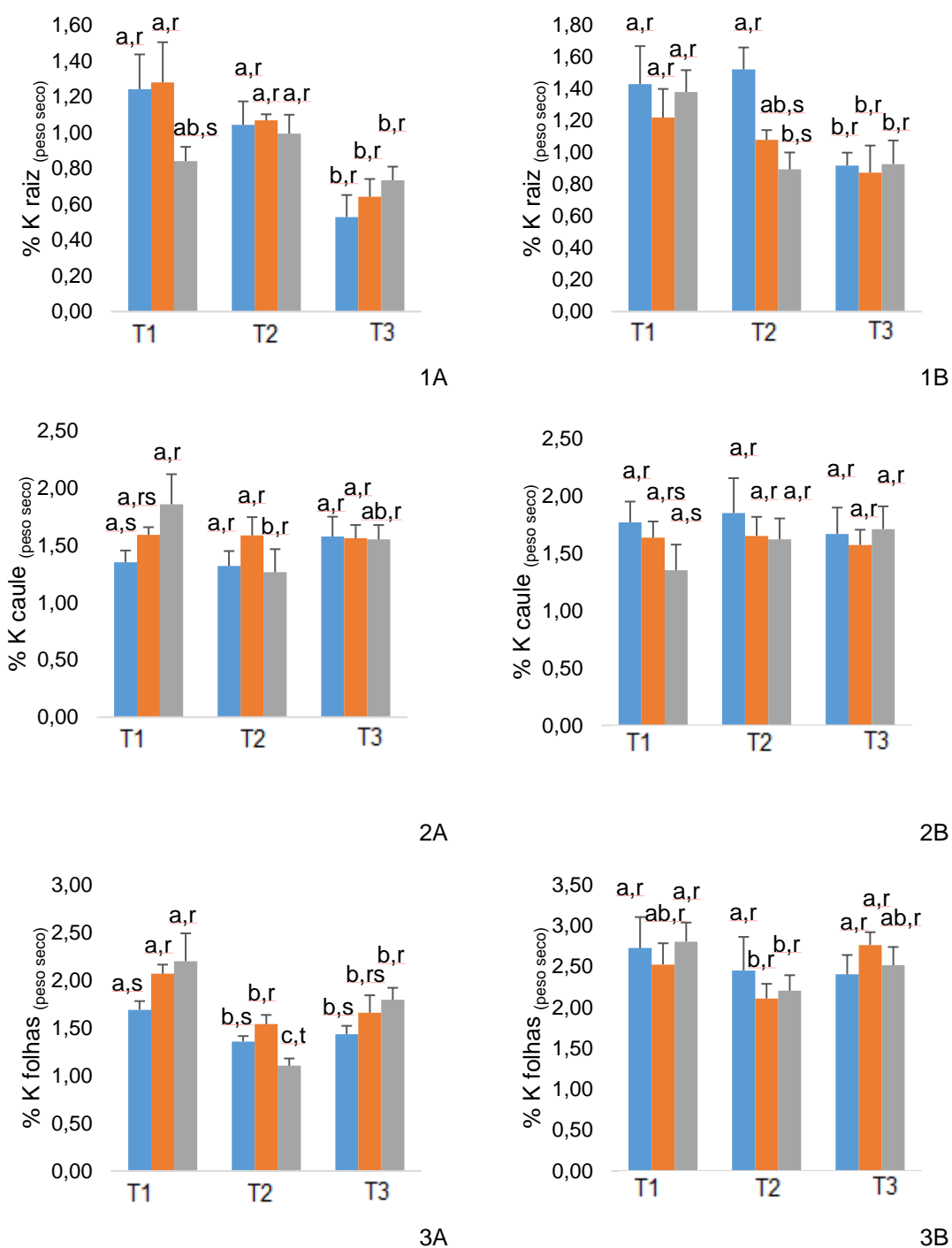


Figura 4.14 - Teor médio de potássio na raiz (1), no caule (2) e nas folhas (3), ( $\pm$  Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

#### 4.2.5.3. Zinco

Os teores mais elevados de zinco foram observados na estrutura radicular de ambas as espécies. Ao longo do período experimental, a nível radicular, destacaram-se variações significativas nos teores do zinco, que poderão decorrer da alteração induzida pelas concentrações crescentes de arsénio no solo. Em T2, as plantas do controlo continham 1,4 e 3,4 vezes mais zinco que as plantas do tratamento 100 e 200, respetivamente, enquanto em T3, apresentavam 1,2 e 1,5 vezes mais zinco que as plantas do tratamento 100 e 200, respetivamente (Figura 4.15 – 1A). Relativamente à *E. nitens*, apesar dos teores mais elevados também ocorrerem nas raízes, não parece subsistir uma correlação com a acumulação de arsénio. Os teores de zinco, apesar de ao longo do período experimental não terem variado de forma significativa (exceto no controlo entre T1 e T2), apresentaram um aparente decréscimo. Por oposição, se no momento T1 e T3 o controlo das raízes de *E. nitens* apresentaram teores de zinco superiores aos tratamentos 100 e 200, em T2, no tratamento 100, constatou-se o oposto relativamente ao controlo. Aponte-se ainda que em T3, as concentrações de zinco das raízes das plantas controlo continham 1,2 e 1,4 vezes mais zinco face às plantas do tratamento 100 e 200, respetivamente (Figura 4.15 – 1B).

Realce-se que os teores encontrados nas raízes da *E. globulus* (plantas tratadas ou não) são claramente superiores aos verificados na *E. nitens*. Na *E. globulus* os teores mínimos e máximos do tratamento 100 e 200 variaram entre 89,7 e 167  $\mu\text{g g}^{-1}$  e entre 69,6 e 121  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente. Na *E. nitens*, os teores mínimos e máximos nas plantas do tratamento 100 e 200 variaram entre 52,9 e 77,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  e entre 43,7 e 61,5  $\mu\text{g g}^{-1}$  respetivamente. Neste enquadramento aponte-se que as concentrações de zinco são em qualquer dos casos, superiores à concentração considerada adequada para tecidos vegetais (as quais, de acordo com Raven *et al.*, 2005, devem oscilar em torno de 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

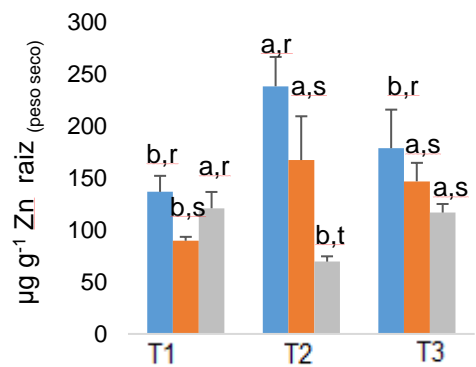
Na *E. globulus*, os teores mais baixos de zinco foram observados no tratamento 200 (9,9  $\mu\text{g g}^{-1}$  em T1, para 11,3  $\mu\text{g g}^{-1}$  em T3). Nas plantas controlo, e tratamento 100, as variações detetadas no mesmo período foram as seguintes: de 23,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  para 26,0  $\mu\text{g g}^{-1}$  e de 20,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  para 16,8  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente (Figura 4.15 – 2A). Na *E. nitens* os teores de zinco diminuíram entre T1 e T3 (Figura 4.15 – 2B).

A acumulação de zinco nas folhas da *E. globulus*, do tratamento 200, apresentou, de forma consistente, sempre os teores mais baixos, enquanto as concentrações nas plantas controlo e tratamento 100 não foram significativamente diferentes. As concentrações mais elevadas foram detetadas nas plantas controlo, com teores variando entre 28,3 e 43,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ , enquanto as plantas do tratamento 100 apresentavam variações entre 29,6 e 35,7  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Figura 4.15 – 3A). Na *E. nitens*, os teores mais elevados foram quantificados nas folhas do controlo com concentrações variando entre 52,8  $\mu\text{g g}^{-1}$  (T1) e 38,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  (T3) (Figura 4.15 – 3B).

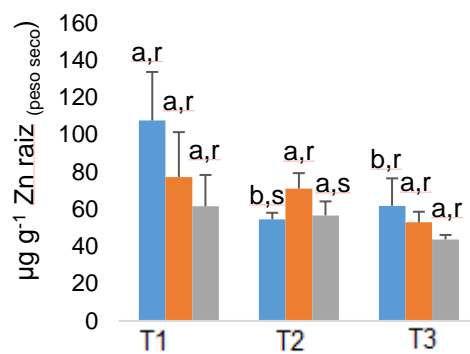
Freitas *et al.* (2004) verificaram que as folhas de *Eucalyptus camaldulensis* e da *E. globulus*, vivendo em solos contaminados por arsénio, em redor da mina de S. Domingos acumularam 80



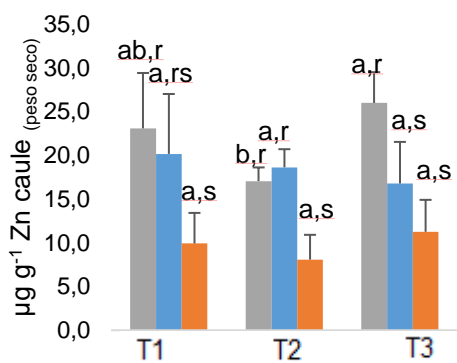
e  $25,5 \mu\text{g g}^{-1}$  de zinco, respetivamente, para correspondentes concentrações de arsénio foliar de  $0,6$  e  $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ . Evidenciou-se assim que, para além das diferenças interespecíficas relativamente à acumulação desses elementos, poderão ter prevalecido diferentes mecanismos de tolerância. O valor de  $25,5 \mu\text{g g}^{-1}$  de zinco está próximo dos valores médios (T1 + T2 + T3), que foram  $33,0$  e  $22,7 \mu\text{g g}^{-1}$  de zinco, para a *E. globulus*, nos tratamentos 100 e 200, respetivamente. Também a média das médias na *E. nitens* foi de  $31,1$  e  $28,8 \mu\text{g g}^{-1}$  de zinco, para as plantas do tratamento 100 e 200, respetivamente. Destaque-se ainda que a *Eucalyptus camaldulensis* e a *E. globulus* viviam em solos com teores de arsénio total de  $391$  e  $479 \mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente (Freitas *et al.*, 2004), enquanto no nosso estudo, as concentrações máximas no solo corresponderam a  $36,5 - 46,5 \mu\text{g g}^{-1}$  e os valores máximos nas raízes foram observados no tratamento 200, da *E. globulus* em T3 -  $9,68 \text{ mg}$  de arsénio e na *E. nitens* em T2 -  $7,53 \text{ mg}$  de arsénio. Acresce ainda que se reconhece que o arsénio interfere com o balanço de nutrientes de algumas espécies, nomeadamente no arroz (Williams *et al.*, 2009) e na aveia (Shaibur *et al.*, 2013). No caso do arroz, o arsénio provocou reduções, quer de produção, quer nos teores de selénio, zinco e níquel do grão, com reflexos na qualidade nutricional, sendo mais acentuadas quanto maiores as concentrações de arsénio observadas.



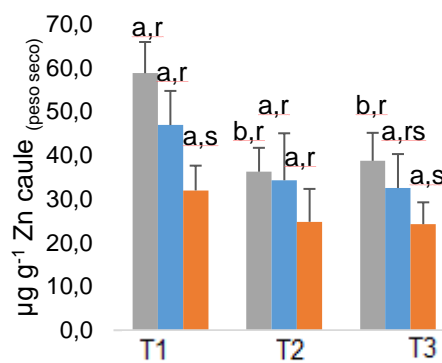
1A



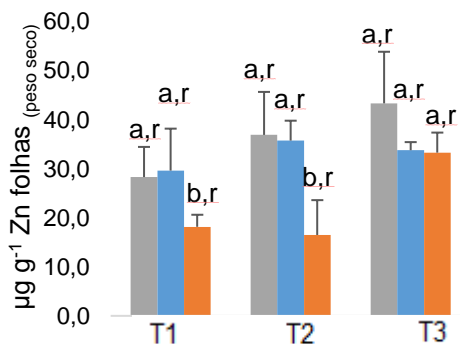
1B



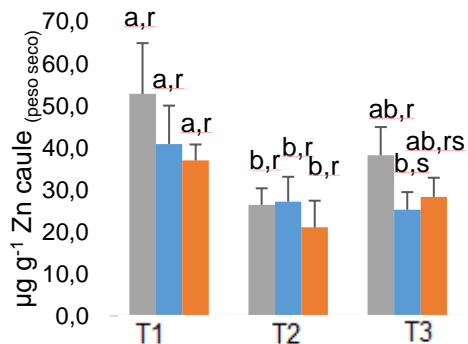
2A



2B



3A



3B

Figura 4.15 - Teor médio de zinco na raiz (1), no caule (2) e nas folhas (3), ( $\pm$  Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do ensaio do período experimental.

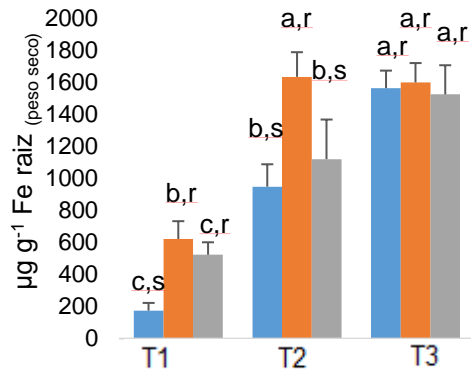
Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

#### 4.2.5.4. Ferro

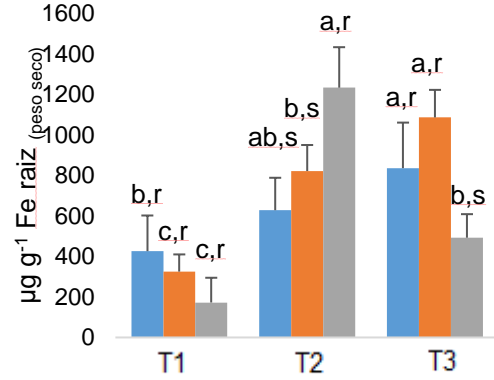
Na *E. globulus*, a acumulação de ferro nas raízes, aumentou significativamente ao longo do período experimental nos diferentes tratamentos, com valores finais situados entre 1500 - 1600  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Saliente-se que, face ao controlo, em T1 as plantas do tratamento 100 e 200 continham 3,6 e 3,0 vezes mais ferro, respetivamente; em T2 para 1,7 e 1,2 (Figura 4.16 - 1A). Na *E. nitens* observou-se igualmente um aumento ao longo do período experimental para todos os tratamentos (exceto no tratamento 200, entre T2 e T3) (Figura 4.16 - 1B). As concentrações de ferro são, em qualquer dos casos, muito superiores à concentração considerada adequada para tecidos vegetais (assumindo o peso seco como referencial) por Raven *et al.* (2005) que reporta 100  $\mu\text{g g}^{-1}$ . A nível radicular, a acumulação de ferro, como resposta à toxicidade do arsénio, foi evidenciada por Shaibur *et al.* (2013), que demonstrou que as raízes de aveia (*Hordeum vulgare*) acumulavam 262,6  $\mu\text{g g}^{-1}$  de ferro após tratamento com 10  $\mu\text{M}$ , enquanto as plantas sem arsénio continham apenas 24,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Inversamente, as concentrações na parte aérea eram superiores nas plantas controlo, por comparação com as plantas tratadas (63,8  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 26,3  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respetivamente).

No caule da *E. globulus*, no controlo, verificou-se um aumento ao longo do tempo experimental. Nas plantas do tratamento 100 e 200 o ferro aumentou em T2 e diminuiu em T3 (Figura 4.16 - 2A). Na *E. nitens*, o teor de ferro no controlo diminuiu, após T1, apresentando valores muito próximos em T2 e T3. Para os demais tratamentos, observou-se um aumento do ferro em T2 e uma descida em T3. De salientar que em T3 a concentração de ferro em todos os grupos é muito aproximada, ainda que apresentando diferenças significativas (Figura 4.16 - 2B).

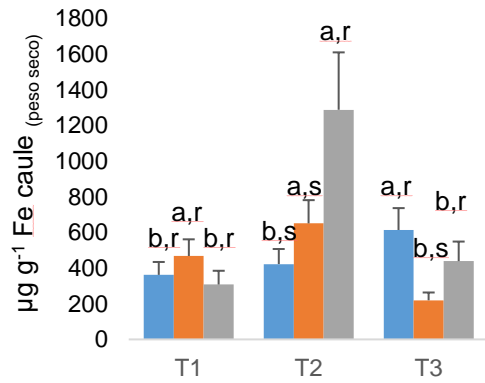
Nas folhas da *E. globulus*, o tratamento 200 apresentou quase sempre os teores mais baixos (exceção verificada em T2), enquanto no controlo se verificaram os níveis mais elevados em T1 e T3. Em todos os casos, notou-se um aumento da concentração ao longo do tempo (Figura 4.16 - 3A). Na *E. nitens*, as concentrações de ferro aumentaram entre o início e o fim do período experimental (tratamentos T1 e T3), ocorrendo o inverso para as plantas controlo (Figura 4.16 - 3B). De qualquer modo, os valores foram em geral inferiores aos observados para *E. globulus*.



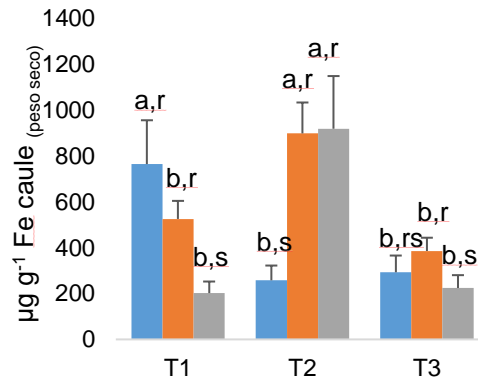
1A



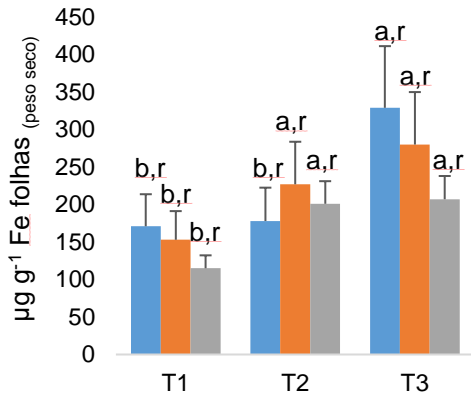
2B



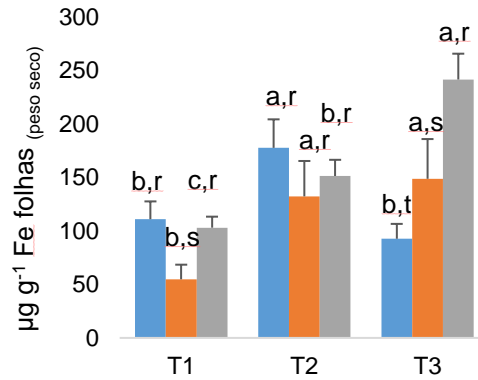
2A



2B



3A



3B

Figura 4.16 - Teor médio de ferro nas raízes, (1) ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %) na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental. Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

#### 4.2.6. Desenvolvimento vegetativo

O crescimento apical, verificado ao longo do tempo, e nos diferentes tratamentos, não apresentou variações significativas na *E. globulus* (Figura 4.17 - A1). No entanto, na *E. nitens* verificou-se um crescimento apical significativo entre T1 e T2, ainda que não se tenham detetado diferenças significativas entre tratamentos em cada intervalo de tempo (Figura 4.17 - B1).

Tal como verificado para o índice de crescimento apical na *E. globulus*, também o peso seco total variou de forma similar, verificando-se apenas nas plantas de controlo um aumento significativo em T3 (comparativamente aos períodos anteriores). Neste caso, também não ocorreram variações significativas nos diferentes tratamentos em cada intervalo de tempo (Figura 4.17 - A2). No caso da *E. nitens* registaram-se diferenças ao longo do tempo e entre tratamentos. Os tratamentos 100 e 200 apresentaram valores significativamente superiores em T2 e T3 (face a T1). Constatou-se ainda que, em T1, o peso seco no tratamento 100 foi significativamente superior face ao controlo (Figura 4.17 - B2).

Equacionando a razão entre os pesos secos da raiz e da parte aérea das plantas, na *E. globulus* verificou-se uma diminuição significativa dos valores ao longo do tempo, para todos os tratamentos. Não se registaram diferenças significativas entre os tratamentos de ambas as espécies, o que sugere que o arsénio não terá limitado o desenvolvimento da parte aérea (Figura 4.17 - A3, B3). Note-se contudo que o confinamento espacial das raízes nos vasos poderá ter condicionado a absorção de água e nutrientes pelas plantas.

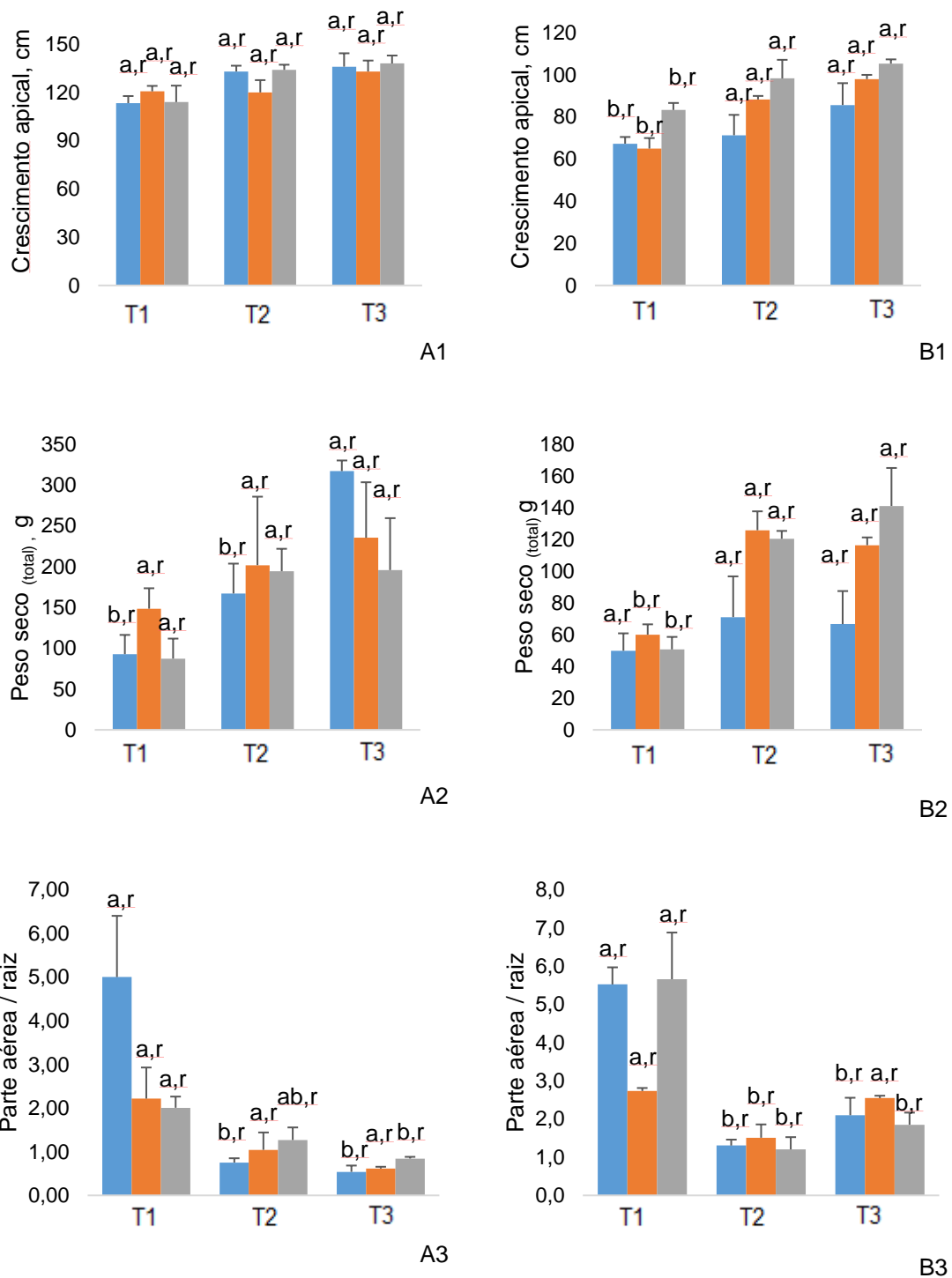


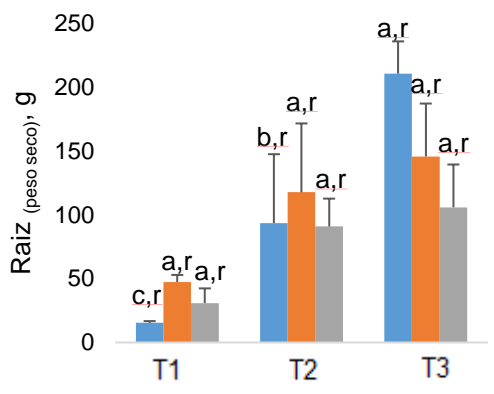
Figura 4.17 – Crescimento apical médio na parte aérea (1), peso seco total (2), razão entre o peso seco da parte aérea e da raiz (3), ( $\pm$  Erro Padrão; *p-value*, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: 0 mg de As (Controlo), 100 mg de As, 200 mg de As.

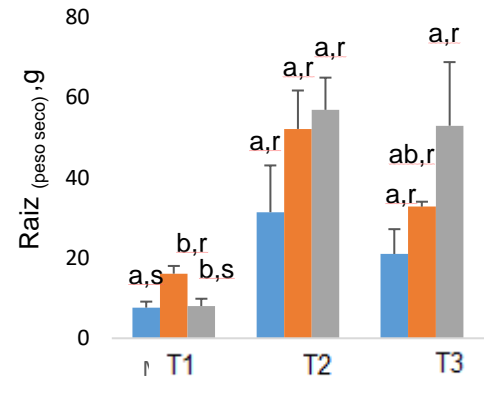
Entre T1 e T3, o peso seco da raiz da *E. globulus* aumentou significativamente no controle, contudo nos restantes tratamentos não se detetaram alterações significativas ao longo do período experimental. Esta tendência também persistiu entre os diferentes tratamentos em cada período experimental (Figura 4.18 - A1). Um comportamento diferente, foi detetado ao longo do tempo na *E. nitens* (tendo-se detetados valores mínimos no controle em T1) (Figura 4.18 - B2). Considerando que a biomassa radicular é a consequência de um bom desenvolvimento na parte aérea (Coelho, 1999), a ausência de um efeito induzido, diretamente ou indiretamente na *E. nitens*, pelos diferentes teores de arsénio em T2 e T3, sugere ainda uma ausência de toxicidade.

Na *E. globulus*, o peso seco do caule não variou significativamente, quer ao longo do tempo, quer entre tratamentos (Figura 4.18 - A2). No entanto, o peso seco do caule da *E. nitens*, nos tratamentos 100 e 200, aumentou significativamente entre T1 e T3. Note-se ainda que na *E. nitens* não ocorreram diferenças entre tratamentos no peso seco dos caules (Figura 4.18 - B2).

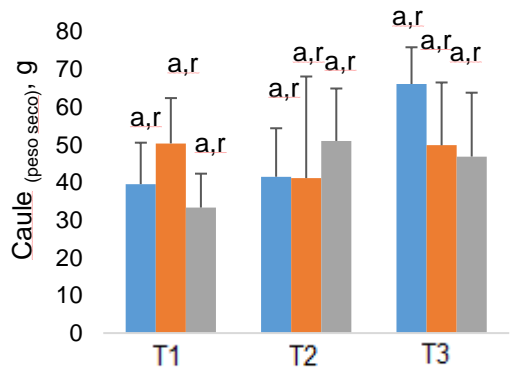
A nível foliar, na *E. globulus*, não se quantificaram variações significativas entre o respetivo peso seco, ao longo do período de ensaio, e também entre os diferentes grupos de tratamentos (Figura 4.18 - A3). No entanto, na *E. nitens*, o peso seco das folhas no tratamento 100, foi significativamente menor em T1, face aos demais períodos experimentais. Em T3, entre os tratamentos, as plantas controle apresentaram menor peso seco foliar (Figura 4.18 - B3). Considerando o peso seco dos diferentes órgãos e, paralelamente, o respetivo desenvolvimento fenológico, parece evidenciar-se a ausência de um efeito negativo promovido pelo arsénio.



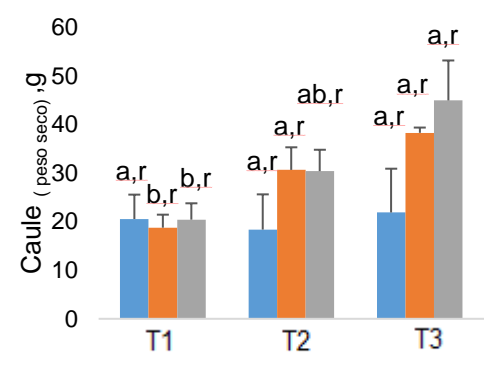
A1



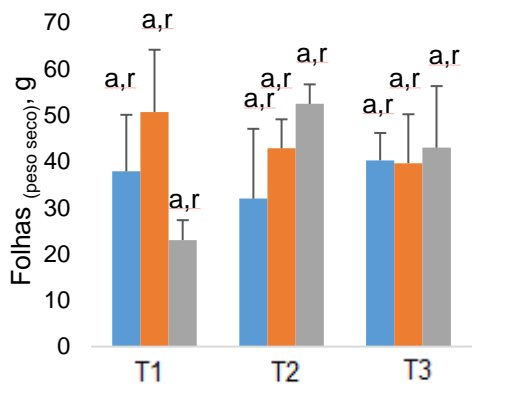
B1



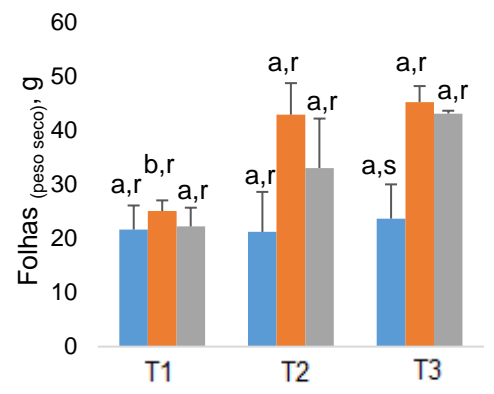
A2



B2



A3



B3

Figura 4.18 - Pesos secos da raiz (1), caule (2) e foliar (3), ( $\pm$  Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental. Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.



Considera-se que, quanto maior a razão foliar relativa (LWR), maior é o investimento biomássico que a planta faz na parte aérea. Neste contexto, nas plantas controle de ambas as espécies, após T1, verificou-se que o LWR decresceu, de forma significativa. Porém, em T3, no controle da *E. globulus*, o LWR foi menor face aos restantes tratamentos de cada período experimental (Figura 4.19 - A1). Paralelamente, na *E. nitens* não se detetaram diferenças significativas entre os tratamentos de cada período experimental (Figura 4.19 - A2).

Nas duas espécies, o número de folhas não variou de forma significativa ao longo do período de ensaio, ou entre os diferentes tratamentos (Figura 4.19 – B1, B2). Aponte-se contudo que no género *Eucalyptus* subsistem diferentes ecótipos. Este efeito foi visualizado por King *et al.* (2008), que descreveram diferentes comportamentos em quatro espécies do táxon *Eucalyptus* de uma zona mineira na Austrália, (assim como diferenças no tamanho e variações no número de folhas), tendo indicado que a espécie de menor porte apresentou o maior número de folhas.

Na *E. globulus* verificou-se ainda que o diâmetro do caule também não variou, de forma significativa, ao longo do período de ensaio, ou entre os diferentes tratamentos (Figura 4.19 - A3). No entanto, na *E. nitens*, em T2, relativamente a T1 no tratamento 100, ocorreu um aumento significativo no diâmetro do caule. Aponte-se ainda que nesta espécie não subsistiram diferenças entre os tratamentos de cada período experimental (Figura 4.19 - B3).

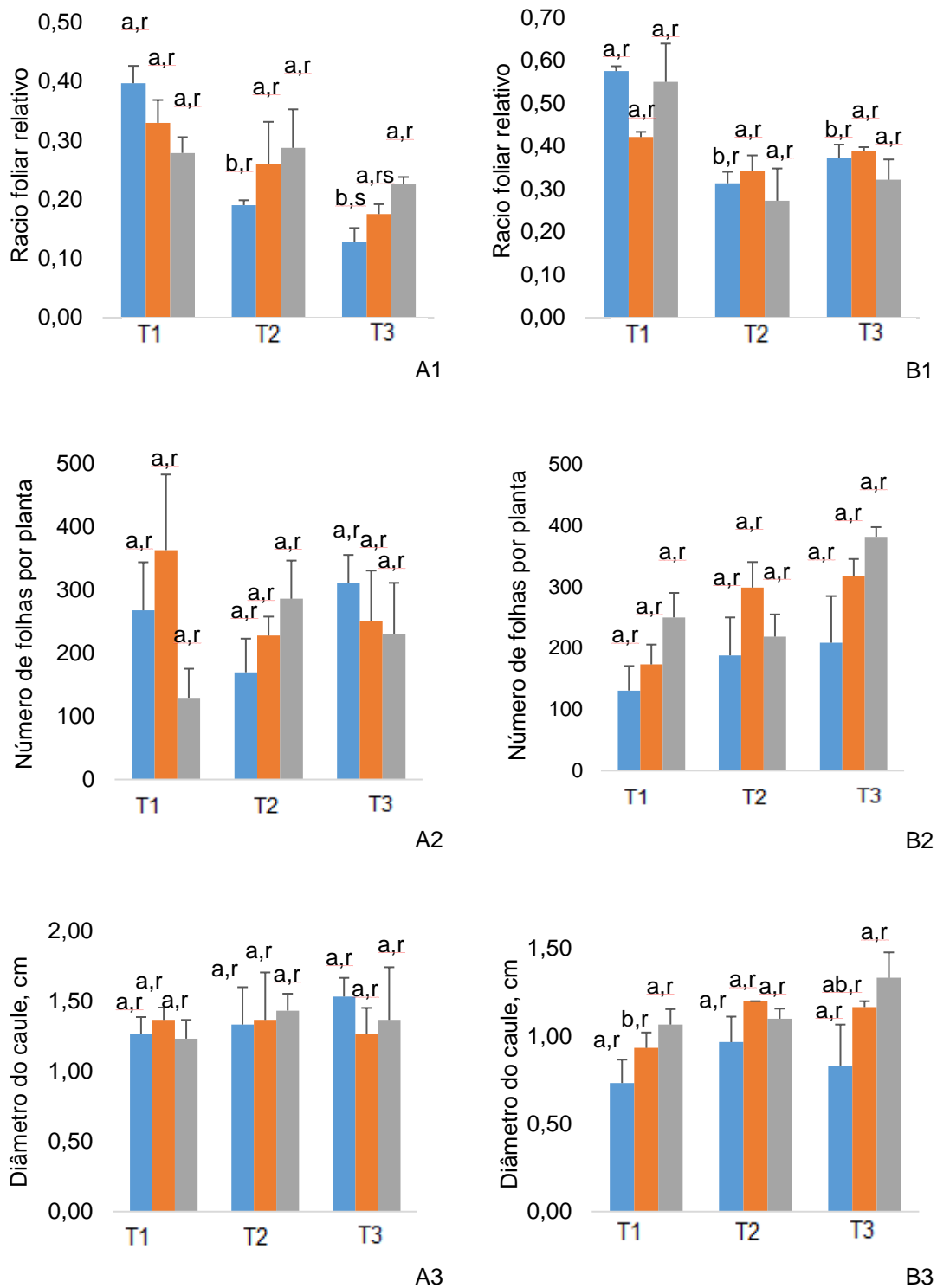


Figura 4.19 – Racio foliar relativo - LWR (1), número de folhas por planta (2) e diâmetro do caule (3), ( $\pm$  Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: 0 mg de As (Controlo), 100 mg de As, 200 mg de As.

Na *E. globulus*, a área foliar diminuiu, de forma significativa, de T1 para T3, eventualmente implicando quedas no potencial hídrico, assim como acréscimo na temperatura média do ecótopo (decorrente da sazonalidade a que a generalidade dos tratamentos estiveram submetidos) (Wimmer *et al.*, 2002). Em T2 e T3, equacionando a diferença na área foliar dos diferentes tratamentos, constatou-se que no controlo subsistiu uma área significativamente menor, face ao tratamento 100 (em T2). Paralelamente, em T3, no tratamento 200, ocorreu uma área foliar significativamente superior, relativamente aos restantes tratamentos (Figura 4.20 - A1).

Na *E. nitens*, em T1, registou-se uma diferença significativa nos tratamentos 100 e 200 face ao controlo; em T2, ocorreu uma inversão de tendência ainda que aparentemente não significativa. De salientar a diminuição significativa dos tratamentos 100 e 200, entre T1 e T2, e entre T1 e T3, respetivamente. (Figura 4.20 - B1). Sendo a área foliar um bom indicador da capacidade fotossintética (Asmis e Ferraz, 2001), estes efeitos parecem sugerir para uma interferência do arsénio no desenvolvimento foliar da *E. nitens*.

Na *E. globulus*, a área foliar específica (SLA), que correlaciona a densidade da folha e a razão entre a área e o respetivo peso (Lambers e Poorter, 1992; Hunt, 2003), decresceu de forma significativa ao longo do período experimental. Os valores mínimos em T3, quando comparados com os valores obtidos em T1 e T2, poderão ainda decorrer de uma ação conjugada da temperatura e da disponibilidade hídrica. Ainda na *E. globulus*, os diferentes tratamentos revelaram variações que foram significativas em T2 (para o tratamento 100, face ao controlo) e em T3 (para o tratamento 200 que foi significativamente inferior) (Figura 4.20 - B1).

Na *E. nitens*, os valores do SLA decresceram ao longo do tempo, ainda que sejam apenas significativamente menores no controlo em T3. Aponte-se, contudo, que não se registaram diferenças significativas entre os tratamentos de cada um dos períodos experimentais (Figura 4.20 - B2).

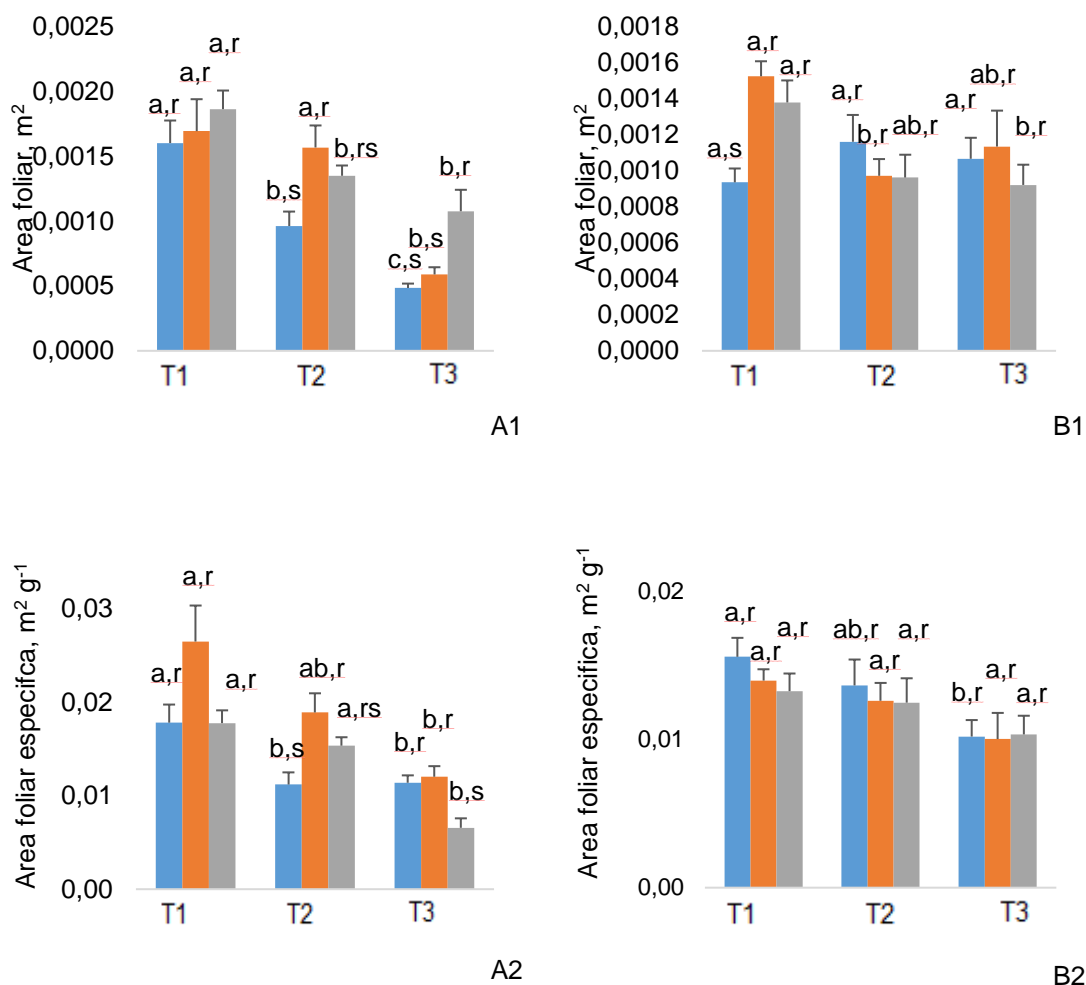


Figura 4.20 - Área foliar (1) e Área foliar específica - SLA (2), ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental. Tratamentos: 0 mg de As (Controlo), 100 mg de As, 200 mg de As.

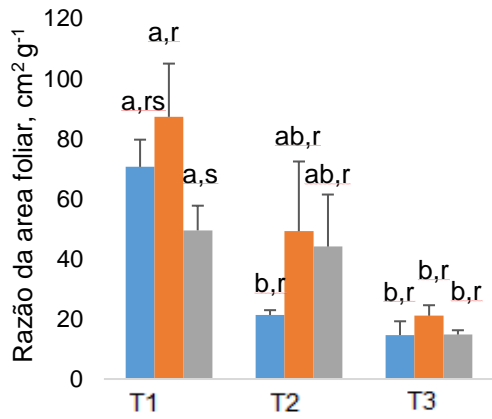
Nas duas espécies, o valor médio da razão da área foliar (LAR) diminuiu de forma significativa em T3 (Figura 4.21 - A1 e B1). Na *E. globulus*, em T1, quantificaram-se ainda variações significativas entre os tratamentos 100 e 200. Ainda nesta espécie, no controlo e ao longo do tempo (T3), houve um aumento considerável da taxa líquida de assimilação (NAR), porém, nos tratamentos 100 e 200, em T3, o valor obtido ficou estável, ou ocorreu uma diminuição substancial (sendo o valor 0,002), respetivamente. Estas diferenças estiveram associadas a um investimento significativo das plantas controlo na biomassa da raiz, e a uma manutenção do peso seco no tratamento 200 (Figura 4.18 - A1).

Na *E. nitens*, em T2 e T3, as diferenças entre tratamentos foram substanciais (Figura 4.21 - B2). Como adiante ser verás, estes efeitos poderão ter decorrido de uma associação próxima com a performance fotossintética, tal como anteriormente apontado por Gonzalez-Meler *et al.* (2004), para espécies lenhosas. Nesta espécie, ocorreu um aumento considerável dos valores da NAR para o tratamento 100 e 200, em T2, seguindo-se uma descida em T3 (Figura 4.21 - B2). As plantas controlo, e do tratamento 100, apresentaram valores negativos. Estes valores, revelaram

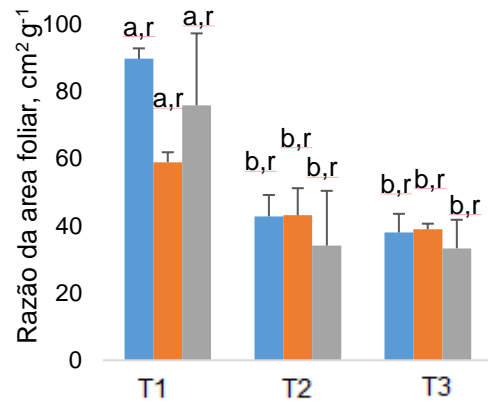
um ponto de compensação fisiológico negativo na *E. nitens*, tendo bloqueado efetivamente o respetivo desenvolvimento (Figura 4.21 - B2).

Na *E. globulus*, ao longo do período experimental, as plantas controlo mantiveram sem variações apreciáveis a sua taxa de crescimento relativo (RGR), tendo o tratamento 100 diminuído de forma acentuada os respetivos valores. O aumento da RGR em T2 para o tratamento 200, não se manteve em T3, tendo diminuído para  $1.0 \times 10^{-4}$  (Figura 4.21 - A3).

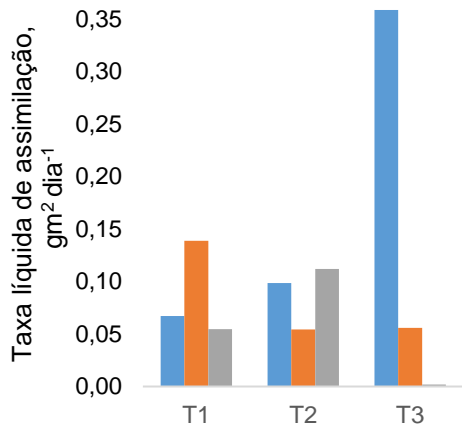
Na *E. nitens*, o controlo e o tratamento 100 apresentaram uma RGR positiva entre T1 e T2, no entanto em T3 apresentaram uma RGR negativa. O tratamento 200, apresentou um crescimento relativo em T2 face a T1, no entanto em T3 apresentou um decréscimo muito pronunciado da RGR (Figura 4.21 - B3). Note-se que os valores da RGR negativos apontam para condicionantes edafoclimáticas na *E. nitens*. Neste enquadramento, como anteriormente apontado, esta espécie revela características particulares e pode ser afetada por um aumento da temperatura e do défice hídrico.



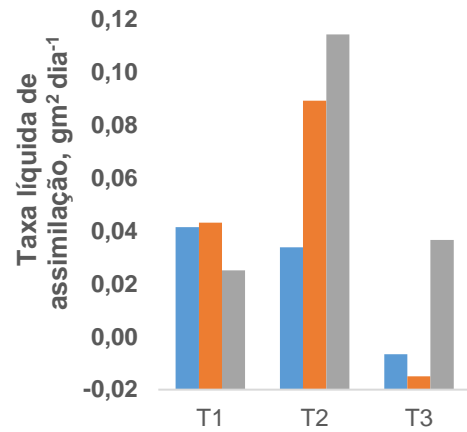
A1



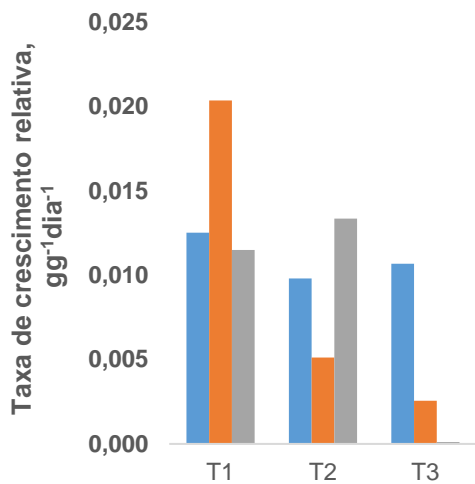
B1



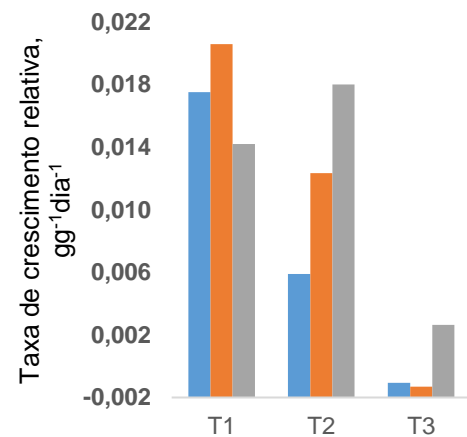
A2



B2



A3



B3

Figura 4.21 - Razão da área foliar - LAR (1), ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %), Taxa líquida de assimilação - NAR (2) e Taxa de crescimento relativo - RGR (3), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

#### 4.2.7. Acumulação de pigmentos fotossintéticos e conversão bioenergética

##### 4.2.7.1. Parametrização cromática

Equacionando os parâmetros de cor (Tabela 4.13), verificou-se que a coordenada  $L^*$ , que representa a luminosidade, nas folhas da *E. globulus* aumentou em todos os tratamentos entre T1 e T3 (ainda que significativamente apenas no controlo). O parâmetro  $L^*$ , nas folhas de *E. nitens*, também aumentou significativamente entre T1 e T3.

Relativamente à coordenada  $a^*$ , que representa os tons de verde, nas duas espécies, verificaram-se valores mais baixos em T2 (significativos no tratamento 100), revelando assim, uma maior intensidade de verde.

Segundo Assis (2012), o incremento do “amarelo” decorre do aumento da degradação do teor em clorofilas  $a$  e  $b$  nas folhas. Considerando que a coordenada  $b^*$ , retrata o amarelo verificou-se, em T2, que as folhas do tratamento 200 de *E. globulus* apresentaram uma maior intensidade para o amarelo. Este parâmetro apresentou diferenças significativas, face aos outros tratamentos, e ao longo do tempo.

Na *E. nitens*, em T2, observou-se o aumento do significativo “do amarelo” nas folhas do tratamento 100. Em T3, as folhas do tratamento 200 revelaram uma diminuição mais pronunciada no teor da clorofila  $a$  e  $b$ . Este valor é significativamente mais elevado, comparativamente ao controlo e ao longo do tempo, parecendo indiciar uma afetação por parte do arsénio.

Tabela 4.13 - Parâmetros colorimétricos na 2ª folha mais jovem das ramificações mais desenvolvidas, a um metro do solo e com exposição a sudeste (coordenadas L\*, a\*, b\*, ± Erro Padrão; *p-value*, no intervalo de confiança de 95 %) na *E. globulus* e na *E. nitens* ao longo do período experimental.

	As (µg g <sup>-1</sup> )	T1		T2		T3	
<b>L*</b>							
<i>E. globulus</i>	0	47,8 ± 4,85	c,r	53,8 ± 1,33	b,r	62,0 ± 3,31	a,r
	100	47,6 ± 1,26	a,r	50,8 ± 5,70	a,r	52,3 ± 6,04	a,s
	200	48,2 ± 3,18	a,r	53,2 ± 2,04	a,r	52,3 ± 8,51	a,s
<i>E. nitens</i>	0	40,3 ± 2,75	c,r	49,4 ± 2,80	b,r	58,1 ± 3,37	a,r
	100	43,5 ± 2,54	b,s	52,1 ± 2,18	a,r	46,0 ± 8,38	ab,s
	200	43,2 ± 2,31	c,rs	50,9 ± 4,16	b,r	58,6 ± 4,07	a,r
<b>a*</b>							
<i>E. globulus</i>	0	-2,73 ± 2,16	a,r	-4,49 ± 0,54	a,rs	-3,43 ± 1,56	a,r
	100	-2,51 ± 0,90	a,r	-6,00 ± 2,41	b,s	-4,19 ± 1,65	ab,r
	200	-1,95 ± 2,20	a,r	-3,76 ± 1,96	a,r	-2,30 ± 1,72	a,r
<i>E. nitens</i>	0	-2,14 ± 0,51	b,r	-4,65 ± 0,33	c,s	-0,68 ± 0,84	a,r
	100	-2,09 ± 1,00	a,r	-5,69 ± 0,92	b,t	-1,12 ± 0,51	a,r
	200	-1,62 ± 0,23	a,r	-2,70 ± 0,49	a,r	-2,23 ± 2,37	a,r
<b>b*</b>							
<i>E. globulus</i>	0	32,4 ± 2,74	a,rs	32,0 ± 1,25	a,s	32,7 ± 1,15	a,r
	100	31,3 ± 1,43	a,s	32,4 ± 3,25	a,s	32,7 ± 0,80	a,r
	200	34,9 ± 3,54	ab,r	36,3 ± 0,79	a,r	33,2 ± 1,35	b,r
<i>E. nitens</i>	0	28,1 ± 3,04	b,s	31,5 ± 1,38	a,s	30,6 ± 0,93	a,s
	100	30,5 ± 1,99	b,r	36,5 ± 0,93	a,r	31,1 ± 4,98	b,rs
	200	32,0 ± 2,14	b,r	32,4 ± 0,71	b,s	34,3 ± 1,13	a,r

#### 4.2.7.2. O caso particular das clorofilas e carotenoides

Nas folhas da *E. globulus*, o teor da clorofila total variou de forma significativa ao longo do tempo e entre tratamentos (Figura 4.22 - A1). No tratamento 100 e 200 apresentou um incremento dos valores em T2, persistindo elevados e máximos em T3. Neste período, o teor de clorofila total no controlo registou o seu valor mínimo. Na *E. nitens*, em T2, em todos os tratamentos ocorreu um aumento significativo do teor em clorofila total. Contudo, também em todos os tratamentos, estes valores decresceram em T3 (Figura 4.22 - B1).

Na *E. globulus*, o teor de carotenoides aumentou em T2 para todos os tratamentos, tendo o tratamento 100 apresentando os teores mais elevados (Figura 4.22 - A2). O controlo registou o menor teor de carotenoides em T3. Na *E. nitens*, em T2, o teor em carotenoides atingiu o seu valor máximo para o controlo e tratamento 100, tendo decrescido em T3. Em T3, tal como ocorreu na *E. globulus*, o controlo registou os teores mais baixos de carotenoides (Figura 4.22 - B2), sendo possível visualizar a respetiva correlação com os parâmetros de cor e o teor em clorofilas. Em T2 os valores mais negativos de a\* (Tabela 4.13), estiveram associados ao acréscimo dos teores da clorofila (Figura 4.22 - A1 e B1). Em T2, na *E. nitens*, os valores mais elevados de b\*



(Tabela 4.13) terão envolvido o aumento do teor dos carotenoides em todos os tratamentos no mesmo período (Figura 4.22 - B2).

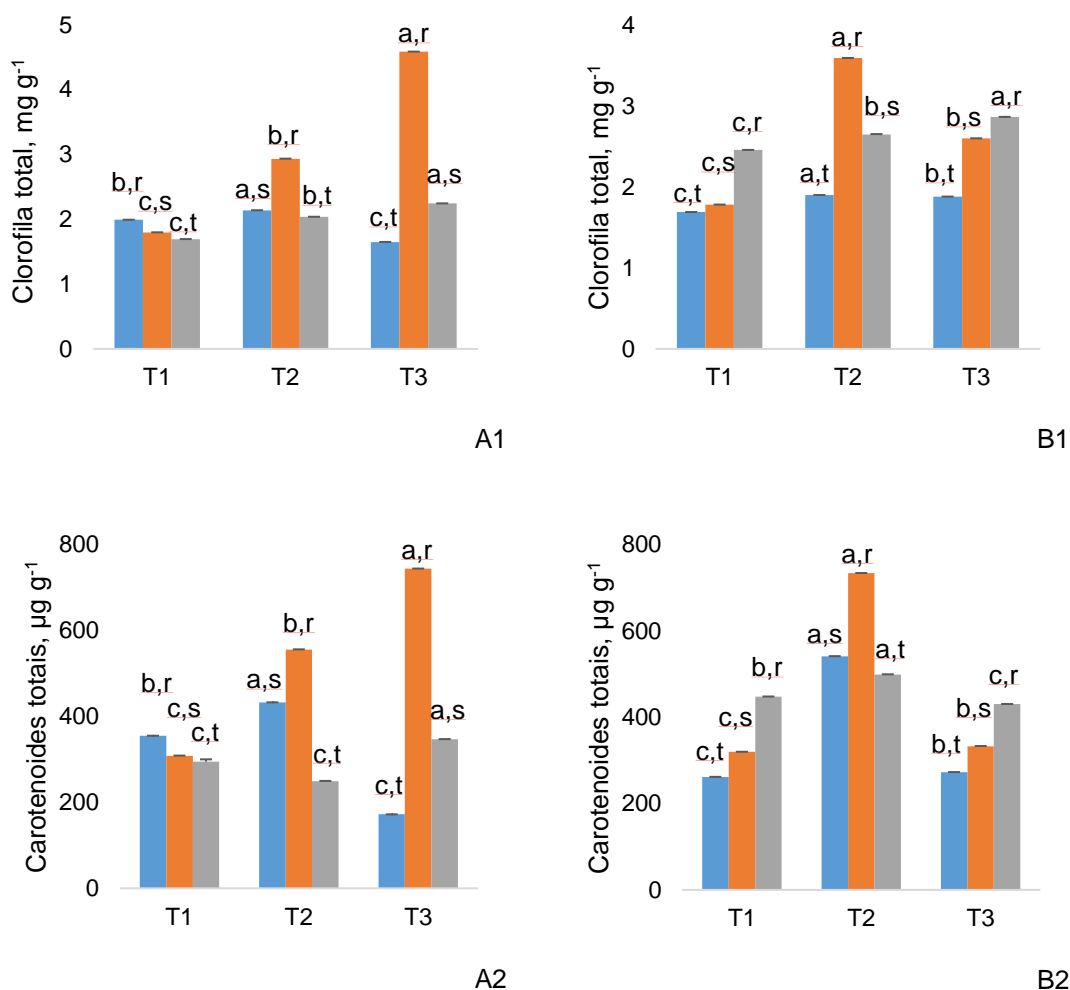


Figura 4.22 - Teores de clorofila total (1) e carotenoides totais (2) nas folhas, ( $\pm$  Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %) na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental. Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

#### 4.2.7.3. Fase fotoquímica e bioquímica da fotossíntese

Entre T1 e T2 a condutância estomática ( $g_s$ ), na *E. globulus*, diminuiu em todos os tratamentos, (ainda que, apenas no tratamento 200, de forma significativa). Em T3, estes valores voltaram a aumentar, contudo não foram significativamente diferentes de T1 (Figura 4.23 - A1). A diminuição da  $g_s$  poderá estar relacionada com o aumento da temperatura atmosférica que evoluiu progressivamente nesse período experimental e, conseqüentemente, com a modificação da *boundary layer* (Martin *et al.*, 1999). De facto, face a uma continuada perda de água por transpiração e evaporação, a planta tende a induzir o fecho estomático, atenuando assim a desidratação. Este efeito, que é comum nas plantas, também já foi identificado para o género

*Eucalyptus*. De facto, Vellini *et al.* (2008) caracterizaram a inibição estomática e a taxa de transpiração em eucaliptos, face a um stress hídrico. Relacionando a condutância estomática com o investimento da planta na sua área foliar, no nosso ensaio também se verificou que, apesar da diminuição da condutância estomática, os níveis de CO<sub>2</sub> ainda terão possibilitado um acréscimo na produção da biomassa, tal como também indicado por Costa e Silva *et al.* (2005). No entanto, na *E. nitens*, em T2 e T3, somente o tratamento 200 apresentou valores significativamente menores face a T1 (Figura 4.23 - B1). A exposição do tratamento 200 da *E. nitens* ao arsénio, em T2 e T3, poderá ter levado a uma limitação estomática e / ou mesofílica da fotossíntese (Araujo, 2011). De facto, alguns estudos (Ahsan *et al.*, 2010; Hoffmann e Schenk, 2011) demonstram que teores crescentes de arsénio provocam uma inibição progressiva da condutividade estomática, da concentração intercelular de CO<sub>2</sub> e da ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase.

Nas duas espécies de *Eucalyptus*, tal como seria expectável verificou-se que o comportamento da transpiração (Tr) foi muito semelhante ao da condutância estomática (Figura 4.23 – A2 e B2). Assim, estes dados sugerem que o aumento da temperatura terá levado a uma minimização da perda de água pelas plantas, envolvendo o fecho estomático, o que consequentemente determinou a redução da taxa transpiração (Whitehead e Beadle, 2004). Neste enquadramento, na *E. nitens*, também no tratamento 200, a limitação estomática terá implicado uma menor perda de água.

Nas duas espécies de *Eucalyptus*, a taxa de fotossíntese líquida (Pn) não variou de forma significativa, ao longo do tempo e entre os tratamentos (Figura 4.23 - A3 e B3). Neste contexto, Rapley *et al.* (2009), num estudo realizado com o género *Eucalyptus*, reportaram que a temperatura ótima para a fotossíntese deve oscilar entre os 17 – 23 °C, podendo obter-se taxas fotossintéticas variando entre 12 - 14 µmol CO<sub>2</sub> m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. No nosso estudo, estes valores foram inferiores na *E. globulus* e na *E. nitens* (em T1 e T2), tendo a interação com a condutância estomática contribuído para um efeito inibitório ainda que outros fatores bioquímicos e / ou fotoquímicos tenham também estado envolvidos.

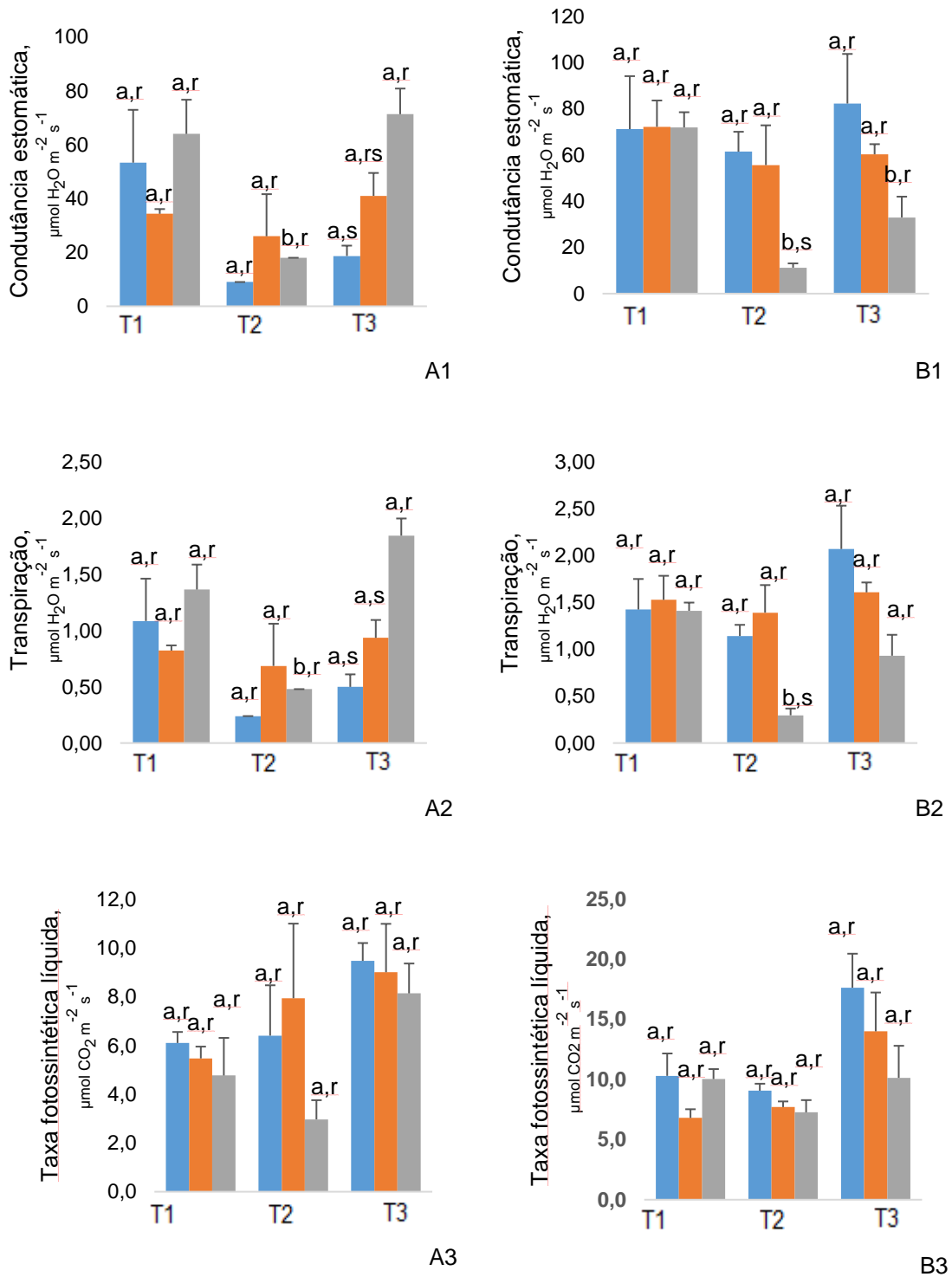


Figura 4.23 – Condutância estomática -  $g_s$  (1), Transpiração -  $Tr$  (2) e Taxa fotossintética líquida -  $P_n$  (3), ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

Na *E. globulus* e na *E. nitens*, a fluorescência basal ( $F_0$ ) apresentou valores máximos em T3 (Figura 4.24 - A1). Na *E. globulus*, o valor mínimo foi registrado em T2, no tratamento 200. Este valor, e todos os demais em T1, para todos os tratamentos, foram ainda significativamente inferiores (face a T3). Na *E. nitens*, de T1 para T3, os valores de  $F_0$  aumentaram significativamente em cada período. Note-se ainda que no tratamento 200, se detetou um valor mais elevado em T3, que foi significativamente superior face aos restantes tratamentos. O aumento de  $F_0$  está associado a stresses ambientais que causam alterações estruturais nas antenas dos pigmentos fotossintéticos do PS II. Estes stresses ambientais usualmente são reportados considerando carências hídricas ou toxicidades com metais pesados. Na *E. nitens*, em T3, o valor elevado do tratamento 200 (Figura 4.24 - A2) poderá estar associado ao aumento de arsénio nas folhas (Tabela 4.11). No entanto, o aumento significativo de  $F_0$ , detetado em T3, também se verificou nos restantes tratamentos e nas duas espécies, aspeto que poderá ter decorrido da interferência térmica neste processo (Araújo, 2011).

A eficiência quântica máxima ( $F_v/F_m$ ), revela a eficiência fotónica potencial do PSII, constituindo um indicador que pode expressar a sensibilidade da performance fotossintética a fatores de stress (Araújo e Deminicis, 2009). Nas plantas superiores, quando a relação entre a  $F_v/F_m$  varia entre 0,75 - 0,85, considera-se que não ocorre uma inibição dos centros de reação dos fotossistemas (Araújo e Deminicis, 2009). Colateralmente, a diminuição de  $F_v/F_m$  constitui um excelente indicador de efeito fotoinibitório quando as plantas estão submetidas a qualquer tipo de stress, indicando uma regulação fotoprotetora reversível, ou uma inativação irreversível, do PSII (Araújo e Deminicis, 2009). Neste enquadramento, constatou-se que na *E. globulus* não subsistem diferenças significativas ao longo do período experimental, ou entre tratamentos (Figura 4.24 - A2). No entanto, na *E. nitens*, em T3, verificaram-se diferenças significativas no tratamento 200 (Figura 4.24 - B2). Esta diferença consubstanciou-se com valores abaixo de 0,75, o que evidenciou a ocorrência de uma situação de *stress*, eventualmente alavancado pela contaminação com arsénio, sobre o PSII.

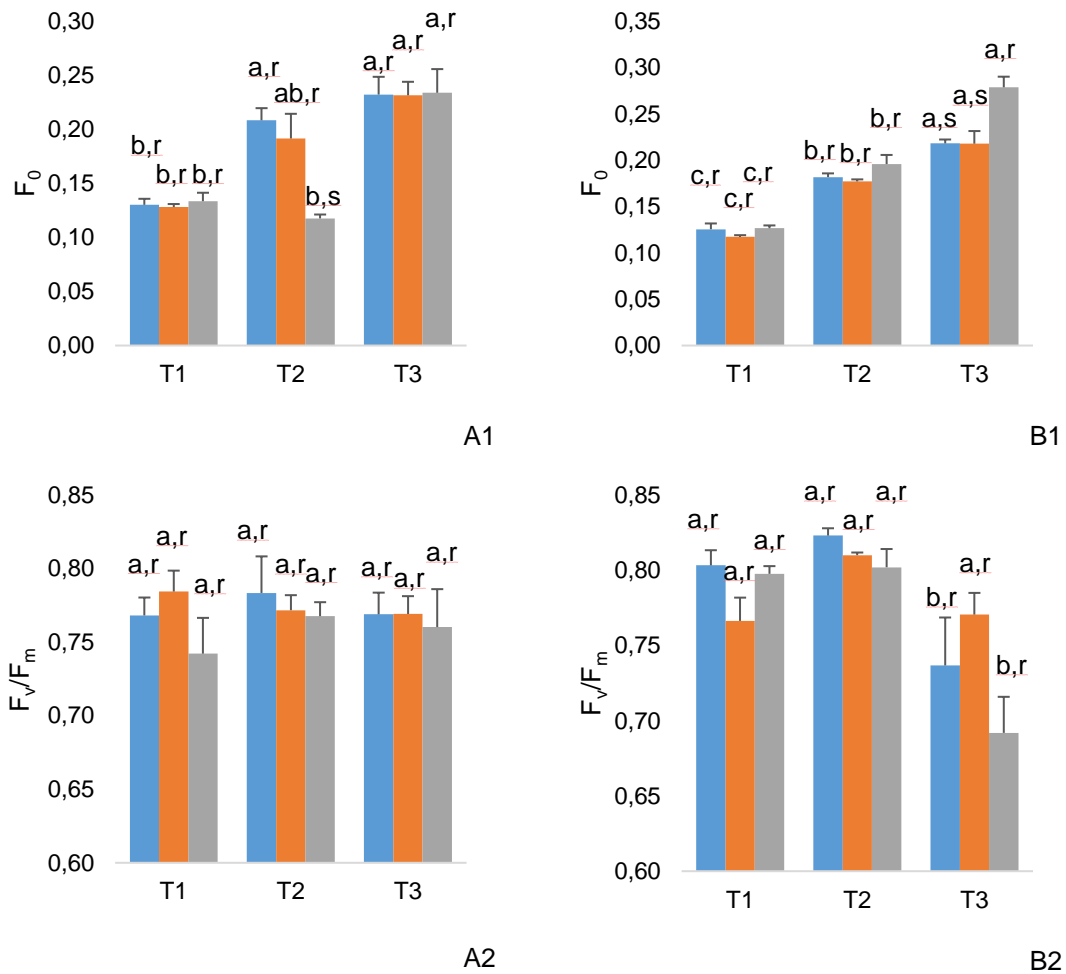


Figura 4.24 -  $F_0$  (1) e  $F_v/F_m$  (2), ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

Nas plantas superiores,  $\phi_e$  traduzem a energia fotónica recebida e transformada em energia química. Neste contexto, na *E. globulus* verificou-se que os valores de  $\phi_e$  são baixos (Figura 4.25 - A1), comparativamente aos obtidos em  $Y_{(NPQ)}$  (Figura 4.25 - A2) e  $Y_{(NO)}$  (Figura 4.25 - A3). Para este efeito poderá ter contribuído o crescimento das plantas em vaso a sua dependência da dotação de rega, não sendo ainda possível a respetiva expressão potencial da absorção radicular. De facto, este condicionamento poderá levar a limitações várias no crescimento e nas funções básicas associadas à obtenção de energia, constituindo uma possível ação fotoinibitória (Araújo e Deminics, 2009), que deve ser considerado.

Na *E. globulus*, no tratamento 100, em T2, existe um aumento significativo, comparativamente com os demais períodos. Para o tratamento 200, em T2 e T3, os valores são significativamente inferiores, face ao tratamento 100 e controlo, respetivamente. Aponte-se que, esta diferença significativa, em T2, do  $\phi_e$ , entre os tratamentos 100 e 200 se verifica em paralelo com diferenças também detetadas para a  $g_s$ ,  $Tr$ ,  $P_n$  e  $F_0$ . Neste enquadramento, tal, como sugerido por Wang *et al.* (2012), também parece evidenciar-se a ação do arsénio sobre o  $\phi_e$ .

O  $Y_{(NPQ)}$ , na *E. globulus*, que foi sempre superior ou igual a 0,50, constitui um referencial para a fotoproteção das membranas tilacoidais envolvendo o Ciclo das Xantófilas (Ramalho *et al.*, 2014). Este ciclo é regulado pelo gradiente de prótons da membrana do tilacóide, o qual decorre da intensidade fotónica, funcionando como mecanismo de fotoproteção dos fotossistema, mediante relaxação térmica. No entanto, na *E. globulus*, os valores mais baixos de  $Y_{(NPQ)}$ , foram registados em T1. Para o controlo e tratamento 200 foram significativamente mais baixos face aos demais períodos. Em T2, os valores do controlo, são significativamente mais elevados (face aos tratamentos com arsénio), no entanto, em T3 os valores do tratamento 200 são superiores aos do tratamento 100.

$Y_{(NO)}$  representa a energia da carga térmica dissipada, ou a fluorescência nas antenas do PSII (Ramalho *et al.*, 2014). Na *E. globulus*, em T1, verificaram-se valores mais elevados, face aos demais períodos experimentais (Figura 4.25 - A3). Este efeito terá constituído um constrangimento na utilização incidente da energia, que terá resultado numa maior ineficiência na conversão em energia fotoquímica e não fotoquímica. A mesma, previsivelmente, dissipou-se durante o funcionamento do PSII, tal como se visualizou pelo decréscimo de  $Y_{(NPQ)}$ , funcionando como protetor ou regulador do fotossistema (Rodrigues *et al.*, 2016). Note-se contudo que nos meses seguintes as plantas adaptaram-se, aumentando o  $Y_{(NPQ)}$ , situação que incrementou a proteção do aparelho fotossintético.

Na *E. nitens*, para o  $\phi_e$ , os tratamentos 100 e 200, revelaram um decréscimo dos seus valores ao longo do tempo. Esta tendência foi significativamente inferior face ao controlo em T3. Neste período, o tratamento 200 apresentou o seu valor mínimo para  $\phi_e$  e significativamente inferior aos demais períodos (Figura 4.25 - B1). A  $Y_{(NPQ)}$  foi mais elevada em T2 (e significativa face a T1, para todos os tratamentos) (Figura 4.25 - B2). No entanto, em T3 não revelaram diferenças significativas entre os tratamentos 100 e 200. Neste período, o tratamento 200 apresentou a  $Y_{(NPQ)}$  mais elevada, indicando uma maior taxa de dissipação térmica regulada da energia. Em T1, a  $Y_{(NO)}$ , foi elevada tal como ocorreu em *E. globulus* (Figura 4.25 - B3). De facto, não se verificaram diferenças significativas entre tratamentos e, conseqüentemente, nenhum efeito do arsénio sobre a  $Y_{(NO)}$ .

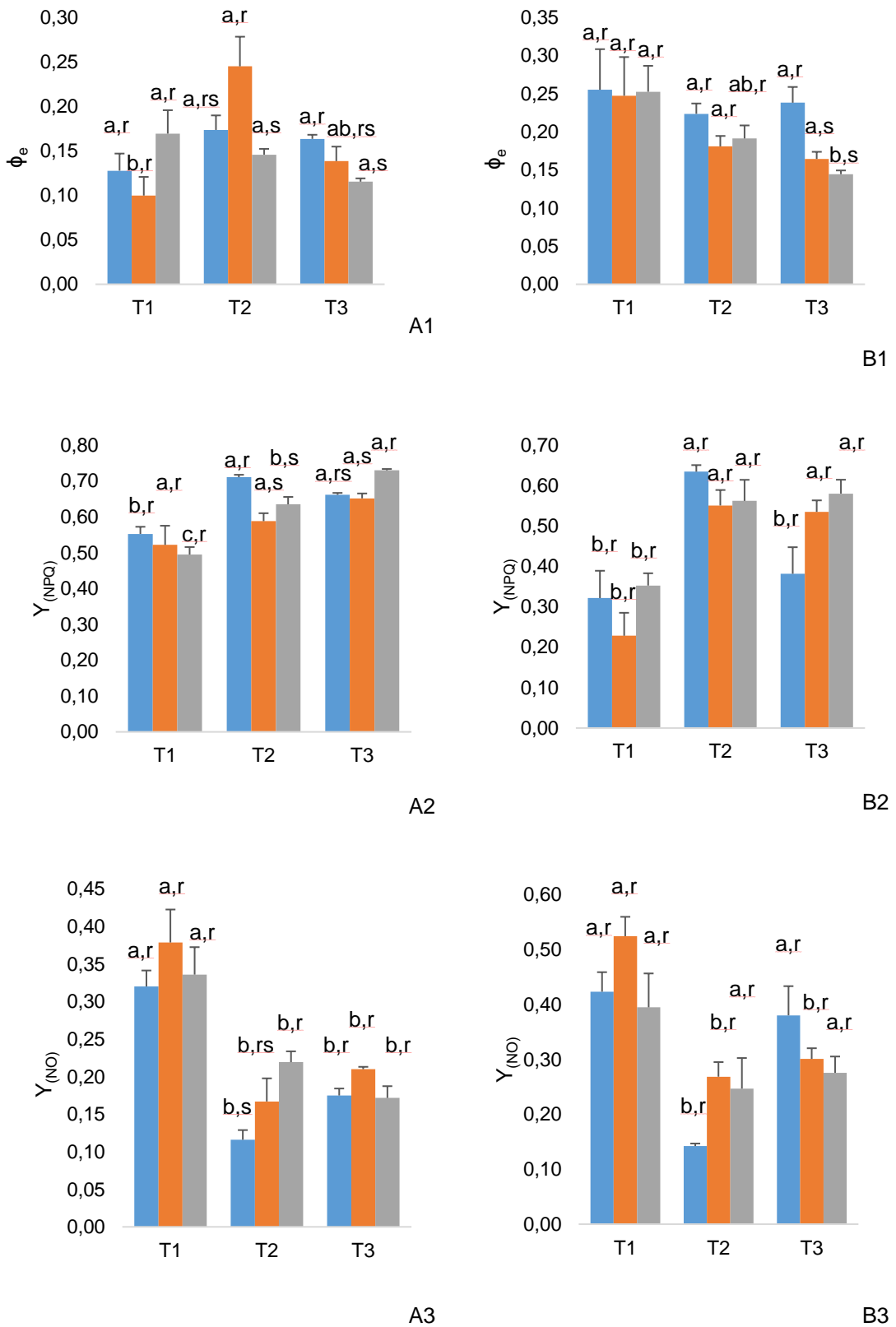


Figura 4.25 -  $\phi_e$ ,  $Y_{(NPQ)}$  e  $Y_{(NO)}$ , ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.  
 Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

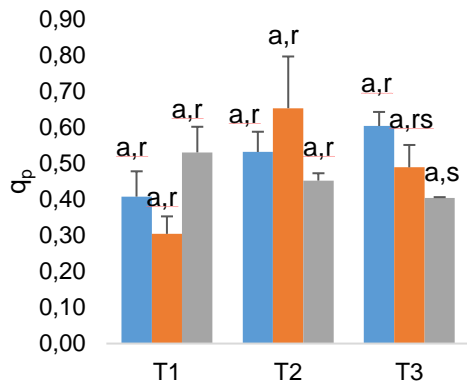
Embora, na *E. globulus*, os valores do *quenching* fotoquímico ( $q_p$ ), tenham apresentado variações ao longo do tempo, estes não foram significativos (Figura 4.26 - A1). Contudo em T3, o tratamento 200 apresentou valores significativamente inferiores aos do controlo. O mesmo comportamento, ao longo do tempo, ocorreu na *E. nitens*, não existindo diferenças significativas (Figura 4.26 - B1). No entanto, em T2, uma descida significativa da  $q_p$ , nos tratamentos 100 e 200 (face ao controlo), sugere um efeito consequente da ação do arsénio. Este comportamento, que no controlo persistiu em T3, apresentou uma maior dissipação fotoquímica comparativamente aos restantes tratamentos. Este efeito parece ainda indicar um maior número de centros reativos no PSII oxidados ou abertos no controlo (Moreno *et al.*, 2008).

Em T1, o NPQ apresenta valores que nalguns casos foram significativamente mais baixos para ambas as espécies (Figura 4.26 - A2 e B2). Contudo, o aumento registado em T2 poderá ter refletido o incremento da temperatura e o correspondente efeito na organização estrutural do PSII.

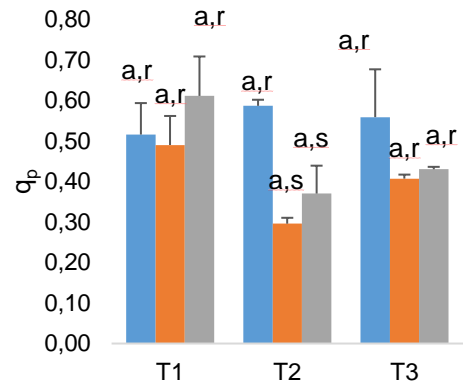
No tratamento 200 em T3, o aumento, embora não significativo, poderá eventualmente indicar a redução da eficiência energética dos centros de reação do PSII. Note-se que a tendência foi similar com os parâmetros  $F_v/F_m$  e  $\phi_e$ , tendo também aumentado  $F_0$ .

Relativamente a  $q_N$ , nas duas espécies (Figura 4.26 - A3 e B3), verificaram-se comportamentos similares aos da NPQ. Na *E. nitens*, a mesma tendência foi observada no tratamento 200 em T3 face ao controlo, situação que sugere que os centros de reação do PSII também foram afetados (Moreno *et al.*, 2008; Araujo e Deminiciis, 2009; Ramalho *et al.*, 2014), neste caso ainda com a influência do arsénio neste tratamento.

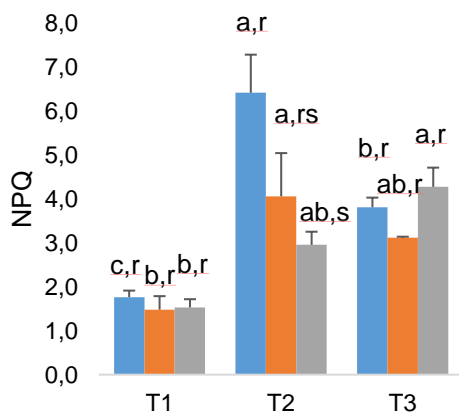




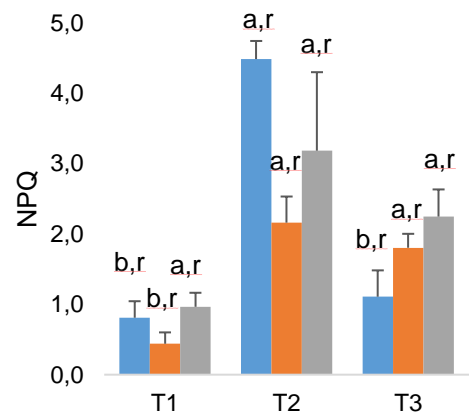
A1



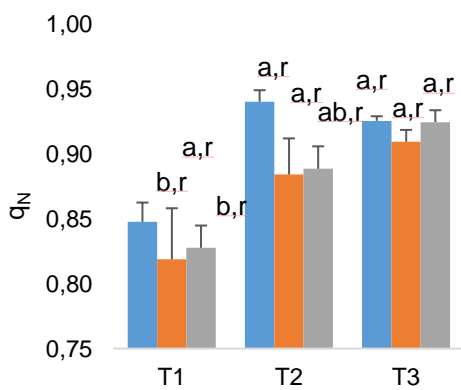
B1



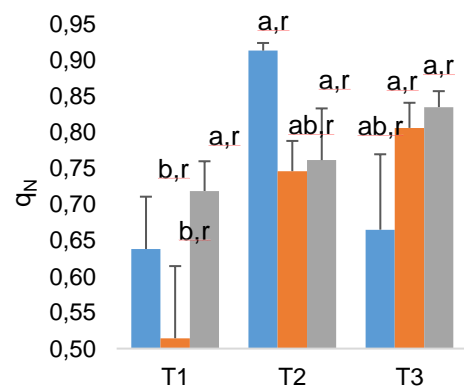
A2



B2



A3



B3

Figura 4.26 -  $q_p$  (1), NPQ (2) e  $q_N$  (3), ( $\pm$  Erro Padrão;  $p$ -value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

Na *E. globulus*,  $q_L$  não variou em função do tempo e entre tratamentos (Figura 4.27 - A1). A capacidade fotoquímica do PSII permaneceu intacta ao longo do tempo, revelando assim uma estabilidade funcional e estrutural das membranas dos tilacoides (Campostrini, 2001; Araujo, 2011). No entanto, em T2, na *E. nitens*, a  $q_L$  dos tratamentos 100 e 200, diminuiu de forma significativa, face ao controlo. Uma tendência similar ocorreu em T3, contudo, as diferenças não foram significativas (Figura 4.27 -B1). Tal como em  $F_0$ ,  $F_v/F_m$  e  $\phi_e$  e  $Y_{(NPQ)}$  o tratamento 200 também revelou uma ação fotoinibitória na maquinaria fotossintética.

Na *E. globulus*, em T2, a taxa de transporte de eletrões no PSII (ETR), foi significativamente mais elevada para o tratamento 100 (comparativamente a T1) (Figura 4.27 - A2). Em T2 e T3 verificou-se que o tratamento 200, apresentou valores significativamente mais baixos que o tratamento 100. No entanto na *E. nitens* T3, o valor do ETR relativo aos tratamentos 100 e 200 baixou significativamente face ao controlo (Figura 4.27 - B2), correspondendo à observação feita para  $q_L$  nos mesmos tratamentos. Ainda em T3, as diferenças significativas entre tratamentos sugerem uma inibição da ETR, eventualmente envolvendo aceitadores de eletrões, a ribulose - 1,5 - bifosfato carboxilase / oxigenase, ou a taxa de fotossíntese aparente e da condutância estomática (Moreno *et al.*, 2008; Araújo e Demicis, 2009).

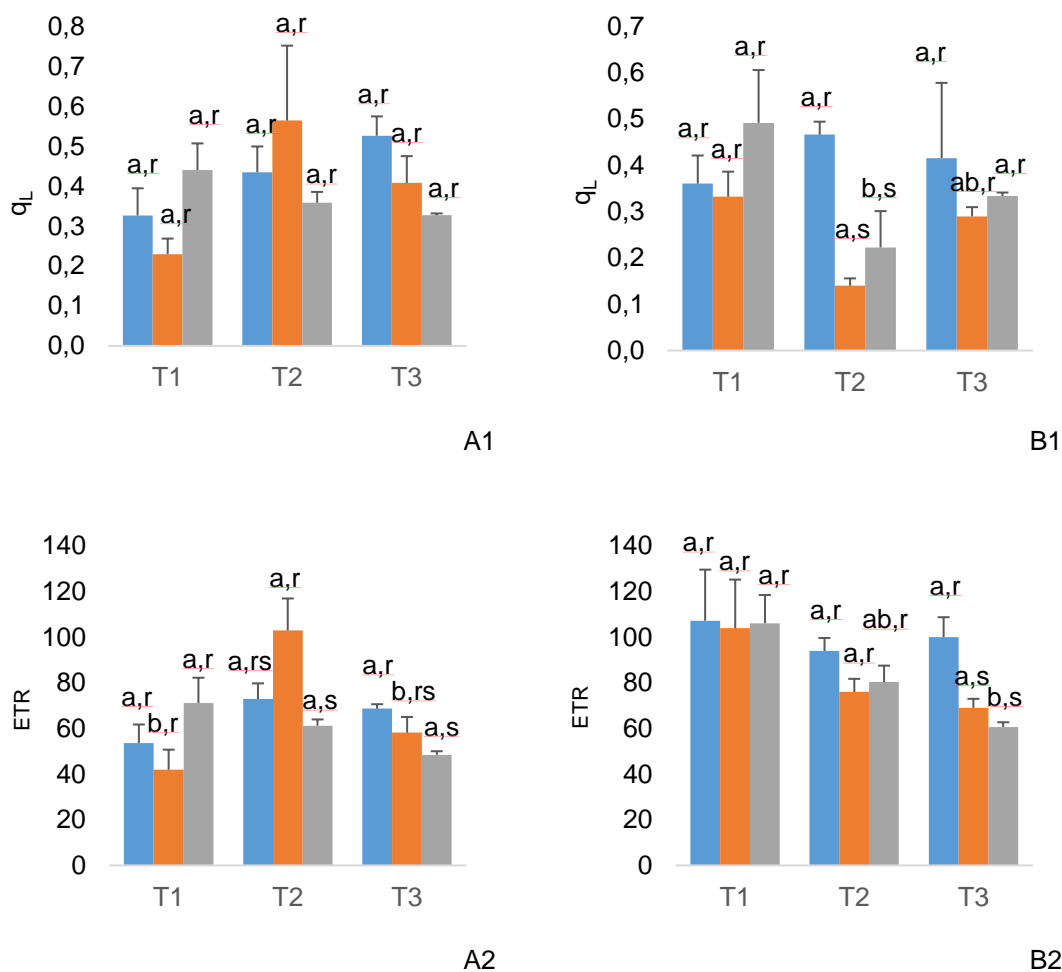


Figura 4.27 - q<sub>L</sub> (1) e ETR (2) (± Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

Na *E. globulus*, a  $F_v/F_m'$ , ao longo do tempo, não revelou variações significativas (Figura 4.28 - A1). Na *E. nitens*, em T2, os tratamentos 100 e 200 apresentaram valores de  $F_v/F_m'$  mais elevados e significativamente diferentes no tratamento 100. No entanto situação antagónica prevaleceu em T3, não ocorrendo uma variação significativa entre tratamentos (Figura 4.28 - B1). Na *E. globulus*, a  $F_s/F_m'$ , apenas variou ao longo do tempo de forma significativa para o tratamento 100, em T2 (neste caso sendo também significativo também entre tratamentos). Em T3, o valor do tratamento 200 é máximo e significativamente superior ao do controlo (Figura 4.28 - A2). Ao longo do ensaio, no tratamento 200 em T1, a  $F_s/F_m'$  apresentou valores mínimos na *E. nitens*. Para os diferentes tratamentos, em T3 ocorreram diferenças significativas, sendo os valores de  $F_s/F_m'$ , nos tratamentos 100 e 200, significativamente superiores em relação ao controlo (Figura 4.28 - B2). Em T3, a  $\phi_e$  baixa e a  $F_s/F_m'$  elevada no tratamento 100 e 200, sugerem a ocorrência de inibição do PSII.

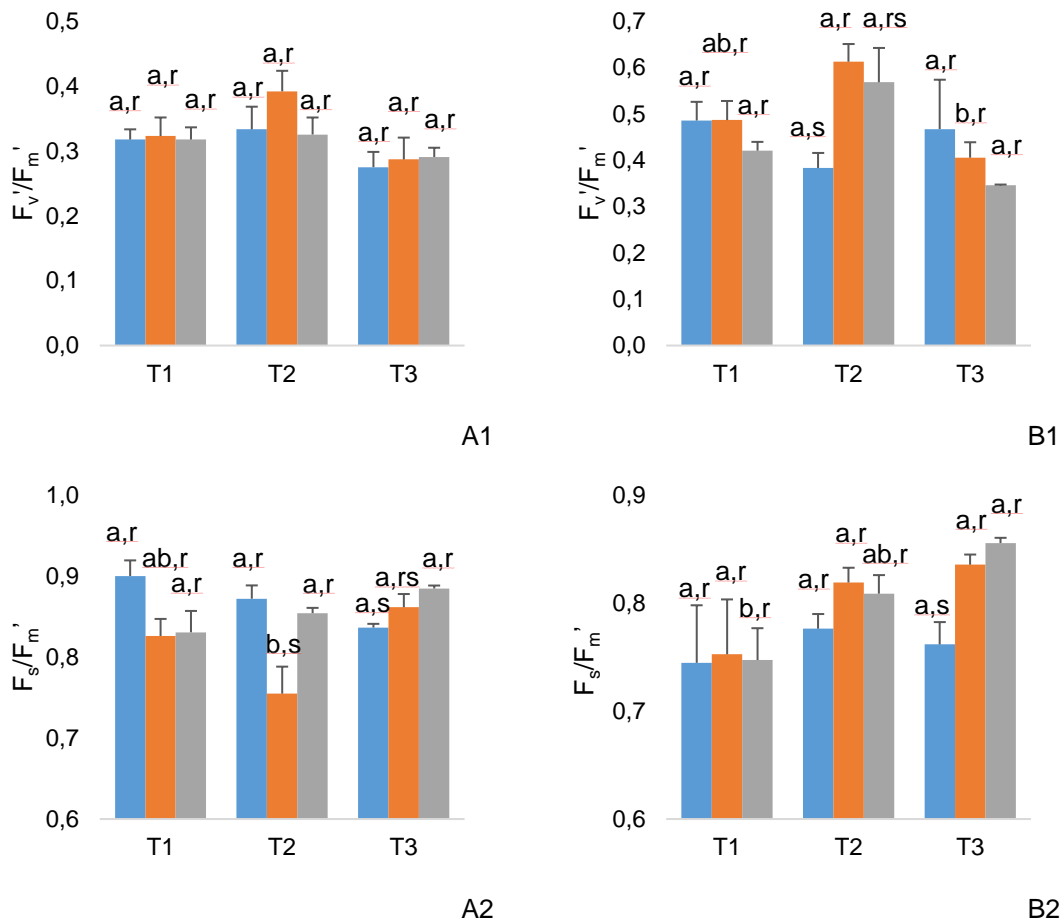


Figura 4.28 -  $F_v/F_m'$  (1) e  $F_s/F_m'$  (2) ( $\pm$  Erro Padrão; *p*-value, no intervalo de confiança de 95 %) na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental. Tratamentos: 0 mg de As (Controlo), 100 mg de As, 200 mg de As.

Na *E. globulus*, os valores de fotoinibição crónica não apresentaram diferenças significativas ao longo do tempo e entre tratamentos (Tabela 4.14). No entanto, entre T1 e T3, na *E. nitens*, ocorreram valores significativamente mais elevados, no controlo e no tratamento 200. Estes valores seguiram o mesmo padrão que  $F_v/F_m'$  reforçando a indicação de que o aparelho fotossintético das plantas do tratamento 200 poderá estar substancialmente afetado. De facto, atente-se que a fotoinibição crónica está associada ao dano e substituição da proteína D1 dos centros de reação do PSII (Araújo e Deminicis, 2009).

Na *E. globulus*, em T3, a fotoinibição dinâmica apresentou valores elevados (Tabela 4.14), mas não se detetaram diferenças significativas entre tratamentos.

Na *E. nitens*, no tratamento 100, em T2, os valores da fotoinibição dinâmica foram significativamente mais baixos. Estes dados apontam para um efeito de sazonalidade e aumento da carga térmica. A nível mais geral, parece verificar-se uma fotoinibição dinâmica, envolvendo a dissipação de energia luminosa sob a forma de relaxação térmica. Justifica-se assim o decréscimo na eficiência quântica. Porém aponte-se o carácter temporal deste decréscimo, pois a eficiência quântica pode retornar ao seu valor inicial mais elevado, quando o fluxo fotónico decresce abaixo dos níveis de saturação (Araujo e Deminicis, 2009).

Tabela 4.14 - Fotoinibição crônica, fotoinibição dinâmica, ( $\pm$  Erro Padrão; *p-value*, no intervalo de confiança de 95 %), na *E. globulus* e na *E. nitens*, ao longo do período experimental.

		As ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )		
		T1	T2	T3
Fotoinibição crônica				
<i>E. globulus</i>	0	7,12 $\pm$ 3,29 a,r	5,54 $\pm$ 5,65 a,r	7,03 $\pm$ 3,09 a,r
	100	5,16 $\pm$ 3,44 a,r	6,69 $\pm$ 2,47 a,r	7,00 $\pm$ 2,54 a,r
	200	10,3 $\pm$ 5,88 a,r	7,18 $\pm$ 2,30 a,r	8,08 $\pm$ 5,40 a,r
<i>E. nitens</i>	0	1,10 $\pm$ 1,57 b,r	0,00 $\pm$ 0,00 b,r	9,36 $\pm$ 5,43 a,r
	100	4,80 $\pm$ 3,84 a,r	0,00 $\pm$ 0,00 a,r	4,28 $\pm$ 3,10 a,r
	200	1,51 $\pm$ 0,56 b,r	1,54 $\pm$ 2,31 b,r	14,1 $\pm$ 5,15 a,r
Fotoinibição dinâmica				
<i>E. globulus</i>	0	54,5 $\pm$ 3,48 a,r	54,4 $\pm$ 6,81 a,r	59,7 $\pm$ 6,25 a,r
	100	55,8 $\pm$ 10,0 a,r	45,9 $\pm$ 10,1 a,r	58,3 $\pm$ 4,73 a,r
	200	51,3 $\pm$ 2,93 a,r	53,5 $\pm$ 8,35 a,r	56,8 $\pm$ 6,07 a,r
<i>E. nitens</i>	0	39,4 $\pm$ 12,1 a,r	54,6 $\pm$ 8,38 a,r	33,3 $\pm$ 19,7 a,r
	100	34,7 $\pm$ 10,4 a,r	24,5 $\pm$ 9,30 a,s	45,3 $\pm$ 10,2 a,r
	200	46,2 $\pm$ 5,26 a,r	28,9 $\pm$ 19,2 a,rs	43,0 $\pm$ 5,49 a,r

Englobando a fotoinibição crônica e a fotoinibição dinâmica (portanto, a fotoinibição total), na *E. globulus*, em T3, não se verificaram variações significativas entre os tratamentos e ao longo do período experimental (Figura 4.29 - A1).

Na *E. nitens*, no controlo e no tratamento 200 prevaleceram valores de fotoinibição total sem variação significativa ao longo do tempo (Figura 4.29 - B1). Contudo, em T2, o tratamento 100 apresentou o seu valor mínimo, verificando-se o mais elevado em T3. O valor mínimo de T2 foi significativamente inferior aos dos demais tratamentos tendo, em consequência, as plantas apresentado nesta fase o seu melhor período de desenvolvimento.

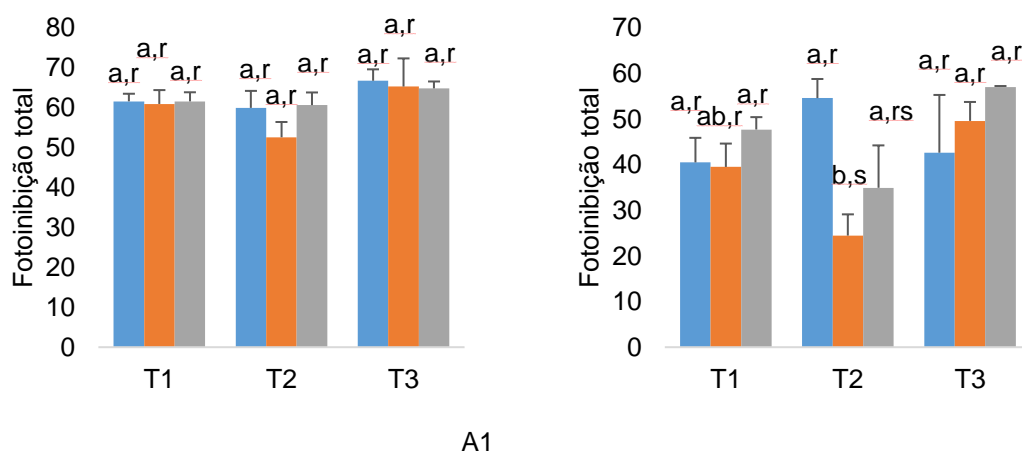


Figura 4.29 - Fotoinibição total ( $\pm$  Erro Padrão; *p-value*, no intervalo de confiança de 95 %) na *E. globulus* (A) e na *E. nitens* (B), ao longo do período experimental.

Tratamentos: ■ 0 mg de As (Controlo), ■ 100 mg de As, ■ 200 mg de As.

### 4.3. Transposição para regiões mineiras contaminadas

Desde o início da revolução industrial, e com o rápido aumento da população nas últimas décadas, a prospeção de minério e a produção agrícola têm aumentado consideravelmente. Associado a este aumento está o consumo energético e o lixo acumulado. Como resultado, a contaminação da biosfera em geral (e de alguns ecossistemas em particular) com metais pesados tem aumentado também consideravelmente, tendo ainda, como consequência, ocorrido mudanças na composição da atmosfera, solo, fontes de água doce, mares e oceanos (Van der Perk, 2013; Asrari, 2014).

Singh *et al.* (2003) reporta que anualmente são libertados e disseminados na atmosfera cerca de 22 000 toneladas de cádmio, 939 000 toneladas de cobre, 1 250 000 toneladas de zinco e 738 000 toneladas de chumbo. No caso do arsénio, estima-se que em todo o mundo cerca de 100 milhões de pessoas estejam em contacto com níveis de arsénio superiores a  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (James *et al.*, 2013).

Os dados sobre fontes de contaminação da União Europeia, para o espaço europeu, indicam ainda que as duas maiores fontes de contaminação do solo (72 % do total) são a gestão e tratamento de lixos, assim como atividades industriais e comerciais.

Os dados mais recentes da Agência Europeia do Ambiente, que datam de 2011, estimam que haja 2,5 milhões de locais contaminados com metais pesados nos 39 países da União Europeia, dos quais só 45 % estão identificados e registados estando somente 51 000 abrangidos por processos de remediação (AEA, 2017).

Em média, na União Europeia, 42 % do total de gastos económicos em locais contaminados provém do orçamento público. Acresce que anualmente, em média, os gastos de cada país, para remediação de locais contaminados oscila em torno de 10,7 euros *per capita*, o que corresponde a 0,041 % do PIB médio. Dos gastos anuais que cada país da União Europeia faz para gestão de locais contaminados, 81 % desse valor é para medidas de remediação e 15 % para investigação (AEA, 2017).

Para descontaminação, as técnicas mais comuns, utilizadas na União Europeia, são as denominadas “técnicas tradicionais” (*i.e.*, escavações e colocação em aterro e técnicas de remediação *in-situ* e *ex-situ*).

Os custos para o estudo dos locais contaminados variam entre 5 000 e 50 000 euros (dados referentes a 60 % dos casos). Considerando todos os casos reportados, destacam-se dois casos (na Itália e na Suíça) em que o estudo de investigação custou mais de 5 milhões de euros. Os projetos efetivos podem oscilar entre 50 000€ e 500 000€ (em aproximadamente 40 % dos casos), contudo projetos mais pequenos deverão custar um mínimo de 5 000€.

Não existem dados recentes sobre ecoregiões ou ecozonas contaminadas em Portugal, porém dados de 2000, alocados no “Inventário Preliminar de Áreas Potencialmente Contaminadas em Portugal” (Eco-Solos, 2000) elaborado pelo LNEC, referia um total de 22 000 sítios predominantemente industriais potencialmente contaminados em Portugal. Esse inventário contabilizava 2000 “pontos negros”, entre lixeiras a céu aberto, locais de deposição não

controlada, extração mineiras, indústria e outras atividades. Para remediação dos 12 locais mais urgentes, os cálculos efetuados apontavam para 100 milhões de euros, podendo contudo ascender a 500 milhões de euros se outros locais fossem contabilizados (Brochura Técnica, 2015).

Segundo dados da Lusa – Agência de Notícias de Portugal, S.A., de 2008, o Estado Português lançou nesse ano um programa de candidaturas para "Recuperação do Passivo Ambiental" no eixo de Prevenção, Gestão e Monitorização de Riscos Naturais e Tecnológicas do Programa Nacional de Valorização do Território, que teria uma dotação orçamental de 762 milhões de euros, a investir entre 2007 e 2013. Entre os grandes projetos a submeter à aprovação pela Comissão Europeia, neste período incluíam-se a recuperação de minas de urânio abandonadas, com um investimento previsto de 60 milhões de euros, e a recuperação de antigas áreas de exploração de minérios polimetálicos (58 milhões de euros), projetos a cargo da Empresa de Desenvolvimento Mineiro (EDM) ([http://www.rtp.pt/noticias/economia/95-milhoes-de-euros-para-recuperar-sitios-contaminados-e-minas-abandonadas\\_n93063](http://www.rtp.pt/noticias/economia/95-milhoes-de-euros-para-recuperar-sitios-contaminados-e-minas-abandonadas_n93063) – Acedido em Março 2017).

Em 2011, o Secretário de Estado do Ambiente e Ordenamento do Território elaborou uma lista de “Propostas de Ações / Candidaturas Prioritárias de Sítios Contaminados” para apresentação ao “Programa Operacional de Valorização do Território” e as intervenções necessárias nos seguintes sítios (APA, 2017):

- Zonas Industriais de Estarreja, Barreiro e Alcanena;
- Instalações e zonas adjacentes da antiga Siderurgia Nacional (Seixal);
- Complexos industriais de Sines e da bacia do Alvéola;
- Complexo mineiro de S. Pedro da Cova em Gondomar.

Em 2015, foi elaborada uma “Brochura Técnica” (2015) sobre solos contaminados, indicando alguns dos casos mencionados anteriormente como parcialmente remediados. No entanto, alguns dos casos ainda são de risco, nomeadamente os Parques Empresariais de Estarreja e do Barreiro, a área de Sines e os terrenos da antiga Siderurgia Nacional no Seixal. As áreas mineiras abandonadas, incluindo as que foram indevidamente aproveitadas para deposição de resíduos industriais, como é o caso das escombrelas de S. Pedro da Cova, presentemente em processo de reabilitação, fazem ainda parte deste rol.

Relacionado com a extração mineira, para além de São Pedro da Cova em Gondomar, existem ainda os casos das minas da Urgeiriça, Panasqueira, Aljustrel, São Domingos e Neves-Corvo. Os dados da Tabela 4.15 mostram estudos publicados (exceto Neves-Corvo que são dados referentes a este estudo) sobre as zonas mineiras em questão.

Tabela 4.15 - Valores de arsênio, cobre, chumbo e zinco em zonas mineiras que estão mencionadas como sítios de potencial risco de contaminação ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

	As	Cu	Pb	Zn	Autor do estudo
Panasqueira Valores médios n= 17	223	163	58,6	323	Candeias <i>et al.</i> , (2014)
Aljustrel Valores médios n = 80	172	261	146	520	Barbosa (2002)
São Domingos Valores Min. e Máx.n =5	746 - 5598	484 - 1928	1049 - 14041	816 - 2140	Alvarenga <i>et al.</i> , (2013)
Neves-Corvo Valores médios n = 44	29,6	168	30,2	108	Dados do autor

Conforme já apontado no capítulo 2, verifica-se a contaminação de um local quando, por via direta ou indireta, a concentração de metais, ou outros elementos, alteram a respetiva concentração para níveis mais elevados e potencialmente tóxicos.

Neste contexto aponte-se que os limites máximos de referência, estipulados pela APA, para o arsênio em Portugal, são de  $11 \mu\text{g g}^{-1}$  (para solos agrícolas) e  $18 \mu\text{g g}^{-1}$  (para solos com utilização residencial, industrial, comercial e propriedade comunitária), valores declarados da regulamentação Ontário (Ontario Ministry of the Environment, 2011). No entanto, na Faixa Piritosa Ibérica, e em particular nas respetivas zonas mineiras, devido às características geomorfológicas do local, os valores da concentração natural dos elementos, poderão ser mais elevados. Assim, nesta região, os valores máximos estipulados pela APA são muitas vezes ultrapassados somente devido às características geomorfológicas do local. Torna-se assim necessário proceder a estudos com o intuito de chegar aos valores de fundo regionais ou locais para cada elemento.

Segundo Galán *et al.* (2008), a região da Faixa Piritosa Ibérica, junto à fronteira com Espanha, apresenta valores de fundo para o arsênio de  $48 \mu\text{g g}^{-1}$ . No setor Espanhol os valores de fundo para o arsênio oscilam em torno de  $23 \mu\text{g g}^{-1}$  (*i.e.*, na região da Ossa Morena). Os valores de corte superiores aos limites de toxicidade, baseado no percentil 95 consideram-se solos contaminados. Assim, os teores de arsênio considerados anómalos por Galán *et al.* (2008), correspondem a  $179 \mu\text{g g}^{-1}$  (para a zona Portuguesa) e  $96 \mu\text{g g}^{-1}$  (para a zona de Ossa Morena). No entanto, usando o limite de corte com o percentil 95, constata-se que os valores anómalos são extremamente elevados e, assim, consideram-se como não contaminados, alguns valores apontando concentrações muito elevadas.

Barbosa (2002), utilizou outro método de corte, tendo por base a distribuição assimétrica, e eliminando os valores anómalos que estão fora do intervalo dos valores médios. Consequentemente, os valores da média e da mediana aproximaram-se, e a distribuição dos elementos ficou mais próximo de uma distribuição normal. Este método foi posteriormente usado nos trabalhos de Albanese *et al.* (2007), Ferreira *et al.* (2016) e (Pelica *et al.*, 2018).



Para os locais particulares de Aljustrel, ou Neves-Corvo, os valores de corte para o arsénio corresponderam a  $50 \mu\text{g g}^{-1}$  (Barbosa, 2002; Pelica *et al.*, 2017 – submetido). Este resultado revelou que valores de concentração de arsénio acima deste valor são consideradas contaminantes (muito embora seja uma análise localizada). Pelica *et al.* (2018), aponta que das 44 amostras de solo analisadas na região envolvente à mina de Neves-Corvo existem 7 amostras de solo que estão acima de  $50 \mu\text{g As g}^{-1}$ . Os valores elevados devem-se à dispersão pelos ventos dominantes N - NE, de elementos provenientes da mina. Assim, a zona mais afetada ocorre a sul da mina, devido à ação dos ventos que arrastam a poeira proveniente da mineração e armazenamento do minério (durante muitos anos a céu aberto). De facto, este armazenamento, sem qualquer proteção face às condições climáticas, aumentou a dispersão dos elementos.

A fitorremediação poderá ser a proposta biotecnológica mais barata para níveis moderados de contaminantes (que permitem o desenvolvimento e crescimento da planta), em áreas que poderão ser de grandes dimensões. Não existe nenhum custo estipulado para a introdução de um processo de fitorremediação, pois dependendo da localização, área, espécies a utilizar e manutenção da área, o custo varia e em rigor não é fácil estimar o preço por hectare. No entanto, a diferença de custos entre a fitorremediação e as técnicas *in-situ* e *ex-situ* pode ser até 90 % mais barata (Linacre *et al.*, 2005; Lewandowski *et al.*, 2006).

O uso do eucalipto como planta fitorremediadora vem sendo usado na investigação com resultados positivos. Alguns casos de fitorremediação, com diferentes espécies de *Eucalyptus*, em zonas mineiras contaminadas, mostraram que as raízes das plantas acumulam diferentes metais pesados. Note-se ainda que a translocação / acumulação para a parte aérea desses elementos é muito reduzida e insignificante. Assim, o limite de toxicidade e a correspondente mobilização de fotoassimilados não é comprometida, e portanto, o seu desenvolvimento não fica condicionado.

Em Portugal, a *E. globulus* é uma das espécies florestais mais importantes em termos económicos. No entanto, em Espanha a *E. nitens* atinge números mais significativos. Em Portugal, a *E. globulus* atinge densidade superior às existentes nas diferentes regiões da Austrália (*i.e.*, local onde a espécie é autóctone). O solo florestal Australiano no seu conjunto possui pH relativamente baixo, com tendência para a deficiência em fósforo e azoto. Estes solos são ricos em ferro, alumínio e magnésio, mas pobres em elementos menores como cobre, zinco, boro e molibdénio. No geral, os teores são baixos em carbono livre, mesmo com a presença de formações calcárias. Neste enquadramento, havendo algumas características comuns entre os solos e a microfauna da Austrália e Portugal, é a adaptação fácil de muitas das 600 espécies do género *Eucalyptus* a diferentes combinações de fatores edáficos, que fazem o sucesso da floresta do eucalipto (FAO, 1981). Águas *et al.* (2017), relatam que a *E. globulus*, sendo proveniente de zonas húmidas, onde as temperaturas máximas estão um pouco abaixo da temperatura média de Portugal, contribui para a sua dispersão (sendo até superior no nosso país). A precipitação anual registada em Portugal (600 mm) correspondendo ao limite mínimo da precipitação da zona Este Australiana (entre 500 - 1500 mm). O contraste faz-se nos 4 meses sem precipitação em Portugal, sendo este período na região Este Australiana menor e menos

rigoroso (FAO, 1981). As limitações para o desenvolvimento vegetativo do *Eucalyptus* nalgumas regiões de Portugal decorrem da seca e das geadas. Mesmo tendo uma biomassa subterrânea (40 – 60 toneladas), que representa 25 % da sua biomassa (Gominho *et al.*, 2015), a seca primaveril e estival afeta os níveis de carbono, provocando uma redução no crescimento que pode ainda incrementar a mortalidade (Barreiro e Torres, 2005). Assim, a falta de água nos meses mais quentes, induz uma taxa de evaporação mais elevada e, conseqüente, uma alteração no potencial hídrico nas plantas. O acréscimo da temperatura pode ainda provocar um aumento da condutância estomática noturna, incrementando ainda a desidratação, e o risco de senescência (Vale *et al.*, 2015). Assim, são as regiões norte e oeste de Portugal que apresentam as melhores condições para o plantio de *Eucalyptus*, devido às condições de luz moderada e grande disponibilidade de água associada a solos profundos (Águas *et al.*, 2017). Neste contexto, aponte-se portanto que a plantação da *E. nitens* no nosso país, não têm significado, pois esta espécie está adaptada a grandes altitudes (entre 1000 - 1100 metros), suportando geadas, temperaturas negativas e precipitação entre os 750 - 1250 mm, com seca não rigorosa de 3 meses.

No nosso ensaio, observou-se que embora as taxas de crescimento relativo tenham diminuído para a *E. globulus*, estas foram negativas para a *E. nitens*, coincidindo com o aumento da temperatura. Verificou-se assim uma tolerância da *E. globulus* aos meses mais quentes, a par de um défice adaptativo da *E. nitens*. A *E. globulus*, enquanto espécie mais plantada em Portugal, com 812 mil ha, 26 % da floresta e principal recurso industrial (7,7 milhões m<sup>3</sup> sem casca, 92 % da madeira consumida para pasta), produz 2,46 milhões de toneladas de fibra virgem (94 % do total), devido ao aumento da área do plantio de eucalipto (13 % entre 1995 e 2010) (ICNF, 2013; Pereira, 2015). No entanto, a área florestal diminuiu no mesmo período 4,6 % (10 mil ha / ano), a par da área total alocada à floresta endémica de sobreiros, azinheiras e carvalhos (ICNF, 2013).

De acordo com o Decreto-lei nº 96/2013 de 19 de Julho, que reporta para as ações de arborização e rearborização, estas duas ações estão sujeitas a uma autorização prévia do ICNF, I.P., para qualquer espécie florestal. De facto, de acordo com o artigo 5º, será de existir comunicação prévia quando se verifique as seguintes condições cumulativas:

- A área de intervenção ser inferior a dois hectares;
- Não se inserirem total ou parcialmente no Sistema Nacional de Áreas Classificadas;
- Não se realizarem em terrenos percorridos por incêndios nos 10 anos anteriores;
- Tratando-se de rearborizações, não alterarem a espécies ou espécies dominantes anteriormente instaladas.

No entanto, de acordo com o artigo 6º, não são necessárias autorizações e comunicação prévia se as espécies integradas estiverem no âmbito de projetos financiados com fundos públicos, ou pela União Europeia. Sem a necessária autorização de arborização e rearborização estão também os casos em que nos termos de lei, haja lugar a procedimento de avaliação de impacte ambiental ou análise de incidências ambientais, desde que sejam consideradas, favoráveis ou parcialmente favoráveis. Assim, não se exclui, a arborização com eucaliptos de zonas com declarado impacte ambiental, porventura para eventual remediação de solos.

Transpondo o nosso ensaio para a região mineira de Neves-Corvo, é necessário ter em conta as condições edafoclimáticas da região. A pluviosidade na região de Castro Verde e Almodôvar oscila em torno de 500 mm por ano, contrastando com os 600 mm a nível nacional (o mínimo exigido pelas condições edafoclimáticas da espécie *E. globulus* e abaixo da *E. nitens*). Com temperaturas a ultrapassar 43°C no Verão, a média da temperatura mínima ronda os 10°C, sendo a temperatura anual média de 16°C (CMCV, 2017). Assim, e pelos resultados adquiridos com o nosso trabalho, seria muito difícil à *E. nitens*, quer pelas condições edafoclimáticas da região, quer pelos resultados da translocação do arsénio para a sua parte aérea, adaptar-se com sucesso à zona mineira de Neves-Corvo. Paralelamente, o plantio da *E. globulus*, enquanto como agente de fitorremediação, deverá ocorrer apenas em áreas onde os valores de arsénio ultrapassem os 50 µg de As g<sup>-1</sup> no solo. Estudos preliminares a partir das 44 amostras de solo, permitiram efetuar, por krigagem, um mapa morfológico com as zonas acima desse valor (*i.e.*, contaminadas), zonas de incerteza, bem como as zonas não contaminadas (Figura 4. 30).

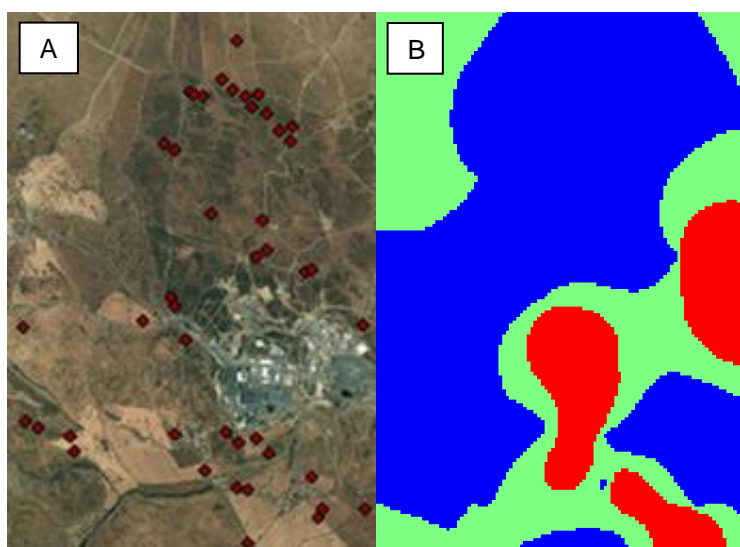


Figura 4. 30 – A - Localização das 44 amostras de solo analisado; B - Mapa morfológico da zona mineira de Neves-Corvo. Vermelho = Zona contaminada, Verde = Zonas de incerteza, Azul = Zonas não contaminadas, a partir das 44 amostras.

Como se pode constatar na Figura 4. 30, na zona envolvente da mina encontram-se os valores acima dos valores de corte, ou seja, é por influência da mina que os valores de arsénio se apresentam acima de 50 µg de As g<sup>-1</sup>. Assim, um plano de fitorremediação nesta zona com a *E. globulus* poderia ser considerado, pois os resultados ao nível da fitoestabilização, que se obtiveram no nosso estudo, revelam uma acentuada capacidade de retenção do arsénio nas raízes das plantas (*i.e.*, na zona da rizosfera). As plantas apresentaram crescimento nos meses mais secos e as taxas fotossintéticas e de fluorescência da Chl *a* não apresentaram sinais de interferência relevantes do arsénio na mobilização de fotoassimilados. Assim, o problema seria apenas de adaptação das plantas às condições edafoclimáticas da região, e a possível falta de água nos meses mais quentes.

Para uma rearborização na zona contaminada, o artigo 24º, do Plano Diretor Municipal de Castro Verde, em Diário da República n.º 240/1993, Série I-B de 1993-10-13, estipula que as

áreas abertas deverão ser mantidas para cultivos de cereais e rotação longas, devendo as áreas mistas para a agricultura extensivas ser passíveis de florestação até 50 % com espécies autóctones. No entanto, as áreas passíveis de florestação deverão ser ocupadas preferencialmente por espécies autóctones (mediante aplicação de a legislação adequada). Como vimos anteriormente, o artigo 6º do Decreto-lei nº 96/2013 reporta que não haverá “problemas de maior” se a florestação por eucalipto se traduzir num impacte ambiental positivo. Utilizar área agrícolas contaminadas, com valores elevados de arsénio e de outros metais pesados, para o cultivo de cereais, para uso humano ou criação de gado, poderá traduzir um risco de contaminação da cadeia trófica e um perigo para a saúde pública. Tendo ainda em conta o reduzido tamanho das raízes de muitas espécies vegetais (comparativamente ao eucalipto), e o seu baixo rendimento para retenção dos contaminantes na zona da rizosfera, a dispersão dos metais pesados por lixiviação poderá ser ainda um problema maior, caso os elementos contaminantes atinjam os lençóis freáticos. Os solos contaminados ao redor da mina, do ponto de vista agrícola não terão assim grande utilidade, pois esta área terá de ser descontaminada, uma solução que poderá passar pela fitorremediação dos contaminantes na zona da rizosfera (considerando os resultados positivos neste estudo). Aponte-se que, reporta o artigo 24º, alínea c), do PDM de Castro-Verde, não se exclui a plantação de eucaliptos para arborização / florestação e, de acordo com o artigo 6º do Decreto-lei nº 96/2013, se o impacte ambiental for favorável, não se poderá questionar a arborização do eucalipto.

Espécies autóctones, como a esteva, poderão ser utilizadas como fitoestabilizadores de solos, no entanto, conforme apresentado por Batista (2003), análises feitas à raiz da esteva e respetivas folhas, permitem constatar que as raízes apresentam em média níveis mais baixos de arsénio ( $1,4 \mu\text{g g}^{-1}$ , com máximos de  $6,67 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e as folhas apresentam níveis médios de arsénio mais elevados ( $9,11 \mu\text{g g}^{-1}$  e máximo de  $48,17 \mu\text{g g}^{-1}$ ). No entanto, estes valores de arsénio são justificados como sendo provenientes de poeiras depositadas nas folhas e posteriormente incorporadas pela planta. Outras espécies autóctones, como azinheiras e sobreiros, apresentam uma taxa de crescimento muito mais lenta e ainda uma baixa produção de biomassa, não se valorizando como agentes fitoestabilizadores de solos. Assim o eucalipto surge com boas características, como elemento de fitoestabilização e remediador de solos contaminados. No entanto, o plantio de eucalipto, e o Decreto-lei nº 96/2013, vem sendo muito contestado. O aumento da monocultura de eucalipto, em relação a outras espécies, e a diminuição da área florestal, surgem como primeira e mais importante crítica a este procedimento legislativo. Consequência do aumento da área de plantio desorganizado de eucalipto é a descaracterização da paisagem, consumo de água elevado, e com o aumento da temperatura global aumenta o risco de incêndio de eucalipto. A folhagem do eucalipto é facilmente inflamável, e o eucalipto desorganizado torna o combate ao incêndio muito difícil, o que poderá ter consequências muito graves. O eucalipto é uma espécie invasora a sua monocultura dificulta a biodiversidade florestal. Em Março de 2017, o primeiro-ministro António Costa afirmou em debate quinzenal na Assembleia da República: “Travar a expansão da área florestal com eucaliptos é essencial para termos uma floresta mais ordenada, uma melhor prevenção contra os incêndios

e uma gestão mais ordenada (da floresta)”. Assim, espera-se que seja discutida e reformulada a lei em vigor para arborização e rearborização.

No entanto, um grupo de trabalho constituído pelo presidente da CAP – Confederação dos Agricultores de Portugal, João Machado, por Jaime de Lacerda (diretor-geral do Fórum) e por presidentes e administradores de grupos privados ligados ao setor agro-florestal como a Symington Family Estates, Corticeira Amorim, Jerónimo Martins Agro-Alimentar, Sogepoc (holding que controla a Sugal), The Navigator Company (ex-Portucel), Sovena e Sogrape referenciam que se torna necessário investir na floresta e no eucalipto para reduzir as importações (22 % ano, 180 milhões de euros) (<http://www.portugalglobal.pt/PT/PortugalNews/Paginas/NewDetail.aspx?newId=%7B3B77FD3E-2DFF-4BC9-9F5C-802E0D1881C7%7D> – Acedido em Março 2017).

O líder do grupo Altri, Paulo Fernandes, é ainda apologista da substituição de terras ao abandono e mato, que ciclicamente são objeto de incêndios, por floresta organizada de eucalipto, rentável, com incentivos à renovação e conduz à criação de riqueza e de preservação de habitats. A importância do eucalipto surge assim como essencial na economia. A pasta de papel e o uso da biomassa para produção de energia renovável é de uma grande importância no panorama económico nacional, tendo uma percentagem muito significativa no PIB. Assim, o uso do *E. globulus*, como fitoestabilizador de solos através das suas eficientes raízes, surge como solução em zonas contaminadas, usadas como zonas agrícolas ou de mato como é o caso da área de Neves-Corvo. Para além de agente fitorremediador, o eucalipto é um grande sequestrador de oxigénio, e com a baixa translocação do arsénio da parte inferior para a parte superior poderá ter valor económico (utilização para pasta de celulose e papel, bem como combustível bioenergético).

De acordo com Jiang *et al.* (2015), a fitorremediação nas suas várias práticas poderá levar ao retorno de capital de formas distintas; a matéria vegetal poderá ser usada para fins energéticos; a recuperação de metais e o aumento do preço do solo. A sustentabilidade deste estudo reside em vários exemplos de Inglaterra e do País de Gales, em que o modelo económico de fitorremediação integrada é adotado. A margem de lucro é calculada somando o lucro do rendimento energético da biomassa ao lucro da valorização dos terrenos, subtraindo o custo do plantio e da recuperação dos metais. Neste contexto, poderão surgir assim novos postos de trabalho ligados à fitorremediação, sendo que a floresta em Portugal gera 113 mil empregos diretos (2 % da população ativa) (<https://www.pefc.pt/certificacao-gfs/introducao/floresta-portuguesa> - Acedido em Março 2017).

Esta arborização de áreas agrícolas contaminadas, encontra um vazio na lei e nos documentos de revisão à lei, nunca se mencionando o caso de remediação de solos com nenhuma espécie do coberto vegetal. Assim, seria interessante equacionar, a nível jurídico, a fitorremediação de solos com espécies vegetais já estudadas e devidamente enquadradas no panorama nacional e florestal ou silvícola, como solução para casos similares ao dos solos agrícolas contaminados junto e ao redor da mina de Neves-Corvo. Adaptando uma perspetiva ambiental, a fitorremediação para além da remediação valoriza a área afetada. Se a opção for

tirar lucro do processo, um estudo preliminar para a otimização dos processos terá de ser elaborado. Um primeiro modelo terá de analisar os lucros obtidos, caso opte pela rotação, num primeiro hectare consoante o ano a que se pretenda fazer. Todos os cenários terão de ser estudados para tornar possível um modelo financeiro, no entanto, a fitoestabilização baseia-se simplesmente na retenção dos metais na zona da rizosfera por parte das plantas, sem o intuito de lucro, no processo.

Segundo Sharma e Pandey (2014), os problemas que a fitorremediação encontra na União Europeia são vários, pois a nível político e empresarial o conhecimento é limitado, não havendo ligação entre a investigação, empresas e setor político. A legislação europeia, não considera a fitorremediação com aplicabilidade corrente, junto com as demais técnicas usadas. Essas técnicas que, nalguns casos, poderão ter revelado algum sucesso, embora a preços elevados, vão servir de comparação com um método ainda desconhecido para a maioria. Assim, a falta de investimento, bem como o direito de propriedade, não encoraja o investimento iniciativas privadas. No entanto, o sucesso e a divulgação da fitorremediação como técnica de descontaminação de solos, passa por resultados práticos e efetivos de projetos em zonas de risco, como é o caso das Minas de Neves-Corvo. Justifica-se, assim, para continuação deste estudo, a promoção de projetos de fitorremediação e integração com todos os agentes envolvidos, empresa mineira, entidades políticas, ambientais e universidade (investigação), para análise e arborização de áreas contaminadas. A divulgação dos resultados e a formulação de um itinerário técnico, considerando as principais conclusões obtidas neste estudo, seriam assim de particular relevância para a introdução de soluções nas áreas contaminadas com arsénio.

## 5.Considerações finais

O problema da poluição ambiental deve ser enquadrada de forma primordial, pois a maioria dos seres humanos depende de recursos naturais, presentes e interligados ao meio ambiente, como meio de subsistência. O ambiente, como sistema de apoio à sobrevivência humana, bem como provedor de meio físico e matérias-primas necessárias para o progresso sócio e económico da humanidade, é um *ex libris* para a humanidade que deverá ser salvaguardado. Assim, organizações mundiais, continentais e nações traçam metas para que a poluição ambiental não seja um flagelo, mas sim algo controlado e com soluções. Neste enquadramento, as diferentes componentes do ambiente (solo, ar e água) em torno das minas fica em risco. Em alguns casos (nomeadamente, na região de Neves-Corvo), a maior parte dos terrenos que circunscrevem o perímetro das minas são terrenos agrícolas. Nestes ambientes contaminados, potencia-se a passagem de elementos tóxicos para os organismos (plantas e animais) que integram a cadeia alimentar das sociedades humanas.

Um dos maiores contaminantes que deriva da exploração de minérios é o arsénio. Este contaminante é mutagénico, citotóxico e genotóxico, estando associado ao cancro da pele, rim, pulmão e bexiga, afetando todo o tipo de animais, estimando-se ainda que afete mais de 150 milhões de seres humanos no planeta. Nos solos da Europa reconhecem-se vastas áreas onde o arsénio ocorre em níveis elevados, não só como contaminante mas como constituinte das rochas. O arsénio está associado a vários tipos de mineração, nomeadamente de Au, Ag, Cu, Pb e Zn, sendo um indicador na prospeção destas mineralizações.

Uma solução para a redução e mobilidade do arsénio no solo é a fitorremediação. Este processo que é potencialmente barato e de fácil implementação vem, de forma consistente, apresentando resultados positivos nas últimas décadas em ambientes associados à exploração mineira.

O uso de plantas adequadas ao terreno e com tolerância a elevados teores de contaminantes (nomeadamente, arsénio), pode favorecer a acumulação nos tecidos, nomeadamente na zona radicular. Por vezes existe ainda translocação dos elementos, em pequenas concentrações, para outras partes da planta (caule e folhas), não influenciando, de forma significativa, as suas atividades e metabolismos primários. Neste contexto, não só as camadas superiores ficam abrangidas por este meio de descontaminação, mas também horizontes mais profundos do solo podem ser positivamente visados, face à ação de raízes profundas de árvores (nomeadamente, salgueiros ou eucaliptos).

Este estudo partiu da análise aos solos na zona envolvente à mina de Neves-Corvo e São Domingos. A observação dos teores de arsénio na zona da mina de Neves-Corvo alertaram para o facto de a média dos valores das 44 amostras estar acima dos limites usados como máximos e possíveis de intervenção estipulados pela Agência Portuguesa do Ambiente para o território nacional e em alguns casos acima do valor de fundo da zona. Neste panorama, o *Eucalyptus*, que ocupa quase 27 % da área florestal portuguesa, e tendo algumas espécies sido utilizadas para estudos de fitorremediação, apresenta resistência à toxicidade induzida por metais e

semimetais. Assim, selecionaram-se duas espécies *E. globulus* e *E. nitens*, para aferir as respetivas capacidades ecofisiológicas para utilização em sistemas de fitorremediação. Verificou-se que a *E. globulus* e a *E. nitens* se desenvolveram em solos contaminados com 33 e 66 µg em arsénio. As duas espécies revelaram teores elevados de arsénio na zona da raiz, mas a absorção deste elemento para os caules e as folhas só foram registada no tratamento 200 da *E. nitens*. A *Eucalyptus globulus* apresentou sempre níveis de desenvolvimento mais elevados ao longo do desenho experimental, mas, face ao teor de arsénio nos solos, a *E. globulus* não apresentou diferenças no seu desenvolvimento. Porém, o aumento da temperatura minimizou o desenvolvimento vegetativo. A condutância eletrolítica nas folhas de *E. globulus* permitiu observar essa desaceleração. Por oposição, o aumento da temperatura, aumentou os níveis de clorofila total na *E. globulus*. Foi também em Maio que os valores das trocas gasosas, nomeadamente a condutância estomática e a transpiração diminuíram, prevalecendo uma recuperação em Julho, e não se registando diferenças na taxa fotossintética líquida nestes meses. Analisando os parâmetros da fluorescência da clorofila *a*, não se verificaram danos substanciais nos fotossistemas da *E. globulus*.

Nas folhas do tratamento 200 da *E. nitens* detetaram-se, teores de arsénio dentro dos limites de toxicidade 5 – 20 µg de As g<sup>-1</sup>. No entanto, na *E. nitens*, o desenvolvimento da biomassa não foi idêntica ao da *E. globulus*, tendo as plantas controlo apresentado menor crescimento e biomassa. Conclui-se assim que o arsénio não afetou o desenvolvimento destas plantas. Já os resultados relativos às trocas gasosas, no tratamento 200 revelam alterações apreciáveis. A fluorescência da clorofila *a*, em Julho, revela valores de F<sub>0</sub> máximos e de F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> mínimos, permitindo concluir que existe um efeito inibitório nas antenas dos fotossistemas. Para o mesmo grupo de plantas, outros parâmetros de fluorescência (φ<sub>e</sub>, ETR e F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>) apontam para uma tendência de toxicidade do arsénio. O mesmo se pode concluir através dos valores máximos detetados para o F<sub>s</sub>/F<sub>m</sub> e a inibição crónica do PSII. No tratamento 100 na *E. nitens*, não se evidenciaram efeitos do arsénio.

Equacionando o sistema piloto de fitorremediação implementado neste estudo, concluiu-se que as duas espécies concentram níveis de arsénio relativamente elevados na raiz. No entanto, neste enquadramento a *E. nitens*, transloca uma parte relevante do arsénio para as suas folhas (tal como se visualizou no tratamento 200). Tendo em conta o comportamento das duas espécies e a sua interação com as diferentes contaminações de arsénio, concluiu-se que, em Portugal, a *E. globulus* será mais eficiente em sistemas de fitorremediação para solos contaminados com arsénio.

O encerramento das minas, após esgotamento dos recursos, obriga a que se estudem formas de monitorização ambiental para as zonas contaminadas. Assim, a fitorremediação com a *E. globulus* surge como uma solução possível. Portanto, a continuação deste estudo deverá considerar a implementação de *E. globulus* em sistema *scale up*, numa zona mineira com teores elevados de arsénio. Contudo, reconhecendo-se que a idade das plantas se correlaciona diretamente com a sensibilidade à toxicidade nutricional, este processo deveria ainda considerar diferentes parâmetros. Assume-se que só neste contexto se poderá confirmar a



ecosustentabilidade das capacidades do eucalipto, enquanto agente biológico da fitorremediação.

## 6.Referências Bibliográficas

Abreu, M.M., Santos, E.S., Magalhães, M.C.F., Nabais C. (2009). Arsenic containing phases in soils from São Domingos mining area and in non-contaminated soils from Pomarão and Serra do Caldeirão. *Revista de Ciências Agrárias*, 32(1), 155 – 169.

Abreu, M.M., Santos, E.S., Ferreira, M., Magalhães, M.C.F. (2012a). *Cistus salviifolius* a promising species for mine wastes remediation. *Journal of Geochemical Exploration*, 113, 86 – 93.

Abreu, M.M., Santos, E.S., Magalhães, M.C.F., Fernandes, E. (2012b). Trace elements tolerance, accumulation and translocation in *Cistus populifolius*, *Cistus salviifolius* and their hybrid growing in polymetallic contaminated mine areas. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 52 – 60.

Acosta, J.A., Faz, A., Martínez-Martínez, S., Zornoza, R., Carmona, D.M., Kabas, S. (2011). Multivariate statistical and GIS-based approach to evaluate heavy metals behavior in mine sites for future reclamation. *Journal of Geochemical Exploration*, 109 (1-3), 8 – 17.

Adams W. W. III, Demmig-Adams B., Verhoeven A. S. e Barker D. H. (1995). “Photoinhibition” during winter stress: Involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology*, 22: 261-276.

Adriano, D.C. (1986). Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer-Verlag, New York, USA, pp. 533.

AEA (2017). European Environment Agency. <https://www.eea.europa.eu/>. [Acedido em Janeiro, 2017].

Águas, A., Larcombe, M., Matias, H., Deus, E., Potts, B.M., Rego, F.C., Silva, J.S. (2017). Understanding the naturalization of *Eucalyptus globulus* in Portugal: a comparison with Australian plantations. *European Journal of Forest Research*, 136 (3), 433 - 446.

Ahsan, N., Lee, D.G., Kim, K.H., Alam, I., Lee, S.H., Lee, K.W., Lee H. (2010). Analysis of arsenic stress-induced differentially expressed proteins in rice leaves by two-dimensional gel electrophoresis coupled with mass spectrometry. *Chemosphere*, 78(3), 224 – 31.

Albanese, S., De Vivo, B., Lima, A., Cicchella, D. (2007). Geochemical background and baseline values of toxic elements in stream sediments of Campania region (Italy). *Journal of Geochemical Exploration*, 93(1), 21 - 34.

Alvarenga, P., Palma, P., Varennes, A., Cunha-Queda, A.C. (2012). A contribution towards the risk assessment of soils from the Sao Domingos Mine (Portugal): chemical, microbial and ecotoxicological indicators. *Environmental Pollution*, 161, 50 – 56.

Alvarenga, P., Laneiro, C., Palma, P., Varennes, A., Cunha-Queda A.C. (2013). A study on As, Cu, Pb and Zn (bio)availability in an abandoned mine area (São Domingos, Portugal) using chemical and ecotoxicological tools. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 6539 – 6550.

Alvarenga, P., Simões, I., Palma, P., Amaral, O., Matos, J.X. (2014a). Field study on the accumulation of trace elements by vegetables produced in the vicinity of abandoned pyrite mines. *Science of Total Environment*, 470 - 471, 1233 – 1242.

Alvarenga, P., Varennes, A., Cunha-Queda, A.C. (2014b). The effect of compost treatments and a plant cover with *Agrostis tenuis* on the immobilization / mobilization of trace elements in a mine-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 16,138 – 154.

- APA. (2015). Agência Portuguesa do ambiente. <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=19&subref=174> [Acedido em Setembro, 2015].
- APA. (2016). Agência Portuguesa do ambiente. <http://www.apambiente.pt/index.php?ref=19&subref=174> [Acedido em Dezembro, 2016].
- Araujo, S.A.C., Deminicis, B.B. (2009). Revisão fotoinibição da fotossíntese. *Revista Brasileira de Biociências*, 4849(4), 463 – 472.
- Araujo, S.H.C. (2011). *Tolerância de Brassica juncea ao arsênio e seu potencial para a fitoestabilização de solos*. Tese de Mestrado em Fisiologia Vegetal. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Minas Gerais, Brasil, pp. 56.
- Arriagada, C., Aranda, E., Sampedro, I., Garcia-Romera, I., Ocampo, J.A. (2009). Contribution of the saprobic fungi and *Trichoderma harzianum* and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus deserticola* and *G. claroideum* to arsenic tolerance of *Eucalyptus globulus*. *Bioresources Technology*, 100(24), 6250 – 6257.
- Asensio, V., Covelo, E.F., Kandeler, E. (2013). Soil management of copper mine tailing soils--sludge amendment and tree vegetation could improve biological soil quality. *Science of Total Environment*, 456 - 457, 82 – 90.
- Asmis, G., Ferraz, L. (2001). Relação entre densidade populacional de *Meloidogyne javanica* e a área foliar, a fotossíntese e os danos causada a variedades de Soja. *Nematologia Brasileira*, 25(1), 1 - 13.
- Assis, A.L. (2012). *Secagem, embalagem e armazenamento de folhas de pitangueira*. Tese de Mestrado em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil, pp.74.
- Asrari, E. (2014). Heavy metal contamination of water and soil: analysis, assessment, and remediation strategies. CRC Press, USA, pp. 386.
- Austruy, A., Wanat, N., Moussard, C., Vernay, P., Joussein, E., Ledoigt, G., Hitmi, A. (2013). Physiological impacts of soil pollution and arsenic uptake in three plant species: *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum* and *Vicia faba*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 90, 28 – 34.
- Barbosa, S. (2002). *Contributo da geoestatística para o melhor conhecimento da situação geoambiental do sector de algares (Minas de Aljustrel)*. Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal, pp.125.
- Barreiro, S., Torres, M. (2005). O impacte das alterações climáticas na disponibilidade a longo prazo da madeira de eucalipto. O eucalipto produção e ambiente. Ciclo de Sessões da Investigação à Aplicação. Livro de Resumos. Centro de Estudos Florestais. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, pp. 13.
- Batista, M.J.F. (2003). Comportamento de elementos químicos no sistema rocha-solo-sedimento-planta na área mineira de Neves Corvo: Implicações Ambientais. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal, pp. 406.
- Batista, M.J., Abreu, M.M., Pinto, M.S. (2007). Biogeochemistry in Neves Corvo mining region, Iberian Pyrite Belt, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration*, 92(2-3), 159 – 176.
- Batista, M.J., Sousa, A.J., Abreu, M.M., Pinto, M.S. (2012a). A two-way approach for the definition of anthropogenic and natural copper anomalies at a massive sulphide mine. The case of the Neves Corvo mine in Iberian Pyrite Belt, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration*, 113, 13 – 22.

- Batista, M.J., Abreu, M.M., Locutura, J., De Oliveira, D., Matos, J.X., Silva, C., Bel-Lan, A., Martins, L. (2012b). Evaluation of trace elements mobility from soils to sediments between the Iberian Pyrite Belt and the Atlantic Ocean. *Journal of Geochemical Exploration*, 123, 61 – 68.
- Bolan, N., Mahimairaja, S., Kunhikrishnan, A., Choppala, G. (2013). Phosphorus-arsenic interactions in variable-charge soils in relation to arsenic mobility and bioavailability. *Science Total Environment*, 463 - 464, 1154 – 1162.
- Branco, M., Bragança, H., Sousa, E., Phillips, A. (2014). Pests and diseases in Portuguese forestry: current and new threats. In: "Forest context and policies in Portugal. Present and Future Challenges" (Reboredo F. ed). World Forests Series Vol. 19, *Springer International Publishing*, New York, USA, pp. 117-154.
- Brito, M.G. (2005). *Metodologia para avaliação e remediação da contaminação por metais pesados em áreas industriais degradadas*. Tese de Doutoramento, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, pp.360.
- Brochura Técnica. (2015). Costa C., Brito G., Vendas D., Lopes M., Caramelo A.. Solos Contaminados - O Problema e as Soluções de Remediação. *Apemeta*, pp. 94.
- Candeias, C., Melo, R., Avila, P., Ferreira da Silva, E., Salgueiro, A., Teixeira, J. (2014). Heavy metal pollution in mine–soil–plant system in S. Francisco de Assis – Panasqueira mine (Portugal). *Applied Geochemistry*, 44,12 – 26.
- Campostrini, E. (2001). Fluorescência da clorofila *a*: considerações teóricas e aplicações práticas. Apóstila. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Brasil.
- Caporale, A.G., Pigna, M., Sommella, A., Dynes, J.J., Cozzolino, V., Violante, A. (2013). Influence of compost on the mobility of arsenic in soil and its uptake by bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.) irrigated with arsenite-contaminated water. *Journal of Environmental Management*, 128, 837 – 843.
- Cedergreen, N. (2008). Is the growth stimulation by low doses of glyphosate sustained over time? *Environmental Pollution*, 156, 1099 – 1104.
- CEMSD (2016). Centro de Estudos da Mina de S. Domingos. Available at: <http://cemsd.minadesdomingos.com/> [Acedido em Janeiro, 2016].
- Chang, P., Kim, J.Y., Kim, K.W. (2005). Concentrations of arsenic and heavy metals in vegetation at two abandoned mine tailings in South Korea. *Environmental Geochemistry and Health*, 27(2), 109–119.
- Chen, G., Zou, X., Zhou, Y., Zhang, J., Owens, G. (2014). A short-term study to evaluate the uptake and accumulation of arsenic in Asian willow (*Salix spp.*) from arsenic-contaminated water. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(5), 3275 – 3284.
- Chou, M.L., Jean, J.S., Yang, C.M., Hseu, Z.Y., Chen, Y.H., Wang, H.L., Das, S., Chou, L.S. (2016). Inhibition of ethylenediaminetetraacetic acid ferric sodium salt (EDTA-Fe) and calcium peroxide (CaO<sub>2</sub>) on arsenic uptake by vegetables in arsenic-rich agricultural soil. *Journal of Geochemical Exploration*, 163, 19 - 27.
- CMCV (2017). Câmara Municipal de Castro Verde. <http://www.cm-castroverde.pt/pt/Default.aspx>. Acedida em Dezembro de 2016.
- Coelho, M.T. (1999). Influência da cocentração de CO<sub>2</sub> na aclimatização de plantas de castanheiro regeneradas *in vitro*. Tese de Mestrado, Universidade de Évora, Évora, Portugal, p.99.

- Costa e Silva, F., Shvaleva, A., Araujo, J.A., Almeida, M.H., Chaves, M.M., Pereira, J.S. (2005). Bases fisiológicas para a distribuição de clones de *Eucalyptus globulus* Labill. por diferentes áreas endofo-climáticas. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. Portugal
- Ebrahimi, E., Sadeghi, S., Moradi, S. (2016). Arsenic toxicity and salinity stress effects on macronutrient uptake in watercress (*Nasturtium officinale*). *Scinzer Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 2, 1 - 5.
- Eco-Solos. (2000). Inventário preliminar de áreas potencialmente contaminadas em Portugal, (2000). Eco-Solos - Tratamento de Solos e Resíduos, S.A.(Projecto Co-financiado pela Comunidade Europeia, Fundo de Coesão, IPE/REGIA).
- Encyclopedia of Australian Science. (2015). Gardens, A.N.B., Available at: <https://www.anbg.gov.au/cpbr/cd-keys/euclid3/euclidsample/html/index.htm>. [Acedido em Setembro, 2015].
- FAO. (1981). El *Eucalyptus* en la repoblación forestal. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Itália.
- Ferreira, A.R., Barbosa, S., Almeida, J.A. (2016). Characterization of local geochemical anomalies in soils and stream sediments for improving land-use planning: A case study from Nisa, Portugal. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 28 (6), 425 - 437.
- Foelkel, C. (2011). Minerais e nutrientes das árvores dos eucaliptos. In *Eucalyptus Online Book & Newsletter*. p. 133. Available at: [www.eucalyptus.com.br](http://www.eucalyptus.com.br). [Acedido em Fevereiro, 2016].
- Freitas, H., Prasad, M.N.V., Pratas, J. (2004). Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environment International*, 30, 65 - 72.
- Galán, E., Fernández-Caliani, J.C., González, I., Aparicio, P., Romero, A. (2008). Influence of geological setting on geochemical baselines of trace elements in soils. Application to soils of Southwest Spain. *Journal of Geochemical Exploration*, 98, 89 – 106.
- Garnier, J.M., Travassac, F., Lenoble, V., Rose, J., Zheng, Y., Hossain, M.S., Chowdhury, S.H., Biswas, A.K., Ahmed, K.M., Cheng, Z., van Geen, A. (2010). Temporal variations in arsenic uptake by rice plants in Bangladesh: The role of iron plaque in paddy fields irrigated with groundwater. *Science of the Total Environment*, 408, 4185 - 4193.
- Gaspar, O.C. (2002). Mineralogy and sulfide mineral chemistry of the Neves-Corvo ores, Portugal: Insight into their genesis. *The Canadian Mineralogist*, 40, 611 – 636.
- Gerim, N.G. (2012) - *Análise Comparativa de Metodologias de Avaliação de Locais Contaminados*. Tese de Mestrado em Engenharia Geológica, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal, pp.181.
- Goes, E. (1977). Os Eucaliptos (ecologia, cultura, produções e rentabilidade) Portucel-E.P. Centro de Produção Florestal, Portugal, pp.366.
- Goes, E. (1985). Os Eucaliptos. Identificação e monografia de 121 espécies existentes em Portugal. Portucel-E.P. Centro de Produção Florestal, Portugal, pp.372.
- Gominho, J., Lourenço, A., Neiva, D., Luís, A., Duarte, A. P., Pereira, H. (2005). Cepos de eucalipto: uma matéria-prima para biorrefinarias. O eucalipto produção e ambiente. Ciclo de Sessões da Investigação à Aplicação. Livro de Resumos. Centro de Estudos Florestais. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, pp. 7.
- Gonzalez-Meler, M., Taneva, L., Trueman, R. (2004). Plant respiration and elevated atmospheric CO<sub>2</sub> concentration: Cellular responses and global significance. Invited Review - *Annals of Botany*, 94, 647 - 656.

- Grant, O.M., Incoll, L.D. (2005). Photochemical efficiency is an important component of ecophysiological variation of *Cistus albidus* between habitats in south-east Spain. *Functional Plant Biology*, 32(2), 107 – 115.
- Grimes, D., Carvalho, D. (1994). Geochemical Exploration Studies in the Portuguese Pyrite Belt. *US Geological Survey Bulletin*, 2081, 53 - 75.
- Guo, L.B., Sims, R.E.H., Horne, D.J. (2002). Biomass production and nutrient cycling in *Eucalyptus* short rotation energy forests in New Zealand. I: biomass and nutrient accumulation. *Bioresources Technology*, 85, 273 – 283.
- Hettiarachchi, G.M., Nelson, N.O., Agudelo-Arbelaez, S.C. (2012). *Phytoremediation: Protecting the Environment with Plants*, Kansas State University, USA, pp.8.
- Hoffmann, H., Schenk, M.K. (2011). Arsenite toxicity and uptake rate of rice (*Oryza sativa* L.) *in vivo*. *Environmental Pollution*, 159(10), 2398 – 2404.
- Huang W., Zhang, S. B., Cao K. F. (2011). Cyclic Electron Flow Plays an Important Role in Photoprotection of Tropical Trees Illuminated at Temporal Chilling Temperature. *Plant and Cell Physiology*, 52(2): 297-305.
- Hunt, R. (2003). Growth analysis, individual plants. *In: Encyclopaedia of plant sciences*. Academic press, London, England, pp. 579-588.
- ICNF. (2003). Instituto da Conservação da Natureza. <http://www.icnf.pt/portal>. [Acedido em Janeiro, 2016].
- Instituto Português do Mar e da Atmosfera (2016). index @ [www.ipma.pt](http://www.ipma.pt). Available at: <http://www.ipma.pt/pt/index.html> [Acedido em Janeiro, 2016].
- James, K.A., Meliker, J.R. (2013). Is Arsenic a Contributor to CKD. *American Journal of Kidney Diseases*, 61, 364–365.
- Jiang, Y., Lei, M., Duan, L., Longhurst, P. (2015). Integrating phytoremediation with biomass valorisation and critical element recovery: A UK contaminated land perspective. *Biomass and Energy*, 83, 328 - 339.
- Jung, H., Chae, M.J., Kim, S.J., Kong, M.S., Kang, S.S., Lee, D.B., Ju, H.J., Kim, Y.H. (2015). Effects of cadmium and arsenic on physiological responses and copper and zinc homeostasis of rice. *Korean Journal Soil Science and Fertilizer*, 48(5), 397 - 403.
- Kabata-Pendias, A., Pendias, H. (1985). *Trace elements in soils and plants* 3<sup>rd</sup> ed. CRC. Press, ed.,USA, pp.315.
- Kabata-Pendias, A. (2011). *Trace Elements in Soils and Plants* 4<sup>th</sup> ed. C. Press, ed.,USA, pp.512.
- Ketchie, D.O., Beeman, C.H., Ballard, A.L. (1972). Relationship of electrolytic conductance to cold injury and acclimation in fruit trees. *Journal of the American Society Horticultural Science*. 97, 403 - 406.
- King, D.J., Doronila, A.I., Feenstra, C., Baker, A.J., Woodrow, I.E. (2008). Phytostabilisation of arsenical gold mine tailings using four *Eucalyptus* species: growth, arsenic uptake and availability after five years. *Science Total Environment*, 406(1-2), 35 – 42.
- Klughammer C. e Schreiber U. (2008). Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes*, 1: 27-35.

- Kramer D. M., Johnson G., Kiirats O. e Edwards G. E. (2004). New flux parameters for the determination of QA redox state and excitation fluxes. *Photosynthesis Research*, 79: 209-218.
- Krupa Z., Öquist G. e Huner N.P. (1993). The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* - a fluorescence analysis. *Physiologia Plantarum*, 88: 626-630.
- Kumar, D., Singh, V.P., Tripathi, D.K., Prasad, S.M., Chauhan, D.K. (2015) Effect of arsenic on growth, arsenic uptake, distribution of nutrient elements and thiols in seedlings of *Wrightia arborea* (Dennst.) Mabb. *International Journal of Phytoremediation*, 17(2), 128 - 134.
- Lambers, H., Poorter, H. (1992). Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research*, 34(3), 283 – 362.
- Lei, M., Wan, X., Li, X., Chen, T., Liu, Y., Huang, Z. (2013). Impacts of sulfur regulation in vivo on arsenic accumulation and tolerance of hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Environmental and Experimental Botany*, 85, 1 – 6.
- Leistel, J.M., Sánchez, A., Almodôvar, G.R., Pascual, E., Sáez, R. (1998). The volcanic-hosted massive sulphide deposits of the Iberian Pyrite Belt. *Mineralium Deposita*, 33, 2 – 30.
- Lewandowski, I., Schmidt, U., Londo, M., Faaij A. (2006). The economic value of the phytoremediation function – assessed by the example of cadmium remediation by willow (*Salix* ssp.). *Agricultural Systems*, 89, 68 – 89.
- Lichtenthaler, H. (1987). Chlorophylls carotenoids and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350 – 382.
- Linacre, N.A., Whiting, S.N., Angle, J.S. (2005). Incorporating project uncertainty in novel environmental biotechnology: illustrated using phytoremediation. EPT Discussion Paper 132. International Food Policy Research Institute, Washington, USA.
- Ludin Mining Corporation, (2014). Lundin Mining. Available at: <http://www.lundinmining.com/s/Neves-Corvo.asp>. [Acedido em Janeiro, 2016].
- Ma, Y., Prasad, M.N.V., Rajkumar, M. Freitas, H. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*, 29, 248 – 258.
- Madejón, P., Marán, T., Murillo, J.M., Robinson, B. (2004). White poplar (*Populus alba*) as a biomonitor of trace elements in contaminated riparian forests. *Environmental Pollution*, 132(1), 145 – 155.
- Madruga, M.J., Brogueira, A., Alberto, G., Cardoso, F. (2001). <sup>226</sup>Ra bioavailability to plants at the Urgeiriça uranium mill tailings site. *Journal of Environmental Radioactivity*, 54, 175 – 188.
- Magalhães, M., Amaral Sobrinho, N., Mazur, N., Machado, M., Júnior, J. (2012). Performance of two eucalyptus species in soil with high levels of Mn. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 16(1), 92 – 95.
- Mains, D., Craw, D., Rufaut, C.G., Smith, C.M.S. (2006). Phytostabilization of gold mine tailings from New Zealand. Part 2: Experimental evaluation of arsenic mobilization during revegetation. *International Journal of Phytoremediation*, 8(2), 163 – 83.
- Mallick, S., Sinam, G., Sinha, S. (2011). Study on arsenate tolerant and sensitive cultivars of *Zea mays* L.: Differential detoxification mechanism and effect on nutrients status. *Ecotoxicol Environmental Safety*, 74, 1316 – 1324.

- Márquez - García, B., Pérez-López, R., Ruíz-Chancho, M.J., López-Sánchez, J.F., Rubio, R., Abreu, M.M., Nieto, J.M., Córdoba, F. (2012). Arsenic speciation in soils and *Erica andevalensis* Cabezudo & Rivera and *Erica australis* L. from São Domingos Mine area, Portugal. *Journal of Geochemical Exploration*, 119 - 120, 51 – 59.
- Martin, T., Hinckley, T., Meinzer, F., Spruguel, D. (1999). Boundary layer conductance, leaf temperature and transpiration of *Abies amabilis* branches. *Tree Physiology*, 19, 435 - 443.
- Martins, C.M.B. (2008). A exploração mineira romana e a metalurgia do ouro em Portugal, Universidade do Minho, Braga: (Cadernos de Arqueologia. Monografias nº 14), Braga, Portugal.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergman, H. (2010). Arsenate toxicity: effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science*, 163, 961 – 969.
- Meharg, A.A., Macnair, M.R. (1994). Relationship between plant phosphorus status and the kinetics of arsenate influx in clones of *Deschamsia caespitosa* (L.) Beauv that differ in their tolerance of arsenate. *Plant Soil*, 162, 99 – 106.
- Mertens, J., Van Nevel, L., De Schrijver, A., Piesschaert, F., Oosterbaan, A., Tack, F.M., Verheyen, K. (2007). Tree species effect on the redistribution of soil metals. *Environmental Pollution*, 149(2), 173 – 181.
- Moreira, J., Grácio, L., Romariz, P., Veloso, P., Costa, S. (2011). O Tratamento de Minérios de Cobre da Faixa Piritosa Ibérica. Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Porto, Portugal.
- Moreno, G., Vela, P., Salcedo Alvarez, Martha, O. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *Revista de Educación Bioquímica*, 27(4), 119 – 129.
- Moreno-Jimenez, E., Esteban, E., Carpena-Ruiz, R.O., Lobo, M.C., Penalosa, J.M. (2012). Phytostabilisation with Mediterranean shrubs and liming improved soil quality in a pot experiment with a pyrite mine soil. *Journal of Hazardous Material*, 201 - 202, 52 – 59.
- Moura, A. (2005). Fluids from the Neves Corvo massive sulphide ores, Iberian Pyrite Belt, Portugal. *Chemical Geology*, 223(1-3), 153 – 169.
- Nenman, D. V, Nimyel, N.D., Ezekiel, D.I. (2012). The Potentials of *Eucalyptus camaldulensis* for the phytoextraction. *International Journal of Engineering Research and Applications*, 2(2), 346 – 349.
- Olías, M., Nieto, J.M., Pérez-López, R., Cánovas, C.R., Macías, F., Sarmiento, A.M., Galván, L. (2016). Controls on acid mine water composition from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain). *Catena*, 137, 12 – 23.
- Ontario Ministry of the Environment. (2011). Soil, Ground Water and Sediment Standards for Use. Canadian Legislation. Under Part XV.1 of the Environmental Protection Act.
- Otones, V., Álvarez-Ayuso, E., García-Sánchez, A., Santa Regina, I., Murciego, A. (2011). Mobility and phytoavailability of arsenic in an abandoned mining area. *Geoderma*, 166(1), 153 – 161.
- Ozturk, F., Duman, F., Leblebici, Z., Temizgul, R. (2010). Arsenic accumulation and biological responses of watercress (*Nasturtium officinale* R. Br.) exposed to arsenite. *Environmental and Experimental Botany*, 69, 167 – 174.
- Pelica, J, Barbosa, S., Lidon, F., Pessoa, M.F., Calvão, T. (2018). The paradigm of high concentration of metals of natural or anthropogenic origin in the soils – the case of Neves-Corvo mining area (South of Portugal). *Journal of Geochemical Exploration*, 186, 12-13.



- Pereira, H. (2015). Explorar a diversidade do género *Eucalyptus* espécies e utilizações. O eucalipto produção e ambiente. Ciclo de Sessões da Investigação à Aplicação. Livro de Resumos. Centro de Estudos Florestais. Instituto Superior de Agronomia. pp. 5.
- Pérez-Cruzado, C., Muñoz-Sáez, C., Basurco, F., Riesco, F., Rodríguez-Soalleiro, R. (2011). Combining empirical models and the process-based model 3-PG to predict *Eucalyptus nitens* plantations growth in Spain. *Forest Ecology and Management*, 262(6), 1067 – 1077.
- Pérez-Cruzado, C., Rodríguez-Soalleiro, R. (2011). Improvement in accuracy of aboveground biomass estimation in *Eucalyptus nitens* plantations: Effect of bole sampling intensity and explanatory variables. *Forest Ecology and Management*, 261(11), 2016 – 2028.
- Pinho, J. (2014). Forest planning in Portugal. In: “Forest context and policies in Portugal. Present and Future Challenges” (Reboredo, F. ed). World Forests, Springer International Publishing, New York, USA, 19. pp. 155 – 183.
- Pratas, J., Prasad, M.N.V., Freitas, H., Conde, L. (2005). Plants growing in abandoned mines of Portugal are useful for biogeochemical exploration of arsenic, antimony, tungsten and mine reclamation. *Journal of Geochemical Exploration*, 85(3), 99 – 107.
- Pratas, J., Favas, P.J., D'Souza, R., Varun, M., Paul, M.S. (2013). Phytoremedial assessment of flora tolerant to heavy metals in the contaminated soils of an abandoned Pb mine in Central Portugal. *Chemosphere*, 90(8), 2216 – 2225.
- Pulford, I. (2003). Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees - a review. *Environment International*, 29(4), 529 – 540.
- Pyatt, F.B. (2001). Copper and lead bioaccumulation by *Acacia retinoides* and *Eucalyptus torquata* in sites contaminated as a consequence of extensive ancient mining activities in Cyprus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50(1), 60 – 64.
- Quispe, D., Pérez-López, R., Acero, P., Ayora, C., Nieto, J.M. (2013). The role of mineralogy on element mobility in two sulfide mine tailings from the Iberian Pyrite Belt (SW Spain). *Chemical Geology*, 345, 119 – 129.
- Rahimi, M., Asgharipoor, M.R., Farhadi, R., Bagherifard, A. (2013). Effects of potassium and phosphorus fertilizers on arsenic phytotoxicity and essential oil yield of two basil cultivars. *Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 2(5), 86 - 92.
- Rahman, S., Kim, K.H., Saha, S.K. Swaraz, A.M., Paul, D.K. (2014). Review of remediation techniques for arsenic (As) contamination: A novel approach utilizing bio-organisms. *Journal Environmental Management*, 134C, 175 – 185.
- Rajkumar, M., Sandhya, S., Prasad, M.N., Freitas, H. (2012). Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1562 – 1574.
- Ramalho, J.C., Zlatev, Z.S., Pais, I.P., Fortunato, A.S., Lidon, F.C. (2014). Moderate water stress causes different stomatal and non-stomatal changes in the photosynthetic functioning of *Phaseolus vulgaris* L. genotypes. *Plant Biology*, 16, 133 – 146.
- Rodrigues, W.P., Martins, M.Q., Fortunato, A.S., Rodrigues, A.P., Semedo, J.N., Simões-Costa, M.C., Pais, I.P., Leitão, A.E., Colwell, F., Goulão, L., Máguas, C., Maia, R., Partelli, F.L., Campostrini, E., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.C., Damatta, F. M., Ramalho, J.C. (2016). Long-term elevated air [CO<sub>2</sub>] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Global Change Biology*, 22(1), 415 - 431.
- Rapley, L.P., Potts, B.M., Battaglia, M., Patel, V.S., Allen, G.R. (2009). Long-term realised and projected growth impacts caused by autumn gum moth defoliation of 2-year-old *Eucalyptus nitens* plantation trees in Tasmania, Australia. *Forest Ecology and Management*, 258(9), 1896 – 1903.

Raven, P.H., Evert, R.F., Eichhorn, S.E. (2005). *Biology of Plants*, 7<sup>th</sup> edit. W.H. Freeman and Company Publishers, pp. 686.

Reboredo, F. (1981). Determinação de metais em sedimentos de estuário do rio Tejo, por espectrofotometria de absorção atômica, por processo de chama e sem chama. Relatório de Licenciatura. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal.

Reboredo, F. (1985). Heavy metal analysis of sedimentos and live tissues of *Spartina maritima* from salt marshes of Sado estuary, Portugal. In T. D. Lekkas, ed. *Proceedings of the 5th International Conference of Heavy Metals in the Environment. Athens (Greece): CEP Consultants Ltd. Publishers*, 330 – 333.

Reboredo, F. (1992). Cadmium accumulation by *Halimione portulacoides* (L.) Aellen. A seasonal study. *Marine Environmental Research*, 33(1), 17 – 29.

Reboredo, F. (1993). How differences in the field influence Cu, Fe and Zn uptake by *Halimione portulacoides* and *Spartina maritima*. *Science of the Total Environment*, 133 (1-2), 111 – 132.

Reboredo, F. (2014). Forest Context and Policies in Portugal. Present and Future Challenges. *World Forests*, Series vol. 19, Springer International Publishing, New York, USA, pp.259.

Reboredo, F., Ribeiro, C.A.G. (1984). Vertical distribution of Al, Cu, Fe and Zn in soil salt marshes of the Sado estuary, Portugal. *International Journal of Environmental Studies*, 23, 249 – 253.

Regvar, M., Vogel-Mikus, K. (2008). Arbuscular mycorrhiza in metal hyperaccumulating plants A. Varma, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp.20.

Roba, C., Rosu, C., Pistea, I., Ozunu, A., Baci, C. (2016). Heavy metal content in vegetables and fruits cultivated in Baia Mare mining area (Romania) and health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 6062 – 6073.

Santos, E.S., Ferreira, M., Abreu, M.M. (2011). Contribuição de *Cistus Ladanifer* L. e *Cistus Salviifolius* L. na recuperação de áreas mineiras da faixa piritosa Ibérica. *Revista de Ciências Agrárias*, 34(2), 21 – 31.

Santos Oliveira, J.M., Farinha, J., Matos, J.X., Ávila, P., Rosa, C., Canto Machado, M.J., Daniel, F.S., Martins, L., Machado Leite, M.R. (2002). Diagnóstico ambiental das principais áreas mineiras degradadas do país. *Boletim de Minas*, 39(2), 67 – 85.

Sarmiento, A.M., Oliveira, V., Gómez - Ariza, J.L., Nieto, J.M., Sánchez-Rodas, D. (2007). Diel cycles of arsenic speciation due to photooxidation in acid mine drainage from the Iberian Pyrite Belt (Sw Spain). *Chemosphere*, 66, 677 – 683.

Sarmiento, A.M., Nieto, J.M., Casiot, C., Elbaz - Poulichet, F., Egal, M. (2009). Inorganic arsenic speciation at river basin scales: the Tinto and Odiel rivers in the Iberian Pyrite Belt, SW Spain. *Environmental Pollution*, 157(4), 1202 – 1209.

Schulz, H. (1888). Ueber Hefegifte. *Pflueger's Arc*, 42, 515 - 541.

Sharma, P., Pandey, S. (2014). Status of Phytoremediation in World Scenario. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, 2(4), 178 - 191.

Shaibur, M.R., Adjadeh, T.A., Kawai, S. (2013). Effect of phosphorus on the concentrations of arsenic, iron and some other elements in barley grown hydroponically. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(1), 87 - 98.

- Silva, M.P. (2008). Avaliação e remediação de zona contaminada por hidrocarbonetos. Caso de estudo: Contaminação num armazém de lubrificantes. Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal.
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain, R.K. (2003). Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology Biotechnology*, 61(5 - 6), 405 - 412.
- Southam, C.M., Erlich, J. (1943). Effects of Extract of western red-cedar heartwood on certain wood-decaying fungi in culture. *Phytopathology*, 33, 517 – 541.
- Stirbet A. e Govindjee (2011). On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll a fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. *Journal Photochemical. Photobiology B: Biol.*, 104: 236-257.
- Tavares, M.T., Abreu, M.M., Vairinho, M.M., Sousa, A.J., Quental, L. (2009). Comportamento geoquímico de alguns elementos vestigiais na envolvente das Minas de S. Domingos, Alentejo: áreas da Tapada e do Telheiro. *Revista de Ciências Agrárias*, 32, 182 – 194.
- Tlustoš, P., Száková, J., Vysloužilová, M., Pavlíková, D., Weger, J., Javorská, H. (2007). Variation in the uptake of arsenic, cadmium, lead, and zinc by different species of willows *Salix spp.* grown in contaminated soils. *Central European Journal of Biology*, 2(2), 254 – 275.
- Tripathi, R.D., Srivastava, S., Mishra, S., Singh, N., Tuli, R., Gupta, D.K., Maathuis, F.J. (2007). Arsenic hazards: strategies for tolerance and remediation by plants. *Trends Biotechnology*, 25(4), 158 – 165.
- Tu, C., Ma, L.Q. (2005). Effects of arsenic on concentration and distribution of nutrients in the fronds of the arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. *Environmental Pollution*, 135, 333 – 340.
- Vale, R., Breia, E., Horta, A., Caldeira, M.C. (2015). Respostas fisiológicas do eucalipto aos efeitos combinados do stress hídrico e aumento da temperatura. O eucalipto produção e ambiente. Ciclo de Sessões da Investigação à Aplicação. Livro de Resumos. Centro de Estudos Florestais. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Portugal, pp.15.
- van der Perk, M. (2013). Soil and Water Contamination. CRC Press, 2<sup>nd</sup> edition. Boca Raton, Florida, USA.
- Van Kooten O. e Snel J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147-150.
- Vamerali, T., Bandiera, M., Coletto, L., Zanetti, F., Dickinson, N.M., Mosca, G. (2009). Phytoremediation trials on metal- and arsenic-contaminated pyrite wastes (Torviscosa, Italy). *Environmental Pollution*, 157(3), 887 – 894.
- Vellini, A., Alves, P., Aguiar, P., Pavani, C., Bonine, C., Aparecido, E., Rinaldo P. (2008). Respostas fisiológicas de diferentes clones de eucalipto sob diferentes regimes de irrigação. *Revista Árvore*, 32, 651 – 663.
- Wang, J., Zhao, F.-J., Meharg, A.A., Raab, A, Feldmann, J., McGrath S.P. (2002). Mechanisms of arsenic hyperaccumulation in *Pteris vittata*. Uptake kinetics, interactions with phosphate, and arsenic speciation. *Plant Physiology*, 130, 1552 - 1561.
- Wang, H.B., Xie, F., Yao, Y.Z., Zhao, B., Xiao, Q.Q., Pan, Y.H., Wang, H.J. (2012). The effects of arsenic and induced-phytoextraction methods on photosynthesis in *Pteris spp.* with different arsenic-accumulating abilities. *Environmental and Experimental Botany*, 75, 298 – 306.

- Wang, Q., Xiong, D., Zhao, P., Yu, X., Tu, B., Wang, G. (2011). Effect of applying an arsenic-resistant and plant growth-promoting rhizobacterium to enhance soil arsenic phytoremediation by *Populus deltoides* LH05-17. *Journal of Applied Microbiology*, 111(5), 1065 – 1074.
- Webb, S.M., Gaillard, J.F., Ma, L.Q., Tu, C. (2003). XAS speciation of arsenic in a hyper-accumulating fern. *Environmental Science and Technology*, 37, 754 – 760.
- Weindorf, D.C., Paulette, L., Man, T. (2013). *In-situ* assessment of metal contamination via portable X-ray fluorescence spectroscopy: Zlatna, Romania. *Environmental Pollution*, 182, 92 – 100.
- Werner, C., Correia, O., Beyschlag, W. (2002). Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Functional Plant Biology*, 29, 999 – 1011.
- Whitehead, D., Beadle, C.L. (2004). Physiological regulation of productivity and water use in *Eucalyptus*: A review. *Forest Ecology and Management*, 193(1-2), 113 – 140.
- Williams, P.N., Islam, S., Islam, R., Jahiruddin, M., Adomako, E., Soliaman, A.R.M., G.K.M.M., Lu, Y., Deacon, C., Zhu, Y-G, Meharg, A.A. (2009). Arsenic limits trace mineral nutrition (selenium, zinc, and nickel) in Bangladesh rice grain. *Environmental Science and Technology*, 43 (21), 8430 – 8436.
- Wimmer, R., Downes, G.M., Evans, R. (2002). Temporal variation of microfibril angle in *Eucalyptus nitens* grown in different irrigation regimes. *Tree Physiology*, 22(7), 449 – 457.
- Zeiger, E., Taiz, L. (1998). *Plant Physiology* 2<sup>nd</sup> ed., Sinauer Associates Publishers, Inc, Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 792.
- Zhao, F.J., Ma, J.F., Meharg, A.A., McGrath, S.P. (2009). Arsenic uptake and metabolism in plants. *The New Phytologist*, 181(4), 777 – 794.
- Zhao, F.J., Ago, Y., Mitani, N., Li, R.Y., Su, Y.H., Yamaji, N., McGrath, S.P., Ma, J.F. (2010). The role of the rice aquaporin Lsi1 in arsenite efflux from roots. *The New Phytologist*, 186(2), 392 – 399.
- Zhuang, P., McBride, M.B., Xia, H., Li, N., Li, Z. (2009). Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China. *Science of the Total Environment*, 407, 1551 - 1561.

