

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

Érica Soares Barbosa

**Potencial de *Catharanthus roseus* para fitorremediação de metais em lodo de esgoto e
otimização de metodologia para especiação de cromo em lodo de esgoto**

**Montes Claros
2020**

Érica Soares Barbosa

Potencial de *Catharanthus roseus* para fitorremediação de metais em lodo de esgoto e otimização de metodologia para especiação de cromo em lodo de esgoto

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Produção Vegetal.

Orientador: Flaviano Oliveira Silvério

Coorientadora: Gevany Paulino de Pinho

Montes Claros
Fevereiro de 2020

Barbosa, Érica Soares.

B238p
2020

Potencial de *Catharanthus roseus* para fitorremediação de metais em lodo de esgoto e otimização de metodologia para especiação de cromo em lodo de esgoto / Érica Soares Barbosa. Montes Claros, 2020.
71 f. : il.

Tese (Doutorado) - Área de concentração em Produção Vegetal, Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Prof. Flaviano Oliveira Silvério.

Banca examinadora: Prof.^a Elka Fabiana Aparecida Almeida, Prof. Paulo Henrique Fidencio, Prof. Vico Mendes Pereira Lima, Prof. Douglas Lopes Cassimiro.

Inclui referências: f. 29-37, 51-53, 68-70.

1. Lodo de esgoto. 2. Fitorremediação. 3. Metais pesados. I. Silvério, Flaviano Oliveira (Orientador). II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 628.3

Érica Soares Barbosa

**Potencial de *Catharanthus roseus* para fitorremediação de metais em lodo de esgoto e
otimização de metodologia para especiação de cromo em lodo de esgoto**


Aprovado pela banca examinadora constituída pelos professores:

Dr. Paulo Henrique Fidencio
UFVJM

Dr. Vico Mendes Pereira Lima
IFNMG

Dr. Douglas Lopes Cassimiro
Unimontes

Dra. Elka Fabiana Aparecida Almeida
ICA/UFMG



Dr. Flaviano Oliveira Silvério
Orientador - ICA/UFMG

Montes Claros, 11 de fevereiro de 2020

DEDICO

Ao meu pai que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos, e que não terá a oportunidade de viver este momento. À minha mãe pelo exemplo de coragem e persistência. Ao meu marido pelo apoio e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor Deus pela oportunidade e conquista;

Aos Professores Flaviano Oliveira Silvério e Gevany Paulino de Pinho, pela orientação, por compartilhar conhecimentos e pela confiança;

Aos meus pais Lázaro e Belizária, meu marido Júnior, meus irmãos Matheus e Marcos pelo companheirismo, incentivo e paciência;

Aos professores que aceitaram o convite para participar da minha banca e disponibilizaram do seu tempo para contribuir com o conhecimento;

À Ane Cacique, Paulo, Paula e aos colegas de laboratório pela ajuda no trabalho e ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG) pela infra-estrutura e realização do trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro para que a pesquisa pudesse ser realizada;

A todos que de algum modo colaboraram para a conclusão dessa importante etapa da minha vida. Muito obrigada!

ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

1. BARBOSA, É. S.; CACIQUE, A. P.; DE PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. *Catharanthus roseus* potential for phyto-stabilizing metals in sewage sludge. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, p. 1-7, 2019. DOI 10.1080/10934529.2019.1680059
2. BARBOSA, É. S.; CACIQUE, A. P.; DE PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Optimization of methodology for simultaneous determination of chromium(III) and chromium(VI) in sewage sludge samples by HPLC-ICP-MS/MS. Enviado a **Journal of the Brazilian Chemical Society**

RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS E CONGRESSOS

1. SICUPIRA, L. C.; BARBOSA, É. S.; PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Avaliação de uma nova estratégia para quantificação de PCDD/Fs por ICP-MS/MS em amostras aquosas. In: XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química XXXII ERSBQ-MG, 2018, Juiz de Fora.
2. RAMALHO, M. B.; BARBOSA, É. S.; CACIQUE, A. P.; TIAGO, J. P. F.; TEIXEIRA, V. S.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P. Miniaturização do método de digestão para quantificação de Fe, Cu, Zn, Ca e Mg em plantas medicinais por absorção atômica. In: 11º Fórum De Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG), 2017.
3. TIAGO, J. P. F.; CACIQUE, A. P.; BARBOSA, É. S.; RAMALHO, M. B.; TEIXEIRA, V. S.; SILVÉRIO, F. O.; PINHO, G. P. Prospecção do uso de lodo de esgoto e terra diatomácea como substrato para germinação de *Catharanthus roseus*. In: 11º Fórum De Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG), 2017.
4. TIAGO, J. P. F.; CACIQUE, A. P.; BARBOSA, É. S.; RAMALHO, M. B.; TEIXEIRA, V. S.; PINHO, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Eficiência do extrator Mehlich-I para quantificação de fósforo em diferentes tipos de solos. In: 11º Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG), 2017.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. Workshop sobre aplicações em ICP-MS/MS. Palestra: Quantificação multielementar de metais pesados por ICP-MS/MS. 2018. (Encontro).

APRESENTAÇÃO

Esta tese está organizada em uma introdução geral, seguida por três capítulos e as considerações finais.

No primeiro capítulo, preparamos uma revisão de literatura concisa, porém que contemplasse todos os temas do estado da arte estudados e discutidos nesta pesquisa. Durante sua elaboração, tivemos sempre o cuidado de preparar o leitor para compreender as metodologias, os termos científicos e, principalmente, os resultados obtidos.

No segundo capítulo é apresentado o estudo detalhado envolvendo a fitorremediação de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Neste estudo, conseguimos mostrar o potencial de fitorremediação dessa espécie vegetal, bem como seu desenvolvimento morfológico. Este capítulo é referente ao primeiro artigo publicado no doutorado.

No terceiro capítulo é apresentado a otimização de um método para determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em amostra de lodo de esgoto. Para isso, foram discutidas as etapas de otimização, validação, comparação entre métodos de extração e aplicação em amostra real. Este estudo é referente ao segundo artigo produzido durante o doutorado. Concluímos a escrita da tese com as considerações finais.

Potencial de *Catharanthus roseus* para fitorremediação de metais em lodo de esgoto e otimização de metodologia para especiação de cromo em lodo de esgoto

RESUMO

O lodo de esgoto é um subproduto gerado nas estações de tratamento de efluentes e tem sido utilizado como condicionador e fertilizante de solos. Entretanto, o lodo também pode apresentar contaminantes inorgânicos e orgânicos, por isso, o uso de técnicas como a fitorremediação tem sido uma alternativa econômica e ecológica para reaproveitar e descontaminar o lodo. Neste contexto, surge *Catharanthus roseus* (L.) G. Don que é uma planta ornamental e medicinal, mas que também apresenta tolerância a diferentes tipos de estresses ambientais. Dessa forma, a primeira parte deste trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de *C. roseus* para fitorremediação de As, Ba, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Se e Zn em substrato a base de lodo de esgoto. Para isso, foi avaliado os fatores de bioconcentração (FB) e translocação (FT), após o cultivo de *C. roseus* em lodo:vermiculita (70:30%) e em substrato comercial (100%) em vasos na casa de vegetação por 108 dias. Os resultados mostraram que *C. roseus* apresentou FB superior a 1 para Cd, Cu e Zn no lodo de esgoto, indicando que a planta foi fitoestabilizadora para estes metais. O FT foi superior a 1 para Ba, Cd, Cu, Ni, Se e Zn no tratamento controle, mostrando que para estes metais a planta foi fitoextratora. Portanto, pode-se afirmar que *C. roseus* é uma alternativa econômica e ecológica para a remediação de metais. Além disso, foi verificado o desenvolvimento morfológico superior da planta cultivada no tratamento com lodo. Apesar de *C. roseus* ter extraído menos de 11% do cromo nos substratos, é importante o estudo das espécies químicas desse metal no lodo. Isso se justifica pelo cromo ser comum em amostras de lodo e, por ser considerado carcinogênico e mutagênico para saúde humana quando se encontra no estado de oxidação (VI). Entretanto vale destacar que, são poucas as metodologias utilizadas para determinar essa espécie de cromo no lodo de esgoto. Por isso, a segunda parte do trabalho teve como objetivo otimizar e validar uma metodologia para extração e análise simultânea de Cr(III) e Cr(VI) por HPLC-ICP-MS/MS em amostras de lodo. A metodologia otimizada foi baseada na extração sólido-líquido assistida por microondas e na extração sólido-líquido convencional. Foram avaliados a composição da fase extratora, modo de homogeneização, tempo e temperatura, sendo os extratos analisados por absorção atômica. A especiação foi realizada em HPLC-ICP-MS/MS com o extrato obtido pelo método desenvolvido. A porcentagem de extração de cromo disponível foi comparada com o método EPA 1311. Os resultados mostram que a extração deve ocorrer usando fase extratora constituída por EDTA a 50 mmol L⁻¹ em pH 9,5, sob agitação a 50 °C por 16 h. Essas condições permitiram atingir 82% de recuperação do cromo e desvio padrão relativo inferior a 10%. Na especiação por HPLC-ICP-MS/MS foi detectado apenas o Cr(III) e, foi verificado que a composição química do lodo promove a redução de Cr(VI) a Cr(III). O método de extração de cromo otimizado foi mais eficiente que o método de referência para determinação do cromo disponível em lodo de esgoto.

Palavras-chave: Biossólido. Contaminantes inorgânicos. Remediação. Vinca. Especiação. Redução.

***Catharanthus roseus* potential for phytoremediation metals in sewage sludge and optimization of methodology for speciation of chromium in sewage sludge**

ABSTRACT

The sewage sludge is a by-product generated in wastewater treatment plants and has been used as a conditioner and soil fertilizer. However, sludge can also present inorganic and organic contaminants, so the use of techniques such as phytoremediation has been an economic and ecological alternative to reuse and decontaminate sludge. In this context, *Catharanthus roseus* (L.) G. Don arises which is an ornamental and medicinal plant, but also tolerates different types of environmental stress. Thus, the first part of this paper aimed to evaluate the potential of *C. roseus* for phytoremediation of As, Ba, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Se and Zn in substrate based on sewage sludge. For this, bioconcentration (FB) and translocation (FT) factors were evaluated after *C. roseus* cultivation in sludge:vermiculite (70:30%) and in commercial substrate (100%) in pots in the greenhouse for 108 days. The results showed that *C. roseus* presented FB greater than 1 for Cd, Cu and Zn in the sewage sludge, indicating that the plant was a phytostabilizer for these metals. The TF was greater than 1 for Ba, Cd, Cu, Ni, Se and Zn in the control treatment, showing that for these metals the plant was phytoextractor. Therefore, it can be stated that *C. roseus* is an economical and ecological alternative for metal remediation. In addition, the superior morphological development of the cultivated plant in the sludge treatment was verified. Although, the *C. roseus* extracted less than 11% of chromium from substrates, it is important to study the chemical species of this metal in sludge. This is justified by the fact that chromium is common in sludge samples and is considered carcinogenic and mutagenic to human health when in the oxidation state (VI). However, it is worth mentioning that there are few methodologies used to determine this species of chromium in sewage sludge. Therefore, the second part of the work aimed to optimize and validate a methodology for simultaneous extraction and analysis of Cr(III) and Cr(VI) by HPLC-ICP-MS/MS in sludge samples. The optimized methodology was based on microwave-assisted solid-liquid extraction and conventional solid-liquid extraction. The composition of the extraction phase, homogenization mode, time and temperature were evaluated, and the extracts were analyzed by atomic absorption. The speciation was carried out in HPLC-ICP-MS/MS with the extract obtained by the developed method. The percentage of chromium extraction available was compared with the EPA 1311 method. The results show that the extraction must occur using the extraction phase consisting of EDTA to 50 mmol L⁻¹ in pH 9.5, under agitation by 50 °C for 16 h. These conditions allowed achieving 82% of chrome recovery and relative standard deviation of less than 10%. In speciation by HPLC-ICP-MS/MS was detected only Cr(III), it was verified that the chemical composition of the sludge promotes the reduction of Cr(VI) to Cr(III). The optimized chromium extraction method was more efficient than the reference method for determining available chromium in sewage sludge.

Keywords: Biosolid. Inorganic contaminants. Remediation. Vinca. Speciation. Reduction.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

3 REVISÃO DE LITERATURA	17
Figura 1 – Sistema de acoplamento HPLC-ICP-MS/MS para técnicas de especiação, considerando: a) coluna cromatográfica do HPLC, b) primeiro quadrupolo do ICP (Q1), c) cela colisão/reação e d) segundo quadrupolo (Q2).....	23
Figura 2 – Fotografias de <i>Catharanthus roseus</i> , considerando: (a) raiz, (b) flores, (c) frutos, (d) folhas e (e) caules.	29
4.1 Artigo 1- Potencial de <i>Catharanthus roseus</i> para fitoestabilização de metais em lodo de esgoto	38
Figura 1. Ensaio de retenção de água nas proporções de lodo e vermiculita 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 e 100%, respectivamente.	44
Figura 2. Fotografias de <i>C. roseus</i> , a) após 30 dias de cultivo em lodo:vermiculita e em b) substrato comercial (controle); c) após 90 dias de cultivo em lodo:vermiculita e em d) substrato comercial (controle).....	46
Figura 3. Avaliações morfológicas de <i>C. roseus</i> no período de 30 a 108 dias de cultivo em lodo:vermiculita, e no substrato comercial (controle), considerando: a) altura, b) número de folhas e c) diâmetro do caule e d) massa fresca.....	47
Figura 4. Fatores de a) bioconcentração (FB) e de b) translocação (FT) de metais em <i>C. roseus</i> cultivada em substrato comercial (controle) e em lodo de esgoto:vermiculita.....	49
4.2 Artigo 2- Otimização de metodologia para determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS	54
Figura 1. Porcentagem de recuperação de Cr(III) em amostras de lodo usando quatro fases extratoras na extração por micro-ondas.....	62
Figura 2. Porcentagem de recuperação de Cr(III) e Cr(VI) usando cinco tipos de homogeneização da amostra com a fase extratora constituída pela solução de EDTA em pH 9,5.....	62
Figura 3. Porcentagem de recuperação de Cr(III) e Cr(VI) em amostras de lodo usando quatro tempos de extração em banho-maria com agitação.....	63
Figura 4. Porcentagem de recuperação de Cr em amostras de lodo usando três temperaturas para a extração em banho-maria por 16 h.....	64
Figura 5. Cromatogramas da solução padrão contendo Cr(III) e Cr(VI), a 50 µg L ⁻¹ preparada na fase móvel (A) e do extrato de lodo de esgoto obtido nas condições de extração otimizadas (B).....	65
Figura 6. Cromatogramas dos extratos obtidos a partir da fortificação das amostras de lodo com uma espécie de Cr a 6,25 mg kg ⁻¹ , sendo Cr(III) (A) e Cr(VI) (B).....	65
Figura 7. Cromatograma da solução padrão contendo Cr(III) e Cr(VI) a 50 µg L ⁻¹ , a qual foi submetida ao método de extração otimizado sem a presença de lodo de esgoto.....	66

Figura 8. Curva de calibração de soluções padrões contendo Cr(III) na faixa de concentração de 0,20 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e quantificação por ICP-MS/MS.....67

LISTA DE TABELAS

3 REVISÃO DE LITERATURA	17
Tabela 1 - Concentrações máximas permitidas de substâncias inorgânicas em lodo de esgoto estabelecidas pelo CONAMA e pela Diretiva europeia (EEC).....	18
Tabela 2 - Comparação de métodos para a determinação de espécies de cromo em diferentes matrizes.....	20
4.1 Artigo 1- Potencial de <i>Catharanthus roseus</i> para fitoestabilização de metais em lodo de esgoto	38
Tabela 1. Propriedades físico-químicas e concentração de metais totais do lodo de esgoto e do substrato comercial usados neste experimento.....	41
Tabela 2. Concentração (mg kg^{-1}) dos metais no extrato de lixiviação dos substratos quantificados por ICP-MS/MS.....	45
Tabela 3. Concentração (mg kg^{-1}) de metais nas folhas, caule e raiz de <i>C. roseus</i> quantificados por ICP-MS/MS nos dois tratamentos.....	48
4.2 Artigo 2- Otimização de metodologia para determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS	54
Tabela 1. Características do lodo de esgoto.....	58
Tabela 2. Parâmetros avaliados na otimização da extração de Cr(III) e Cr(VI) em amostras de lodo de esgoto.....	59
Tabela 3. Resultados da validação do método de extração de Cr(III) em de lodo de esgoto por ICP-MS/MS.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo Geral.....	16
2.2 Objetivos Específicos	16
3 REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1 Lodo de esgoto.....	17
3.2 Contaminantes inorgânicos em lodo de esgoto	17
3.3 Cromo(III) e cromo(VI).....	18
3.4 Comportamento do cromo em matrizes ambientais	18
3.5 Técnicas de especiação de Cr(III) e Cr(VI)	19
3.6 Métodos de extração de Cr(III) e Cr(VI)	21
3.7 Análises de Cr(III) e Cr(VI)	22
3.7.1 Análises por HPLC-ICP-MS/MS.....	23
3.8 Remediação	24
3.8.1 Fitorremediação.....	25
3.9 Plantas Fitorremediadoras	27
3.10 <i>Catharanthus roseus</i> (L.) G. Don	28
3.11 Referências	29
4 ARTIGOS	38
4.1 Artigo 1- Potencial de <i>Catharanthus roseus</i> para fitoestabilização de metais em lodo de esgoto	38
Resumo	39
Introdução.....	40
Materiais e Metodologia	40
Resultados e Discussão	44
Conclusão.....	50
Referências	51
4.2 Artigo 2- Otimização de metodologia para determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS.....	54
Resumo	55
Introdução.....	56
Experimental.....	57
Resultados e Discussão	61
Conclusões	68
Referências	68
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	71

1 INTRODUÇÃO

O lodo de esgoto é um resíduo proveniente das estações de tratamento de efluentes e pode ser utilizado como condicionador e fertilizante de solos, pois, possui composição físico-química com características favoráveis para o crescimento das plantas (BONDARCZUK; MARKOWICZ; PIOTROWSKA-SEGET, 2016). No entanto, para utilizar o lodo em culturas vegetais é importante conhecer a procedência e a composição química desse biossólido, pois ele também pode apresentar diferentes tipos de contaminantes como metais, patógenos e poluentes orgânicos que em determinadas concentrações podem contaminar o solo e entrar na cadeia alimentar (COLLARD; TEYCHENÉ; LEMÉE, 2017).

Para evitar esses problemas, quando o lodo de esgoto apresenta em sua composição elevadas concentrações de contaminantes, este pode ser submetido às técnicas de remediação (ANJOS; SÁNCHEZ; BERTOLINO, 2012). Dentre essas técnicas, podemos destacar o uso de produtos químicos para reagir com os contaminantes e evitar a mobilidade e disponibilidade para outros locais. Entretanto, essa prática agrega custo de aquisição dos reagentes (WUANA; OKIEMEN, 2011).

Por outro lado, uma remediação mais econômica e menos agressiva ao ambiente pode ser realizada empregando plantas. Este processo é denominado fitorremediação e, as espécies vegetais devem ser tolerantes aos contaminantes alvos e às outras condições que podem gerar estresse durante seu cultivo (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2016).

Neste contexto, o cultivo de plantas ornamentais visando a remediação de contaminantes tem sido uma alternativa mais segura, pois não são destinadas ao consumo humano (LIU *et al.*, 2017). *Catharanthus roseus* (L.) G. Don é uma espécie ornamental que tem apresentado características favoráveis ao processo de fitorremediação, pois sobrevive em condições ambientais adversas (NEJAT *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018).

Dos contaminantes que podem ser remediados no lodo de esgoto, os metais estão entre os mais comuns de serem detectadas nesse resíduo (CHARLTON *et al.*, 2016). Nesse sentido, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu através da Resolução nº 375, a concentração máxima permitida de onze metais no lodo (CONAMA, 2006). Nessa Resolução a concentração máxima permitida de cada metal se refere à forma total extraída e quantificada no lodo de esgoto.

Todavia, a concentração máxima permitida de cromo total no lodo determinada pela Resolução brasileira é 1000 mg kg^{-1} . Este valor pode ser considerado elevado quando se considera a presença e toxicidade do cromo no estado de oxidação (VI). Vale destacar que, ainda não existem Resoluções no Brasil que estabelecem os níveis permitidos de Cr(III) e Cr(VI) nessa matriz. Isso reforça a importância de estudar metodologias que permitam o monitoramento destas espécies químicas de cromo no lodo de esgoto.

O método para determinação da concentração do Cr(VI) em amostras de lodo de esgoto, solos e sedimentos é definido pela agência de proteção ambiental americana (EPA) através do protocolo EPA 3060 A. Este método utiliza uma fase extratora alcalina para extrair o Cr(VI) e precipitar o Cr(III). Nesta metodologia, a quantificação do Cr(VI) extraído é realizada por espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP). Já no método EPA 1311 é utilizada uma fase extratora ácida para obter a concentração de cromo que é disponível nos resíduos sólidos e líquidos. Entretanto, não existem

metodologias para extração e análise simultânea de Cr(III) e Cr(VI) no lodo de esgoto. Essa determinação simultânea tem como vantagens a quantificação das espécies de cromo no extrato de lodo em uma única análise, menor número de etapas no preparo de amostras e maior rapidez na execução da análise.

Dessa forma, este estudo teve como objetivos avaliar o potencial de *C. roseus* como espécie fitorremediadora de As, Ba, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Se e Zn em substrato a base de lodo de esgoto e, posteriormente, otimizar e validar uma metodologia para extração e quantificação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) por HPLC-ICP-MS/MS em lodo de esgoto.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o potencial de *C. roseus* para fitorremediação de As, Ba, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Se e Zn em substrato a base de lodo de esgoto e otimizar e validar uma metodologia para extração e análise simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial de *C. roseus* para fitorremediação dos metais descritos na Resolução n° 375 do CONAMA em substratos a base de lodo de esgoto;
- Otimizar e validar uma metodologia para extração e especiação simultânea de Cr(III) e Cr (VI) em lodo de esgoto;
- Utilizar o método de determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) otimizado para identificar a espécie de cromo presente e disponível na amostra de lodo de esgoto coletado em Montes Claros.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Lodo de esgoto

As Estações de Tratamento de Efluentes (ETEs) têm sido o principal caminho empregado no tratamento e gerenciamento de efluentes industriais, residenciais e hospitalares. Nas ETEs, os efluentes são tratados e o resíduo sólido gerado deste processo é denominado lodo de esgoto ou biossólido (PENA *et al.*, 2008).

Em geral, o lodo de esgoto é constituído por elevado teor de matéria orgânica, como proteínas, polissacarídeos, celulose, hemicelulose, lipídios, ácidos orgânicos, e espécies inorgânicas: íons metálicos e silicatos (FYTILI; ZABANIOTOU, 2008; COLLARD; TEYCHENÉ; LEMÉE, 2017).

Esse material pode ser: depositado em aterro sanitário; reutilizado para fabricação de tijolos, cerâmica e cimento; incinerado e utilizado na recuperação de solos degradados (CHEN; KUO, 2016; LU; ZHOU; HE, 2019).

Entretanto, antes da disposição em solos, é necessário que o lodo de esgoto atenda às legislações ambientais, a fim de evitar problemas à saúde pública e ao meio ambiente (CONAMA 375/2006; Lei nº 12.305/2010, capítulo II, artigo 3º).

3.2 Contaminantes inorgânicos em lodo de esgoto

Os principais contaminantes inorgânicos quantificados no lodo de esgoto tem sido o arsênio, cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco (CAMARGO *et al.*, 2018). Esses metais podem ser oriundos de fertilizantes, agrotóxicos, combustão de carvão e óleo, emissões veiculares, mineração, fundição, refinamento e incineração de resíduos urbanos e industriais (TAVARES; CARVALHO, 1992).

Por isso, as agências regulamentadoras, como o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a Directiva europeia, têm estabelecido as concentrações máximas permitidas das substâncias inorgânicas no lodo de esgoto ou produto derivado. Na Tabela 1, estão representadas as concentrações máximas permitidas desses contaminantes que são estabelecidas por esses órgãos.

Tabela 1- Concentrações máximas permitidas de substâncias inorgânicas em lodo de esgoto estabelecidas pelo CONAMA e pela Diretiva europeia (EEC).

Substância inorgânica	Concentração máxima permitida (mg kg ⁻¹)	
	CONAMA 375/2006	86/278/EEC
Arsênio	41	-
Bário	1300	-
Cádmio	39	20 - 40
Chumbo	300	750 - 1 200
Cobre	1500	1000 - 1750
Cromo	1000	-
Mercúrio	17	16 - 25
Molibdênio	50	-
Níquel	420	300 - 400
Selênio	100	-
Zinco	2800	2500 - 4000

Dentre esses metais, um dos mais freqüentes de serem detectados em lodo de esgoto tem sido o cromo, em virtude dos descartes de curtumes, tintas, galvanização e tratamento de madeira (CHOPPALA *et al.*, 2018; SÉBY; VACCHINA, 2018).

3.3 Cromo(III) e cromo(VI)

O cromo é um metal comum de ser encontrado no ambiente na forma trivalente (Cr(III)) e hexavalente (Cr(VI)). O Cr(III) é a espécie química essencial para a saúde humana, pois, em pequenas concentrações, é considerado importante para o metabolismo glicídico animal (YANNI *et al.*, 2018).

O Cr(VI) é a forma mais tóxica e pode causar nos humanos dermatites, úlceras, danos ao fígado, rins, coração e órgãos reprodutivos, e, em situações agravantes pode desencadear efeitos mutagênicos e carcinogênicos (NICKENS *et al.*, 2010).

Considerando a toxicidade do Cr(VI), a legislação brasileira estabelece limites máximos aceitáveis dessa espécie química em produtos alimentícios e água potável, sendo as concentrações limites de 0,10 mg kg⁻¹ e 0,05 mg L⁻¹, respectivamente (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005). Entretanto, no Brasil, ainda são estabelecidos os limites admissíveis de Cr(VI) em matrizes destinadas à agricultura, como solos e lodo de esgoto.

3.4 Comportamento do cromo em matrizes ambientais

A mobilidade e a disponibilidade das espécies de cromo em matrizes ambientais dependem de propriedades do meio como: o pH, composição da matéria orgânica, capacidade de troca catiônica e estado de oxidação (CHOPPALA *et al.*, 2018). O Cr(III) é pouco solúvel, nas condições ambientais, e pode ser encontrado nas águas naturais, ligado a complexos orgânicos (UNCETA *et al.*, 2010). Além disso, é mais estável no meio ambiente, pois não são comuns os oxidantes naturais dessa espécie. O

óxido de manganês é o composto mais eficaz para oxidar o Cr(III) em matrizes ambientais. Por sua vez, o Cr(VI) pode ser facilmente reduzido a Cr(III) por diferentes agentes, como o Fe(II), fosfato, sulfeto e matéria orgânica (SÉBY; VACCHINA, 2018).

Nesse sentido, a quantidade de Cr(VI) pode ser minimizada por processos de redução que ocorrem naturalmente. Nessa reação, a matéria orgânica atua como importante redutor do Cr(VI), devido aos grupos funcionais e microrganismos que doam elétrons para reduzir e, conseqüentemente, reter o cromo no solo (CHOPPALA *et al.*, 2018).

A redução microbiana do Cr(VI) é realizada pela ação de bactérias, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas putida*, *Paracoccus denitrificans* e *Bacillus subtilis*. Além disso, essa reação também pode ocorrer pela biorredução de Fe(III) pela matéria orgânica. Em tal processo, o Fe(II) presente no meio reduz o Cr(VI) e o Fe(III) proveniente dessa reação é novamente reduzido a Fe(II) pelos doadores de elétrons presentes na matéria orgânica (DING *et al.*, 2016). Estudos com materiais fonte de matéria orgânica, como o esterco bovino, têm sido desenvolvidos para reduzir o Cr(VI) a Cr(III) em solos contaminados, como tratamento de baixo custo e longo prazo (DING *et al.*, 2016; CHOPPALA *et al.*, 2018).

Vale ressaltar que, mesmo na presença de matrizes ricas em matéria orgânica e ferro, o Cr(VI) foi quantificado em trabalhos anteriores nesses tipos de amostras. Em estudo realizado com chás pretos preparados em água fervida, foram obtidas concentrações inferiores a $3,15 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr(VI) após extração alcalina com Na_2CO_3 (MANDIWANA; PANICHEV; PANICHEVA, 2011). Essa espécie química de cromo também foi quantificada em concentrações inferiores a $4,30 \text{ mg kg}^{-1}$ em amostras de lodo de esgoto seco ($90 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 h) após extração em meio básico (NaOH e Na_2CO_3), seguida por neutralização com CH_3COOH (SPANOS; ENE; KARADJOVA, 2015). Em outro estudo, as espécies de Cr(III) e Cr(VI) foram analisados em extratos alcalinos de solos orgânicos, que apresentaram 5,4-10% de matéria orgânica e 6-14,2 mg g^{-1} de ferro, e foram quantificados uma média de $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr(VI) e $0,48 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cr(III) (LEŚNIEWSKA; GODLEWSKA-ZYŁKIEWICZ, 2019).

3.5 Técnicas de especiação de Cr(III) e Cr(VI)

A especiação química de metais é conhecida como o processo que permite quantificar um elemento químico nos diferentes estados de oxidação presente em uma amostra, por exemplo, o Cr(III) e o Cr(VI) (SÉBY; VACCHINA, 2018). A especiação do metal pode ocorrer durante a etapa de extração ou na etapa de análise química.

Quando a especiação ocorre na etapa de extração, cada espécie química é extraída e quantificada separadamente (KRUGER *et al.*, 2017). No entanto, quando a especiação ocorre na análise química, todas as espécies presentes do elemento químico são extraídas simultaneamente e, são separadas, geralmente, por análise cromatográfica (MARKIEWICZ *et al.*, 2015). Os principais métodos de especiação de cromo em matrizes ambientais podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2- Comparação de métodos para a determinação de espécies de cromo em diferentes matrizes.

Método	Espécie	Método de extração	Técnica de análise	Matriz	Referência
1	Cr(III)	Extração em fase sólida	AAS ^a	Águas residuais e do mar	FILIK <i>et al.</i> , 2003
2	Cr(III)	Extração em fase sólida	AAS	Água de torneira e rio	CHANG <i>et al.</i> , 2012
3	Cr(VI)	NH ₄ OH em pH 11 e 1 h de banho ultrassônico	HPLC-ICP-MS ^b	Alimentos	VACCHINA <i>et al.</i> , 2015
4	Cr(III)/Cr(VI)	EDTA 50 mmol L ⁻¹ em pH 11 e chapa de aquecimento, 95 °C por 60 min	HPLC-ICP-MS	Suplementos alimentares	UNCETA <i>et al.</i> , 2016
5	Cr(III)/Cr(VI)	Na ₂ CO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ e agitação por 16 h	AAAE ^c	Solos orgânicos	LEŚNIEWSKA <i>et al.</i> , 2017
6	Cr(VI)/Cr(III)	EDTA 50 mmol L ⁻¹ em pH 10 e micro-ondas a 110 °C por 5 min	HPLC-ICP-MS	Solos	WOLLE <i>et al.</i> , 2014
7	Cr(III)/Cr(VI)	EDTA 50 mmol L ⁻¹ em pH 10 e micro-ondas a 80 °C por 5 min	HPLC-ICP-MS	Solos	GUIDOTTI <i>et al.</i> , 2015
8	Cr(VI)	Na ₂ CO ₃ 0,1 mol L ⁻¹ e 50 min de banho ultrassônico	HPLC-ICP-MS/MS	Solos	LEŚNIEWSKA <i>et al.</i> , 2019
9	Cr(VI)	Água e agitação por 2 h	HPLC - AAS	Lodos	MILACIC; SCANCAR; 2000
10	Cr(VI)	NaOH/Na ₂ CO ₃ 0,5 mol L ⁻¹ e agitação por 3 h.	AAAE	Lodos	SPANOS <i>et al.</i> , 2015
11	Cr(VI)	Na ₂ CO ₃ 0,28 mol L ⁻¹ , NaOH 0,5 mol L ⁻¹ , MgCl ₂ , tampão K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ a 92,5 °C	ICP-OES ^d	Lodos, cinzas, sedimentos e fertilizantes	KRUGER <i>et al.</i> , 2017

Notas: a. AAS – Espectroscopia de absorção atômica; b. HPLC-ICP-MS – Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado; c. AAEE- Absorção atômica com atomização eletrotérmica; d. ICP-OES - Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente.

Como pode ser observado na Tabela 2, nos métodos 1, 2, 5, 10 e 11, a especiação foi realizada durante a extração, pois as condições utilizadas permitiram obter apenas uma espécie química no extrato e a quantificação foi realizada por uma técnica não seletiva, para determinar espécies químicas, como o espectrofotômetro de absorção atômica (AAS).

No método 4, a especiação também foi realizada na etapa de extração, entretanto, as amostras foram fortificadas separadamente com cada espécie de cromo e a quantificação foi realizada por AAS. Esse procedimento foi utilizado para avaliar diferentes fases extratoras na recuperação de Cr(III) e Cr(VI) em amostras de solos (Tabela 2).

Nos métodos 6, 7 e 9, da Tabela 2, a especiação de Cr(III) e Cr(VI) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detecção em espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP) ou AAS. Nesses métodos, a especiação ocorreu durante a separação cromatográfica.

Trabalhos recentes têm adotado a especiação tanto na etapa de extração, quanto na quantificação. Esse procedimento permite confirmar a presença das espécies nos extratos obtidos, como demonstrado nos métodos 3 e 8 (Tabela 2).

3.6 Métodos de extração de Cr(III) e Cr(VI)

Para a extração de Cr(III) e Cr(VI), o pH da fase extratora tem sido um dos principais parâmetros a serem monitorados, pois, em meio alcalino, o Cr(VI) é estável e em fases extratoras, com pH superior a 10, ocorre a precipitação do Cr(III). Isso possibilita a separação das espécies de cromo por filtração e é o tipo de especiação mais adotado para a separação de Cr(III) e Cr(VI) (KRUGER *et al.*, 2017).

Esse procedimento é recomendado pela Agência de Proteção Ambiental americana (US EPA) e pela União Europeia, por meio dos métodos de referência EPA 3060A (1996) e a DIN EN 15192 (2006), para monitoramento de Cr(VI) em lodo de esgoto, respectivamente. Nesses métodos, tem sido realizados a hidrólise alcalina em pH superior a 11,5 sob agitação em chapa de aquecimento a 95 °C, semelhante ao método 11 da Tabela 2.

Em soluções com pH entre 4 e 12, o Cr(III) apresenta pouca solubilidade, por isso, as principais fases extratoras alcalinas apresentam em sua composição o ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico diidratado, EDTA, para a formação do complexo solúvel [Cr-EDTA]. A reação entre o Cr(III) e o EDTA pode ocorrer em até 6,5 h, e, por isso, tem sido acelerada empregando etapas de aquecimento entre 40 e 80 °C (JEN *et al.*, 1993; AGUILAR *et al.*, 2008). A extração que utiliza esse tipo de fase extratora tem como vantagens: evitar a redução do Cr(VI) e extrair o Cr(III) disponível (GUIDOTTI *et al.*, 2015).

Em meio ácido, o Cr(III) é bastante estável e, por isso, as extrações têm sido realizadas simulando a disponibilidade de cromo em condições de contaminação, denominado Cr(III) e Cr(VI) bioacessíveis. Nesse procedimento, essas espécies de cromo são extraídas utilizando uma fase extratora constituída por solução de HCl a 70 mmol L⁻¹ sob aquecimento a 37 °C por 1 h (ISO 8124-3, 2010).

Por sua vez, a determinação das concentrações de Cr(III) e Cr(VI) disponíveis por lixiviação é definida pelo método EPA 1311 (1992). Em tal método, a extração é realizada empregando uma fase

extratora com pH = 2,88, constituída por solução de ácido acético, e agitação por 18 h em temperatura ambiente. Nessas condições, a fase extratora simula as condições da chuva ácida.

A extração de cromo em meio muito ácido, seguida de aquecimento, é conhecida como digestão e é utilizada para quantificação dos metais totais em diferentes matrizes (CUELLO *et al.*, 2016). As digestões recomendadas pelos protocolos EPA 3050B e EPA 3051A utilizam ácidos concentrados e aquecimento superior a 90 °C, para digerir a matriz orgânica e obter a concentração máxima dos metais disponíveis em solos, sedimentos e lodos. No entanto, esse procedimento não é adequado para a extração das espécies de cromo, pois pode ocorrer a redução do Cr(VI) a Cr(III), devido à elevada acidez do meio e das condições mais severas de temperatura (VACCHINA; DE LA CALLE; SÉBY, 2015).

3.7 Análises de Cr(III) e Cr(VI)

A determinação da concentração de Cr(III) e Cr(VI) em matrizes ambientais pode ser realizada através de espectroscopia de absorção molecular (Uv-vis), AAS, ICP-MS, ICP-MS/MS e ICP-OES (SÉBY; VACCHINA, 2018).

As análises por Uv-vis, geralmente, são utilizadas para quantificar Cr(VI) em 540 nm. Na supracitada metodologia, o Cr(VI) reage inicialmente com difenilcarbazida em meio ácido formando um complexo que apresenta coloração violeta. Essa metodologia é sugerida pelo protocolo EPA 7196A, para quantificar Cr(VI) em matrizes sólidas (1992). As análises realizadas por esse método apresentam praticidade, entretanto, os limites de detecção são elevados, em geral na ordem de g L^{-1} (UNCETA *et al.*, 2010).

Já as análises empregando o AAS são mais utilizadas para a determinação da concentração de cromo total ou de uma única espécie obtida por especificação realizada no método de extração (HABILA *et al.*, 2015). Em geral, a análise tradicional emprega o uso do AAS no modo chama e consegue atingir concentrações de cromo na faixa de parte por milhão (ppm ou mg L^{-1}). A utilização de tubo de grafite e aquecimento elétrico permite atingir faixas de trabalho em parte por bilhão (ppb ou $\mu\text{g L}^{-1}$) (UNCETA *et al.*, 2010).

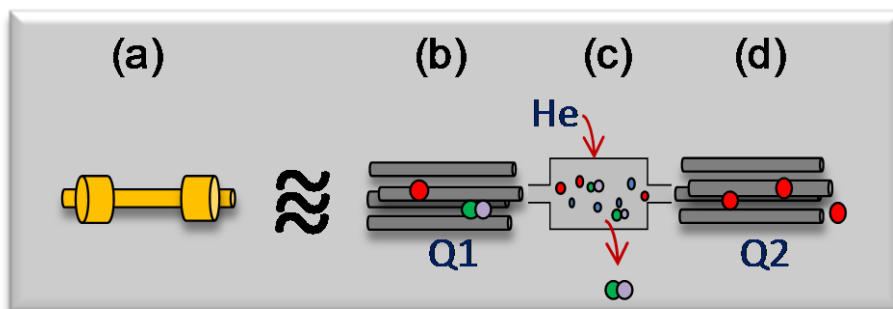
Para atingir níveis mais baixos de concentração de cromo, tem sido necessário o emprego do espectrômetro de massas por plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) ou o ICP com dois quadropolos (MS/MS). Esses equipamentos permitem detectar tais metais em parte por trilhão (ppt ou ng L^{-1}) (CHOJNACKA; MIKULEWICZ, 2019).

Por isso, nos últimos anos, tem se observado vários trabalhos analíticos empregando o cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC) acoplado ao ICP-MS e ICP-MS/MS (VACCHINA; DE LA CALLE; SÉBY, 2015; LEŚNIEWSKA; GODLEWSKA-ZYŁKIEWICZ, 2019), para determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI). Esse acoplamento tem permitido a realização da especificação alinhada à elevada sensibilidade desses detectores (SÉBY; VACCHINA, 2018).

3.7.1 Análises por HPLC-ICP-MS/MS

O emprego do HPLC permite que o Cr(III) e Cr(VI) sejam separados na coluna cromatográfica e, conseqüentemente, cheguem ao detector (ICP-MS/MS) em momentos distintos (ARAUJO-BARBOSA *et al.*, 2017). Um esquema do referido acoplamento pode ser observado na Figura 1.

Figura 1– Sistema de acoplamento HPLC-ICP-MS/MS para técnicas de especiação, considerando: a) coluna cromatográfica do HPLC, b) primeiro quadrupolo do ICP (Q1), c) cela colisão/reação e d) segundo quadrupolo (Q2).



Fonte: Da autora.

Em geral, colunas de fase reversa como a sílica revestida com octil (C8) ou octadecil (C18) podem ser empregadas para a separação de Cr(III) e Cr(VI) (ARAUJO-BARBOSA *et al.*, 2017; LEŚNIEWSKA; GODLEWSKA-ZYŁKIEWICZ, 2019). Quando essas colunas cromatográficas são utilizadas, é necessário o uso de íons pareadores na fase móvel, como o tetrabutilamônio, para que ocorra maior interação entre fase estacionária e o analito (PIMENTA *et al.*, 2019). Em contrapartida, em colunas de troca iônica, esta interação ocorre de forma direta e efetiva entre os analitos e a fase estacionária (AGUILAR *et al.*, 2008).

Para que ocorra a interação efetiva entre os íons de Cr(III) e Cr(VI) com o tetrabutilamônio ou com a coluna de troca aniônica, essas espécies de cromo devem estar com cargas negativas em solução. Por isso, em geral, o Cr(VI) é analisado na forma de HCrO_4^- ou CrO_4^{2-} (SÉBY; VACCHINA, 2018) e o Cr(III) é analisado na forma do complexo $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$ (UNCETA *et al.*, 2016).

Após a etapa de separação cromatográfica, as supracitadas espécies de cromo chegam ao sistema de detecção, o ICP-MS/MS (Figura 1-b,c,d). Esse detector é constituído por dois quadrupolos, denominado de Q1 e Q2, e por uma cela na qual pode ocorrer a colisão ou reação (Figura 1-b,c,d) (FU; SHI; CHEN, 2018). Quando os analitos chegam no Q1, o equipamento é ajustado para permitir a passagem apenas das espécies químicas com razão massa/carga (m/z) desejada, no caso do cromo, a razão m/z é 52.

Entretanto, as amostras ambientais podem apresentar vários interferentes com essa mesma massa, chamados de interferentes isobáricos (WALKNER *et al.*, 2017). Por isso, as espécies de cromo e os interferentes com razão $m/z = 52$ chegam até a cela de colisão e reação. Em tal compartimento, pode ocorrer uma reação para alterar a massa do cromo com gases como o oxigênio ou uma colisão entre o gás hélio e os interferentes poliatômicos (FU; SHI, 2019). Quando os analitos chegam no Q2, o

equipamento é novamente ajustado para permitir a passagem apenas das espécies químicas com razão m/z desejada, no caso do cromo, continua sendo 52 para as reações de colisão com gás hélio.

Nas análises de cromo por ICP, tem sido comum monitorar a massa 52, por ser a mais abundante entre os isótopos de cromo (83,8%). Todavia, esse isótopo possui interferentes isobáricos poliatômicos comuns como $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$, $^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$ e $^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$ que podem ser obtidos e formados a partir de amostras ambientais (WALKNER *et al.*, 2017).

3.8 Remediação

A remediação é o nome dado ao conjunto de medidas que podem ser empregadas para reduzir a concentração ou remover contaminantes de ambientes poluídos, a fim de alcançar níveis seguros à saúde humana e ao ecossistema (ANJOS; SÁNCHEZ; BERTOLINO, 2012). A remediação pode ser realizada no local da contaminação, denominado *in situ*, ou *ex situ*, quando é realizada a remoção e transporte da matriz contaminada (DERAKHSHAN NEJAD; JUNG; KIM, 2018).

A remediação de metais pode envolver a imobilização, separação física, isolamento, extração e redução de toxicidade (LIU *et al.*, 2016). Assim, o processo de imobilização consiste na redução da biodisponibilidade e migração dos poluentes para a subsuperfície do solo (MESQUITA *et al.*, 2006). Na imobilização *in situ*, pode se utilizar argila, cimento, cinzas, carbonatos, óxidos, fosfatos, biocarvões e matéria orgânica para promover a solidificação ou estabilização dos contaminantes (WUANA; OKIEMEN, 2011). A solidificação ocorre pelo encapsulamento do solo contaminado e a estabilização permite a conversão dos metais em formas menos solúveis ou tóxicas (DERAKHSHAN NEJAD; JUNG; KIM, 2018).

A imobilização *ex situ* têm sido empregada para remediar áreas altamente contaminadas por meio de escavações (KHALID *et al.*, 2017). Apesar de ser uma alternativa imediata, esse tipo de imobilização apresenta maior custo, invasão ao meio ambiente, geração de resíduos e necessidade de aterro sanitário especial (PENG *et al.*, 2009).

A separação física permite separar os contaminantes da matriz por processos físicos, como a lavagem do solo contaminado. Essa lavagem pode ser realizada com água, reagentes ou fluidos para lixiviar os poluentes do solo (DERAKHSHAN NEJAD; JUNG; KIM, 2018). Após a lavagem, o material lixiviado pode ser tratado ou destinado para aterros. Dentre os tratamentos, pode ser empregada a extração dos contaminantes pelo método eletrocínético ou por extração com surfactantes, solventes, ciclodextrinas, agentes quelantes e ácidos orgânicos, conforme o tipo de contaminante (KHALID *et al.*, 2017; NOURI *et al.*, 2017).

O isolamento é uma técnica utilizada para evitar a migração dos contaminantes a partir da área poluída. Esse procedimento é muito empregado para ambientes aquáticos, no qual os contaminantes podem ser isolados por barreiras físicas (WUANA; OKIEMEN, 2011).

A redução de toxicidade da água, solos e sedimentos pode ser intermediada por agentes biológicos, por meio da bioremediação (GAUR *et al.*, 2014). Esse tipo de remediação utiliza enzimas e microrganismos como fungos e bactérias para inibir a migração e alterar as propriedades físico-químicas dos contaminantes (LIU *et al.*, 2017). Para isso, os microrganismos promovem nos metais a

complexação, precipitação, reação de oxidação-redução e acúmulo intracelular. Essas atividades biológicas são dependentes de temperatura, oxigênio, umidade e pH (GAUR *et al.*, 2014)

A remediação realizada por plantas é denominada fitorremediação ou remediação verde, e tem sido aplicada com sucesso para descontaminar a água, solos e resíduos de diferentes classes de poluentes (NOURI *et al.*, 2017). Essa técnica apresenta como vantagens ser econômica e menos prejudicial ao ambiente, pois, não é necessário o uso de reagentes e escavações (WUANA; OKIEMEN, 2011).

3.8.1 Fitorremediação

A agência de proteção ambiental americana (EPA, 2000) define a fitorremediação como o conjunto de tecnologias que utiliza plantas para degradar, extrair ou imobilizar contaminantes do solo e da água. Os principais mecanismos de fitorremediação desenvolvidos pelas plantas são a rizofiltração, rizodegradação, fitodegradação, fitovolatilização, fitoextração e fitoestabilização. Vale destacar que a eficiência da fitorremediação depende da tolerância do vegetal ao contaminante e às condições de cultivo como a capacidade de troca catiônica, tipo e textura do solo, pH, exsudatos, associação de microrganismos à raiz e disponibilidade de água (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2016).

A absorção dos contaminantes pelas plantas ocorre devido à similaridade destes, com os nutrientes disponíveis nos substratos. O transporte para os tecidos vegetais ocorre através do cilindro vascular por meio de difusão ou fluxo de massas nas células dos pêlos radiculares (MUSTAFA; KOMATSU, 2016). Em seguida, os contaminantes são absorvidos pelos tecidos corticais das raízes e adotam a via simplástica e/ou apoplástica para alcançar o sistema de transporte do xilema (MAHAR *et al.*, 2016).

O mecanismo de fitorremediação conhecido como rizofiltração é utilizado por plantas que absorvem os contaminantes e os acumulam no interior dos seus tecidos radiculares ou os imobilizam na parte externa da raiz, por adsorção (EPA, 2000). Esse processo é característico de plantas aquáticas, como *Phragmites australis* e *Kyllinga nemoralis*, sendo favorecido pela maior área superficial entre as raízes aquáticas e os metais no meio (REZANIA *et al.*, 2016, ODINGA *et al.*, 2019).

Por sua vez, a rizodegradação é realizada por plantas que degradam os contaminantes orgânicos na zona radicular (GAUR *et al.*, 2014). Esse mecanismo ocorre devido à atividade microbiana associada à raiz e também é conhecido como degradação assistida por plantas, biorremediação assistida, biodegradação *in situ* assistida e biodegradação reforçada na rizosfera (LIMMER *et al.*, 2018). Esse tipo de fitorremediação foi observado em *Typha angustifolia* que degradou o ibuprofeno nos tecidos radiculares (LI *et al.*, 2016).

A fitodegradação ou fitotransformação é o mecanismo de degradação dos contaminantes nos tecidos vegetais. Essa degradação pode ser realizada por processos metabólicos do vegetal ou pela ação de enzimas produzidas pelas plantas que decompõe os contaminantes (PARMAR; SINGH, 2015). Além disso, bactérias e fungos presentes em plantas halófitas, também podem reduzir a toxicidade de metais por reações de óxido-redução, pela fitoconversão de Cr(VI) para Cr(III) (CAÇADOR; DUARTE, 2015).

A fitovolatilização é o mecanismo de liberação para a atmosfera de contaminantes específicos, como os orgânicos voláteis, compostos contendo cloro, selênio, mercúrio e arsênio. Esses contaminantes podem ser liberados pelas plantas, pelos processos de transpiração, a partir de caules e folhas, ou do solo devido às atividades das raízes (LIMMER; BURKEN, 2016). Por meio desse princípio, as árvores *Populus deltoides* e *Populus nigra* foram capazes de fitovolatilizar o percloroetileno presente em solo contaminado (JAMES et al., 2009).

A fitoextração ou fitominação é o processo característico de plantas que acumulam os contaminantes na parte aérea vegetal (EPA, 2000). Para isso, as plantas absorvem os contaminantes e translocam para os caules e folhas. Esse tipo de acúmulo facilita a remoção da parte contaminada da planta após a absorção (LIU; XIN; ZHOU, 2017). A fitoextração pode ser identificada nas plantas pelo fator de translocação (FT), que é calculado através da equação:

$$FT = \frac{[P.A]}{[R]}$$

Nesse cálculo, P.A refere-se a concentração do metal quantificado na parte aérea da planta e R refere-se a concentração do metal quantificado na raiz. Os valores de FT superiores a 1 são associados às plantas que apresentaram o potencial de fitoextração (GOSWAMI; DAS, 2016). Esse mecanismo de fitorremediação de metais foi observado em plantas como *Sida hermaphrodita*, *Calandula officinalis* L. e *Dyera costulata* (GOSWAMI; DAS, 2016; ANTONKIEWICZ; KOŁODZIEJ; BIELIŃSKA, 2017).

A fitoestabilização ou imobilização é o processo de absorção dos contaminantes e acúmulo no tecido radicular das plantas (EPA, 2000). Esse tipo de fitorremediação apresenta como vantagens impedir a exposição dos contaminantes na parte aérea da planta e evitar a entrada na cadeia alimentar (PARMAR; SINGH, 2015). A fitoestabilização pode ser potencializada pela associação de plantas com microorganismos radiculares, pois, contribui para a tolerância das plantas à toxicidade do meio, intensifica o crescimento radicular, e assim, a lixiviação dos contaminantes é reduzida (VANGRONSVELD et al., 2009; BOLAN et al., 2011). Com esta finalidade, um estudo foi realizado com a planta fitoestabilizadora *Leptochloa fusca* (L.) Kunth e as bactérias endófitas *Pantoea stewartii* ASI11, *Enterobacter* sp. HU38 e *Microbacterium arborescens* HU33. Essa associação promoveu o aumento no teor de metais imobilizados na zona radicular (AHSAN et al., 2017). O potencial de fitoestabilização da planta pode ser determinado pelo fator de bioconcentração (FB), que é obtido pela equação:

$$FB = \frac{[R]}{[S]}$$

No cálculo, R refere-se à concentração do metal quantificado nas raízes e S à concentração do metal quantificado no substrato. Os valores superiores a 1 indicam que ocorreu a fitoestabilização do metal (VENDRUSCOLO et al., 2018). Esse mecanismo de fitorremediação foi observado nas plantas *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) e *Leptochloa fusca* (L.) Kunth (Poaceae) para metais presentes em solos contaminados (FRANCO; RUFO; DE LA FUENTE, 2012; AHSAN et al., 2017).

Após a fitorremediação, a biomassa das plantas pode ser destinada a processos como a compostagem, compactação de massa, combustão ou pirólise (GOMES, 2012). Na compostagem ou na compactação da biomassa, os metais podem ser coletados dos produtos de lixiviação e, em seguida, serem tratados de forma adequada para reuso ou descarte (NOURI *et al.*, 2017). Pelo processo de combustão, os metais obtidos nas cinzas podem ser precipitados e, por pirólise, os metais contidos no carvão podem ser reutilizados como produtos de minério (GHOSH; SINGH, 2005; GOMES, 2012).

3.9 Plantas Fitorremediadoras

As plantas selecionadas para remediação devem apresentar capacidade de tolerar ou prosperar em ambientes que possuem os contaminantes (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2016). Além dessas características, o sucesso da remediação está relacionado às adaptações desenvolvidas por essas plantas, como: a morfologia da raiz; eficiência no uso da água; composição química da rizosfera; proteínas transportadoras na superfície radicular; transporte dos contaminantes via xilema e translocação dentro da planta (LAGHLIMI *et al.*, 2015).

As raízes são as primeiras estruturas das plantas que entram em contato com os contaminantes do solo, e o comprimento determina a profundidade a ser remediada (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2016). As gramíneas, por exemplo, possuem raízes fibrosas que penetram intensivamente no solo, sendo capazes de fechar a camada superficial e reduzir a dispersão e lixiviação dos contaminantes (MUKHOPADHYAY; MAITI, 2010). Além disso, essas plantas apresentam como vantagens para a fitorremediação o rápido crescimento, elevada biomassa e tolerância a condições de estresse nutricional e ambiental (LAGHLIMI *et al.*, 2015).

Existem espécies vegetais, como *Alyxia rubricaulis*, *Macadamia neurophylla*, *Eleocharis acicularis*, que são capazes de acumular em sua biomassa concentrações de metais superiores a 10 000 mg kg⁻¹ de Mn ou Zn; 1000 mg kg⁻¹ de Co, Cu, Cr, Ni ou Pb e 100 mg kg⁻¹ de Cd (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2009; CHANEY; BROADHURST; CENTOFANTI, 2010, SAKAKIBARA *et al.*, 2011). As elencadas espécies são denominadas como plantas hiperacumuladoras de metais (BAKER, 2000). A família das Brassicaceae estão entre as que apresentam maior taxa de acumulação de metais como As, Cd, Cu, Au, Pb, Ni, Se, Ag, Tl, U e Zn (MAHAR *et al.*, 2016).

As espécies lenhosas como *Salix babylonica* (salgueiro), *Jatropha curcas* (pinhão-mansão) e *Eucalyptus globulus* (eucalipto) não são hiperacumuladoras, mas extraem metais como Cd, Cr, Cu e Zn presente nos solos (LUO *et al.*, 2016; OUYANG *et al.*, 2017; ÁLVAREZ-MATEOS; ALÉS-ÁLVAREZ; GARCÍA-MARTÍN, 2019). A vantagem de uso dessas plantas é a remediação em longo prazo, em virtude do tempo de crescimento. Além disso, a biomassa produzida pode ser utilizada como madeira comercial e bioenergia por combustão (NEILSON; RAJAKARUNA, 2015).

Os vegetais folhosos como *Lactuca sativa* (alface) e *Spinacia oleracea* (espinafre) foram estudados para fitorremediação de Cd e apresentaram acúmulo desse metal na parte aérea comestível, isso devido à elevada taxa de transpiração dessas plantas (TANG *et al.*, 2016; SHAMSHAD *et al.*, 2019). Apesar dos bons resultados, a prática de remediação de áreas contaminadas com essas plantas deve ser evitada, por apresentar risco de contaminação à saúde pública (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2016).

Por isso, estudos recentes de fitorremediação têm sido desenvolvidos com plantas ornamentais, pois é uma alternativa que evita a entrada na cadeia alimentar de humanos e proporciona aparência agradável ao ambiente (LIU *et al.*, 2017). Nesse sentido, as plantas *Calendula officinalis* (margarida), *Tagetes erecta* (cravo), *Chrysanthemum indicum* (crisântemo), *Helianthus annuus* (girassol) e *Erica andevalensis* têm sido eficientes na fitorremediação de metais como Cd, Pb, Cu, Cr, Mn, Fe, Zn, Al e As em diferentes tratamentos com solos (LAJAYER *et al.*, 2019).

Além dessas plantas, *C. roseus* é uma planta ornamental e medicinal que tem se apresentado tolerante a condições ambientais adversas, tais como secas, salinidade, radiação ultravioleta (UV-B), déficit hídrico e nutricional, por isso, pode sobreviver em solos: arenosos, prados, savanas, rochas calcárias, locais secos e baldios (GAJALAKSHMI *et al.*, 2013; NEJAT *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2018). Tais características convidam a um estudo mais detalhado, visando avaliar o potencial fitorremediador dessa importante espécie vegetal.

3.10 *Catharanthus roseus* (L.) G. Don

A espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don é uma planta da família Apocynaceae, nativa de Madagascar (África), cujo clima tropical é quente e úmido. Em ambientes de clima quente, essa planta perene apresenta o desenvolvimento de flores e frutos durante todo o ano (NEJAT *et al.*, 2015). *C. roseus* é popularmente conhecida como vinca, maria-sem-vergonha, vinca de Madagascar e boa-noite (GAJALAKSHMI *et al.*, 2013). Possui valor estético ornamental, em virtude das cores esplêndidas das flores (YAMAMOTO *et al.*, 2016).

Anatomicamente, *C. roseus* possui folhas ovais e alongadas, variando de 2,5 a 9,0 cm de comprimento e 1,0 a 3,5 cm de largura, a coloração é verde brilhante, sem pêlos, com nervura central pálida e um pecíolo curto disposto em pares opostos, o vegetal pode atingir até 1,0 m de altura (NEJAT *et al.*, 2015). As flores podem apresentar cores que variam do branco ao rosa escuro, e uma corola de cerca de 2,0 - 5,0 cm de diâmetro com cinco pétalas. Os frutos são um par de folículos com 2,0 a 4,0 cm de comprimento e 3,0 mm de largura (GAJALAKSHMI *et al.*, 2013). Na Figura 2 estão representadas fotografias da planta.

Figura 2– Fotografias de *Catharanthus roseus*, considerando: (a) raiz, (b) flores, (c) frutos, (d) folhas e (e) caules.



Fonte: Da autora, 2017.

Nessa espécie já foram descobertos mais de 130 tipos diferentes de alcalóides, e em virtude desses compostos, tal planta pode ser utilizada como antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anticancerígena e antiviral. Destaca-se entre esses alcalóides, a vincristina e a vimblastina que são importantes antitumorais (GAJALAKSHMI *et al.*, 2013). Além disso, também é visada economicamente pelo valor Em países como a Malásia, Índia, China, África do Sul e México, *C. roseus* é usada tradicionalmente para o tratamento de diabetes (TIONG *et al.*, 2015).

Apesar de todas essas aplicações científicas e econômicas de *C. roseus*, estudos envolvendo a avaliação do potencial dessa planta como fitorremediadora de metais em lodo de esgoto são escassos e insipientes na literatura (AHMAD; MISRA, 2014). Por isso, essa planta foi selecionada para este estudo.

3.11 Referências

AGUILAR, F. J. A.; WROBEL, K.; LOKITS, K.; CARUSO, J. A.; ALONSO, A. C.; CORONA, J. F. G.; WROBEL, K. Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromate-resistant filamentous fungi. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 392, n. 1-2, p. 269-276, 2008.

AHSAN, M. T.; NAJAM-UL-HAQ, M.; IDREES, M.; ULLAH, I.; AFZAL, M. Bacterial endophytes enhance phytostabilization in soils contaminated with uranium and lead. **International journal of phytoremediation**, v. 19, n. 10, p. 937-946, 2017.

ÁLVAREZ-MATEOS, P.; ALÉS-ÁLVAREZ, F-J.; GARCÍA-MARTÍN, J. F. Phytoremediation of highly contaminated mining soils by *Jatropha curcas* L. and production of catalytic carbons from the generated biomass. **Journal of environmental management**, v. 231, p. 886-895, 2019.

ANJOS, J. Â. S. A. D.; SÁNCHEZ, L. E.; BERTOLINO, L. C. Remediação de áreas contaminadas: proposições para o sítio da Plumbum em Santo Amaro da Purificação-BA. CETEM/MCTI. **Santo Amaro**.

p. 103-130, 2012.

ANTONKIEWICZ, J.; KOŁODZIEJ, B.; BIELIŃSKA, E. J. Phytoextraction of heavy metals from municipal sewage sludge by *Rosa multiflora* and *Sida hermaphrodita*. **International journal of phytoremediation**, v. 19, n. 4, p. 309-318, 2017

ARAUJO-BARBOSA, U.; PEÑA-VAZQUEZ, E.; BARCIELA-ALONSO, M. C.; FERREIRA, S. L. C.; DOS SANTOS, A. M. P.; BERMEJO-BARRERA, P. Simultaneous determination and speciation analysis of arsenic and chromium in iron supplements used for iron-deficiency anemia treatment by HPLC-ICP-MS. **Talanta**, v. 170, p. 523-529, 2017.

BAKER, A. J. M. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal-polluted soils. **Phytoremediation of contaminated soil and water**, 2000.

BOLAN, N. S.; PARK, J. H.; ROBINSON, B.; NAIDU, R.; HUH, K. Y. PHYTOSTABILIZATION: a green approach to contaminant containment. In: **Advances in agronomy**. Academic Press, 2011. p. 145-204.

BONDARCZUK, K.; MARKOWICZ, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. **Environment international**, v. 87, p. 49-55, 2016.

Brasil. Conselho Nacional do Meio ambiente. Resolução Conama n.º 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil, 18 mar 2005. Seção I, p.59.

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n.º 518 de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. Diário Oficial da União. República Federativa do Brasil, 26 mar 2004. Seção I, p.266-70.

CAÇADOR, I.; DUARTE, B. Chromium phyto-transformation in salt marshes: the role of halophytes. In: **Phytoremediation**. Springer, Cham, 2015. p. 211-217.

CAMARGO, F. P.; DO PRADO, P. F.; TONELLO, P. S.; DOS SANTOS, A. C. A.; DUARTE, I. C. S. Bioleaching of toxic metals from sewage sludge by co-inoculation of *Acidithiobacillus* and the biosurfactant-producing yeast *Meyerozyma guilliermondii*. **Journal of environmental management**, v. 211, p. 28-35, 2018.

CHANEY, R.; BROADHURST, C.; CENTOFANTI, T. Phytoremediation of soil trace elements. **Trace elements in soils**, p. 311-352, 2010.

CHANG, Q.; SONG, S.; WANG, Y.; LI, J.; MA, J. Application of graphene as a sorbent for preconcentration and determination of trace amounts of chromium (III) in water samples by flame atomic absorption spectrometry. **Analytical Methods**, v. 4, n. 4, p. 1110-1116, 2012.

CHARLTON, A., SAKRABANI, R., TYRREL, S., CASADO, M. R., MCGRATH, S. P., CROOKS, B., CAMPBELL, C. D. Long-term impact of sewage sludge application on soil microbial biomass: An evaluation using meta-analysis. **Environmental pollution**, v. 219, p. 1021-1035, 2016.

CHEN, X.; TAI, C. T.; WU, L.; TSAI, F. S.; SRIMANUS, K. Business models for social innovation of municipal solid waste recycling companies: Comparison of two business cases in Thailand and Taiwan. **Sustainability**, v. 10, n. 4, p. 1009, 2018.

CHEN, Y-C; KUO, J. Potential of greenhouse gas emissions from sewage sludge management: a case study of Taiwan. **Journal of Cleaner Production**, v. 129, p. 196–201, 2016.

CHOJNACKA, K.; MIKULEWICZ, M. Green analytical methods of metals determination in biosorption studies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 2019.

CHOPPALA, G.; KUNHIKRISHNAN, A.; SESHADRI, B.; PARK, J. H.; BUSH, R.; BOLAN, N. Comparative sorption of chromium species as influenced by pH, surface charge and organic matter content in contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 184, p. 255–260, 2018.

COLLARD, M.; TEYCHENÉ, B.; LEMÉE, L. Comparison of three different wastewater sludge and their respective drying processes: Solar, thermal and reed beds – Impact on organic matter characteristics. **Journal of Environmental Management**, v. 203, p. 760–767, 2017.

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução n. 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 ago. 2006. Disponível em: <www.fundagresorg.br/biossolido/images/downloads/res_conama37506>. Acesso em: 02 ago. 2016

CUELLO, S.; ENTWISLE, J.; BENNING, J.; LIU, C.; COBURN, S.; MCADAM, K. G.; GOENAGA-INFANTE, H.. Complementary HPLC-ICP-MS and synchrotron X-ray absorption spectroscopy for speciation analysis of chromium in tobacco samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 31, n. 9, p. 1818-1829, 2016.

DERAKHSHAN NEJAD, Z.; JUNG, M.; KIM, K-H. Remediation of soils contaminated with heavy metals with an emphasis on immobilization technology. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 40, n. 3, p. 927–953, 2018.

DIN EN 15192, Characterisation of Waste and Soil - Determination of Cr (VI) in Solid Material by Alkaline Digestion and Ion Chromatography with Spectrometric Detection; 2006.

DING, W.; STEWART, D. I.; HUMPHREYS, P. N.; ROUT, S. P.; BURKE, I. T. Role of an organic carbon-rich soil and Fe(III) reduction in reducing the toxicity and environmental mobility of chromium(VI) at a COPR disposal site. **Science of the Total Environment**, v. 541, p. 1191–1199, 2016.

DIRECTIVE 86/278/EEC. Council et al. Council directive on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. **Offic. J. Eur. Comm**, v. 181, p. 0006-

0012, 1986.

EPA 1311. **Method 1311. Toxicity characteristic leaching procedure.** 1992. Disponível em : <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/1311.pdf>. Acesso em: 12 de jan. 2019

EPA 3050B. **Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils.** 1996. Disponível em : <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/epa-3050b.pdf>. Acesso em: 01 de dez. 2018

EPA 3051A. **Method 3051A. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils.** 2007. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf>. Acesso em: 09 de dez. 2018

EPA 3060A. **Method 3060A. Alkaline digestion for hexavalent chromium.** Disponível em: <papers3://publication/uuid/DA0F9469-B780-4205-A14F-955225268FF3>. Acesso em: 8 out. 2018.

EPA 7196. **Method 7196A chromium, hexavalent (colorimetric).** 1992. Disponível em : <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/7196a.pdf> Acesso em: 8 de jun. 2018

FILIK, H.; DOĞUTAN, M.; APAK, R. Speciation analysis of chromium by separation on a 5-palmitoyl oxine-functionalized XAD-2 resin and spectrophotometric determination with diphenylcarbazide. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 376, n. 6, p. 928-933, 2003.

FRANCO, A.; RUFO, L.; DE LA FUENTE, V. Metal concentration and distribution in plant tissues of *Nerium oleander* (Apocynaceae, Plantae) from extremely acidic and less extremely acidic water courses in the Río Tinto area (Huelva, Spain). **Ecological engineering**, v. 47, p. 87-91, 2012.

FU, L.; SHI, S-Y. A novel strategy to determine the compositions of inorganic elements in fruit wines using ICP-MS/MS. **Food chemistry**, v. 299, p. 125172, 2019.

FU, L.; SHI, S-Y.; CHEN, X-Q. Accurate quantification of toxic elements in medicine food homologous plants using ICP-MS/MS. **Food chemistry**, v. 245, p. 692-697, 2018.

FYTILI, D.; ZABANIOTOU, A. Utilization of sewage sludge in EU application of old and new methods-A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 12, n. 1, p. 116–140, 2008.

GAJALAKSHMI, S.; VIJAYALAKSHMI, S.; DEVI, RAJESWARI V. Pharmacological activities of *Catharanthus roseus*: a perspective review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 4, n. 2, p. 431-439, 2013.

GAUR, N.; FLORA, G.; YADAV, M.; TIWARI, A. A review with recent advancements on bioremediation-based abolition of heavy metals. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 16, n. 2, p. 180-193, 2014.

GHOSH, M.; SINGH, S. P. A review on phytoremediation of heavy metals and utilization of its byproducts. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 1–18, 2005.

GOMES, H. I. Phytoremediation for bioenergy: challenges and opportunities. **Environmental Technology Reviews**, v. 1, n. 1, p. 59-66, 2012.

GOSWAMI, S.; DAS, S. Copper phytoremediation potential of *Calandula officinalis* L. and the role of antioxidant enzymes in metal tolerance. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 126, p. 211-218, 2016.

GUIDOTTI, L.; ABAD, S. Q.; RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P.; ALONSO, J. I. G.; BEONE, G. M. Quantification of Cr(VI) in soil samples from a contaminated area in northern Italy by isotope dilution mass spectrometry. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17569–17576, 1 nov. 2015.

HABILA, M.; UNSAL, Y. E.; ALOTHMAN, Z. A.; SHABAKA, A.; TUZEN, M.; SOYLAK, M. Speciation of chromium in natural waters, tea, and soil with membrane filtration flame atomic absorption spectrometry. **Analytical Letters**, v. 48, n. 14, p. 2258-2271, 2015.

ISO 8124-3, Safety of Toys e Part 3: Migration of Certain Elements, 2010

JAMES, C. A.; XIN, G.; DOTY, S. L.; MUIZNIEKS, I.; NEWMAN, L.; STRAND, S. E. A mass balance study of the phytoremediation of perchloroethylene-contaminated groundwater. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 8-9, p. 2564-2569, 2009.

JEN, J. F.; OU-YANG, G. L.; CHEN, C. S.; YANG, S. M. (1993). Simultaneous determination of chromium (III) and chromium (VI) with reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 118, n. 10, p. 1281-1284, 1993.

KHALID, S.; SHAHID, M.; NIAZI, N. K.; MURTAZA, B.; BIBI, I.; DUMAT, C. A comparison of technologies for remediation of heavy metal contaminated soils. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 182, p. 247-268, 2017.

KRÜGER, O.; FIEDLER, F.; ADAM, C.; VOGEL, C.; SENZ, R. Determination of chromium (VI) in primary and secondary fertilizer and their respective precursors. **Chemosphere**, v. 182, p. 48–53, 2017.

LAGHLIMI, M.; BAGHDAD, B.; EL HADI, H.; BOUABDLI, A. Phytoremediation mechanisms of heavy metal contaminated soils: a review. **Open journal of Ecology**, v. 5, n. 08, p. 375, 2015.

LAJAYER, B. A.; MOGHADAM, N. K.; MAGHSOODI, M. R.; GHORBANPOUR, M.; KARIMAN, K. Phytoextraction of heavy metals from contaminated soil, water and atmosphere using ornamental plants: mechanisms and efficiency improvement strategies. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 9, p. 8468-8484, 2019.

LEI, Nº. 12305. **Política Nacional de Resíduos Sólidos**, Brasília, DF, 2010. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2010/lei/l12305.htm. Acesso em: 05 jan. 2018

LEŚNIEWSKA, B.; GODLEWSKA-ZYŁKIEWICZ, B. Speciation of chromium in alkaline soil extracts by an ion-pair reversed phase HPLC-ICP MS method. **Molecules**, 2019.

LEŚNIEWSKA, B.; GONTARSKA, M.; GODLEWSKA-ŻYŁKIEWICZ, B. Selective separation of chromium species from soils by single-step extraction methods: A critical appraisal. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 8, p. 274, 2017.

LI, Y.; ZHANG, J.; ZHU, G.; LIU, Y.; WU, B.; NG, W. J.; TAN, S. K. Phytoextraction, phytotransformation and rhizodegradation of ibuprofen associated with *Typha angustifolia* in a horizontal subsurface flow constructed wetland. **Water research**, v. 102, p. 294-304, 2016.

LIMMER, M. A.; WILSON, J.; WESTENBERG, D.; LEE, A.; SIEGMAN, M.; BURKEN, J. G. Phytoremediation removal rates of benzene, toluene, and chlorobenzene. **International Journal of Phytoremediation**, v. 20, n. 7, p. 666–674, 2018.

LIMMER, M.; BURKEN, J. Phytovolatilization of Organic Contaminants. **Environmental Science and Technology**, v. 50, n. 13, p. 6632–6643, 2016.

LIU, J.; XIN, X.; ZHOU, Q. Phytoremediation of contaminated soils using ornamental plants. **Environmental Reviews**, v. 26, n. 1, p. 43-54, 2017.

LIU, K.; HUANG, T.; HUANG, X.; YU, L.; MUHAMMAD, F.; JIAO, B.; LI, D. The application of homemade *Neosinocalamus affinis* AC in electrokinetic removal technology on heavy metal removal from the MSWI fly ash. **Scientific Reports**, v. 6, n. July, p. 1–12, 2016.

LIU, S. H.; ZENG, G. M.; NIU, Q. Y.; LIU, Y.; ZHOU, L.; JIANG, L. H.; CHENG, M. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. **Bioresource technology**, v. 224, p. 25-33, 2017.

LU, J. X.; ZHOU, Y.; HE, P.; WANG, S.; SHEN, P.; POON, C. S. Sustainable reuse of waste glass and incinerated sewage sludge ash in insulating building products: Functional and durability assessment. **Journal of Cleaner Production**, v. 236, p. 117635, 2019.

LUO, J.; QI, S.; PENG, L. E WANG, J. Phytoremediation efficiency of Cd by *Eucalyptus globulus* transplanted from polluted and unpolluted sites. **International journal of phytoremediation**, v. 18, n. 4, p. 308-314, 2016.

MAHAR, A.; WANG, P.; ALI, A.; AWASTHI, M. K.; LAHORI, A. H.; WANG, Q.; ZHANG, Z. Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 126, p. 111–121, 2016.

MAJID, N. M.; ISLAM, M. M.; ABDUL RAUF, R.; AHMADPOUR, P.; ABDU, A. Assessment of heavy metal uptake and translocation in *Dyera costulata* for phytoremediation of cadmium contaminated soil. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B-Soil & Plant Science**, v. 62, n. 3, p. 245-250, 2012.

MANDIWANA, K. L.; PANICHEV, N.; PANICHEVA, S. Determination of chromium(VI) in black, green and herbal teas. **Food Chemistry**, v. 129, n. 4, p. 1839–1843, 2011.

MARKIEWICZ, B.; KOMOROWICZ, I.; SAJNÓG, A.; BELTER, M.; BARAŁKIEWICZ, D. Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS—technique establishing metrological traceability: a review since 2000. **Talanta**, v. 132, p. 814-828, 2015.

MESQUITA, A. A.; SOBRINHO, N. M. B. A.; OLIVEIRA, C.; MAZUR, N.; SANTOS, F. S. Remediação de solos tratado com lodo rico em zinco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 02, p. 738-744, 2006.

MILAČIČ, R.; ŠČANČAR, J. Determination of hexavalent chromium in lime-treated sewage sludge by anion-exchange fast protein liquid chromatography with electrothermal atomic absorption spectrometry detection. **Analyst**, v. 125, n. 11, p. 1938-1942, 2000.

MUKHOPADHYAY, S.; MAITI, S.K. Phytoremediation of metal mine waste. **Applied ecology and environmental research**, v. 8, n. 3, p. 207-222, 2010.

NEILSON, S.; RAJAKARUNA, N. Phytoremediation of agricultural soils: using plants to clean metal-contaminated arable land. In: **Phytoremediation**. Springer, Cham, 2015. p. 159-168.

NEJAT, N.; VALDIANI, A.; CAHILL, D.; TAN, Y. H.; MAZIAH, M.; ABIRI, R. Ornamental exterior versus therapeutic interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): The two faces of a versatile herb. **Scientific World Journal**, v. 2015, n. 1759, 2015.

NICKENS, K. P.; PATIERNO, S. R.; CERYAK, S. Chromium genotoxicity: a double-edged sword. **Chemico-biological interactions**, v. 188, n. 2, p. 276-288, 2010.

NOURI, H.; BORUJENI, S. C.; NIROLA, R.; HASSANLI, A.; BEECHAM, S.; ALAGHMAND, S.; MULCAHY, D. Application of green remediation on soil salinity treatment: A review on halophytoremediation. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 107, p. 94–107, 2017.

ODINGA, C. A.; KUMAR, A.; MTHEMBU, M. S.; BUX, F.; SWALAHA, F. M. Rhizofiltration system consisting of *Phragmites australis* and *Kyllinga nemoralis*: evaluation of efficient removal of metals and pathogenic microorganisms. **Desalination and Water Treatment**, v. 169, p. 120-132, 2019.

OUYANG, J.; LI, B.; LI, C.; SHANG, X.; ZOU, J. Cadmium effects on mineral accumulation and selected physiological and biochemical characters of *Salix babylonica* L. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 26, n. 6, 2017.

PARMAR, S.; SINGH, V. Phytoremediation Approaches for Heavy Metal Pollution: A Review. **Journal of Plant Science & Research**, v. 2, n. 2, p. 1–8, 2015.

PENA, M. T.; CASAIS, M. C.; MEJUTO, M. C.; CELA, R. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 626, n. 2, p. 155–165, 2008.

PENG, J. F.; SONG, Y. H.; YUAN, P.; CUI, X. Y.; QIU, G. L. The remediation of heavy metals contaminated sediment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 161, n. 2–3, p. 633–640, 2009.

PIMENTA, E. M.; DA SILVA, F. F.; BARBOSA, É. S.; CACIQUE, A. P.; CASSIMIRO, D. L.; DE PINHOA, G. P.; SILVÉRIO, F. O. Quantification of Glyphosate and AMPA by HPLC-ICP-MS/MS and HPLC-DAD: A Comparative Study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1–7, 2019.

REZANIA, S.; TAIB, S. M.; DIN, M. F. M.; DAHALAN, F. A.; KAMYAB, H. Comprehensive review on phytotechnology: Heavy metals removal by diverse aquatic plants species from wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v. 318, p. 587–599, 2016.

SAKAKIBARA, M.; OHMORI, Y.; HA, N. T. H.; SANO, S.; SERA, K. Phytoremediation of heavy metal-contaminated water and sediment by *Eleocharis acicularis*. **CLEAN–Soil, Air, Water**, v. 39, n. 8, p. 735-741, 2011.

SÉBY, F.; VACCHINA, V. Critical assessment of hexavalent chromium species from different solid environmental, industrial and food matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 104, p. 54–68, 1 jul. 2018.

SHAMSHAD, S.; SHAHID, M.; DUMAT, C.; RAFIQ, M.; KHALID, S.; SABIR, M.; NIAZI, N. K. A. multivariate analysis of health risk assessment, phytoremediation potential, and biochemical attributes of *Spinacia oleracea* exposed to cadmium in the presence of organic amendments under hydroponic conditions. **International journal of phytoremediation**, v. 21, n. 5, p. 461-470, 2019.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A. S.; POONIA, P. Factors Affecting Phytoextraction: A Review. **Pedosphere**, v. 26, n. 2, p. 148–166, 2016.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A. S.; POONIA, P. Phytomining: A review. **Minerals Engineering**, v. 22, n. 12, p. 1007-1019, 2009.

SPANOS, T.; ENE, A.; KARADJOVA, I. B. Assessment of toxic elements Cu, Cr, Ni, Pb, Cd, Hg, Zn, As and hexavalent chromium in sewage sludge from municipal wastewater treatment plants by combined spectroscopic techniques. **Romanian Journal of Physics**, v. 60, n. 1–2, p. 237–245, 2015.

TANG, X.; PANG, Y.; JI, P.; GAO, P.; NGUYEN, TH.; TONG, YA. Cadmium uptake in above-ground parts of lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 125, p. 102-106, 2016.

TAVARES, T. M.; CARVALHO, F. M. Avaliação da exposição de populações humanas a metais pesados no ambiente: exemplos do Recôncavo Bahiano. **Química Nova**, v.15, p.147-153, 1992.

TIONG, S. H.; LOOI, C. Y.; ARYA, A.; WONG, W. F.; HAZNI, H.; MUSTAFA, M. R.; AWANG, K. Vindogentianine, a hypoglycemic alkaloid from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (*Apocynaceae*). **Fitoterapia**, v. 102, p. 182-188, 2015.

UNCETA, N.; SÉBY, F.; MALHERBE, J.; DONARD, O. F. X. Chromium speciation in solid matrices and regulation: a review. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 3, p. 1097-1111, 2010.

UNCETA, N.; ASTORKIA, M.; ABREGO, Z.; GÓMEZ-CABALLERO, A.; GOICOLEA, M. A.; BARRIO, R. J. A novel strategy for Cr(III) and Cr(VI) analysis in dietary supplements by speciated isotope dilution

mass spectrometry. **Talanta**, v. 154, p. 255–262, 2016.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Introduction to phytoremediation (EPA/600/R-99/107). p. 377, 2000.

VACCHINA, V.; DE LA CALLE, I.; SÉBY, F. Cr(VI) speciation in foods by HPLC-ICP-MS: investigation of Cr(VI)/food interactions by size exclusion and Cr(VI) determination and stability by ion-exchange on-line separations. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3831–3839, 2015.

VANGRONSVELD, J.; HERZIG, R.; WEYENS, N.; BOULET, J.; ADRIAENSEN, K.; RUTTENS, A.; VAN DER LELIE, D. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 7, p. 765-794, 2009.

VENDRUSCOLO, D.; SANTANA, N. A.; SOUTO, K. M.; FERREIRA, P. A. A.; DE MELO, G. W. B.; JACQUES, R. J. S. Differential behavior of the summer cover crops in the absorption and translocation of copper. **Ciência Rural**, v. 48, n. 12, 2018.

WALKNER, C.; GRATZER, R.; MEISEL, T.; BOKHARI, S. N. H. Multi-element analysis of crude oils using ICP-QQQ-MS. **Organic Geochemistry**, v. 103, p. 22-30, 2017.

WOLLE, M. M.; RAHMAN, G. M.; KINGSTON, H. S.; PAMUKU, M. Optimization and validation of strategies for quantifying chromium species in soil based on speciated isotope dilution mass spectrometry with mass balance. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 29, n. 9, p. 1640–1647, 2014.

WUANA, R. A.; OKIEIMEN, F. E. Heavy metals in contaminated soils: a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. **Isrn Ecology**, v. 2011, 2011.

YAMAMOTO, K.; TAKAHASHI, K.; MIZUNO, H.; ANEGAWA, A.; ISHIZAKI, K.; FUKAKI, H.; MIMURA, T. Cell-specific localization of alkaloids in *Catharanthus roseus* stem tissue measured with Imaging MS and Single-cell MS. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 14, p. 3891-3896, 2016.

YANNI, A. E.; STAMATAKI, N. S.; KONSTANTOPOULOS, P.; STOUPAKI, M.; ABELIATIS, A.; NIKOLAKEA, I.; TENTOLOURIS, N. Controlling type-2 diabetes by inclusion of Cr-enriched yeast bread in the daily dietary pattern: a randomized clinical trial. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 259–267, 2018.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo 1- Potencial de *Catharanthus roseus* para fitoestabilização de metais em lodo de esgoto

Este artigo foi elaborado conforme as normas da Revista *Environmental Science and Health, Part A - Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*

Resumo

A fitorremediação é uma alternativa sustentável que utiliza plantas para extrair poluentes orgânicos e inorgânicos de solos e da água. Neste trabalho, foi avaliado o potencial de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don na fitorremediação de As, Ba, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Se e Zn em substratos a base de lodo de esgoto. *C. roseus* foi cultivada por 108 dias no tratamento contendo lodo de esgoto:vermiculita (70:30, v/v) e, no controle com 100% de substrato comercial. As plantas cultivadas em lodo de esgoto apresentaram aproximadamente quatro vezes maior altura, número de folhas e diâmetro do caule, além de massa fresca 89% superior as do controle. As maiores concentrações dos metais foram obtidas nas raízes das plantas cultivadas no lodo, e variaram de 2,04 mg kg⁻¹ (Cd) a 1121 mg kg⁻¹ (Zn). Os metais Cu, Cd e Zn apresentaram fator de bioconcentração superior a 1 nos dois tratamentos. Já no controle, o valor do fator de translocação foi superior a 1 para Ba, Cd, Cu, Ni, Se e Zn. Os resultados mostraram que *C. roseus* foi eficiente na fitorremediação dos metais avaliados, sendo progressivo o processo de translocação no tratamento que apresentou maior teor dos metais.

Palavras-chave: biossólidos; contaminantes inorgânicos; remediação; vinca; desenvolvimento morfológico.

Introdução

O lodo de esgoto é um subproduto sólido gerado nas estações de tratamento de efluentes. Este material é rico em matéria orgânica e nutrientes, por isso tem sido muito utilizado na recuperação de áreas degradadas e solos agrícolas.^[1] Embora o lodo de esgoto apresente composição favorável ao desenvolvimento das plantas, também pode possuir contaminantes orgânicos e inorgânicos. Dentre os contaminantes inorgânicos, podemos destacar As, Cd, Pb, Zn e Cu, pois são os mais comuns de serem investigados no lodo.^[1-3]

Estes metais, quando presentes em níveis elevados podem promover a contaminação das plantas, do solo e do lençol freático e em menores concentrações podem acumular no ambiente em longo prazo.^[2,3] Neste sentido, antes da aplicação do lodo no solo é necessário certificar se os níveis destes contaminantes estão entre os admissíveis pelas legislações. No Brasil, estes limites são definidos pela Resolução 375 do Conselho Nacional do meio ambiente (CONAMA), nos Estados Unidos pelo Title 40 Code of Federal Regulations, Part 503 e na União Europeia pela Directive 86/278/EEC.^[4-6]

Lodos de esgoto com níveis de contaminantes acima dos permitidos não poderão ser utilizados ou devem passar por um processo de redução destes contaminantes conforme a destinação agrícola adotada.^[6,7] Neste contexto, o processo de remediação é uma alternativa para reduzir ou eliminar contaminantes presentes no lodo de esgoto. Esta técnica é muito empregada na descontaminação de outras matrizes ambientais como água e solos.^[3,8]

Em geral, os processos de remediação utilizam organismos como fungos, bactérias e espécies vegetais.^[9] A utilização de plantas remediadoras é uma forma ecológica e econômica usada para extrair e/ou degradar os contaminantes de interesse.^[2] Para isso, as espécies fitorremediadoras devem apresentar características específicas como facilidade de plantio, adaptabilidade ao clima local, rápido crescimento, raízes longas e rendimento de biomassa.^[10,11]

Dessa forma, várias pesquisas científicas têm sido realizadas visando avaliar novas plantas que possam auxiliar neste processo de redução dos níveis de contaminantes no meio ambiente.^[12] *Catharanthus roseus* (L.) G. Don é uma planta que apresenta elevada resistência a diferentes tipos de estresses ambientais, como salinidade, radiação intensa de UV-B, déficit hídrico e carência nutricional.^[13] Essa espécie também conhecida como vinca é nativa de Madagáscar e possui elevado valor medicinal e paisagístico.^[14]

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de *C. roseus* como planta fitorremediadora dos metais As, Ba, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, Se e Zn presentes em substrato a base de lodo de esgoto.

Materiais e Metodologia

Amostras

As sementes de *C. roseus* foram obtidas no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG - *Campus* Montes Claros (MG, Brasil), nas coordenadas 16°40'5" S e 43°50' W, e a 640 metros de altitude. O substrato comercial composto de casca de pinus moída, moinha de carvão, terra preta e adubo foi adquirido em casa de floricultura. Já o lodo de esgoto foi obtido na ETE de Montes Claros, MG, em 2017.

As propriedades físico-químicas e a concentração de metais totais do lodo e no substrato comercial, que foram determinadas em laboratório, estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e concentração de metais totais do lodo de esgoto e do substrato comercial usados neste experimento

Propriedades	Lodo de esgoto	Substrato Comercial
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1933 \pm 6,60	915 \pm 6,45
Umidade (%)	6,10	22,5
pH (1:5 = sólido:água)	6,70	7,20
Matéria orgânica (%)	65,0 \pm 0,68	25,5 \pm 1,9
C - Orgânico (%)	31,2 \pm 0,54	14,8 \pm 0,001
N - Total (%)	3,31 \pm 0,034	0,37 \pm 0,001
P - Mehlich (g kg^{-1})	0,425 \pm 0,050	0,112 \pm 0,004
K - Total (g kg^{-1})	0,436 \pm 0,075	0,609 \pm 0,057
Mg - Total (g kg^{-1})	1,92 \pm 0,098	0,441 \pm 0,075
Fe - Total (mg kg^{-1})	23991 \pm 15	6437 \pm 37
Mn - Total (mg kg^{-1})	150 \pm 4,3	48,3 \pm 1,2
Na - Total (mg kg^{-1})	321 \pm 17	57 \pm 8,4
As - Total (mg kg^{-1})	3,62 \pm 0,72	5,50 \pm 0,60
Ba - Total (mg kg^{-1})	176 \pm 0,72	56,3 \pm 0,07
Cr - Total (mg kg^{-1})	38,5 \pm 0,34	24,0 \pm 1,9
Cd - Total (mg kg^{-1})	0,780 \pm 0,052	0,180 \pm 0,03
Cu - Total (mg kg^{-1})	153 \pm 0,46	9,96 \pm 0,73
Ni - Total (mg kg^{-1})	75,5 \pm 0,50	48,3 \pm 9,4
Pb - Total (mg kg^{-1})	34,8 \pm 1,7	9,76 \pm 2,1
Zn - Total (mg kg^{-1})	652,5 \pm 10	73,0 \pm 2,7

Nota: Dados expressos em média \pm desvio padrão (n = 3)

Experimento de retenção de água

A proporção de lodo e vermiculita foi determinada através de ensaios de retenção de água. Para isso, em um erlenmeyer de 125 mL foi colocado um funil (60 mm) contendo chumaço de algodão. Em seguida, foram transferidos 20 mL da mistura lodo e vermiculita nas seguintes proporções: 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40 e 50:50, respectivamente. Cada mistura foi eluída com 25 mL de água destilada e o volume final foi recolhido e registrado. O experimento foi realizado em triplicata.

Germinação de sementes de *C. roseus*

As sementes de *C. roseus* foram embebidas em água destilada por 24 h e quatro sementes foram dispostas em cada célula da bandeja de isopor contendo substrato comercial. Após a germinação, as mudas contendo dois pares de folhas foram transplantadas para os tratamentos de cultivo. Para o cultivo foi empregado substrato comercial (tratamento controle) e a mistura constituída por lodo de esgoto e vermiculita na proporção 70:30 (v/v). A mistura de lodo e vermiculita apresentaram as seguintes características: condutividade elétrica de $1751 \mu\text{S cm}^{-1}$; 1,20% de umidade; pH 6,4 (1:5 = sólido:água); 55,3% de matéria orgânica; 36,6% de carbono orgânico; 3,42% de N-Total; $0,280 \text{ g kg}^{-1}$ de P-Mehlich; $3,07 \text{ g kg}^{-1}$ de K-Total; $8,57 \text{ g kg}^{-1}$ de Mg-Total.

Metais disponíveis por lixiviação nos substratos

O método padrão 1311, conhecido como Procedimento de Lixiviação para Características de Toxicidade (PLCT), foi adotado com adaptações para obter os metais disponíveis no lodo de esgoto, vermiculita, substrato comercial e na mistura lodo:vermiculita (70:30).^[14] Neste método, 40 mL de solução de ácido acético glacial pH = 2,88 (Sigma Aldrich, EUA) foram adicionados em 2 mL dos substratos. Posteriormente, o sistema foi agitado a 29 rpm por 18 h em mesa agitadora e após a extração foi centrifugado a 4000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi coletado, diluído na proporção de dez vezes e filtrado em membrana de *nylon* de $0,45 \mu\text{m}$. Em seguida, foi determinada a concentração dos metais em cada extrato por espectrômetro de massas em tandem com plasma indutivamente acoplado.

Cultivo de *C. roseus*

O cultivo foi conduzido em casa de vegetação coberto com sombrite® 50% no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, Campus Montes Claros (ICA-UFMG). O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. As mudas de *C. roseus* contendo dois pares de folhas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 0,7 L, contendo os substratos e os vasos foram dispostos em bancada. Foram cultivadas três repetições de *C. roseus* em substrato comercial, sendo o tratamento controle, e dez repetições de *C. roseus* cultivada na mistura de lodo de esgoto e vermiculita (70:30, v/v). Todos os vasos foram regados com água destilada uma vez ao dia e não foi necessário o controle de pragas.

As plantas foram avaliadas morfológicamente em 30, 40, 60, 80, 90, 100 e 108 dias após o plantio entre os meses de maio a setembro de 2017. Neste período foram avaliados o (1) número de folhas, (2) altura da planta e (3) diâmetro do caule.

As plantas foram retiradas do substrato, separadas em folhas, flores, vagens, caules e raízes. Em seguida, foram lavadas com água ultrapura (resistividade maior que $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$, Millipore, EUA) e o excesso de água foi removido com papel toalha. As partes das plantas foram transferidas para sacos de papel identificados e secas em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 72 h. Após a secagem, as amostras foram finamente trituradas com auxílio de pistilo e almofariz e armazenadas em recipientes de plástico até a etapa de digestão.

Digestão das amostras

Todas as vidrarias utilizadas para os ensaios laboratoriais foram imersas em solução de HNO₃ 10% (v/v) e lavadas três vezes com água ultrapura. Foram selecionadas três repetições das plantas de *C. roseus* cultivadas em lodo de esgoto:vermiculita, e três das cultivadas no substrato comercial (controle). O procedimento de digestão consistiu em adicionar 5 mL de água ultrapura, 2 mL de HNO₃ puríssimo a 65% (v/v) (Sigma Aldrich, EUA) e 1 mL de H₂O₂ a 30% (v/v) (Sigma Aldrich, EUA) em 0,1000 g das amostras de folha, caule e raiz das plantas cultivadas em lodo. O mesmo procedimento foi realizado nas plantas do controle com redução da massa para 0,0500 g.^[15]

As amostras foram digeridas em forno de micro-ondas Mars 6 (CEM, EUA) em tubos de teflon com capacidade de 55 mL. A potência utilizada variou de 800 a 1200 W, o tempo de rampa foi de 5,5 min até a temperatura de 175 °C e permanência por 4,5 min. Para finalizar foi necessário o tempo de 15 min de arrefecimento do sistema. Após a digestão, as amostras foram filtradas em papel qualitativo e recuperadas em volume de 25 mL. Em seguida, foram transferidas para frascos plásticos e armazenados em geladeira (4 °C).

Análise por ICP-MS/MS

A quantificação multielementar de As, Ba, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se e Zn nas amostras de *C. roseus* e do experimento de lixiviação foi realizada em espectrômetro de massas em tandem com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS/MS) 8800 (Agilent Technologies, Japão). As amostras foram aspiradas em amostrador automático ASX-500 com auxílio de uma bomba peristáltica. Foram utilizados como parâmetros de análise a potência de 1550 W na radiofrequência, 15 L min⁻¹ de gás Ar no plasma, 1,09 L min⁻¹ de gás carregador, 0,9 L min⁻¹ de gás auxiliar, 10 mm de profundidade da amostragem e 2 °C na câmara de nebulização. O He (99,999% de pureza) foi utilizado, em fluxo de 5 mL min⁻¹, como gás de colisão para remover interferentes poliatômicos. Foram monitoradas as massas atômicas 52 (Cr), 58 (Ni), 63 (Cu), 64 (Zn), 75 (As), 80 (Se), 114 (Cd), 138 (Ba), 208 (Pb).

A solução estoque multielementar foi adquirida da Sigma Aldrich (EUA) contendo os metais As, Ba, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se e Zn, em diferentes concentrações, foi diluída para obtenção das curvas analíticas em solução de HNO₃ a 2% (65% puríssimo, v/v).

Potencial de Fitorremediação de *C. roseus*

Para avaliar o potencial de fitorremediação de *C. roseus* foram determinados o Fator de Bioconcentração (FB) e o de Translocação (FT) nos dois tratamentos. O FB foi obtido pela razão entre a concentração total do metal nas raízes das plantas cultivadas no tratamento controle pela concentração de metais totais no substrato comercial. O mesmo cálculo de FB foi obtido para o tratamento com lodo, considerando a concentração total do metal nas raízes das plantas cultivadas no lodo pela concentração de metais totais no lodo de esgoto (Tabela 1). Este fator indica a eficiência da planta em acumular metais do solo ou água nos tecidos vegetais. O FT avalia a capacidade das espécies vegetais em translocar os metais das raízes para a parte aérea da planta.^[3,16] O FT foi calculado pela razão numérica entre a concentração do metal na parte aérea e na raiz.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANAVA) pelo teste-*F* a 5% de significância e as médias significativas entre folhas, caules e raízes do controle e tratamento foram comparadas pelo teste de *Dunnet*. As médias das concentrações dos metais analisados nos extratos obtidos por PLCT foram comparadas pelo teste de *Tukey*. Todos os parâmetros foram realizados no programa estatístico BioEstat 5.3.

Resultados e Discussão

Experimento de retenção de água

A adição de vermiculita foi importante tanto para a retenção de água na mistura de substratos, quanto para a minimização do estresse salino sofrido pela planta nas primeiras semanas após o transplante. Como pode ser observado na Figura 1, os teores de lodo de esgoto superiores a 80% apresentaram menor retenção de água.

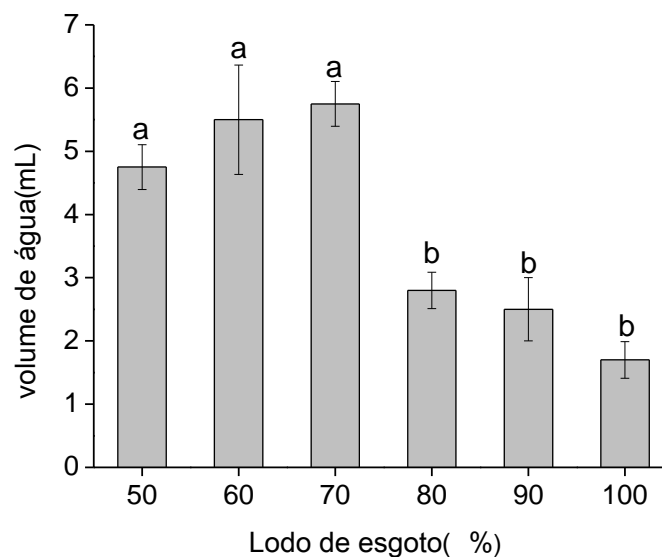


Figura 1. Ensaio de retenção de água nas proporções de lodo e vermiculita 50:50, 60:40, 70:30, 80:20, 90:10 e 100%, respectivamente. Barras acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 5% de probabilidade

As misturas contendo 50 e 60% de lodo foram semelhantes estatisticamente, no entanto não foram utilizadas para o cultivo de *C. roseus*, pois apresentaram maior teor de vermiculita. A mistura 70% de lodo e 30% de vermiculita foi escolhida como ideal, pois nesta condição foi obtida maior retenção de água com maior teor de lodo na mistura.

Metais disponíveis por lixiviação nos substratos

Na Tabela 2 estão representados os metais quantificados no extrato obtido pelo método PLCT.

Tabela 2. Concentração (mg kg^{-1}) dos metais no extrato de lixiviação dos substratos quantificados por ICP-MS/MS

Metais	Substrato comercial	Vermiculita	Lodo de esgoto	LD:VM
As	0,345a \pm 0,050	-	0,600b \pm 0,17	0,670b \pm 0,15
Ba	1,44a \pm 0,16	3,57b \pm 0,050	2,98ab \pm 0,30	3,63bc \pm 0,22
Cr	0,155a \pm 0,014	0,670ab \pm 0,37	1,57b \pm 0,025	1,63b \pm 0,018
Cd	-	-	0,0270a \pm 0,0001	0,0415a \pm 0,012
Cu	-	-	10,3a \pm 0,38	6,45b \pm 0,58
Ni	-	-	6,20a \pm 0,48	5,27a \pm 0,26
Pb	0,0034a \pm 0,00049	2,10b \pm 0,17	0,920c \pm 0,18	0,940c \pm 0,23
Se	0,345a \pm 0,050	-	0,722a \pm 0,0001	0,674a \pm 0,11
Zn	-	-	100a \pm 3,5	126b \pm 1,33

Notas: Dados foram representados como média \pm DP (n = 3). LD:VM – lodo:vermiculita (70:30). Médias acompanhadas da mesma letra na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os resultados mostraram que as concentrações dos metais avaliados no substrato comercial foram inferiores e diferiram das concentrações da mistura lodo:vermiculita, e somente a concentração de Se não diferiu estatisticamente. Os elementos Cd, Cu, Ni e Zn não foram quantificados no substrato comercial. Em estudo recente realizado com o PLTC verificou-se que os metais Cd, Cu, Pb e Zn apresentaram maior mobilidade do que o Cr em solos contaminados.^[17]

Na Tabela 2 também se pode observar que os nove metais monitorados foram quantificados na mistura lodo:vermiculita e as concentrações de As, Ba, Cd, Cr, Ni, Pb e Se foram similares ao lodo de esgoto. Estes resultados mostraram que a vermiculita não liberou metais tóxicos, e neste estudo foi escolhida para ser condicionadora do lodo de esgoto e favorecer na retenção de água do sistema.^[18]

A concentração dos metais avaliados no lodo foram inferiores aos limites máximos permitidos pela Resolução brasileira n° 375, CONAMA.^[4] Vale ressaltar que, a disponibilidade de metais pesados e nutrientes dependem de fatores como o pH, matéria orgânica, exsudados radiculares, biomassa microbiana, e trocas catiônicas.^[19] Além disso, a metodologia PLCT permite determinar apenas a fração potencialmente móvel e bioacessível do metal, que são definidas operacionalmente.^[18]

Cultivo de *C. roseus*

Após o período de 30 dias de cultivo de *C. roseus* foram observadas diferenças morfológicas entre as plantas controle e as cultivadas no lodo de esgoto, como mostrado na Figura 2-ab. Além disso, o desenvolvimento de flores foi verificado apenas nas plantas cultivadas em lodo de esgoto até os 108 dias. Para fins comerciais, geralmente as plantas de *C. roseus* são colhidas três meses após a germinação, pois é quando começam a florir.^[20]

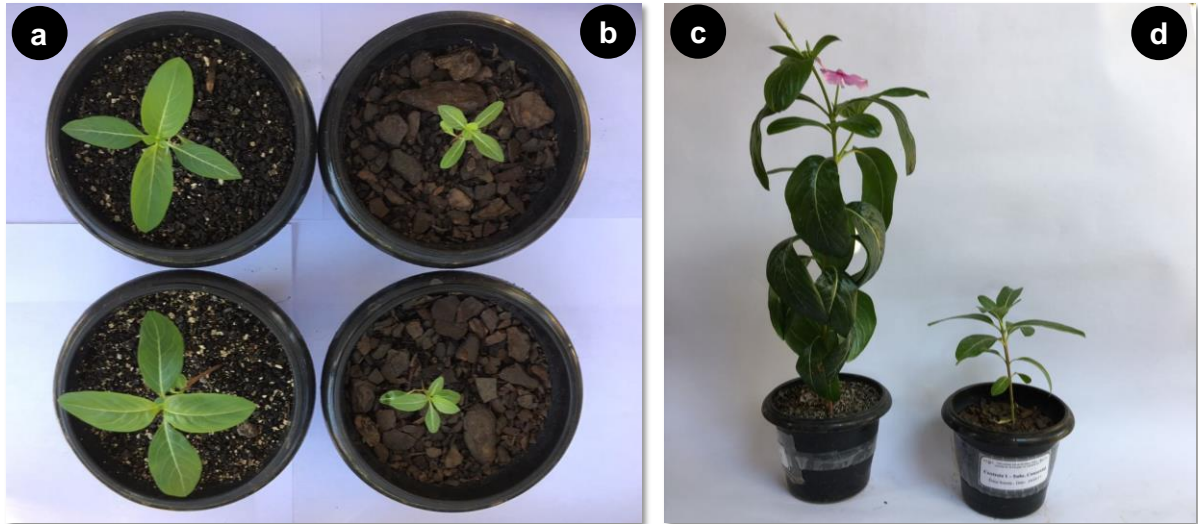


Figura 2. Fotografias de *C. roseus*, a) após 30 dias de cultivo em lodo:vermiculita e em b) substrato comercial (controle); c) após 90 dias de cultivo em lodo:vermiculita e em d) substrato comercial (controle)

Por outro lado, as plantas cultivadas no lodo foram favorecidas pela presença significativa de elementos envolvidos na floração, como Zn e Cu, pois a concentração destes metais foi cerca de nove e quinze vezes superior ao controle, respectivamente, como pode ser visto na Tabela 1.^[21] No período de 90 dias, algumas plantas cultivadas no lodo apresentaram dificuldades para se estabelecerem eretas devido ao tamanho das folhas (Fig. 2-c). Desta forma, as avaliações morfológicas realizadas nas plantas evidenciaram o incremento significativo de altura, número de folhas, diâmetro de caule e massa fresca em virtude do uso do lodo de esgoto (Fig. 3).

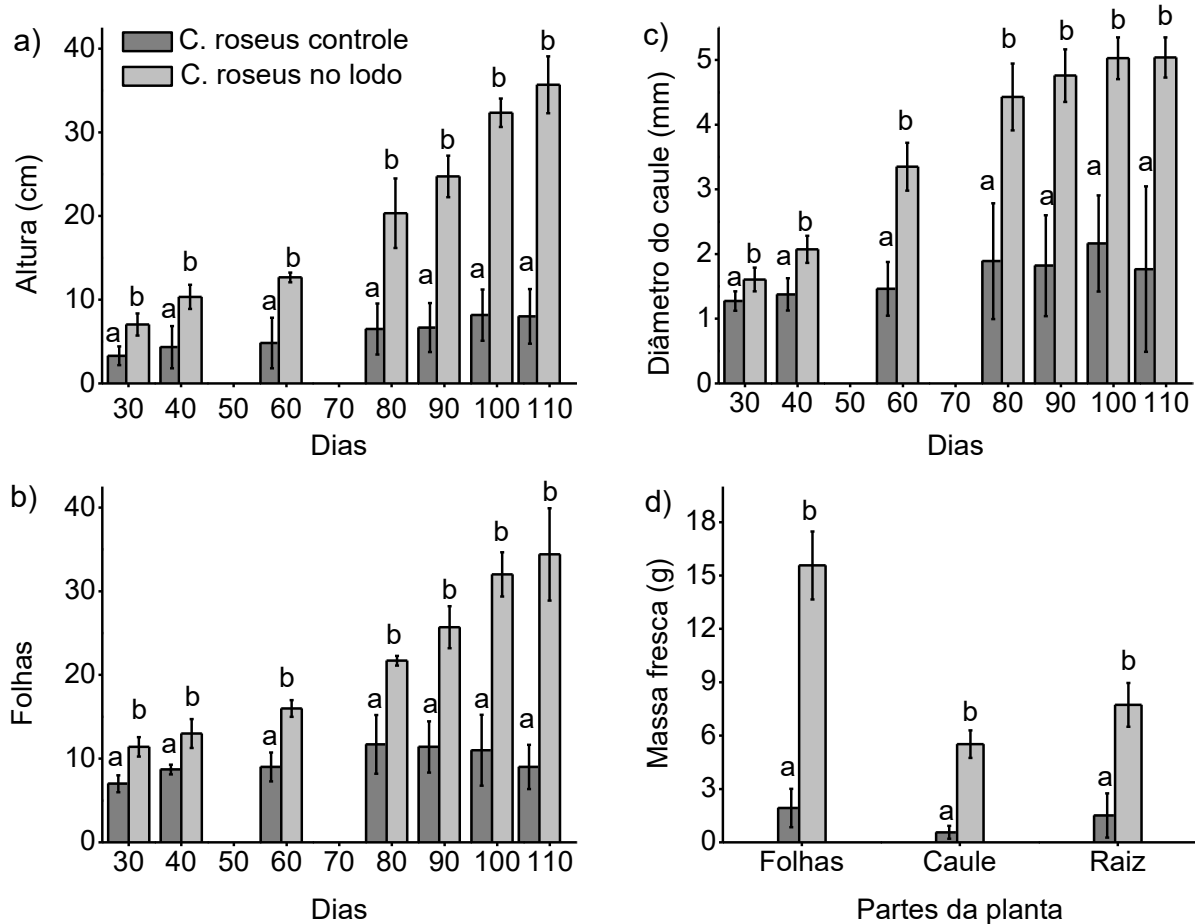


Figura 3. Avaliações morfológicas de *C. roseus* no período de 30 a 108 dias de cultivo em lodo:vermiculita, e no substrato comercial (controle), considerando: a) altura, b) número de folhas e c) diâmetro do caule e d) massa fresca. Barras acompanhadas da mesma letra não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de significância.

A altura de *C. roseus* manteve-se crescente até o período de maturação observado, chegando a atingir em média 36 cm em 108 dias de avaliação (Fig. 3-a). Vale ressaltar que, esta planta pode atingir cerca de 1 m de altura.^[22] O número de folhas das plantas cultivadas no lodo foi cerca de quatro vezes superior às do controle (Fig. 3-b). O diâmetro médio do caule das plantas controle foi aproximadamente 50% inferior à média das plantas cultivadas no lodo (Fig. 3-c). Além disso, foi verificado desenvolvimento de sistema radicular mais longo e ramificado nas plantas cultivadas no lodo de esgoto, resultando em maior rendimento de massa fresca da raiz (Fig. 3-d). Este tratamento possibilitou um incremento de massa fresca de 90, 92 e 86% nas folhas, caule e raiz, respectivamente (Fig. 3-d). Trabalho recente também verificou o rendimento de altura, número de folhas e biomassa em *Melastoma malabathricum* cultivada em proporção de lodo de esgoto semelhante (60% de lodo com 40% de solo).^[3]

Análise dos metais no material vegetal

Para avaliação dos metais no material vegetal foi necessário utilizar menor massa de amostras do controle para a digestão, em virtude do menor rendimento de massa seca após o cultivo. As

concentrações dos metais quantificados nas folhas, caules e raízes de *C. roseus* estão representadas na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração (mg kg^{-1}) de metais nas folhas, caule e raiz de *C. roseus* quantificados por ICP-MS/MS nos dois tratamentos

Metais	Folhas		Caules		Raízes	
	Controle	LD:VM	Controle	LD:VM	Controle	LD:VM
As	0,352a \pm 0,11	0,370a \pm 0,12	-	0,0097 \pm 0,0056	0,393a \pm 0,15	2,05b \pm 0,13
Ba	15, 6a \pm 10	11,3a \pm 0,56	13,2a \pm 5,7	7,80a \pm 1,2	16,9a \pm 1,44	42,68b \pm 3,3
Cr	0,0630 (SR)	0,180 \pm 0,088	0,280 (SR)	0,178 \pm 0,10	0,80a \pm 0,41	3,57b \pm 0,27
Cd	0,16a \pm 0,0087	0,188a \pm 0,008	0,19a \pm 0,063	0,247a \pm 0,059	0,35a \pm 0,07	2,04b \pm 0,02
Cu	7,80a \pm 2,5	12,7a \pm 1,1	7,30a \pm 1,9	16,3b \pm 2,0	11,2a \pm 2,8	208b \pm 13
Ni	1,42a \pm 0,76	1,33a \pm 0,089	1,92a \pm 0,59	2,07a \pm 0,43	2,32a \pm 0,27	18,9b \pm 4,0
Pb	0,815a \pm 0,53	0,418a \pm 0,10	0,850a \pm 0,2	0,27b \pm 0,050	2,95a \pm 1,2	4,15a \pm 1,2
Se	1,20a \pm 0,45	0,125a \pm 0,041	-	0,995 \pm 0,57	0,990 (SR)	2,34 \pm 0,43
Zn	71,6a \pm 17	140a \pm 21	115a \pm 9,1	320b \pm 56	143a \pm 55	1121b \pm 87

Notas: Dados foram representados como média \pm DP (n = 3). SR = Concentração obtida de apenas uma amostra. LD:VM = Lodo:vermiculita. Tratamentos seguidos da mesma letra em cada parte da planta não diferem estatisticamente pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de significância.

Considerando o somatório das concentrações dos metais nas três partes do vegetal, as plantas cultivadas no lodo de esgoto apresentaram maior concentração que as do controle. Nas plantas cultivadas no lodo, as concentrações dos metais nas raízes sempre foram superiores às encontradas nos caules e nas folhas.

Nos dois tratamentos o As foi absorvido pela *C. roseus* e apresentou concentrações semelhantes nas folhas. Em estudo de fitorremediação realizado com plantas ornamentais, após aplicação de diferentes concentrações de As, foi verificada concentrações semelhantes desse metal nas partes aérea da planta (*Helianthus annuus*).^[23]

Os teores do Ba foram semelhantes nas folhas, caules e raízes das plantas controle, porém a maior concentração foi observada nas raízes da planta cultivada no lodo. Em estudos de fitorremediação foi descrito que a concentração elevada deste metal favoreceu o aumento de biomassa em *T. domingensis* e *C. papyrus* cultivadas em solos contaminados.^[24]

O teor de Cr encontrado nas raízes de *C. roseus*, cultivada em lodo de esgoto, foi em torno de 77% superior as do controle. A fitorremediação deste metal pela *C. roseus* já foi avaliada em diferentes substratos, como lodo de esgoto primário, secundário e solos contaminados.^[25,26] Nestes estudos a planta foi considerada fitoextratora eficiente em tratamentos que apresentaram menor concentração do Cr.

As concentrações de Cd foram decrescentes das raízes para as folhas nos dois tratamentos, demonstrando a especificidade da planta para este metal. A tolerância e o desenvolvimento de *C. roseus*

no cultivo contendo Cd já foram avaliados em condições de hidroponia, e, foi verificada maior concentração de Cd nas raízes da planta.^[12]

Cu, Ni e Zn estão entre os metais quantificados em maiores concentrações na *C. roseus*. Estes micronutrientes em concentrações adequadas desempenham funções nobres nos vegetais como cofatores de enzimas, fotossíntese (Cu), transcrição de DNA (Zn), hidrólise da ureia (Ni), floração e crescimento das plantas (Cu e Zn).^[21] No entanto, em elevadas concentrações podem ser fitotóxicos.^[27] Assim, segundo Krämer, as concentrações nas plantas podem variar de 20 a 30 mg kg⁻¹ para o Cu, 100 a 300 mg kg⁻¹ para o Zn e 10 a 50 mg kg⁻¹ para o Ni.^[28] No presente estudo, as raízes das plantas cultivadas no lodo apresentaram concentrações médias de 7 e 3,7 vezes superiores de Cu e Zn, respectivamente, porém efeitos visuais de toxicidade não foram verificados.

Nas folhas de *C. roseus* cultivadas no controle, a concentração de Se foi cerca de 10 vezes superior às cultivadas no lodo. Já no tratamento com lodo de esgoto, a concentração foi decrescente das raízes para as folhas. Vale ressaltar que as concentrações deste metal foram quantificadas em níveis abaixo da faixa de toxicidade crítica de 3 a 100 mg kg⁻¹ em diferentes partes da planta.^[28] Por exemplo, um efeito tóxico em partes da planta de *Vigna unguiculata* L. Walp foi observado após aplicações superior a 50 g h⁻¹.^[29]

Comparando os dois tratamentos, o Pb foi quantificado em concentrações equivalentes, sendo observado maior teor nas raízes. Resultados semelhantes também descreveram maior concentração deste metal nas raízes de *C. roseus* cultivada em solos contaminados.^[30]

Potencial de Fitorremediação de *C. roseus*

Os valores de FB e FT são importantes para indicar o potencial de uma planta para fitorremediação. Valores superiores a 1 para estes fatores indicam que ocorreu a absorção e translocação do metal do substrato para as raízes e destas para as partes aéreas, respectivamente.^[31] Os resultados obtidos para cada metal estão representados na Figura 4.

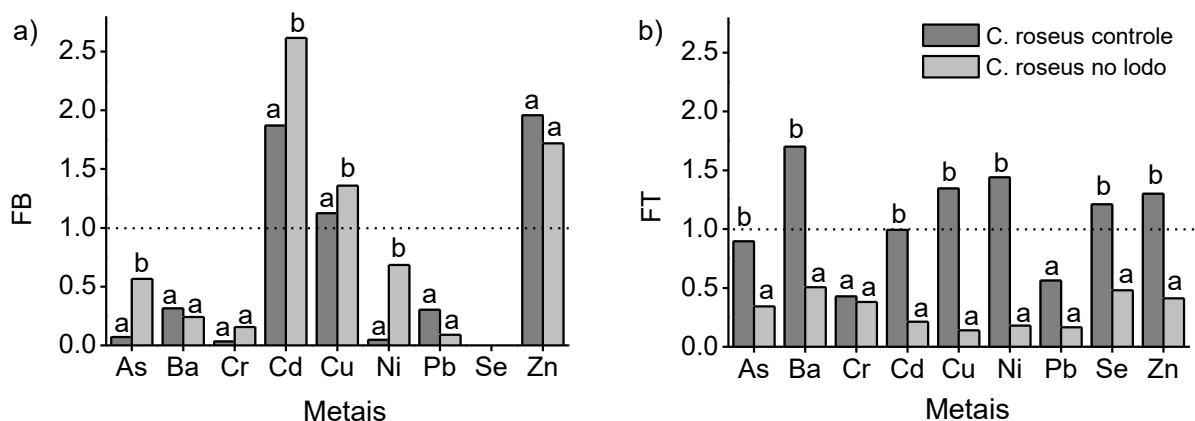


Figura 4. Fatores de a) bioconcentração (FB) e de b) translocação (FT) de metais em *C. roseus* cultivada em substrato comercial (controle) e em lodo de esgoto:vermiculita. Barras acompanhadas da mesma letra não diferem estatisticamente entre os tratamentos pelo teste de Dunnett ao nível de 5% de significância.

Foram verificados valores de FB superiores a 1 para Cd, Cu e Zn nos dois tratamentos (Fig. 4-a). No cultivo com lodo de esgoto, *C. roseus* absorveu em torno de 28% e 18% a mais de Cd e Cu, respectivamente, que no controle. Além disso, esta espécie apresentou em torno de 68% de tendência do FB para o Ni e 57% para o As, no tratamento a base de lodo de esgoto.

Para o estudo de FT, foram obtidos valores superiores a 1 para Ba, Cd, Cu, Ni, Se e Zn (Fig. 4-b) no controle, representando 67% dos metais avaliados e diferiram significativamente das plantas cultivadas no controle. No tratamento controle, o As apresentou cerca de 90% de tendência para o fator translocação. No cultivo em lodo de esgoto foi observado cerca de 40% do FT para As, Ba, Cd, Cr, Se e Zn na parte aérea da planta.

A associação entre FT e FB também podem ser utilizada para classificar as plantas fitorremediadoras. Geralmente, as que apresentam maiores valores de FB e menores valores de FT são consideradas fitoestabilizadoras, pois tendem a acumular os metais extraídos nos tecidos radiculares.^[3,32] Esta condição foi observada para Cd, Cu e Zn no tratamento com lodo. Vale ressaltar também que, neste tratamento foram obtidas concentrações decrescentes de Cr, Cd, Cu, Ni, Se e Zn nas raízes > caules > folhas de *C. roseus* (Tabela 3) indicando um processo de translocação progressivo. Em outro estudo, também foi verificado resultado semelhante de translocação de Pb em *C. roseus*.^[30]

As plantas fitoextratoras são aquelas que apresentam FT superior a 1, indicando a eficiência em translocar os metais para parte aérea.^[22] Este comportamento pode ser observado apenas utilizando o tratamento controle. Os resultados mostraram que *C. roseus* apresentou eficiências distintas para fitorremediação nos dois tratamentos, em virtude da disponibilidade dos metais em cada substrato (Tabela 2).

Conclusão

C. roseus atuou como uma unidade de fitorremediação, sendo fitoestabilizadora para os metais Cd, Cu e Zn presentes no lodo de esgoto e mostrou uma alta tendência à fitoestabilização dos metais Ni e As. Essa planta também atuou como um fitoextrator para os metais Ba, Cd, Cu, Ni, Se e Zn presentes no substrato comercial.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Agradecemos também, ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG) pela infra-estrutura e realização do trabalho.

Referências

- [1] Roy, T.; Biswas, D. R.; Ghosh, A.; Patra, A. K.; Singh, R. D.; Sarkar, A.; Biswas, S. S. Dynamics of Culturable Microbial Fraction in an Inceptisol under Short-Term Amendment with Municipal Sludge from Different Sources. *Appl. Soil Ecol.* **2019**, *136*, 116–121. DOI: 10.1016/j.apsoil.2018.12.024.
- [2] Guidi Nissim, W.; Cincinelli, A.; Martellini, T.; Alvisi, L.; Palm, E.; Mancuso, S.; Azzarello, E. Phytoremediation of Sewage Sludge Contaminated by Trace Elements and Organic Compounds. *Environ. Res.* **2018**, *164*, 356–366. DOI: 10.1016/j.envres.2018.03.009.
- [3] Patek-Mohd, N.-N.; Abdu, A.; Jusop, S.; Abdul-Hamid, H.; Karim, M. R.; Nazrin, M.; Akbar, M.-H.; Jamaluddin, A. S. Potentiality of *Melastoma malabathricum* as Phytoremediators of Soil Contaminated with Sewage Sludge. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)* **2018**, *75*, 27–35. DOI: 10.1590/1678-992x-2016-0002.
- [4] National Council for the Environment – Brazil (CONAMA). Resolution no 375/2006. Defines criteria and procedures for the agricultural use of sewage sludge generated in sewage treatment plants and their derivate products, and makes other provisions. <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf> (accessed Jul 28, 2016).
- [5] United States Environmental Protection Agency (USEPA). A Guide to the Biosolids Risk Assessments for the EPA Part 503 Rule; EPA/832-B-93-005, 1995. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2018-11/documents/guide-biosolids-risk-assessmentspart503.pdf> (accessed Aug 16, 2016).
- [6] European Economic Community (EEC). Council Directive of 12 June 1986 on the Protection of the Environment, and in Particular of the Soil, When Sewage Sludge Is Used in Agriculture; 86/278/EEC. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/f76faa39-2b27-42f2-be1e-9332f795e324/language-en> (accessed Dec 1, 2016).
- [7] Zhang, H.; Ma, G.; Sun, L.; Li, H. Effect of Alkaline Material on Phytotoxicity and Bioavailability of Cu, Cd, Pb and Zn in Stabilized Sewage Sludge. *Environ. Technol.* **2018**, *39*, 2168–2177. DOI: 10.1080/09593330.2017.1351496.
- [8] Tabinda, A. B.; Irfan, R.; Yasar, A.; Iqbal, A.; Mahmood, A. Phytoremediation Potential of *Pistia stratiotes* and *Eichhornia crassipes* to Remove Chromium and Copper. *Environ. Technol.* **2018**, 1–6. DOI: 10.1080/09593330.2018.1540662.
- [9] Quintella, C. M.; Mata, A. M. T.; Lima, L. C. P. Overview of Bioremediation with Technology Assessment and Emphasis on Fungal Bioremediation of Oil Contaminated Soils. *J. Environ. Manage.* **2019**, *241*, 156–166. DOI: 10.1016/j.jenvman.2019.04.019.
- [10] United States Environmental Protection Agency (USEPA). Introduction to Phytoremediation; EPA/600/R-99/107, 2000, 377. https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_report.cfm?Lab=NRMRL&dirEntryId=63433 (accessed Jan 14, 2017).
- [11] Bertan, A. S.; Baumbach, F. P.; Tonial, I. B.; Pokrywiecki, T. S.; Dêusman, E. Assessment of Phytoremediation Potencial of *Allium cepa* L. in Raw Sewage Treatment. *Brazilian J. Biol.* **2019**, *6984*. DOI: 10.1590/1519-6984.214278.

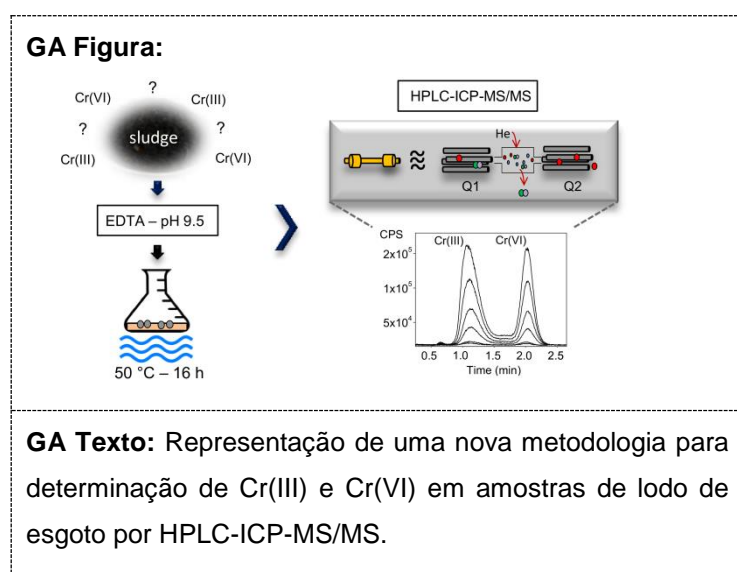
- [12] Chen, Q.; Lu, X.; Guo, X.; Pan, Y.; Yu, B.; Tang, Z.; Guo, Q. Differential Responses to Cd Stress Induced by Exogenous Application of Cu, Zn or Ca in the Medicinal Plant *Catharanthus roseus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2018**, *157*, 266–275. DOI:10.1016/j.ecoenv.2018.03.055.
- [13] Chang, B. W.; Cong, W. W.; Chen, Q.; Zhu, Y. g.; Tang, Z. H.; Kr€amer, U.; Makki, R. M.; Saeedi, A. A.; Khan, T. K.; Ali, H. M.; et al. The Effects of Organic Inputs on Growth, Yield, and Alkaloid Content of *Catharanthus roseus* L. under Defoliation Stress. *J. Plant Interact.* **2019**, *61*, 517–534.
- [14] United States Environmental Protection Agency (USEPA). Method 1311. Toxicity Characteristic Leaching Procedure, 1992. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/1311.pdf> (accessed June 3, 2017).
- [15] Fu, L.; Shi, S.-Y.; Chen, X.-Q. Accurate Quantification of Toxic Elements in Medicine Food Homologous Plants Using ICP-MS/ MS. *Food Chem.* **2018**, *245*, 692–697. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.136.
- [16] Yoon, J.; Cao, X.; Zhou, Q.; Ma, L. Q. Accumulation of Pb, Cu, and Zn in Native Plants Growing on a Contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* **2006**, *368*, 456–464. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2006.01.016.
- [17] Yutong, Z.; Qing, X.; Shenggao, L. Chemical Fraction, Leachability, and Bioaccessibility of Heavy Metals in Contaminated Soils, Northeast China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23*, 24107–24114. DOI: 10.1007/s11356-016-7598-9.
- [18] Farhan, A. F. A.; Zakaria, A. J.; Mat, P. N.; Mohd, K. S. Soilless Media Culture-A Propitious Auxiliary for Crop Production. *Asian J. Crop Sci.* **2017**, *10*, 1–9. DOI: 10.3923/ajcs.2018.1.9.
- [19] Rengel, Z. Availability of Mn, Zn and Fe in the Rhizosphere. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* **2015**, *15*, 397–409. DOI: 10.4067/S0718-95162015005000036.
- [20] Pan, Q.; Chen, Y.; Wang, Q.; Yuan, F.; Xing, S.; Tian, Y.; Zhao, J.; Sun, X.; Tang, K. Effect of Plant Growth Regulators on the Biosynthesis of Vinblastine, Vindoline and Catharanthine in *Catharanthus roseus*. *Plant Growth Regul.* **2010**, *60*, 133–141. DOI: 10.1007/s10725-009-9429-1.
- [21] Sheoran, V.; Sheoran, A. S.; Poonia, P. Factors Affecting Phytoextraction: A Review. *Pedosphere* **2016**, *26*, 148–166. DOI: 10.1016/S1002-0160(15)60032-7.
- [22] Nejat, N.; Maziah, M.; Valdiani, A.; Abiri, R.; Cahill, D.; Tan, Y.-H. Ornamental Exterior versus Therapeutic Interior of Madagascar periwinkle (*Catharanthus roseus*): The Two Faces of a Versatile Herb. *Sci. World J.* **2015**, *2015*, 1. DOI: 10.1155/2015/982412.
- [23] Reed, S. T.; Ayala-Silva, T.; Dunn, C. B.; Gordon, G. G.; Meerow, A. Screening Ornamentals for Their Potential as Accumulator Plants. *J. Agric. Sci.* **2013**, *5*, 20-27.
- [24] Ribeiro, P. R. C. d. C.; Viana, D. G.; Pires, F. R.; Egreja Filho, F. B.; Bonomo, R.; Cargnelutti Filho, A.; Martins, L. F.; Cruz, L. B. S.; Nascimento, M. C. P. Selection of Plants for Phytoremediation of Barium-Polluted Flooded Soils. *Chemosphere* **2018**, *206*, 522–530. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.05.056.
- [25] Ahmad, R.; Misra, N. Evaluation of Phytoremediation Potential of *Catharanthus Roseus* with respect to Chromium Contamination. *Am. J. Plant Sci.* **2014**, *05*, 2378–2388. DOI: 10.4236/ajps.2014.515251.
- [26] Ehsan, N.; Nawaz, R.; Ahmad, S.; Khan, M. M.; Hayat, J. Phytoremediation of Chromium-Contaminated Soil by an Ornamental. *J. Environ. Agric. Sci.* **2016**, *7*, 29–34.

- [27] Nardis, B. O.; Silva, E. B.; Graziotti, P. H.; Alleoni, L. R. F.; Melo, L. C. A.; Farnezi, M. M. M. Availability and Zinc Accumulation in Forage Grasses Grown in Contaminated Soil. *Int. J. Phytoremediation* **2018**, *20*, 205–213. DOI: 10.1080/15226514.2017.1365347.
- [28] Kramer, U. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, *61*, 517–534. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042809-112156.
- [29] Silva, V. M.; Boleta, E. H. M.; Lanza, M. G. D. B.; Lavres, J.; Martins, J. T.; Santos, E. F.; dos Santos, F. L. M.; Putti, F. F.; Junior, E. F.; White, P. J.; et al. Physiological, Biochemical, and Ultrastructural Characterization of Selenium Toxicity in Cowpea Plants. *Environ. Exp. Bot.* **2018**, *150*, 172–182. DOI: 10.1016/j.envexpbot.2018.03.020.
- [30] Subhashini, V.; Swamy, A. Phytoremediation of Lead, Cadmium and Chromium Contaminated Soils Using Selected Weed Plants. *Acta Biol. Indica* **2015**, *4*, 205-212.
- [31] Jamil, S.; Abhilash, P. C.; Singh, N.; Sharma, P. N. *Jatropha curcas*: A Potential Crop for Phytoremediation of Coal Fly Ash. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *172*, 269–275. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2009.07.004.
- [32] Vendruscolo, D.; Santana, N. A.; Souto, K. M.; Ferreira, P. A. A.; de Melo, G. W. B.; Jacques, R. J. S. Differential Behavior of the Summer Cover Crops in the Absorption and Translocation of Copper. *Cienc. Rural* **2018**, *48*, 1–11. DOI: 10.1590/0103-8478cr20180005.

4.2 Artigo 2- Otimização de metodologia para determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS

Este artigo foi elaborado conforme normas da *Journal of the Brazilian Chemical Society*

Graphical Abstract (GA)



Resumo

O Cr(III) em baixas concentrações não é tóxico ao homem e ao ambiente. Já o Cr(VI) é altamente tóxico e, está relacionado à problemas de saúde como carcinogêneses e mutagenicidade. Por isso, as legislações ambientais são altamente rigorosas no monitoramento dos teores de Cr(VI) presente em matrizes alimentares e ambientais. Entretanto, a legislação brasileira ainda não estabelece a concentração limite de Cr(VI) em matrizes como solo e lodo de esgoto. Vale destacar que, até o momento, não existem metodologias para determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em lodo de esgoto. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi otimizar uma metodologia para extração e especiação de Cr(III) e Cr(VI) em lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS. Os resultados obtidos revelaram que a extração sólido-líquido em banho-maria com agitação a 50°C por 16 h e fase extratora EDTA a 50 mmol L⁻¹ em pH 9,5 apresentou maior porcentagem de recuperação. No experimento de fortificação a recuperação foi superior a 80% e o desvio padrão relativo inferior a 6%. Nas análises de especiação foi comprovado que todo Cr(VI) foi reduzido espontaneamente a Cr(III) na amostra de lodo. Os limites de detecção e quantificação foram 0,060 e 0,20 µg L⁻¹, respectivamente, e as análises de Cr(III) por ICP-MS/MS foram lineares de 0,20 a 50 µg L⁻¹. O método desenvolvido apresentou eficiência de extração 13 vezes superior ao método EPA 1311. A metodologia foi aplicada com sucesso na quantificação do Cr(III) em uma amostra de lodo com concentração inferior ao estabelecido pela legislação europeia 80568/4225/91. Neste estudo, a determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) no lodo permitiu quantificar as espécies de cromo em uma única análise e avaliar a presença da reação de redução do cromo pelos componentes da matriz.

Palavras-chave: cromo, extração, especiação, biossólido, redução.

Introdução

O lodo de esgoto é um material sólido gerado após o tratamento de efluentes nas estações de tratamento de esgoto.¹ Este material tem sido utilizado na agricultura como fertilizante ou condicionador de solos, devido ao elevado teor de macro e micronutrientes e, principalmente, de matéria orgânica.² Entretanto, o lodo também pode apresentar em sua composição químicos contaminantes orgânicos e inorgânicos.¹

Em geral, os contaminantes inorgânicos são metais tóxicos como As, Cd, Pb, Hg e Cr, sendo que o Cr pode estar presente no ambiente nos estados de oxidação (III) e (VI).^{1,3} O Cr(III) em baixas concentrações não é tóxico ao homem e ao ambiente e, inclusive, é importante para o metabolismo humano.⁴ Por outro lado, o Cr(VI) é altamente tóxico e, em geral, está relacionado à problemas de saúde como carcinogêneses e mutagenicidade.⁵

Por isso, as legislações ambientais são altamente rigorosas no monitoramento dos teores de Cr(VI) presente em matrizes alimentares e ambientais.⁶ Atualmente no Brasil, a Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA)⁷ estabelece 1000 mg kg⁻¹ como a concentração limite de Cr total no lodo de esgoto. Entretanto, as concentrações máximas permitidas de cada espécie de Cr são estabelecidas por poucos países como a Hungria e a Grécia que determinam 1 e 10 mg kg⁻¹, respectivamente, como a concentração limite de Cr(VI) no lodo de esgoto.^{8,9}

Para atingir estes limites, diferentes metodologias de extração deste metal tem sido desenvolvidas para determinação de Cr(VI) em matrizes como a água,¹⁰ solos,^{11,12} e alimentos de origem vegetal, animal e industrializados.¹³⁻¹⁵ Entretanto, até o momento, não existe nenhuma metodologia de extração e análise simultânea destas espécies de Cr em amostras de lodo de esgoto. Essa determinação simultânea apresenta como vantagens a quantificação de Cr(III) e Cr(VI) em uma única análise no extrato de lodo, além disso, permite menor número de etapas no preparo das amostras e maior rapidez na execução da análise.

No passado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) definiu uma metodologia conhecida como Procedimento de Lixiviação para Características de Toxicidade (PLCT) para determinar a mobilidade de contaminantes tóxicos como o Cr, em resíduos líquidos e sólidos, através do protocolo EPA 1311.¹⁶ Neste método é comum a quantificação do Cr nos extratos por espectrometria de emissão óptica por plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).^{17,18}

No entanto, para análise simultânea de cada espécie de Cr em níveis de traços é necessária o uso de técnicas de separação como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), seguida de uma técnica de detecção como o espectrômetro de massas em tandem com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS/MS).¹³

Por isso, o objetivo desta pesquisa foi otimizar e validar uma nova metodologia baseada na extração sólido-líquido e análise por HPLC-ICP-MS/MS para a determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em amostra de lodo de esgoto.

Experimental

Reagentes e soluções

Os ácidos HCl (36%, v/v), CH₃COOH glacial, HNO₃ (65%, v/v) puríssimo e os reagentes Na₂SO₄, ácido etilenodiaminotetracético sal dissódico diidratado (EDTA.2Na), NaOH, NaH₂PO₄, Cr(NO₃)₃ e K₂CrO₄ foram obtidos da Sigma Aldrich (EUA) com grau de pureza superior a 99% (m/m). NH₄OH (30%, v/v) foi obtido da Neon (Brasil).

As soluções padrão de Cr(III) e Cr(VI) na concentração de 1000 mg L⁻¹ foram preparadas em água ultrapura (Millipore, EUA) a partir dos padrões analíticos de alta pureza, Cr(NO₃)₃ e K₂CrO₄, respectivamente. Essas soluções foram diluídas para preparar as soluções de trabalho.

Instrumentação

Na etapa de otimização das condições de extração de Cr(III) e Cr(VI) foram utilizados o vortex da Scilogex (USA), banho ultrassônico da Unique (Brasil), banho-maria com agitação (Nova Ética, Brasil), chapa de aquecimento (Tecnal, Brasil), pHmetro Quimis (Brasil) e centrífuga da Kindly (Brasil). Também foi utilizado durante o desenvolvimento do trabalho um forno de micro-ondas Mars 6 da CEM (EUA).

Análises por espectrometria de absorção atômica (AAS)

O espectrofotômetro de absorção atômica (AAS 240 FS, Varian) foi utilizado para determinação do teor de Cr na amostra de lodo durante a etapa de otimização do método de extração. As análises foram realizadas no modo chama utilizando ar-acetileno (acetileno 2.8 AA).

Análises por HPLC-ICP-MS/MS

Para realizar a especiação do Cr foi utilizado um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies, Japão) acoplado ao espectrômetro de massas em tandem com plasma indutivamente acoplado, ICP-MS/MS 8800 (Agilent Technologies, Japão). O sistema foi equipado com bomba quaternária G1311B, compartimento de coluna G1316A e amostrador automático G1329B.

A especiação de Cr(III) e Cr(VI) foi realizada em uma coluna cromatográfica de troca aniônica de resina de polimetacrilato (30 × 4,6 mm, 10 μm), modelo G3268, obtida da Agilent Technologies (Japão). A eluição dos analitos-alvo ocorreu no modo isocrático em fluxo de 1,3 mL min⁻¹ com fase móvel constituída por 5 mmol L⁻¹ de EDTA, 15 mmol L⁻¹ de Na₂SO₄ e 5 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄, com pH 7 ajustado com solução de NaOH a 1,0 mol L⁻¹. As análises ocorreram a 30 °C e o volume de injeção foi de 100 μL.

As condições de operação do ICP-MS/MS foram ajustadas para radiofrequência com potência de 1550 W, fluxo de 15 L min⁻¹ de gás argônio no plasma, taxa de 1,10 L min⁻¹ de gás carregador, gás auxiliar de 0,9 L min⁻¹, profundidade da amostragem foi de 8 mm e temperatura de 2 °C na câmara de nebulização. Foram usados amostrador e *skimmer* cone de níquel. O gás de colisão foi o Hélio com

pureza de 99,999% e fluxo de 4,3 mL min⁻¹. Os quadrupolos foram ajustados para monitorar a massa m/z 52 atribuída ao isótopo mais abundante de Cr (83,8%).

Complexação do cromo na solução padrão

Em pH de 4 a 12 o Cr(III) é pouco solúvel em água e não ocorre a sua eluição na coluna cromatográfica de troca aniônica.^{19,20} Dessa forma, foi necessário uma etapa de complexação dele antes da análise por HPLC-ICP-MS/MS para converter o Cr(III) presente na solução-padrão em [Cr-EDTA]. A metodologia consistiu em adicionar em um tubo de vidro 0,1 mL de solução padrão de Cr(III) a 10 mg L⁻¹ e 4,9 mL de solução de EDTA 15 mmol L⁻¹ com pH ajustado para 7 usando solução de NaOH a 1,0 mol L⁻¹. Posteriormente, o sistema foi aquecido a 60 °C por 30 min e, as diluições foram realizadas empregando a fase móvel.²¹ Essas soluções-padrão foram utilizadas para ajustar as condições de análise por HPLC-ICP-MS/MS.

Amostras de lodo de esgoto

As amostras de lodo de esgoto foram obtidas da estação de tratamento de esgoto de Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. Após a coleta, as amostras de lodo foram peneiradas em tamis de 2 mm e armazenadas em geladeira a 4 °C até momento de preparo das amostras. As características do lodo de esgoto estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características do lodo de esgoto

Características	Lodo de esgoto
Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	1933 \pm 7
Umidade (%)	6,10
pH (1:5 = sólido:água)	6,70
Matéria orgânica (%)	65,0 \pm 0,7
C - Orgânico (%)	31,2 \pm 0,5
Fe total (mg kg ⁻¹)	23991 \pm 15

Otimização do método de extração e fortificação das amostras de lodo

A extração de Cr(III) e Cr(VI) em amostra de lodo foi otimizada a partir de experimentos de fortificação e recuperação. Para isso, amostras de 0,200 g em triplicata, foram fortificadas com 0,1 mL de solução de Cr(III) a 250 mg L⁻¹ e deixadas em repouso por 24 h. O mesmo procedimento foi realizado fortificando amostras de lodo com apenas o Cr(VI).

Extração sólido-líquido assistida por microondas

Inicialmente, a extração das espécies de Cr foi baseada no trabalho realizado por Guidotti et al.¹¹ Seguindo essa metodologia, 0,200 g de amostra de lodo fortificada e 5 mL de uma fase extratora foram adicionadas a um tubo de teflon. Este tubo foi introduzido no forno de micro-ondas e a potência do

aparelho variou de 1030 a 1800 W em 25 min a fim de atingir 100 °C. O sistema permaneceu nesta temperatura por 5 min e, posteriormente, resfriado por 15 min. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo, o volume final foi ajustado para 25 mL com água ultrapura e finalmente analisado por AAS. Nessa extração foram avaliadas quatro fases extratoras, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros avaliados na otimização da extração de Cr(III) e Cr(VI) em amostras de lodo de esgoto

Extração sólido-líquido	Parâmetros	Níveis
Micro-ondas	Fase extratora	HCl em pH = 1 EDTA a 50 mmol L ⁻¹ em pH = 7 (ajustado com NaOH) EDTA a 50 mmol L ⁻¹ em pH = 9,5 (ajustado com NH ₄ OH) NH ₄ OH em pH = 10
Convencional	Homogeneização	Agitação em chapa (1 h) Vórtex (5 min) Banho-ultrassônico (30 min) Vórtex / banho-ultrassônico (5 / 30 min) Banho-maria com agitação a 100 rpm (24 h)
	Tempo (h)	1, 6, 16 e 24
	Temperatura (°C)	30, 40 e 50

Extração sólido-líquido convencional

Um novo procedimento experimental baseado na extração sólido-líquido convencional foi otimizado para aumentar a porcentagem de recuperação de Cr(III) e Cr(VI) nas amostras de lodo fortificadas. Para isso, foram utilizados 0,200 g de amostra de lodo fortificado e 5 mL de solução de EDTA a 50 mmol L⁻¹ em pH 9,5. O frasco contendo a amostra e a fase extratora foi agitado por diferentes modos de homogeneização, tempo e temperatura, os quais são detalhados na Tabela 2. Ao final de cada extração, o sobrenadante foi filtrado em papel de filtro qualitativo, o volume final foi ajustado para 25 mL com água ultrapura e as análises foram realizadas por AAS.

Análise estatística

Para cada parâmetro avaliado na etapa de otimização da extração (Tabela 2), os dados de recuperação foram submetidos à análise de variância (ANAVA) pelo teste-F a 5% de significância e as médias comparadas pelo teste de Duncan utilizando o programa estatístico Rstudio (Version 1.0.136 – © 2009-2016 Rstudio).

Especiação do Cr por HPLC-ICP-MS/MS

Amostras de lodo, em triplicata, foram fortificadas com solução padrão contendo simultaneamente Cr(III) e Cr(VI) e deixadas em repouso por 24 h. Depois essas amostras foram submetidas à extração sólido-líquido nas condições ótimas. Os extratos obtidos foram analisados por HPLC-ICP-MS/MS para estudar a especiação do Cr.

Para determinar as porcentagens de recuperação de cada espécie de Cr, uma curva analítica foi preparada diluindo a solução padrão de Cr(III) e Cr(VI) em extrato de lodo (calibração na matriz) a fim de minimizar os problemas associados ao efeito de matriz. Antes da análise por HPLC-ICP-MS/MS cada solução padrão preparada foi aquecida a 60 °C por 30 min para que o Cr(III) fosse complexado pelo EDTA presente no extrato da matriz.

Validação do método de extração

Cinco parâmetros de validação foram avaliados a fim de assegurar a confiabilidade dos resultados do método otimizado. Foram avaliados os limites de detecção (LD), de quantificação (LQ), linearidade, precisão e exatidão conforme recomendados pela IUPAC.²²

Comparação entre métodos

Determinação de Cr total

Uma amostra de lodo foi submetida à digestão em forno de micro-ondas, conforme o método recomendado pela EPA 3051A, a fim de determinar a concentração de Cr total e realizar a comparação entre métodos. Para isso, em tubo de teflon foram adicionados 0,200 g da amostra de lodo e 5 mL de HNO₃ puríssimo 65% (v/v). Em seguida, o tubo foi colocado em forno de micro-ondas e a potência do aparelho foi ajustada para variar de 800 a 1800 W durante 5,5 min. Nestas condições a temperatura final do sistema foi 175 °C e permaneceu por 4,5 min, posteriormente, o sistema foi resfriado em 15 min. Os extratos obtidos foram filtrados em papel de filtro qualitativo, recuperados em 25 mL e diluídos em 50 vezes com água ultrapura. A quantificação do Cr total no extrato foi realizada por ICP-MS/MS.

Método otimizado

A mesma amostra de lodo usada para determinação do Cr total foi submetida ao método otimizado a fim de determinar a porcentagem de extração do Cr biodisponível na amostra. Para isso, em erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 0,200 g de amostra e 5 mL de fase extratora constituída por solução de EDTA a 50 mmol L⁻¹ em pH 9,5. Em seguida, o sistema foi tampado e homogeneizado em banho-maria a 50 °C com agitação por 16 h. O sobrenadante foi centrifugado a 4000 rpm por 20 min, filtrado em papel de filtro qualitativo e recuperado em volume final de 25 mL com água ultrapura. O extrato obtido foi diluído em 10 vezes para as análises por HPLC-ICP-MS/MS. A porcentagem de extração de Cr foi determinada relacionando a concentração de Cr extraído e a concentração de Cr total presente na amostra (item anterior), considerando: [% = (mg kg⁻¹ de Cr extraído pelo método otimizado / mg kg⁻¹ Cr total) x 100].

Método EPA 1311

O método EPA 1311 foi usado para comparar a concentração de Cr extraída com o método proposto neste trabalho.¹⁶ Esta metodologia da EPA foi escolhida pela similaridade no procedimento experimental com o método otimizado. Para isso, em erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 1,000 g de lodo de esgoto e 40 mL de solução de ácido acético glacial em pH 2,88. Posteriormente, o sistema foi agitado a 29 rpm por 18 h e, o sobrenadante coletado foi centrifugado a 4000 rpm por 5 min. A quantificação foi realizada por ICP-MS/MS.

De forma semelhante, a porcentagem de Cr extraído foi determinada relacionando a concentração extraída e a concentração de Cr total presente na amostra, considerando: [% = (mg kg⁻¹ de Cr extraído pelo método EPA 1311 / mg kg⁻¹ Cr total) x 100].

Aplicação do método em amostra real

Uma amostra de lodo foi submetida ao método otimizado e validado para determinar a concentração de Cr. Porém, devido aos problemas associados ao efeito de matriz e a ausência de uma amostra de lodo isenta de Cr (branco da matriz), optamos em fazer a quantificação das espécies deste metal pelo método de adição de padrão. Nesse procedimento, a amostra de lodo foi dividida em três alíquotas, sendo uma parte não fortificada, a segunda porção fortificada com 0,1 mL de solução de Cr na concentração de 25 mg L⁻¹ e a terceira fortificada com 0,1 mL de solução de Cr a 125 mg L⁻¹ e, em seguida, submetidas à extração pelo método otimizado. Os extratos obtidos foram diluídos em 10 vezes antes das análises. A concentração de Cr na amostra de lodo foi obtida por extrapolação da curva analítica.

Resultados e Discussão

Otimização do método de extração

Durante a otimização da extração do Cr em amostras de lodo foi utilizado um espectrofotômetro de absorção atômica. Isso foi necessário porque as análises neste equipamento representava uma economia de aproximadamente 95% em consumo de gases quando comparado com as quantificações por HPLC-ICP-MS-MS. Entretanto, na análise instrumental por absorção atômica não é possível distinguir o Cr(III) do Cr(VI), por isso as amostras de lodo foram fortificadas com cada espécie separadamente, a fim de avaliar a recuperação delas individualmente.

A primeira extração sólido-líquido otimizada foi a assistida por micro-ondas com fase extratora constituída por solução de HCl em pH 1. No entanto, a recuperação obtida foi insatisfatória, pois foi próxima a 10% para o Cr(III) (Figura 1).

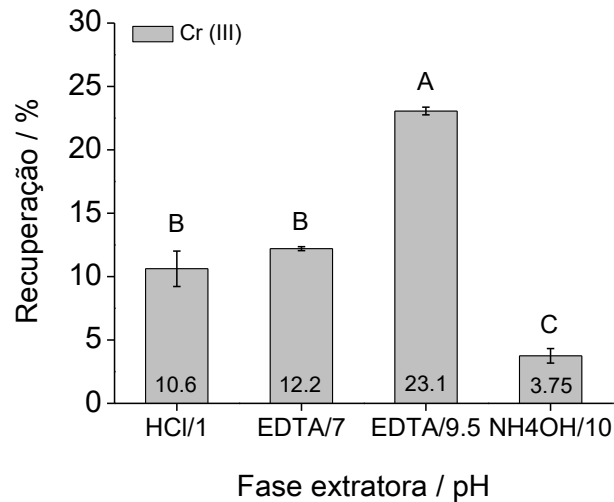


Figura 1. Porcentagem de recuperação de Cr(III) em amostras de lodo usando quatro fases extratoras na extração por micro-ondas. Barras acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Dessa forma, novas fases extratoras foram avaliadas como foi mostrado na Tabela 2. Dentre as quatro soluções analisadas, a fase extratora constituída pela solução de EDTA em pH 9,5 apresentou maior porcentagem de recuperação do Cr(III) e foi diferente estatisticamente das demais. Essa solução também foi utilizada em trabalhos anteriores para a extração de espécies de Cr em solos^{11,23} e suplementos dietéticos.¹⁹

Embora a mudança na fase extratora tenha representado avanços na recuperação do Cr(III) por micro-ondas, o Cr(VI) não foi extraído nestas condições. Por isso, uma alternativa foi submeter a amostra à extração sólido-líquido convencional utilizando a melhor fase extratora. O primeiro parâmetro otimizado neste método foi a forma de homogeneização do sistema lodo-fase extratora. Neste parâmetro, foi avaliado cinco níveis como foi mostrado na Tabela 2. Estes tipos de homogeneização foram utilizados, uma vez que, são os mais citados na literatura para extração de espécies de Cr.^{12,14,24} Na Figura 2 está apresentada a porcentagem de recuperação obtida para cada tipo de homogeneização.

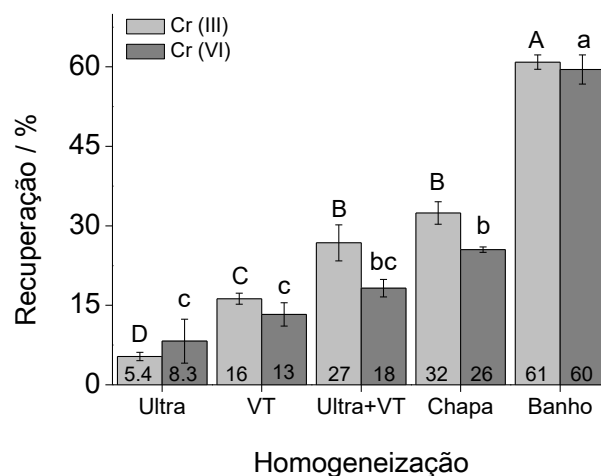


Figura 2. Porcentagem de recuperação de Cr(III) e Cr(VI) usando cinco tipos de homogeneização da amostra com a fase extratora constituída pela solução de EDTA em pH 9,5. Nota: Ultra – banho ultrassônico. VT – vortex. Banho – banho-maria com agitação. Barras acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Observa-se que a homogeneização usando o banho-maria por 24 h resultou em maior porcentagem de recuperação tanto para o Cr(III) quanto para o Cr(VI) na amostra de lodo. Além disso, o banho-maria com agitação (100 rpm) foi o procedimento de homogeneização que permitiu maior solubilização do lodo na fase extratora, quando comparado com os demais tipos de homogeneização descritos na Tabela 2. Este método diferiu significativamente dos outros tipos de homogeneização, por isso foi escolhido para as próximas etapas deste estudo. Esse método de homogeneização também foi utilizado para determinar o Cr(VI) em solos e sedimentos.^{25,26}

O tempo de extração foi a segunda variável estudada para a extração sólido-líquido e foram avaliados quatro níveis como foi mostrado na Tabela 2. As porcentagens de recuperação obtidas em cada tempo estão apresentadas na Figura 3.

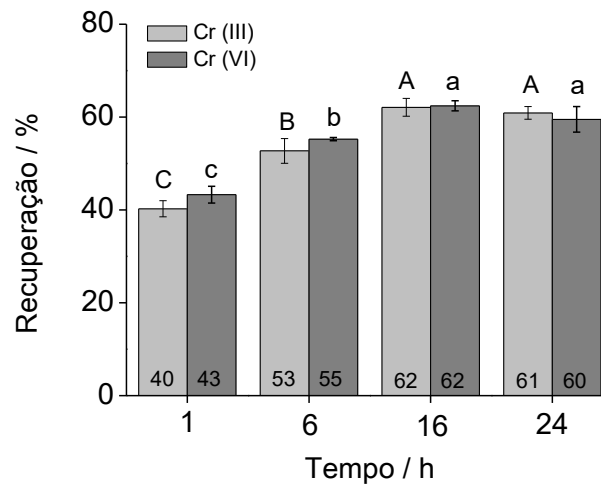


Figura 3. Porcentagem de recuperação de Cr(III) e Cr(VI) em amostras de lodo usando quatro tempos de extração em banho-maria com agitação. Barras acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Como pode ser observado os tempos de 16 e 24 h de extração não diferiram estatisticamente. Por isso, 16 h foi selecionada como melhor tempo para extração de Cr nas amostras de lodo de esgoto. Trabalho anterior também utilizou solução de EDTA em meio alcalino com este tempo de extração, e obteve porcentagens de recuperação inferiores a 42,9 % de Cr em solos orgânicos.¹²

No último parâmetro da otimização foram avaliadas três temperaturas de extração, como foi mostrado na Tabela 2. As porcentagens de recuperação obtidas em cada temperatura estão apresentadas na Figura 4.

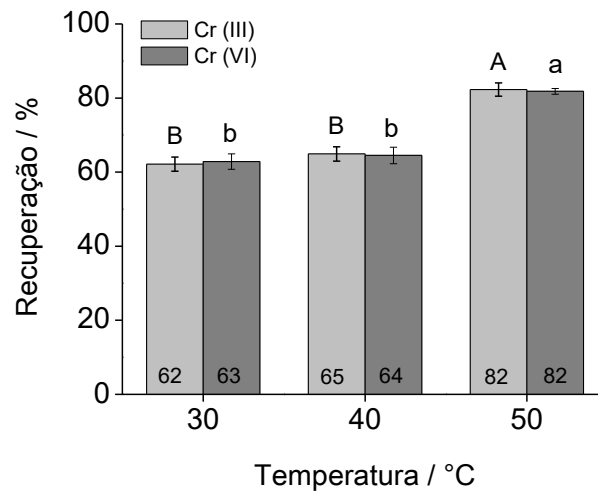


Figura 4. Porcentagem de recuperação de Cr em amostras de lodo usando três temperaturas para a extração em banho-maria por 16 h. Barras acompanhadas da mesma letra não diferem entre si pelo teste Duncan a 5% de probabilidade.

Nesse parâmetro, observou-se que o aquecimento a 50 °C diferiu significativamente das outras temperaturas avaliadas e apresentou um aumento de cerca de 20% na porcentagem de recuperação do Cr. Por isso, essa temperatura foi adotada para a extração de Cr em amostras de lodo de esgoto. Temperaturas entre 40 e 70 °C já foram utilizadas na extração sólido-líquido de Cr(VI) em amostras de sedimentos e fumaças de solda e foram obtidas porcentagens de extração entre 14 a 106%.²⁷⁻²⁹

Após a otimização destes quatro parâmetros de extração foi possível observar que a porcentagem de recuperação de Cr(III) no procedimento final foi quatro vezes superior em relação à metodologia proposta por Guidotti et al.¹¹, que foi avaliado e mostrado na Figura 1.

Especiação do cromo por HPLC-ICP-MS/MS

Para estudar a especiação de Cr(III) e Cr(VI), uma solução padrão contendo simultaneamente as espécies de Cr foram preparadas na fase móvel e analisadas por HPLC-ICP-MS/MS. O cromatograma obtido é apresentado na Figura 5-A.

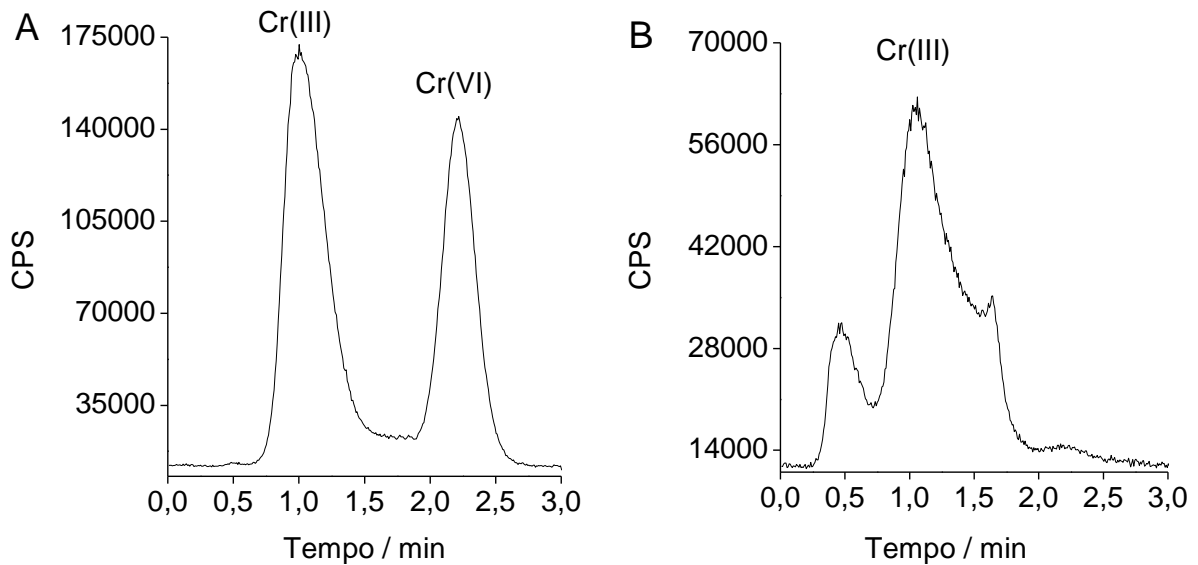


Figura 5. Cromatogramas da solução padrão contendo Cr(III) e Cr(VI), a $50 \mu\text{g L}^{-1}$ preparada na fase móvel (A) e do extrato de lodo de esgoto obtido nas condições de extração otimizadas (B).

Como pode ser visto, as análises foram realizadas em tempo total de 3,0 min e os tempos de retenção de Cr(III) e Cr(VI) foram 1,0 e 2,2 min, respectivamente. Por outro lado, a análise do extrato obtido a partir da amostra de lodo fortificada com Cr(III) e Cr(VI) simultaneamente, resultou em um cromatograma com apenas um sinal em 1,0 min, atribuído ao Cr(III) (Figura-5B).

Para investigar a ausência do sinal do Cr(VI) no cromatograma do extrato, foram fortificadas duas amostras de lodo de esgoto, sendo uma com apenas Cr(III) e outra somente com Cr(VI). As duas amostras foram submetidas à extração nas condições otimizadas e os cromatogramas obtidos estão apresentados na Figura 6.

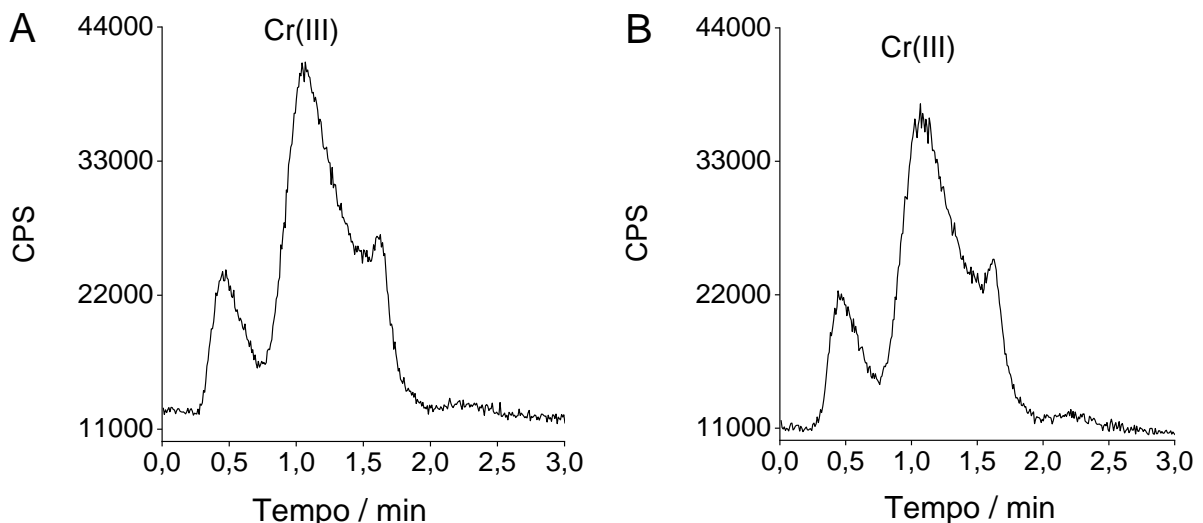


Figura 6. Cromatogramas dos extratos obtidos a partir da fortificação das amostras de lodo com uma espécie de Cr a $6,25 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo Cr(III) (A) e Cr(VI) (B).

Novamente, pode-se observar que os dois cromatogramas mostraram apenas o sinal em 1 min referente ao Cr(III). Esses resultados indicaram que todo Cr(VI) foi reduzido a Cr(III), na amostra de lodo de esgoto ou durante o processo de extração.

Para comprovar em qual etapa ocorreu a redução do Cr(VI), novos experimentos foram realizados. Para isso, a solução padrão contendo Cr(III) e Cr(VI) na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ foi submetida às mesmas condições do método otimizado, porém sem a amostra de lodo de esgoto. O extrato obtido foi analisado por HPLC-ICP-MS/MS e o cromatograma é apresentado na Figura 7.

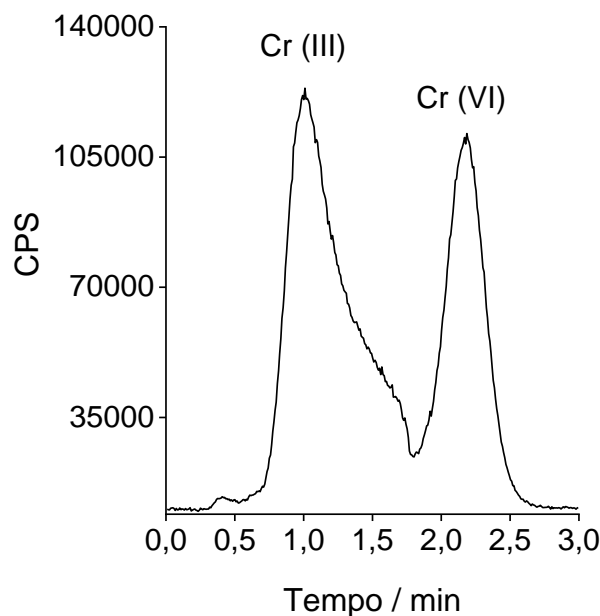


Figura 7. Cromatograma da solução padrão contendo Cr(III) e Cr(VI) a $50 \mu\text{g L}^{-1}$, a qual foi submetida ao método de extração otimizado sem a presença de lodo de esgoto.

Nesse cromatograma pode-se observar que os dois sinais atribuídos ao Cr(III) e Cr(VI) foram detectados em 1 e 2,2 min, respectivamente. Esse estudo revelou que as condições otimizadas de extração não contribuíram para redução do Cr(VI) em Cr(III). Além disso, a fase extratora escolhida favorece a estabilização das espécies de Cr, pois o pH em torno de 10 dificulta a redução do Cr(VI) e o EDTA evita a oxidação ou precipitação do Cr(III).^{3,6,30}

Por outro lado, o lodo de esgoto apresentou composição química que possibilita este tipo de reação (Tabela 1), pois a redução de Cr(VI) em matrizes ambientais pode ocorrer na presença de íons Fe(II), sulfeto e matéria orgânica. Além disso, os ácidos húmicos e fúlvicos que compõem a matéria orgânica também podem contribuir nesta reação de redução.³¹

Validação do método de extração

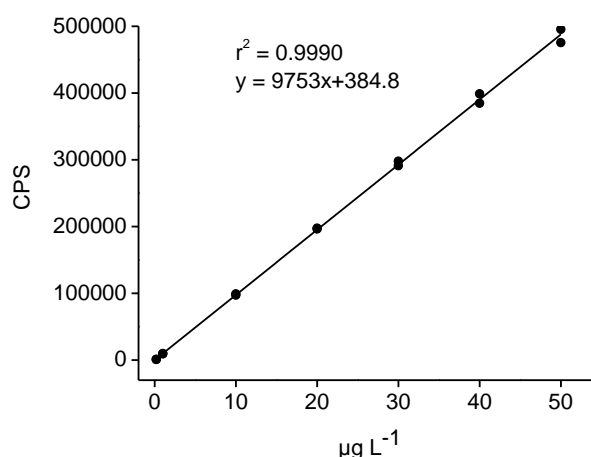
Tendo em mente que todo Cr presente no lodo estava na forma de Cr(III), a etapa de validação foi realizada apenas com essa espécie química. Além disso, como não foi necessário separar as espécies antes da etapa de quantificação, os extratos foram analisados diretamente por ICP-MS/MS. Os resultados obtidos na validação do método otimizado estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da validação do método de extração de Cr(III) em lodo de esgoto por ICP-MS/MS

Dados da calibração				Recuperação (%) \pm DPR	
LD	LQ	Faixa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r^2	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$
0,060	0,20	0,20-50	0,9990	82,3 \pm 2	82,9 \pm 6

O LD e o LQ foram obtidos multiplicando por três e dez vezes, respectivamente, o desvio padrão do branco do método, o qual foi analisado por ICP-MS/MS em dez repetições. Essa estratégia foi necessária devido à ausência de uma amostra de lodo isenta de Cr. Como mostrado na Tabela 3, os valores obtidos foram inferiores aos observados em estudos de detecção e quantificação de Cr em lodo de esgoto por ICP-OES, os quais, 6,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 11,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LD e LQ, respectivamente.^{32,33}

A linearidade instrumental foi avaliada a partir de soluções padrão de Cr(III) preparadas nas concentrações de 0,2; 1,0; 10; 20; 30; 40 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ em duas repetições. Como pode ser observado na Figura 8, a curva de calibração foi linear na faixa estudada e apresentou r^2 superior a 0,99.

**Figura 8.** Curva de calibração de soluções padrões contendo Cr(III) na faixa de concentração de 0,20 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e quantificação por ICP-MS/MS

A precisão e a exatidão do método foram avaliadas a partir de ensaios de fortificação/recuperação de Cr(III) nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo sete repetições em cada nível. O método de extração otimizado apresentou exatidão, pois as porcentagens de recuperação estavam no intervalo aceitável de 70 a 120%, conforme recomendado pela IUPAC.²² A precisão foi considerada adequada, pois os valores de desvio padrão relativo foram cerca de três a doze vezes inferiores ao valor máximo de 20%.²²

Após validação da metodologia, foi comparada a eficiência de extração do método otimizado e validado com o método de referência recomendado pela EPA.

Comparação entre métodos

Uma amostra de lodo foi submetida ao método de extração otimizado e apenas o Cr(III) foi identificado nas análises por HPLC-ICP-MS/MS. Destaca-se que, nas condições ótimas 53,3% do metal presente na amostra foi extraído. Por outro lado, quando a mesma amostra foi submetida à extração pelo método EPA 1311, a quantidade de Cr extraída foi de apenas 4,09%. Isso significa que o método

otimizado apresentou uma eficiência de extração em torno de 13 vezes superior ao método de referência.

Vale ressaltar que a extração do Cr biodisponível foi inferior a 60% em ambos os métodos. Provavelmente, o Cr(III) está fortemente adsorvido nos componentes do lodo de esgoto.

Aplicação do método em amostra real

O método otimizado e validado foi aplicado a uma amostra de lodo de esgoto e foi obtida a concentração de 20,5 mg kg⁻¹ de Cr(III). Essa concentração foi inferior ao limite máximo aceitável de Cr(III) em lodo de esgoto, que é de 500 mg kg⁻¹ conforme a legislação 80568/4225/91 harmonizada com a Diretiva europeia.⁹ Trabalho anterior também quantificou Cr(III) em amostras de lodo em concentrações inferiores às estabelecidas por esse órgão regulamentador, sendo as concentrações encontradas entre 13,5 a 350,7 mg kg⁻¹.³²

Conclusões

Foi otimizado um método de determinação simultânea de Cr(III) e Cr(VI) em amostras de lodo de esgoto. O método foi validado através das principais figuras de mérito e foi preciso, exato, linear e com limites de detecção e quantificação inferiores aos citados na literatura. Nas análises dos extratos de lodo de esgoto por HPLC-ICP-MS/MS foi detectado apenas a espécie de Cr(III), pois todo o Cr(VI) adicionado foi reduzido pelos componentes da matriz lodo. Esse método foi mais eficiente que o de referência na extração do Cr biodisponível, pois permitiu elevar a extração em 13 vezes em relação ao método EPA 1311. A concentração de Cr(III) quantificada na amostra de lodo foi inferior ao limite máximo aceitável pela legislação 80568/4225/91 harmonizada com a Diretiva europeia.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Pró-reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (PRPq/UFMG). Agradecemos também, ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais (ICA-UFMG) pela infra-estrutura e realização do trabalho.

Referências

1. Guidi Nissim, W.; Cincinelli, A.; Martellini, T.; Alvisi, L.; Palm, E.; Mancuso, S.; Azzarello, E.; *Environ. Res.* **2018**, *164*, 356.
2. Roy, T.; Biswas, D. R.; Ghosh, A.; Patra, A. K.; Singh, R. D.; Sarkar, A.; Biswas, S. S.; *Appl. Soil Ecol.* **2019**, *136*, 116.
3. Tirez, K.; Scharf, H.; Calzolari, D.; Cleven, R.; Kisser, M.; Lück, D.; *J. Environ. Monit.* **2007**, *9*, 749.

4. Yanni, A. E.; Stamataki, N. S.; Konstantopoulos, P.; Stoupaki, M.; Abeliatis, A.; Nikolakea, I.; Perrea, D.; Karathanos, V. T.; Tentolouris, N.; *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 259.
5. Hamilton, E. M.; Young, S. D.; Bailey, E. H.; Watts, M. J.; *Food Chem.* **2018**, *250*, 105.
6. Séby, F.; Vacchina, V.; *TrAC Trends Anal. Chem.* **2018**, *104*, 54.
7. CONAMA, Resolução No 375. de 2006. Gestão de resíduos e produtos perigosos – Uso <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=506> (accessed Oct 2, 2016).
8. Kelessidis, A.; Stasinakis, A. S.; *Waste Manag.* **2012**, *32*, 1186.
9. EC. European Commission *Final Implementation Report for Directive 86/278/EEC on Sewage Sludge: 2013-2015 Report for DG Environment, European Commission Prepared by Eunomia, ENT, IVL and EPEM Approved by Contents*; 2018.
10. Catalani, S.; Fostinelli, J.; Gilberti, M. E.; Apostoli, P.; *Int. J. Mass Spectrom.* **2015**, *387*, 31.
11. Guidotti, L.; Abad, S. Q.; Rodríguez-González, P.; Alonso, J. I. G.; Beone, G. M.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2015**, *22*, 17569.
12. Leśniewska, B.; Gontarska, M.; Godlewska-Żyłkiewicz, B.; *Water. Air. Soil Pollut.* **2017**, *228*.
13. Novotnik, B.; Zuliani, T.; Ščančar, J.; Milačič, R.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2013**, *28*, 558.
14. Vacchina, V.; de la Calle, I.; Séby, F.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407*, 3831.
15. Araujo-Barbosa, U.; Peña-Vazquez, E.; Barciela-Alonso, M. C.; Costa Ferreira, S. L.; Pinto dos Santos, A. M.; Bermejo-Barrera, P.; *Talanta* **2017**, *170*, 523.
16. US EPA Method 1311. Toxicity characteristic leaching procedure <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/1311.pdf>.
17. Chen, Z.; Li, J. S.; Poon, C. S.; *J. Clean. Prod.* **2018**, *171*, 1447.
18. Mahdikhani, M.; Khanban, M. R.; *Constr. Build. Mater.* **2019**, *221*, 772.
19. Unceta, N.; Astorkia, M.; Abrego, Z.; Gómez-Caballero, A.; Goicolea, M. A.; Barrio, R. J.; *Talanta* **2016**, *154*, 255.
20. Ding, W.; Stewart, D. I.; Humphreys, P. N.; Rout, S. P.; Burke, I. T.; *Sci. Total Environ.* **2016**, *541*, 1191.
21. Aguilar, F. J. A.; Wrobal, K.; Lokits, K.; Caruso, J. A.; Alonso, A. C.; Corona, J. F. G.; Wrobel, K.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *392*, 269.
22. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R.; *Pure Appl. Chem.* **2002**, *74*, 835.
23. Wolle, M. M.; Rahman, G. M. M.; Skip Kingston, H. M.; Pamuku, M.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2014**, *29*, 1640.
24. US EPA Method 3060a. Alkaline digestion for hexavalent chromium [papers3://publication/uuid/DA0F9469-B780-4205-A14F-955225268FF3](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3060a.pdf) (accessed Oct 8, 2018).
25. Mandiwana, K. L. ; *Talanta* **2008**, *74*, 736.
26. Delay, M.; Mangold, S.; Sembritzki, R.; Frimmel, F. H.; *Aquat. Geochemistry* **2015**, *21*, 313.
27. Ndung'u, K.; Djane, N. K.; Malcus, F.; Mathiasson, L.; *Analyst* **1999**, *124*, 1367.
28. Ščančar, J.; Berlinger, B.; Thomassen, Y.; Milačič, R.; *Talanta* **2015**, *142*, 164.
29. Jabłońska-Czapla, M.; *Int. J. Anal. Chem.* **2015**, *2015*, 1.
30. Cuello, S.; Entwisle, J.; Benning, J.; Liu, C.; Coburn, S.; McAdam, K. G.; Braybrook, J.; Goenaga-Infante, H.; *J. Anal. At. Spectrom.* **2016**, *31*, 1818.
31. Leśniewska, B.; Godlewska-Zyłkiewicz, B.; *Molecules* **2019**.

32. Spanos, T.; Ene, A.; Karadjova, I. B.; *Rom. J. Phys.* **2015**, *60*, 237.
33. Biro, M.; Kavšek, D.; Karasiński, J.; Szwarczewski, P.; Bulska, E.; Vončina, D. B.; *Cent. Eur. J. Chem.* **2014**, *12*, 687.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- *C. roseus* é uma alternativa econômica e ecológica para a remediação de metais, pois foi fitoestabilizadora dos metais Cd, Cu e Zn no lodo e fitoextratora de Ba, Cd, Cu, Ni, Se e Zn no substrato comercial;
- Embora não esteja entre os objetivos deste estudo, podemos dizer que esta planta é tolerante as condições adversas, pois apresentou desenvolvimento morfológico superior às condições tradicionais de cultivo;
- O método otimizado de extração de cromo é mais eficiente que o método de referência EPA 1311 para determinação do cromo disponível em lodo de esgoto;
- Apenas o Cr(III) esteve presente em nossa amostra de lodo, mas é importante destacar que, a composição química do lodo, reduziu completamente o Cr(VI) a Cr(III). Portanto, não é possível determinar Cr(VI) nesta amostra de lodo de esgoto.