

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Organização dos experimentos

1. Coleta
2. Herborização
3. Cultivo da *R. maritima* em dois aquários
4. Testes piloto
 - 1°. Condições ideais de cultivo da planta – a planta foi cultivada com a adição de CdCl_2 ao longo de 14 dias para se conseguir as condições ideais de cultivo.
 - 2°. Diluição de cloreto de cádmio – teste realizado para se chegar a diluição pré-determinada de 0,1 mg de Cd/L de água, que levou em conta a quantidade de Cd encontrado nas águas da Lagoa e o limite máximo estabelecido pelo CONAMA 20 (que em 2004 era a resolução para águas vigente no Brasil).
5. Ensaio para o cultivo da *R. maritima* com a adição de CdCl_2 em laboratório – a planta foi cultivada com a adição de CdCl_2 , durante 14 dias para se saber se ela acumula Cd.
6. Análise dos dados obtidos – realizada de duas formas:
 - 1°. A partir da observação do desenvolvimento da planta nos aquários, no 1° teste piloto e nos ensaios de fitorremediação.
 - 2°. Com o resultado da análise química feita com a planta, seus órgãos, a água e o sedimento usados nos ensaios.

3.2. Coleta

3.2.1. Localização e caracterização da área de estudo

Dois motivos foram determinantes para a escolha do local de estudo:

- ♦ A Lagoa Rodrigo de Freitas possui uma grande quantidade de *R. maritima*, principalmente nas áreas mais contaminadas com Cd (Koblitz *et al.*, 2001).
- ♦ A quantidade mínima de Cd na Lagoa ultrapassa os limites determinados pela Resolução Brasileira vigente (CONAMA 20, 1986).

A origem e evolução da Lagoa está associada a vários eventos ligados a oscilação do nível médio dos oceanos ocorridos durante o Cenozóico. A formação ocorreu a partir do fechamento de uma enseada pelo cordão litorâneo (praias do Leblon e Ipanema) (Bertolino & Andreata, 2001). O seu nome é devido ao último Senhor de Engenho Rodrigo de Freitas de Mello e Castro em 1660. Antes da colonização humana era conhecida como Sacopenopã, que em tupi significa “praia batida pelos socós” (Fazenda, 1927). Ela é uma Lagoa costeira do leste-fluminense localizada na zona sul da cidade do Rio de Janeiro, nas coordenadas 22°58’09”S e 043°13’03”W (IBAMA, 1989). Possui forma poligonal irregular com aproximadamente três quilômetros quadrados de superfície, profundidade média de quatro metros com aproximadamente sete milhões de metros quadrados de volume líquido com a contribuição hidrográfica dos rios: Macaco, Rainha e Cabeça, que se localizam próximos a estação de coleta III (Bertolino & Andreata, 2001). Essa descrição pode ser conferida na Figura 2, que mostra a vista aérea da Lagoa Rodrigo de Freitas, bem como a localização das estações de coleta deste estudo.



Figura 2 – Vista aérea da Lagoa Rodrigo de Freitas (Feema, 2004)

O regime de águas e o equilíbrio biológico são controlados por dois sistemas de drenagem: o canal do Jardim de Alah e o canal do Leblon (que desemboca no oceano junto à Av. Niemeyer). Esses sistemas de dragagem servem para levar para o mar as águas poluídas das bacias de drenagem (IBAMA, 1989). A área central da Lagoa é a que apresenta o maior teor de matéria orgânica (6 a 23%) e silte (1 a 13%) (Bertolino & Andreatta, 2001).

3.2.2. Estações de amostragem neste estudo

A Lagoa foi dividida em cinco estações de coleta, pré-estabelecidas anteriormente pela equipe do Dr. José V. Andreatta, Professor da Universidade Santa Úrsula (USU) (Bertolino & Andreatta, 1997).

Estações (Figura 2):

- I - Próximo ao canal do Jardim de Alah até as proximidades do Clube Caiçaras.
- II - Próximo ao Parque da Catacumbas.
- III - Próximo ao Clube Piraquê, aonde desembocam as águas do Rio Macaco e do canal de recirculação.
- IV - Região nordeste, próximo ao posto Shell (na av. Epitácio Pessoa, próximo ao nº4560)
- V - Área central da Lagoa.

3.2.3. Amostragem

Amostras de *R. maritima* foram coletadas da Lagoa Rodrigo de Freitas nas cinco estações com o auxílio da equipe do Prof. Andreatta (que possui autorização para coletar na Lagoa e desenvolve pesquisa na Lagoa à mais de dez anos), juntamente com as medições dos fatores abióticos, no dia 5 de outubro de 2004. As amostras de *R. maritima* foram utilizadas para: a herborização, os aquários e os testes piloto. No dia 30/05/2005 uma segunda coleta foi realizada com a ajuda da Comlurb nas estações I, II, III e IV. A água e a *R. maritima* provenientes desta coleta foram utilizadas nos testes de contaminação da planta pelo Cd. Ao se coletar a *R. maritima* encontrou-se uma flora associada formada por algas do gênero *Enteromorpha* e uma fauna associada à planta formada por gastrópodes e zooplâncton.

3.2.4. Identificação dos fatores abióticos relevantes

Os fatores abióticos relevantes para o estudo da fitorremediação de Cd pela *R. maritima* foram os nutrientes, o pH, a salinidade e a temperatura. Pois como já foi visto na revisão bibliográfica, eles interferem diretamente nas formas de complexação e transporte do Cd pela planta, na disponibilidade e na mobilidade do Cd. Os fatores abióticos apresentam uma maior variação ligados ao clima da região, sendo que essas variações sazonais são observadas principalmente no verão e no inverno, sendo caracterizados como verão úmido (época das chuvas com níveis de salinidade baixos) e inverno seco (com maiores níveis de salinidade). De acordo com as análises da equipe do prof. Andreatta verificou-se a tendência progressiva na diminuição dos valores de salinidade (Freret *et al.*, 2001; Marca *et al.*, 2001).

As médias dos fatores abióticos da Lagoa de 1991 até 1995 estão na Tabela 9 e foram separadas por estação. A taxa de oxigênio dissolvido (O.D.) oscila muito, podendo variar de $0,7 \text{ mMolL}^{-1}$ à 10 mMolL^{-1} (Marca *et al.*, 2001).

Tabela 9– Dados abióticos da Lagoa Rodrigo de Freitas

	Verão	Inverno
Temperatura	$\cong 28^{\circ}\text{C}$	$\cong 25^{\circ}\text{C}$
Salinidade	2‰ - 16‰	13‰ - 26‰
pH	$\cong 7,8$	$\cong 7,8$

A Feema monitora desde 1970 a qualidade da água na Lagoa Rodrigo de Freitas. Esse monitoramento é realizado semanalmente e são monitorados alguns perfis verticais, a coluna d'água e a biota. Dados mais recentes dos fatores abióticos da Lagoa (oxigênio dissolvido, temperatura, salinidade e transparência) fornecidos pela Feema (2004) foram utilizados em nosso estudo. Esses dados foram resumidos na Tabela 10 (Feema, 2004).

Tabela 10 – Relatório anual dos fatores abióticos fornecido pela Feema (2004)

Temperatura	$\cong 27^{\circ}\text{C}$
Salinidade	14‰

3.2.5. Limites de cádmio estabelecidos pela Resolução CONAMA 20

A Resolução CONAMA 20 de 1986 estabelece classes nas quais os corpos d'água devem ser enquadrados. A classificação das águas esta relacionada ao uso a que se destinam (Brasil, 1986). Por tanto, são estabelecidos limites para alguns parâmetros de qualidade da água para cada classe, inclusive para os metais pesados.

Quando um corpo d'água é enquadrado em uma classe, os órgãos responsáveis pelo mesmo devem estabelecer medidas para que este consiga atingir os limites determinados para aquela classe. Conforme a Resolução CONAMA 20, as águas podem ser classificadas de acordo com os seus usos em nove classes. Por outro lado enquanto não ocorrer o enquadramento, os corpos de águas doces serão considerados como Classe 2, os de águas salinas como Classe 5 e os de águas salobras como Classe 7.

Os Artigos 18 e 19 da Resolução CONAMA 20 explicam de forma geral o que não é permitido ser encontrado nas diferentes classes de águas (Brasil, 1986).

Art. 18 - Na classe especial não serão tolerados nenhum tipo de lançamentos de águas residuárias, domésticas e industriais, lixo e outros resíduos sólidos, substâncias potencialmente tóxicas, defensivos agrícolas, fertilizantes químicos e outros poluentes mesmo tratados. Caso sejam utilizadas para o abastecimento doméstico deverão ser submetidas a uma inspeção sanitária preliminar (Brasil, 1986).

Art. 19 - Nas águas das Classes 1 a 8 serão tolerados lançamentos de despejos, desde que, além de atenderem ao disposto no Art. 21 desta resolução, não venham a fazer com que os limites estabelecidos para as respectivas classes sejam ultrapassados (Brasil, 1986).

A definição detalhada das classes 1 à 8 se encontram na Resolução CONAMA 20. As quantidades máximas admitidas de Cd nos corpos d'água em cada classe se encontram na Tabela 11 (Brasil, 1986).

Tabela 11 - Limites máximos permitidos por classe para o cádmio Resolução CONAMA 20 (Brasil, 1986)

CLASSE	CÁDMIO (mg de Cd/L)
1	0,001
2	0,01
5	0,005
7	0,005

Até que ocorra um novo enquadramento por parte dos órgãos responsáveis, a Lagoa está na classe 7.

A resolução brasileira vigente a partir de 17 de março de 2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água, as diretrizes ambientais e estabelece condições padrões de lançamento de efluentes é a Resolução CONAMA 357 (Brasil, 2005).

Não ocorreu alteração na classificação das águas brasileiras. Quanto as classes ocorreram algumas alterações mostrando uma maior tolerância nos níveis de Cd, essas classes se subdividem de acordo com a classificação. Os limites máximos admitidos de Cd nos corpos d'água em cada classe se encontram na Tabela 12 (Brasil, 2005).

Tabela 12 – Limites máximos admitidos de cádmio segundo Resolução CONAMA 357 (Brasil, 2005)

Águas	Classe	Cd (mg de Cd/L)
Doces	Especial	Manter as condições naturais do corpo d'água
	1	0,001
	2	
	3	0,01
	4	Limite não estabelecido
Salinas	Especial	Manter as condições naturais do corpo d'água
	1	0,005
	2	0,04
	3	Limite não estabelecido
Salobras	Especial	Manter as condições naturais do corpo d'água
	1	0,005
	2	0,04
	3	Limite não estabelecido

A Resolução CONAMA 357 revoga a Resolução CONAMA 20, mas os limites utilizados neste trabalho foram os estabelecidos pela Resolução CONAMA 20, pois era a que estava em vigor na época das coletas.

A classificação das águas quanto à salinidade possui limites pré-estabelecidos pela legislação e descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – Classificação das águas brasileiras

Águas doces: salinidade igual ou inferior a	0,50‰.
Águas salobras: salinidade igual ou inferior a	0,50‰ e 30‰.
Águas salinas: salinidade igual ou superior a	30‰.

Quanto à classificação das águas brasileiras, as águas da Lagoa Rodrigo de Freitas são salobras (salinidade entre 0,50‰ e 30‰.) (Brasil,1986).

A quantidade de contaminantes existentes nos corpos d'água não influencia na quantidade máxima que uma fonte poluidora, qualquer que seja esta fonte, pode lançar no corpo d'água. Toda fonte poluidora precisa seguir os parâmetros determinados nos Artigos 21 e 22 da Resolução CONAMA 20, que determinam as condições e os limites de lançamento de contaminantes nos corpos d'água.

Art.21 - Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam às seguintes condições (Brasil, 1986):

- a) pH entre 5 a 9;
- b) temperatura: inferior a 40°C, sendo que a elevação de temperatura do corpo receptor não deverá exceder a 3°C;
- c) materiais sedimentáveis: até 1ml/litro em teste de 1 hora em cone Imhoff. Para o lançamento em lagos e lagoas, cuja velocidade de circulação seja praticamente nula, os materiais sedimentáveis deverão estar virtualmente ausentes;
- d) regime de lançamento com vazão máxima de até 1,5 vezes a vazão média do período de atividade diária do agente poluidor;

Quanto aos limites de lançamento nos corpos d'água a Resolução CONAMA 357 acrescenta ao artigo 21 da Resolução CONAMA 20, 3 parágrafos relativos aos níveis de toxicidade do material a ser lançado. Esses parágrafos são descritos no artigo 34:

§ 1º - O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2º - Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente.

§ 3º - Nos corpos de água em que as condições e padrões de qualidade previstos nesta Resolução não incluam restrições de toxicidade a organismos aquáticos, não se aplicam os parágrafos anteriores.

O valor máximo de Cd permitido para lançamento nos efluentes, encontra-se na Tabela 14.

Tabela 14 - Valor máximo admissível de cádmio lançado no efluente (Brasil,1986)

METAL	LANÇAMENTO (mg de Cd/L)
Cádmio	0,2

Art. 22 - Não será permitida a diluição de efluentes industriais com águas não poluídas, tais como água de abastecimento, água de mar e água de refrigeração (Brasil, 1986).

3.2.6. Metais pesados na Lagoa Rodrigo de Freitas

Foram feitas análises químicas ao longo de cinco anos (março de 1991 à fevereiro de 1995) nos sedimentos da Lagoa Rodrigo de Freitas nas cinco estações de coleta, aonde foram obtidos os valores de cada estação em mg de Cd por l de água da Lagoa. Esses resultados serviram como base para determinarmos a quantidade de Cd adicionada no experimento. A partir desses valores foram retiradas as médias por estação representadas na Tabela 15 (Koblitz *et al.*, 2001).

Tabela 15- Concentração de Cádmio no sedimento da Lagoa Rodrigo de Freitas

METAL	VALOR (mg de Cd/l)	ESTAÇÃO				
		I	II	III	IV	V
	Média	0,86	0,64	0,39	0,68	1,87
Cd	Máximo	12,20	1,60	1,20	2,20	33,50
	Mínimo	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20

3.3. Herborização da *Ruppia maritima*

A herborização é uma técnica de preservação do material botânico realizada após a coleta e que serve como documentação permanente do material de estudo após ser identificado e depositado em um herbário.

As *R. maritima* herborizadas foram provenientes da coleta na Lagoa Rodrigo de Freitas. Para a herborização no Instituto de Ciências Biológicas e ambientais da Universidade Santa Úrsula (USU) a planta foi prensada e posta para secar na estufa à 60°C por 48h. Após a secagem ela foi montada, registrada no livro tombo e incluída no herbário da Universidade Santa Úrsula (RUSU) com duplicata para o herbário Friburguense da PUC-Rio cuja sigla é FCAB. Registro no livro tombo, sob o número geral, pois s.n. quer dizer sem número de coletor.

Material testemunho à: Brasil, Estado do Rio de Janeiro, Lagoa Rodrigo de Freitas, 05/10/2004, A.C.G. Dutra-Guilherme s.n. (RUSU 14984; FCAB 6173).

3.4. Estabilização dos aquários

A planta foi estabilizada em dois aquários na USU, num período de sete meses (do dia 7/10/2004 ao dia 24/04/2005). No aquário 1 foram colocadas as plantas retiradas das estações I, II e III, e no aquário 2 as coletadas das estações IV e V. Os aquários foram montados com água e sedimento da Lagoa, adicionando-se cascalho lavado os mesmos foram acondicionados ao ar livre com luz natural.

Ao longo dos meses, devido à água das chuvas, os aquários tiveram alterações em alguns de seus fatores abióticos como a diminuição da salinidade e o aumento do pH (de 7 para 8.4), transformando a água salobra dos aquários em água doce.

3.5. Teste Piloto para se determinar as condições ideais de cultivo da planta e a diluição do cádmio

Foram realizados dois testes piloto, um para se ter as condições ideais de cultivo da planta e outro para se chegar a diluição de dez vezes o nível máximo permitido pelo CONAMA 20 em relação ao Cd.

No primeiro teste as plantas permaneceram por duas semanas intoxicadas com CdCl_2 , reagente cloreto de Cd P.A. (puro) monohidratado, com peso molecular de 201,333, fornecido pela Vetec em vidros com capacidade de três litros com 32 cm de altura. Em cada vidro foram montados ambientes contendo aproximadamente 4 cm de sedimento para a fixação da macrófita (o sedimento da Lagoa não foi utilizado por causa do nível de contaminação do mesmo com diversas substâncias que poderiam vir a interferir no desenvolvimento dos experimentos), tendo como composição: terra (PUC-Rio) + cascalho lavado (USU), dois litros de água da torneira e aproximadamente 15g de *R. maritima*. O peso total do sedimento foi de aproximadamente 400g

Os ambientes montados foram colocados em um laboratório (laboratório MAR do Prof. Raul Nunes do DCMM-PUC-Rio) com um sistema de luz artificial (padrão usado na UFF (Universidade Federal Fluminense) para cultivo de plantas com oito lâmpadas frias de 40W) tendo sido dispostos da seguinte forma: um conjunto de quatro lâmpadas em cima dos ambientes e outro conjunto de quatro lâmpadas à frente. O crescimento das plantas foi monitorado ao longo da semana. A posição dos ambientes foi alterada (a cada dois dias). Os ambientes foram colocados em três fileiras dispostas diagonalmente. A primeira fileira recebia mais luz e a terceira menos luz, conforme mostra a Figura 3.

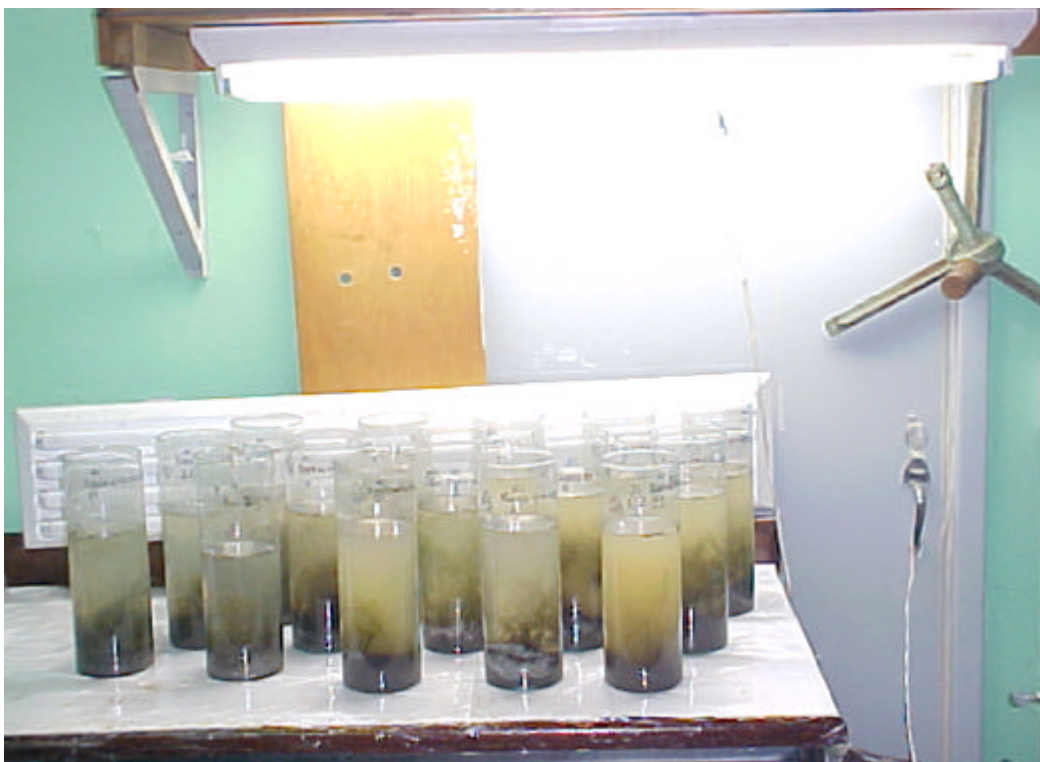


Figura 3 - Localização das luzes artificiais e distribuição dos vidros

O dispositivo de luz estava ligado a um timer com ciclos claro/escuro de 12 horas.

No segundo teste foi preparada uma solução padrão (1,63 g de CdCl_2 diluída em 50 ml de água milli-q) e guardada até a sua utilização. O sal usado na solução foi pesado em uma balança analítica, marca sartorius B1210s. Foram feitas diluições de 1x (1,63 mg de CdCl_2 para cada litro de água), 5x (8,15 mg de CdCl_2 para cada litro de água), 10x (16,3 mg de CdCl_2 para cada litro de água), e 100x (163 mg de CdCl_2 para cada litro de água) a partir da solução padrão todas com duas réplicas, para se estimar quanto de Cd estaria presente na água e no sedimento.

Para os testes de diluição utilizou-se água ultrapurificada (deionizada, desmineralizada e destilada, também chamada água milli-q) com pH 5.5. O sedimento era composto de terra preta homogeneizada, comprada em loja de jardinagem.

3.6. Cultivo da *Ruppia maritima* em ambientes com a adição de cloreto de cádmio

Para a contaminação da planta com CdCl_2 foram usados 12 vidros. A montagem dos ambientes foi realizada colocando-se aproximadamente 200 g de sedimento para a fixação da macrófita, constituído de terra para jardinagem homogeneizada. O cascalho não foi adicionado para que não ocorresse interferência nos resultados da absorção atômica do sedimento. Utilizou-se água da Lagoa Rodrigo de Freitas (pH 7) e água milli-q pH 5.5. As plantas foram podadas com aproximadamente 15 cm de altura, para se conseguir uma distribuição mais homogênea e plantadas em cada vidro aproximadamente 30 g de *R. maritima*.

Para os ensaios de fitorremediação foram montados dois ambientes (cada vidro montado equivale a um ambiente):

- 1) Ambiente de controle com a planta e a sua flora e fauna associadas.
 - (a) Vidros 1, 5 e 9 com água milli-q.
 - (b) Vidros 3, 7 e 11 com água da Lagoa Rodrigo de Freitas.

Na figura 4 são mostrados os ambientes que não foram contaminados com Cd, após 14 dias de experimento.

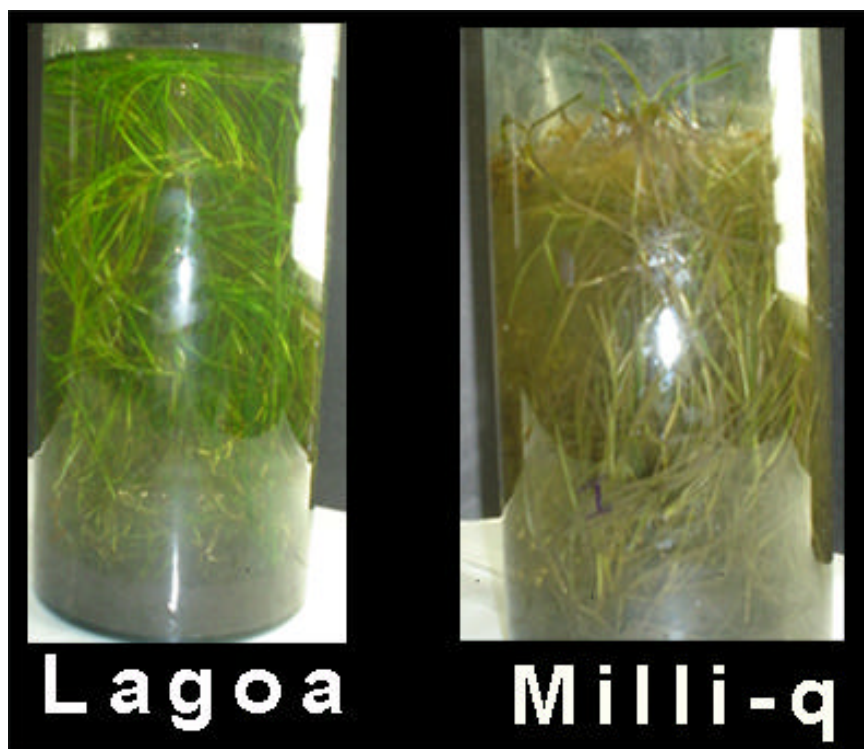


Figura 4 - Ambiente de controle no 14º dia

2) Ambiente com a planta e a sua flora e fauna associadas, com adição de CdCl_2 .

(a) Vidros 2, 6 e 10 com água milli-q.

(b) Vidros 4, 8 e 12 com água da Lagoa Rodrigo de Freitas.

Na figura 5 são mostrados os vidros intoxicados com CdCl_2 , após 14 dias de experimento.



Figura 5 - Ambiente intoxicado com cloreto de cádmio no 14º dia

Todos os testes realizados foram feitos em duplicata. Os ambientes plantados permaneceram três dias sem alteração do meio, para que a planta pudesse se enraizar. Após esse período foram adicionados 1,63mg de CdCl_2 /l de água. Essa diluição foi baseada nos resultados obtidos com os testes de diluição, onde se conseguiu a diluição de uma vez o valor mais próximo de dez vezes o nível máximo permitido pelo CONAMA 20.

As amostras foram levadas para análise química depois de 7 e 14 dias de contaminação com o CdCl_2 . Segundo alguns autores que realizaram análises diárias, esses são os melhores dias para se analisar a absorção de metais pesados por macrófitas (Chen *et al.*, 2000; Sanchiz *et al.*, 2001; Kamal *et al.*, 2004).

3.7. Digestão do material para análise química

3.7.1. Sedimento

Uma parte do sedimento foi seca na estufa à 75°C, durante a noite, em tubos de 50 ml. A outra parte foi guardada em embalagens plásticas com fecho hermético, como testemunho. Depois de seco, o sedimento foi pesado (aproximadamente 500 mg) e foram adicionados 5 ml de ácido nítrico (HNO₃) P.A., fornecido pela Vetec. O material permaneceu no ácido durante a noite toda.

Após este período, o material foi posto na chapa à 70°C por 5hs e em seguida permaneceu no ultra-som por 1h, sendo então centrifugado. O sobrenadante foi vertido para outro frasco de igual volume. A água milli-q foi adicionada no primeiro frasco, que foi agitado e centrifugado. Seu sobrenadante foi novamente vertido. O frasco com o sobrenadante foi avolumado para 20 ml e levado para análise no espectrofotômetro de absorção atômica de chama.

3.7.2. Planta

A planta passou por um processo mecânico de retirada da sua flora e fauna associadas, para que os valores de Cd encontrados fossem só referentes a *R. maritima*. Após esse processo, a planta foi desidratada na estufa. Com base no peso seco das amostras, o material foi digerido e avolumado para 15 e 20 ml.

Amostras com peso seco entre 0,0149 até 0,3577 g (peso A) foram avolumadas para 15 ml e amostras com peso seco entre 0,3577 e 0,6539 g (peso B) foram avolumadas para 20 ml.

Uma parte da planta foi seca na estufa, à 75°C, durante a noite, em tubos de 50 ml e a outra foi guardada em embalagens plásticas com fecho hermético, como testemunho.

Depois de seca, a planta foi pesada e foram adicionados 5 ml de HNO_3 na chapa à 70°C . A planta permaneceu com ácido na chapa à 70°C durante toda a noite. No dia seguinte as amostras foram para o ultra-som por uma hora, sendo então adicionado um mililitro nas amostras de peso A de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) P.A. , marca Vetec, e dois mililitros de H_2O_2 nas amostras de peso B.

As amostras voltaram para o ultra-som por uma hora, sendo levadas em seguida para a chapa à 70°C por uma hora e novamente para o ultra-som por uma hora. Finalmente o material foi avolumado de acordo com o peso seco e levado para leitura no espectrofotômetro de absorção atômica de chama.

3.8. Análises Químicas

Depois de coletado, o material foi preparado segundo procedimento padrão do laboratório de Química do Prof. Reinaldo Calixto (Departamento de Química PUC-Rio), para análise no espectrofotômetro de absorção atômica de chama da Perkin Elmer modelo 1100B. A água foi filtrada e realizada a digestão no sedimento e na planta.

As condições do espectrofotômetro para a leitura do Cd foram compilados na Tabela 16.

Tabela 16- Condições operacionais do espectrofotômetro para o cádmio

Parâmetros	Calibração
Comprimento de onda (λ)	228,8 nm
Abertura da Fenda	200 μm
Corrente	3 mA
Gás	ar/acetileno
tipo de chama	oxidante
Curva padrão	0 / 0,5 / 1 / 1,5 / 2 mg/L