



Universidade do Algarve
Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente

Potencial de utilização de *Cistus ladanifer* L. na vegetalização de áreas mineiras



Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Gestão e Conservação da Natureza

Erika Silva Santos

Faro
Abril 2007

Nome: Erika Silva Santos

Departamento: Faculdade de Ciências do Mar e Ambiente

Orientadores:

Doutora Maria Manuela Silva Nunes Reis Abreu

Doutora Maria Cristina Amaral Penas Nabais dos Santos

Doutora Maria Leonor Quintais Cancela da Fonseca (orientadora pedagógica)

Data: Abril de 2007

Título da dissertação:

Potencial de utilização de *Cistus ladanifer* L. na vegetalização de áreas mineiras

Júri

Presidente:

Doutora Maria Leonor Quintais Cancela da Fonseca
Professora Catedrática da Faculdade de Ciências do Mar e do Ambiente da Universidade do Algarve

Vogais:

Doutora Maria Manuela Silva Nunes Reis Abreu
Professora catedrática do Departamento de Ciências do Ambiente do Instituto Superior de Agronomia

Doutora Maria Cristina Amaral Penas Nabais dos Santos
Professora Auxiliar do Departamento de Botânica da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade de Coimbra

Doutor Eduardo Manuel Ferreira Dias
Professora Auxiliar da Universidade dos Açores

Doutora Maria Clara Semedo da Silva Costa
Professora Auxiliar da Faculdade de Engenharia de Recursos Naturais da Universidade do Algarve

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Prof.^a Doutora Manuela Abreu e Prof.^a Doutora Cristina Nabais, pela amizade e apoio contínuo. Por me ensinarem tantas coisas e possibilitarem todas as experiências que tive dentro e fora do laboratório. Agradeço, principalmente, por terem aceite orientar-me!

À Prof.^a Doutora Leonor Cancela pela orientação, ajuda e incentivo.

Em Aveiro, ao Prof. Doutor Jorge Saraiva pela orientação e ajuda preciosa nas análises enzimáticas, pela completa dedicação e ânimo... e, pela experiência de poder ver as coisas como um químico!

Ao Prof. Doutor Tomaz Dentinho, Prof.^a Doutora Sandra Bolas e Prof.^a Doutora Margarida Castro pela disponibilidade e ajuda no esclarecimento de algumas dúvidas que surgiram.

À Associação de Produtores Florestais da Serra do Caldeirão e La Sabina por facultarem as áreas de estudo, sem eles este trabalho não passaria de um sonho...

Ao Departamento de Química da Universidade de Aveiro e ao Grupo de Bioquímica e Química Alimentar pela oportunidade concebida para a realização de uma parte fulcral do trabalho laboratorial.

Ao meu eterno namorado, Bruno Peça, pela compreensão nos momentos que estava “fastidiada”, pela força para continuar em frente mesmo quando queria mandar pela janela o computador, os apontamentos e tantas outras coisas. Por todas as vezes que ouviu atentamente as minhas ideias luminosas... pelos mimos, por tudo!

Aos meus pais pelo amor, apoio e confiança depositada em mais esta etapa da minha vida.

Ao meu irmão, Wilson, pelo carinho e amor, pelo apoio incondicional... e, também pela maravilhosa ajuda nas novas tecnologias.

À Mara, minha cunhadita e sempre amiga, pelo apoio e ajudas nos momentos mais difíceis, pelos filmes cómicos que sempre fizemos e, como é claro, por me auxiliar nos novos caminhos da ciência.

À Laura Carvalho, minha eterna amiga, pelo auxílio matemático e ânimo... pelos bons momentos que sempre passamos!

Ao meu amigo de todos os tempos, Olívio Pereira, pelo apoio incondicional, mesmo de longe... muchas gracias también pela fabulosa orientação nos mapas e ajudas nas “modernices” dos computadores!!

Ao André Carapeto pela ajuda no árduo trabalho de campo e nos merecidos almoços cheios de terra e com cheirinho a esteva.

À Susana Leal pela ajuda e risos que me proporcionou na recolha das folhas.

Como são muitos, agradeço a todo o Grupo de Ecologia do Departamento de Botânica da Universidade de Coimbra pelo companheirismo, almoços, cafés e lanches fantásticos. Pela partilha de ideias, experiências e ajudas.

Aos meus colegas e amigos do mestrado pela camaradagem nas aulas, nas caracoladas ao final da tarde, jantares, risos e gargalhadas... pela força incessante que senti nestas terras do Sul!

À Carla Reis pela simpatia, amizade, incentivo e ajuda nas papeladas.

Ao Instituto Superior Dom Afonso III pelo absoluto apoio e incentivo para continuar... por toda a confiança que depositaram em mim!

Agradeço assim, a tudo o que o destino me trouxe nesta etapa tão importante...

Resumo

A capacidade de tolerância às alterações sazonais e elevadas concentrações de elementos, potencialmente tóxicos, é uma característica importante na distribuição e desenvolvimento da vegetação em áreas mineiras. Devido à representatividade dos ambientes mineiros nomeadamente pela área que ocupam, sua complexidade físico-química e geológica e ainda sua história antrópica é da maior importância aumentar a informação base para trabalhos de reabilitação dessas áreas.

O presente estudo realizou-se na perspectiva de aumentar o conhecimento sobre a biologia do *Cistus ladanifer* avaliando seu potencial uso na vegetação de locais sujeitos à actividade mineira. Compararam-se os solos e as populações de *Cistus ladanifer* da mina de São Domingos e de dois locais não-contaminados, Pomarão e Serra do Caldeirão. Os elementos seleccionados para o estudo foram o As, Pb, Cu, Hg e Zn por estarem associados à actividade mineira ou abundantes na mineralização.

Os resultados mostraram que a distribuição dos elementos químicos nos solos de São Domingos e sua disponibilidade para os organismos dependeu das características do solo e do próprio elemento, tendo sido diferente das restantes áreas. A distribuição interna e acumulação dos elementos nas plantas variaram com o elemento, época de colheita e população. Os elementos acumulados nas folhas afectaram negativamente a área foliar e clorofilas porém, os carotenóides e o teor em azoto e em água não foram influenciados. Face aos teores de elementos considerados tóxicos para as folhas e ao nível de tolerância de cada população, a actividade das enzimas antioxidativas (Catalase, Peroxidase e Superóxido dismutase) apresentou comportamentos diferentes. Pode-se considerar o uso de plantas e sementes de *Cistus ladanifer* da mina de São Domingos na vegetação desta área devido a sua capacidade de adaptação a elevados níveis de degradação.

Palavras-chave: *Cistus ladanifer*, vegetação, fitoestabilização, área mineira

Potential utilization of Cistus ladanifer L. in mining vegetation

Abstract

The tolerance capacity for seasonal alterations and high concentrations of potential toxic elements is essential to determine the distribution and development of vegetation in mining areas.

Due to the impact by mining areas, namely by their area, physical, chemical and geological complexity and also human history, it is very important to asses to basic information for mine restoration and rehabilitation works. This investigation focuses on the possibilities of using *Cistus ladanifer* in restoration works of mining areas in order to minimise the impacts of the mining activities. We compared soils and populations from São Domingos mine and two non-contaminated areas, Pomarão and Serra do Caldeirão. The elements selected were As, Pb, Cu, Hg e Zn associated mining activities or abundant in the mineralization.

The results demonstrated that the chemical elements distribution into soils from São Domingos and their bioavailability depended on both soils and element characteristics. The internal distribution and element accumulation in plants depended on element, crop time and population. The elements accumulation in plants from São Domingos affected negatively foliar area and chlorophyll contend however, carotenoids, nitrogen and water content were not influenced. Elements concentration considered toxic for leaves and tolerance level of each population showed different behaviours of the antioxidative enzymes activities (Catalase, Peroxidase e Superoxide dismutase). In this way, we can consider possible use of *Cistus ladanifer* plants and seeds from São Domingos in vegetation of this area because it is specie with large capacity for adaptation to different levels of degradation.

Key words: *Cistus ladanifer*, vegetation, phytostabilisation, mining areas

Índice

INTRODUÇÃO GERAL	1
PARTE I - 1. INTRODUÇÃO	5
1.1 ACTIVIDADE MINEIRA.....	5
1.2 TOXICIDADE DOS ELEMENTOS QUÍMICOS.....	7
1.3 DISPONIBILIDADE DOS ELEMENTOS QUÍMICOS.....	9
1.3.1 Aspecto físicos.....	11
1.3.2 Aspectos químicos.....	12
1.3.3 Aspectos biológicos.....	14
1.4 CONCENTRAÇÃO DE ELEMENTOS QUÍMICOS NAS PLANTAS.....	15
1.5 REMEDIAÇÃO DE SOLOS.....	20
1.5.1 Técnicas Físico-químicas.....	21
1.5.2 Fitorremediação.....	23
1.6 CARACTERIZAÇÃO DE CISTUS LADANIFER L.....	25
PARTE II - 1. ENQUADRAMENTO DO ESTUDO.....	31
1.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ÁREAS DE AMOSTRAGEM.....	31
1.1.1 Mina de São Domingos.....	31
1.1.2 Pomarão.....	36
1.1.3 Serra do Caldeirão.....	38
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.1 SOLO.....	41
2.1.1 Colheita e preparação das amostras de solo.....	41
2.1.2 Caracterização física, química e mineralógica.....	42
2.1.2.1 Análise granulométrica.....	42
2.1.2.2 pH em água e em cloreto de potássio.....	45
2.1.2.3 Conteúdo do carbono orgânico total.....	45
2.1.2.4 Conteúdo em fósforo e potássio assimiláveis.....	46
2.1.2.5 Conteúdo em azoto total.....	47
2.1.2.6 Capacidade de troca catiónica e catiões de troca.....	48
Catiões de troca.....	48
Capacidade de troca catiónica.....	49
2.1.2.7 Alumínio de troca.....	49
2.1.2.8 Método de extracção do ferro e alumínio livres.....	49
2.1.2.8.1 Fração associada aos óxidos não cristalinos.....	49
2.1.2.8.2 Fração associada aos óxidos cristalinos e não cristalinos – fração total.....	50
2.1.2.9 Método de extracção do manganês livre.....	50
2.1.3 Análise química total multielementar.....	51
2.1.4 Determinação dos elementos químicos associados às várias fases de suporte nos solos.....	51
2.1.4.1 Fração disponível.....	52
2.1.4.1.1 Fração solúvel em água.....	53
2.1.4.1.2 Método do DTPA.....	53
2.1.4.1.3 Método do acetato de amónio.....	53
2.1.4.1.4 Método do cloreto de cálcio.....	53
2.1.4.1.5 Método do nitrato de cálcio.....	53
2.1.4.2 Fração associada à matéria orgânica.....	54
2.1.4.3 Fração associada aos óxidos de ferro e alumínio.....	54
2.1.4.4 Fração associada aos óxidos de manganês.....	55
2.2 PLANTAS.....	55
2.2.1 Selecção das plantas.....	55
2.2.2 Colheita e preparação das folhas e sementes.....	56
2.2.3 Análise da área foliar.....	58
2.2.4 Conteúdo em água.....	58
2.2.5 Conteúdo em clorofilase e carotenóides.....	58
2.2.6 Conteúdo em elementos químicos nas folhas e sementes.....	59
2.2.7 Conteúdo total de azoto nas folhas.....	60

2.2.8	<i>Determinação de enzimas das folhas</i>	61
2.2.8.1	Catalase	62
2.2.8.2	Guaiacol peroxidase	62
2.2.8.3	Superóxido dismutase	63
2.2.9	<i>Análise da viabilidade das sementes</i>	63
2.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	64
2.4	CONSIDERAÇÕES DE ORDEM ECONÓMICA.....	64
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
3.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E MINERALÓGICA DO SOLO.....	65
3.2	ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO	70
3.2.1	<i>Conteúdo total multielementar</i>	70
3.2.2	<i>Fracção disponível</i>	73
3.2.2.1	Arsénio	74
3.2.2.2	Chumbo	75
3.2.2.3	Cobre.....	76
3.2.2.4	Mercúrio.....	78
3.2.2.5	Zinco	79
3.2.3	<i>Distribuição dos elementos pelas várias fracções do solo</i>	81
3.2.3.1	Arsénio	81
3.2.3.2	Chumbo	83
3.2.3.3	Cobre.....	84
3.2.3.4	Mercúrio.....	86
3.2.3.5	Zinco	87
3.3	ANÁLISE QUÍMICA DAS PLANTAS	89
3.3.1	<i>Conteúdo dos elementos nas folhas</i>	89
3.3.1.1	Arsénio	90
3.3.1.1.1	Comparação das parcelas e áreas de amostragem	90
3.3.1.1.2	Fracção de As disponível para as plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	93
3.3.1.1.3	Índice de acumulação do As nas plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	94
3.3.1.2	Chumbo	95
3.3.1.2.1	Comparação das parcelas e áreas de amostragem	95
3.3.1.2.2	Fracção de Pb disponível para as plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	98
3.3.1.2.3	Índice de acumulação do Pb nas plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	99
3.3.1.3	Cobre.....	100
3.3.1.3.1	Comparação das parcelas e áreas de amostragem	100
3.3.1.3.2	Fracção de Cu disponível para as plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	103
3.3.1.3.3	Índice de acumulação do Cu nas plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	104
3.3.1.4	Mercúrio.....	105
3.3.1.5	Zinco	105
3.3.1.5.1	Comparação das parcelas e áreas de amostragem	105
3.3.1.5.2	Fracção de Zn disponível para as plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	107
3.3.1.5.3	Índice de acumulação do Zn nas plantas de <i>Cistus ladanifer</i>	108
3.3.2	<i>Conteúdo dos elementos nas sementes</i>	109
3.3.2.1	Arsénio	109
3.3.2.2	Chumbo	111
3.3.2.3	Cobre.....	113
3.3.2.4	Mercúrio.....	114
3.3.2.5	Zinco	115
3.4	VIABILIDADE DAS SEMENTES.....	116
3.5	ÁREA FOLIAR.....	118
3.6	CONTEÚDO EM ÁGUA NAS FOLHAS	122
3.7	CONTEÚDO EM PIGMENTOS	125
3.7.1	<i>Clorofilas</i>	125
3.7.2	<i>Carotenóides</i>	132
3.8	CONTEÚDO EM AZOTO.....	135
3.9	ENZIMAS.....	139
3.9.1	<i>Catalase</i>	140
3.9.2	<i>Peroxidase</i>	148
3.9.3	<i>Superóxido dismutase</i>	154

3.10 CONSIDERAÇÕES DE ORDEM ECONÓMICA	161
4. CONCLUSÕES	167
5. BIBLIOGRAFIA	173
6. ANEXOS	199

Índice de Figuras

FIGURA 1 – FOTOGRAFIA DE UMA PLANTA DE <i>CISTUS LADANIFER</i>	26
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS SUCESSIVAS FASES DA FENOLOGIA DE <i>CISTUS LADANIFER</i> . A: CRESCIMENTO VEGETATIVO; B: FLORAÇÃO; C: FRUTIFICAÇÃO; D: DISPERSÃO DAS SEMENTES; E: GERMINAÇÃO (ADAPTADO DE TALAVERA <i>ET AL.</i> , 1993).	27
FIGURA 3 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA MINA DE SÃO DOMINGOS E POMARÃO (ADAPTADO DE HTTP://MAPS.GOOGLE.COM/).....	32
FIGURA 4 – CORTA DA MINA DE SÃO DOMINGOS.	33
FIGURA 5 – RUÍNAS DO ESTABELECIMENTO METALÚRGICO NA ACHADA DO GAMO.....	34
FIGURA 6 – CARACTERÍSTICAS CLIMÁTICAS DA ÁREA DA MINA DE SÃO DOMINGOS.	35
FIGURA 7 – LOCALIZAÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO NA MINA DE SÃO DOMINGOS.	36
FIGURA 8 – ÁREA DE AMOSTRAGEM DO POMARÃO.	37
FIGURA 9 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA SERRA DO CALDEIRÃO (ADAPTADO DE HTTP://MAPS.GOOGLE.COM/).....	38
FIGURA 10 – DADOS CLIMÁTICOS REFERENTES À SERRA DO CALDEIRÃO.	39
FIGURA 11 – ÁREA DE AMOSTRAGEM NA SERRA DO CALDEIRÃO.....	40
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AMOSTRAGEM DOS SOLOS.....	41
FIGURA 13 – RECOLHA DAS FOLHAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i>	56
FIGURA 14 – PLANTA DE <i>CISTUS LADANIFER</i> COM A ESTRUTURA DE RECOLHA DAS FOLHAS SENESCENTES.	57
FIGURA 15 – CONCENTRAÇÃO EM ÓXIDO E HIDRÓXIDOS DE ALUMÍNIO (A) E FERRO (B), CRISTALINO E NÃO CRISTALINO, E MANGANÊS (C) NOS SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E NOS SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E DO POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.	68
FIGURA 16 – CONCENTRAÇÃO DA FRACÇÃO DISPONÍVEL DE ARSÊNIO EM SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E EM SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P), UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRACTANTES. MÉDIA ± DP, n = 3.....	74
FIGURA 17 – CONCENTRAÇÃO DA FRACÇÃO DISPONÍVEL DE CHUMBO EM SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E EM SOLOS NÃO CONTAMINADOS DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P), UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRACTANTES. MÉDIA ± DP, n = 3.....	75
FIGURA 18 – CONCENTRAÇÃO DA FRACÇÃO DISPONÍVEL DE COBRE EM SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E EM SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P), UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRACTANTES. MÉDIA ± DP, n = 3.....	77
FIGURA 19 – CONCENTRAÇÃO DA FRACÇÃO DISPONÍVEL DE MERCÚRIO EM SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E EM SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P), UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRACTANTES. MÉDIA ± DP, n = 3.....	78
FIGURA 20 – CONCENTRAÇÃO DA FRACÇÃO DISPONÍVEL DE ZINCO EM SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E EM SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P), UTILIZANDO DIFERENTES SOLUÇÕES EXTRACTANTES. MÉDIA ± DP, n = 3.....	80
FIGURA 21 – PERCENTAGENS DO TOTAL EM ARSÊNIO ASSOCIADAS ÀS DIFERENTES FRACÇÕES DO SOLO CONTAMINADO DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E DOS SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).....	81
FIGURA 22 – PERCENTAGENS DO TOTAL EM CHUMBO ASSOCIADAS ÀS DIFERENTES FRACÇÕES DO SOLO CONTAMINADO DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E DOS SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).....	83
FIGURA 23 – PERCENTAGENS DO TOTAL EM COBRE ASSOCIADAS ÀS DIFERENTES FRACÇÕES DO SOLO CONTAMINADO DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E DOS SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).....	85
FIGURA 24 – PERCENTAGENS DO TOTAL EM ZINCO ASSOCIADAS ÀS DIFERENTES FRACÇÕES DO SOLO CONTAMINADO DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E DOS SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).....	87
FIGURA 25 – CONCENTRAÇÃO EM ARSÊNIO EM FOLHAS NOVAS, MADURAS E SENESCENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA (A) E VERÃO (B), PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	91
FIGURA 26 – CONCENTRAÇÃO EM CHUMBO EM FOLHAS NOVAS, MADURAS E SENESCENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA (A) E VERÃO (B), PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	95
FIGURA 27 – CONCENTRAÇÃO EM COBRE EM FOLHAS NOVAS, MADURAS E SENESCENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA (A) E VERÃO (B), PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	101

FIGURA 28 – CONCENTRAÇÃO EM ZINCO EM FOLHAS NOVAS, MADURAS E SENESCENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.	106
FIGURA 29 – CONCENTRAÇÃO EM ARSÊNIO EM SEMENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	110
FIGURA 30 – CONCENTRAÇÃO EM CHUMBO EM SEMENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	111
FIGURA 31 – CONCENTRAÇÃO EM COBRE EM SEMENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	113
FIGURA 32 – CONCENTRAÇÃO EM ZINCO EM SEMENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	115
FIGURA 33 – NÚMERO DE SEMENTES GERMINADAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).	117
FIGURA 34 – ÁREA FOLIAR DE FOLHAS NOVAS E MADURAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA (A) E NO VERÃO (B), PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = [39;120]. NO – VALORES OBTIDOS POR NUÑEZ-OLIVERA ET AL. (1996).....	119
FIGURA 35 – CONTEÚDO EM ÁGUA EM FOLHAS NOVAS E MADURAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA (A) E (B), PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	123
FIGURA 36 – CONCENTRAÇÃO DA CLOROFILA TOTAL E <i>CLOROFILA A</i> E <i>B</i> EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	125
FIGURA 37 – CONCENTRAÇÃO EM CLOROFILA TOTAL E <i>CLOROFILA A</i> E <i>B</i> EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NO VERÃO, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.	129
FIGURA 38 – CONCENTRAÇÃO EM CAROTENÓIDES EM FOLHAS NOVAS E MADURAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA (A) E VERÃO (B), PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.	133
FIGURA 39 – CONCENTRAÇÃO EM AZOTO EM FOLHAS NOVAS, MADURAS E SENESCENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA (A) E VERÃO (B), PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	136
FIGURA 40 – ACTIVIDADE DA CATALASE EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± SD. n = 3.....	140
FIGURA 41 – ACTIVIDADE DA CATALASE EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NO VERÃO, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	145
FIGURA 42 – ACTIVIDADE DA PEROXIDASE EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	148
FIGURA 43 – ACTIVIDADE DA PEROXIDASE EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NO VERÃO, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.....	152
FIGURA 44 – ACTIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NA PRIMAVERA, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.	155
FIGURA 45 – ACTIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE EM FOLHAS NOVAS (A) E MADURAS (B) DE <i>CISTUS LADANIFER</i> , COLHIDAS NO VERÃO, PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.	158

Índice de Quadros

QUADRO 1 – TECNOLOGIAS DISPONÍVEIS PARA REMEDIAÇÃO DE ÁREAS CONTAMINADAS POR METAIS. (ADAPTADO DE KHAN <i>ET AL.</i> , 2004)	22
QUADRO 2 – TECNOLOGIAS ASSOCIADAS À FITORREMEDIAÇÃO (ADAPTADO DE PULFORD E WATSON, 2003).	24
QUADRO 3 – PLANTAS IDENTIFICADAS NAS PARCELAS DA ÁREA DE AMOSTRAGEM DA MINA DE SÃO DOMINGOS.....	36
QUADRO 4 – PLANTAS IDENTIFICADAS NAS PARCELAS DA ÁREA DE AMOSTRAGEM DO POMARÃO.....	38
QUADRO 5 – PLANTAS IDENTIFICADAS NAS PARCELAS DA ÁREA DE AMOSTRAGEM DA SERRA DO CALDEIRÃO.	40
QUADRO 6 – TEMPERATURAS DE PRÉ-ATOMIZAÇÃO E ATOMIZAÇÃO USADAS CONSOANTE A SOLUÇÃO DE EXTRACÇÃO E ELEMENTO QUÍMICO.	52
QUADRO 7 – TEMPERATURAS DE PRÉ-ATOMIZAÇÃO E ATOMIZAÇÃO USADAS COM A SOLUÇÃO EXTRACTANTE DE PIROFOSFATO DE SÓDIO E ELEMENTO QUÍMICO.	54
QUADRO 8 – TEMPERATURAS DE PRÉ-ATOMIZAÇÃO E ATOMIZAÇÃO USADAS COM A SOLUÇÃO DE EXTRACÇÃO DE ÁGUA ACIDULADA E COM ELEMENTO COBRE.	55
QUADRO 9 – TEMPERATURAS DE PRÉ-ATOMIZAÇÃO E ATOMIZAÇÃO USADAS CONSOANTE O ELEMENTO. ..	60
QUADRO 10 – CARACTERIZAÇÃO FÍSICA, QUÍMICA E MINERALÓGICA DOS SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS E NOS SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO E POMARÃO.	66
QUADRO 11 – CONCENTRAÇÃO TOTAL DOS ELEMENTOS NOS SOLOS CONTAMINADOS DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E EM SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).	71
QUADRO 12 – TEOR EM MERCÚRIO ASSOCIADO À MATÉRIA ORGÂNICA NO SOLO CONTAMINADO DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD) E NOS SOLOS REFERÊNCIA DA SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). MÉDIA ± DP, n = 3.	86
QUADRO 13 – CONCENTRAÇÕES DE AS, CU, HG, PB E ZN CERTIFICADAS E OBTIDAS PELO MÉTODO USADO NO MATERIAL DE REFERÊNCIA DE FOLHAS DE CHOUPÓ. MÉDIA ± DP, n = 9.	89
QUADRO 14 – VALORES OBTIDOS PARA O ÍNDICE DE ACUMULAÇÃO DE AS NAS PLANTAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).	94
QUADRO 15 – VALORES OBTIDOS PARA O ÍNDICE DE ACUMULAÇÃO DE PB NAS PLANTAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).	99
QUADRO 16 – VALORES CALCULADOS PARA O ÍNDICE DE ACUMULAÇÃO DO CU NAS PLANTAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).	104
QUADRO 17 – VALORES CALCULADOS PARA O ÍNDICE DE ACUMULAÇÃO DO ZN EM PLANTAS DE <i>CISTUS LADANIFER</i> PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P).	108
QUADRO 18 – NÚMERO TOTAL DE SEMENTES DE <i>CISTUS LADANIFER</i> GERMINADAS APÓS 30 DIAS PROVENIENTES DA MINA DE SÃO DOMINGOS (SD), SERRA DO CALDEIRÃO (C) E POMARÃO (P). ...	118
QUADRO 19 – GRUPOS BENEFICIADOS COM O USO DO PROCESSO DE FITORREMEDIAÇÃO NA MINA DE SÃO DOMINGOS.....	164

Introdução geral

A contaminação do solo é um enorme problema que tem atraído uma considerável atenção das populações, desde as últimas décadas. Os elementos químicos existentes no solo podem ter como origem processos geoquímicos naturais ou actividades humanas, nomeadamente, a actividade mineira.

A actividade mineira pode gerar grandes quantidades de resíduos, muitas vezes instáveis, que podem contribuir com elevadas concentrações de elementos químicos para os ecossistemas. Em Portugal a exploração mineira é antiga havendo indícios, em alguns casos anteriores à ocupação Romana, porém conheceu um desenvolvimento intensivo desde a revolução industrial até meados do século XX.

A mina de São Domingos começou a ser explorada desde a época Pré-Romana, com a extracção de ouro, prata e cobre. Assim, a degradação desta área reflecte uma acumulação de impactos ao longo dos séculos que conduziu a sérios problemas ambientais e de saúde pública.

Embora toda esta degradação do ambiente afecte as características e qualidade do solo e da água e ainda, a diminuição da vegetação observa-se, no entanto, que diversas espécies arbustivas conseguem desenvolver-se nestas áreas. O estudo da dinâmica das comunidades arbustivas face a agentes que podem influenciar o seu desenvolvimento é essencial para uma boa gestão e utilização destas comunidades. A esteva (*Cistus ladanifer* L.) é um exemplo deste tipo de arbustos que parecem ter boa capacidade de adaptação a locais com diferentes graus de degradação. Segundo Sengupta (1993), as comunidades de plantas presentes nas zonas mineiras podem contribuir para minimizar os impactes desta actividade.

A sobrevivência das plantas existentes nas áreas mineiras deve-se ao desenvolvimento de um conjunto de estratégias de tolerância às elevadas concentrações de elementos químicos. Por outro lado, a variabilidade existente nos ecossistemas mediterrâneos demonstra também condições limitantes para as quais as plantas desenvolvem um complexo conjunto de capacidades adaptativas. Face às inúmeras interferências existentes, devido à complexidade das áreas mineiras, torna-se essencial a sua análise bem como, o estudo detalhado de espécies mediterrâneas que existam nestas áreas aquando da realização de programas de recuperação e reabilitação. Esta informação pode ser essencial para usar, gerir e reabilitar estes ambientes que correspondem a focos de contaminação ambiental e problemas de saúde pública.

Assim, o presente estudo tem como objectivo principal a caracterização do potencial de utilização das estevas (*Cistus ladanifer* L.) na vegetalização de locais sujeitos à actividade mineira, onde os teores de elementos contaminantes e potencialmente tóxicos para os organismos vivos são elevados. Outro objectivo é comparar e correlacionar a distribuição de alguns elementos vestigiais nos solos e nas plantas de *Cistus ladanifer* L. num local contaminado pela extracção mineira (Mina de São Domingos) e em locais potencialmente não-contaminados (Serra do Caldeirão e Pomarão).

O presente trabalho tem ainda o objectivo de estudar respostas fisiológicas e morfológicas nas plantas de *Cistus ladanifer* provocadas pela presença dos contaminantes nos solos, como consequência da extracção mineira. Para esse efeito, determinam-se as diferenças existentes em alguns parâmetros, comparando-se os valores obtidos da análise de plantas oriundas do local contaminado e dos locais não-contaminados.

Por último, infere-se sobre o potencial de acumulação dos elementos na esteva e a sua possível aplicação em programas de fitorreabilitação de áreas mineiras, efectuando uma análise de efectividade.

A dissertação apresentada foi estruturada em duas partes. Na Parte I apresenta-se, em vários capítulos, a revisão bibliográfica de conceitos inerentes ao tema, enquanto que na Parte II se expõe o caso de estudo realizado na mina de São Domingos (local contaminado) e na Serra do Caldeirão e Pomarão (locais não contaminados). Nesta última parte procede-se à caracterização dos locais de estudo (Capítulo I) e à descrição dos métodos usados na análise dos solos e das plantas (Capítulo II), seguindo-se a apresentação dos resultados obtidos e respectiva discussão (Capítulo III). Finalmente, enunciam-se algumas considerações finais dos resultados (Capítulo IV) e por último um capítulo de Bibliografia.

1. Introdução

1.1 Actividade mineira

Os depósitos minerais existentes são resultado de um ou mais ciclos geoquímicos que ocorreram durante a História da Terra (Batista, 2003). A actividade humana vem explorando activamente estes depósitos provocando assim, resultados nefastos para o equilíbrio do ambiente natural. Como exemplos desta acção pode-se citar a dispersão no ambiente de elementos químicos nomeadamente, os considerados tóxicos para os seres vivos.

A actividade mineira, quer desenvolvida a céu aberto ou em lavra subterrânea, é uma fonte de poluição do ambiente envolvente. A exploração mineira origina uma acumulação em escombreiras de produtos ditos “estéreis” resultantes da extracção e inerentes ao minério e seu encaixante e, ainda a circulação de efluentes líquidos ricos em elementos potencialmente poluidores do meio (Taylor *et al.*, 1992). Assim, este tipo de exploração pode, com forte probabilidade, conduzir à ocorrência de concentrações extremamente elevadas de elementos químicos nos solos, sedimentos e, especialmente, nas águas. Consequentemente, a vida (vegetal e animal) na área pode ser profundamente afectada.

As águas provenientes das minas provocam alterações no ecossistema envolvente devido ao seu pH ser frequentemente baixo contribuindo, em geral, para incrementar a dissolução dos elementos químicos e o seu transporte, sob a forma de lixiviados. Este transporte, por vezes, atinge distâncias consideráveis em relação à origem (Chopin *et al.* 2003). A acção do vento e o escoamento superficial ou subterrâneo podem permitir o transporte, em solução ou na forma particulada, e

consequentemente a dispersão dos elementos químicos na área envolvente (Bleeker *et al.*, 2002).

A instabilidade das escombrelras e escórias resultantes dos processos mineiros é responsável por diferentes e inúmeras agressões ao equilíbrio ambiental, nomeadamente, impacto paisagístico, físico e químico nas águas superficiais e subterrâneas, nos solos e sedimentos e ainda biológico.

Os efeitos directos que ocorrem devido à actividade mineira e seu abandono são a perda de solo ou de vegetação variada e, consequentemente, decréscimo da biodiversidade e da produtividade primária. Como efeitos indirectos inclui-se a contaminação dos solos e sedimentos, da água e do ar que depois conduzem à contaminação dos rios, lagos e aquíferos (Wong, 2003).

Ao mesmo tempo que ocorrem os processos anteriormente citados sucedem-se os problemas de estabilização e colonização da área. A modificação das propriedades físico-químicas dos solos contaminados ou das características dos materiais de escombrelra, normalmente com baixa fertilidade, podem conduzir à inibição dos processos de crescimento das plantas (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Tordoff *et al.*, 2000; Krzaklewski e Pietrzykowski, 2002; Freitas *et al.*, 2004). Este facto pode interferir nos processos de formação do solo a partir das escombrelras, já que as plantas são também um dos factores que contribuem para a ciclagem dos elementos químicos, produção de matéria orgânica e consequentemente para a génese dos solos. Para além do aumento das concentrações de elementos químicos potencialmente tóxicos, a camada superficial do solo também poderá ficar sujeita a um maior risco de erosão, e ainda à diminuição de nutrientes essenciais para as plantas (Wong *et al.*, 1999).

A bioacumulação dos elementos químicos ao longo da cadeia alimentar proporciona consequências deletérias aos diferentes níveis tróficos, atingindo

naturalmente o próprio Homem. As minas abandonadas podem constituir desta forma um risco para a segurança e saúde pública.

1.2 Toxicidade dos elementos químicos

O solo é uma mistura heterogénea composta por três fases: sólida, líquida e gasosa (Kabata-Pendias, 2004). A matriz do solo representa a fase sólida sendo constituída por diferentes organismos, materiais minerais, substâncias orgânicas e outros componentes sólidos que formam um sistema poroso. Este sistema pode albergar a fase líquida, composta pela água do solo e uma variedade de matérias solúveis, e pela fase gasosa ou atmosfera do solo (Varenes, 2003).

Os mecanismos de associação dos elementos químicos aos componentes sólidos do solo podem ser complexos e variados dependendo das características do próprio elemento, da fase sólida e das reacções que podem ocorrer entre ambos, nomeadamente, adsorção, troca iónica, co-precipitação e complexação (Brümmer, 1986).

Os elementos vestigiais constituem um grupo heterogéneo de elementos que podem estar incluídos no solo. Do ponto de vista biológico e fisiológico dos seres vivos, Kennish (1992) classificou estes elementos como essenciais, tais como o cobalto, cobre, ferro, manganês, molibdénio, níquel, e zinco, e não-essenciais, tais como cádmio, crómio, mercúrio, chumbo, arsénio e prata. Assim, os elementos essenciais possuem funções importantes no metabolismo sendo intervenientes em diversos processos celulares enquanto que, os não essenciais não possuem funções metabólicas conhecidas podendo causar efeitos adversos nos seres vivos. No entanto, mesmo sendo essenciais, os elementos vestigiais podem ser tóxicos quando a sua concentração ultrapassa um certo limiar nos organismos vivos.

Um vasto número de factores, ambientais e biológicos, podem influenciar a toxicidade dos elementos nos ecossistemas. Para valores de concentração maiores que o óptimo, os elementos químicos produzem sintomas de toxicidade para os organismos (Bourrelier *et al.*, 1998; Odjegba e Fasidi, 2004). Este intervalo óptimo de concentração difere com a espécie e elemento químico, sendo considerado como a quantidade para a qual o crescimento e desenvolvimento de determinada espécie são máximos. Para as plantas os efeitos da toxicidade podem-se reflectir na redução do crescimento, indução de cloroses e nos processos fisiológicos nomeadamente redução da fotossíntese, alteração do teor de água, entre outros (Bourrelier *et al.*, 1998). Por outro lado, a toxicidade dos elementos pode também afectar o número, diversidade e actividade dos organismos do solo, inibindo a decomposição da matéria orgânica e os processos de mineralização do azoto (Wong, 2003).

A toxicidade dos elementos não se restringe à concentração dos elementos nos solos e organismos. Algumas formas químicas possuem um potencial de toxicidade maior em detrimento de outras devido ao seu estado de oxidação. Por exemplo, o crómio pode existir sob as formas Cr^{3+} ou Cr^{6+} as quais diferem pelo seu nível de toxicidade para os organismos e mobilidade no solo. Assim, a forma hexavalente é relativamente móvel e muito tóxica para os seres vivos enquanto que a trivalente é menos tóxica sendo até essencial para a nutrição animal (Joaquim *et al.*, 2003).

O pH do solo e seu conteúdo em nutrientes também contribuem para que a resposta das plantas aos contaminantes do substrato seja diferente. O pH do solo afecta o crescimento das plantas devido a influenciar a solubilidade química dos elementos (Wong, 2003). Deste modo, torna-se evidente o papel fundamental que as águas ácidas podem ter na mobilização de quantidades significativas de elementos contaminantes tanto à superfície como em profundidade.

1.3 Disponibilidade dos elementos químicos

Os elementos químicos existentes no solo podem ocorrer naturalmente devido à meteorização da rocha-mãe, onde estão presentes e a partir da qual se formam, ou estar associados às actividades antrópicas. Por outro lado, cada elemento possui um determinado nível de mobilidade na solução do solo e disponibilidade para os organismos nomeadamente para as plantas.

A transferência dos elementos químicos entre as fases do solo pode ser considerada como o principal processo no controlo do comportamento, mobilidade e disponibilidade dos mesmos (Kabata-Pendias, 2004).

A fase líquida do solo está sujeita a constantes e rápidas mudanças no seu conteúdo e composição química devido aos processos de equilíbrio gerados entre a solução e as fracções sólidas do solo (Brümmer, 1986; Lázaro *et al.*, 2006) e ainda da absorção das espécies iónicas da solução pelas raízes das plantas (Kabata-Pendias, 2004). Assim, os elementos químicos adsorvidos nas várias fases sólidas podem ser libertados na fase aquosa em períodos de tempo relativamente curtos, por exemplo, um ciclo fenológico (Brümmer, 1986).

A concentração de elementos químicos nas plantas pode ser ponderada pela disponibilidade dos elementos no solo e pela capacidade de absorver e transferir os mesmos para as diferentes partes da planta, através do xilema e floema (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). O conteúdo total de metais no solo é, em regra, um indicador deficiente já que raras vezes se correlaciona com o conteúdo dos mesmos nos tecidos das plantas (Pichtel e Salt, 1998).

De modo a caracterizar a disponibilidade dos elementos químicos para as plantas Brümmer (1986) considerou três parâmetros: conteúdo total no solo que pode estar potencialmente disponível, actividade iónica dos elementos na solução do solo e a taxa

de transferência do elemento da fase sólida para a líquida e desta para as raízes das plantas.

Os diferentes elementos químicos estão associados a distintos componentes que se encontram distribuídos pelas diferentes fases do solo através de vários mecanismos, tais como adsorção, troca iónica, co-precipitação e complexação (Navas e Lindhorfer, 2003). Podem estar presentes sob formas solúveis na água e em posição de troca, em colóides inorgânicos e orgânicos, estando deste modo disponíveis para as plantas (Alloway, 1990; Tavares *et al.*, 2003) ou associados a componentes que muitas vezes os tornam imóveis, formando complexos de superfície com os óxidos de ferro e manganês ou sob forma quelatizada, associados à matéria orgânica. Os hidróxidos de alumínio também podem adsorver de forma não disponível os elementos podendo ter, consoante o tipo de solo, maior importância que os óxidos de ferro (Kabata-Pendias e Pendias, 1985).

Em termos práticos, a realização de extracções sequenciais pode ser considerada como essencial para a compreensão da associação dos elementos químicos às várias fracções do solo, os seus tipos de ligação, potencial mobilidade dos mesmos e, conseqüentemente a sua disponibilidade em relação ao conteúdo total (Armienta *et al.*, 1996). Assim, a identificação das fases às quais os elementos químicos no solo estão associados permite um melhor conhecimento dos processos geoquímicos para a avaliação do potencial de mobilização e indução de riscos no ambiente e na saúde pública (Kaasalainen e Yli-Halla, 2003; Kabata-Pendias, 2004).

Como a absorção dos elementos pelas raízes está restringida à fase aquosa, o conteúdo dos elementos na solução do solo ou associados ao complexo de troca é de extrema importância. Assim, esta fracção pode ser determinada através de uma extracção com água (Biddappa *et al.*, 1982; Bingham *et al.*, 1983), com soluções

diluídas de sais como cloreto de cálcio ou nitrato de cálcio (Biddappa *et al.*, 1982; Köster e Merkel, 1983) ou com DTPA (Lindsay e Norvel, 1978). Ambas as fracções, (solúvel ou associada ao complexo de troca) podem estar bem correlacionadas com a absorção dos elementos pelas plantas (Brümmer, 1986).

A disponibilidade dos elementos para as plantas pode ser influenciada por vários factores que controlam a actividade dos elementos solúveis na solução do solo ou dos que se encontram adsorvidos no complexo de troca. Assim, a disponibilidade destes é regulada por processos físicos (por exemplo: constituição da fracção coloidal), químicos (por exemplo: pH, potencial redox, capacidade de formar complexos de superfície de natureza variada), biológicos e a interacção entre os mesmos (Ernst, 1996). Os factores físicos e químicos podem proporcionar uma estrutura para a actuação dos factores biológicos nomeadamente através do oxigénio, protões e ácidos orgânicos ou pela associação a micorrizas.

1.3.1 Aspecto físicos

As propriedades físicas do solo variam consoante a constituição de cada solo afectando consequentemente a disponibilidade dos elementos (Ernst, 1996). Por exemplo, solos arenosos com baixo teor de argila retêm menos água e elementos devido a apresentar menos locais de ligação para os iões, especialmente de catiões (Taiz e Zayed, 2002).

Locais onde se verificou a actividade mineira possuem, normalmente, uma textura grosseira que facilita a lixiviação dos elementos solúveis podendo tornar inacessíveis os mesmos para as plantas. Esta textura também influencia a capacidade de retenção da água sendo normalmente pequena, factor que condiciona a sobrevivência das plantas durante a época seca.

Boon e Soltanpour (1992) demonstraram que a concentração dos metais aumenta com a diminuição do tamanho da partícula sólida (2-0,5 mm – 158 mg/kg de Cd e 7 607 mg/kg de Pb; 0,5-0,047 mm – 186 mg/kg de Cd e 15 033 mg/kg de Pb; <0,047 mm – 250 mg/kg de Cd e 20 400 mg/kg de Pb).

1.3.2 Aspectos químicos

As condições químicas do solo nomeadamente o pH, potencial redox, capacidade de troca catiónica (CTC), quantidade e qualidade da matéria orgânica, minerais argilosos e óxidos e hidróxidos podem determinar a disponibilidade dos elementos.

Geralmente, para valores baixos de pH a solubilidade dos elementos aumenta e conseqüentemente, a sua mobilidade e disponibilidade (Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Neves *et al.*, 1999; Bleeker *et al.*, 2002). Considerando o exemplo do chumbo (Kabata-Pendias e Pendias, 1992) considera-se que a solubilidade dos elementos no solo, a sua absorção pelas raízes das plantas e a sua translocação no interior das mesmas é, na maioria das plantas, elevada em solos ácidos. Deste modo, as soluções de solo das minas devido a possuírem valores de pH baixo podem promover um aumento da disponibilidade dos elementos (Dinelli e Lombini, 1996). Contudo, nesta gama de pH, a disponibilidade também é dependente de outros parâmetros nomeadamente da presença de óxidos e óxi-hidróxidos de ferro que têm a capacidade de adsorver os elementos, através da formação de complexos de esfera interna (Dinelli e Lombini, 1994).

A capacidade de troca catiónica está associada às características das fases sólidas do solo e da sua capacidade de desenvolverem cargas negativas. Assim, as formas catiónicas dos elementos podem encontrar-se adsorvidos nos locais de carga negativa dos componentes do solo. Contudo, na presença de iões H^+ , estes são preferencialmente

adsorvidos dando-se a libertação dos catiões dos locais de troca que ficam, deste modo, na solução aquosa. A capacidade de troca catiónica depende da superfície específica e da densidade de carga (Kabata-Pendias, 2004), as quais são função das características estruturais das fases sólidas inorgânicas e do tipo de matéria orgânica do solo.

Os elementos de transição podem ocorrer em diferentes estados de oxidação, com comportamentos distintos em função das características da espécie e do solo afectando a sua disponibilidade e eventual toxicidade. A diminuição do potencial redox conduz, normalmente, a um aumento da disponibilidade dos elementos, uma vez que as formas reduzidas são geralmente mais solúveis (Kabata-Pendias e Pendias, 1984).

A presença de óxidos de ferro, alumínio e manganês pode ser decisiva na distribuição e comportamento dos elementos (Kabata-Pendias, 2004). Isto deve-se à sua capacidade de oxidar directamente ou catalisar a oxidação de outros elementos conduzindo, deste modo, a uma diminuição da solubilidade dos elementos químicos (McBride, 1989).

O conteúdo e tipo de matéria orgânica também podem influenciar a disponibilidade dos elementos existentes na solução do solo (Brümmer, 1986). Geralmente, um elevado conteúdo de matéria orgânica pode conduzir à diminuição da disponibilidade dos elementos devido à potencial presença de agentes quelatizantes que serão imobilizadores dos elementos (Alloway, 1990).

A especiação dos elementos também é outro factor que pode influenciar a disponibilidade. Cada elemento químico pode existir em várias formas de acordo com a sua energia de ligação aos componentes do solo, à respectiva superfície específica destes e ainda tipo e número de locais reactivos à superfície da fase sólida que pode permitir a formação de complexos de esfera externa ou complexos de esfera interna (Sparks, 1995; Abreu, 1999). Segundo Galán *et al.* (2003), a disponibilidade de metais

como o chumbo, zinco e cádmio está mais associada ao tipo de ligação à superfície dos colóides do que à sua concentração total.

1.3.3 Aspectos biológicos

A presença de bactérias, microfauna, fungos ou plantas pode modificar fortemente as condições físicas e químicas do solo e os seus processos influenciando a disponibilidade dos elementos (Ernst, 1996; Bourelhier *et al.*, 1998). Vários trabalhos com microrganismos do solo demonstraram a existência de exsudação de compostos orgânicos que, por sua vez, estimulam a disponibilidade dos elementos químicos, como por exemplo o ferro (Bural *et al.*, 2000) e manganês (Barber e Lee, 1974).

Em áreas mineiras a existência de bactérias quimiolitotróficas pode contribuir para a acidificação do meio e, conseqüentemente, para a diminuição da solubilidade dos elementos devido à sua precipitação como sulfuretos em condições redutoras (Kelley e Tuovinen, 1988).

As plantas possuem mecanismos especializados para a estimulação da disponibilidade dos metais na rizosfera. Fushiya *et al.* (1982) demonstraram que algumas espécies de herbáceas exsudam uma classe de compostos orgânicos designados por sideróforos capazes de aumentar a disponibilidade do ferro no solo para posterior absorção pelas raízes.

A presença de plantas pode afectar a concentração dos elementos e sua especiação nos solos. As plantas absorvem os iões do solo e exsudam simultaneamente protões devido à presença de um sistema de absorção por antiporte que, provoca a acidificação da rizosfera e o aumento da disponibilidade (Bienfait *et al.*, 1982).

Associações simbióticas com fungos têm a capacidade de aumentar a área de absorção das raízes e a estimulação da aquisição nutrientes. A associação simbiótica

entre as raízes das plantas e micorrizas vesiculares-arbusculares e ectomicorrizas também pode contribuir para a disponibilidade dos elementos químicos (Colpaert e Van Assche, 1992). As micorrizas arbusculares-vesiculares podem aumentar (Dosskey e Adriano, 1993) ou diminuir (Dueck *et al.*, 1986) a contaminação do solo afectando significativamente a especiação dos elementos e a sua disponibilidade.

1.4 Concentração de elementos químicos nas plantas

Todos os organismos vivos, em particular as plantas, mostram normalmente uma capacidade natural para a selecção de elementos químicos, que por sua vez estão altamente dependentes das condições geoquímicas do meio. Assim, a transferência dos elementos químicos do solo para a planta é apenas uma parte do ciclo natural dos respectivos elementos (Kabata-Pendias, 2004).

Embora a composição química nas plantas seja regulada pela selecção biológica dos elementos, os mecanismos de absorção intervenientes podem, todavia, ser limitados perante o elemento. A composição química das plantas é o resultado da interacção de factores internos e externos, relacionados com as condições geológicas, pedológicas, climáticas, entre outras.

As plantas absorvem os elementos químicos através das raízes ou, em menor quantidade, pelas folhas. Assim, a concentração existente nas plantas está dependente da composição química do solo ou rochas subjacentes e da deposição atmosférica (Chopin *et al.*, 2003). A absorção dos elementos químicos pelas plantas não está directamente relacionada com a sua concentração total no solo mas depende da disponibilidade dos mesmos (Kabata-Pendias e Pendias, 1992), sendo também fundamental a concentração de nutrientes, a disponibilidade de água no solo e a capacidade das plantas em aceder aos elementos.

A acumulação de elementos químicos nas plantas e seus efeitos varia consoante a espécie e o elemento em questão. Em estudos realizados por Boon e Soltanpour (1992) é possível constatar esta variabilidade já que, em locais de elevada contaminação com chumbo (461 mg/kg) a concentração do mesmo elemento em folhas de brócolos é menor que 5 mg/kg enquanto que na alface e espinafres é, respectivamente, de 41 a 45 mg/kg. Em relação ao cádmio, os brócolos desenvolvidos nos solos referidos possuem uma concentração menor que 1 mg/kg enquanto que na alface é superior a 8 mg/kg. A composição química das plantas pode reflectir a disponibilidade de um elemento na proximidade do sistema radicular e a capacidade das plantas para absorverem, translocarem e acumularem o elemento (Nagaraju e Karimulla, 2002). Esta acumulação dentro da planta varia consoante o órgão da mesma.

A concentração de elementos químicos nas plantas tem sido usada em estudos biogeoquímicos (Pratas, 1996) e como indicador de poluição associado com resíduos resultantes da exploração mineira (Dunn *et al.*, 1996).

A associação de observações geobotânicas e a avaliação da concentração de elementos químicos nas plantas pode ser de extrema importância para o reconhecimento de plantas que podem ser utilizadas em programas de estabilização e reconversão de áreas contaminadas (Baker *et al.*, 1994; Nagaraju e Karimulla, 2002).

De acordo com Farago e Merha (1991) existem três índices diferentes que são relevantes na avaliação do comportamento das plantas face à presença de elevadas concentrações de elementos:

- Índice Raízes/solo: indica a disponibilidade do elemento, isto é, quando a concentração de um determinado elemento for superior à existente no solo (valor >1) quer dizer que este se encontra disponível para a absorção pelas plantas;

- Índice Folhas/raízes: revela informação sobre a mobilidade do elemento entre as raízes e folhas. Para valores >1 este coeficiente reflecte um eficiente transporte dos elementos para a parte aérea por outro lado, para valores inferiores Baker (1981) sugere a existência de exclusão como mecanismo de tolerância;
- Índice Folhas/solo: oferece informação sobre a acumulação do elemento na planta sendo que, para valores maiores que um este coeficiente enuncia uma acumulação dos elementos na planta. Quando o valor é menor que um considera-se que as plantas se comportam como não acumuladoras.

Consoante o nível de acumulação dos elementos, as plantas podem ser classificadas em dois grupos: as acumuladoras e não acumuladoras. O grupo das plantas acumuladoras subdivide-se em acumuladoras e hiperacumuladoras consoante a sua capacidade de acumular elementos químicos considerados fitotóxicos. Assim, as hiperacumuladoras possuem elevada capacidade de acumulação, podendo armazenar concentrações de Zn superiores a 1% e de Cu, Pb e Ni maiores que 0,1% do seu peso seco (Baker, 1981).

As plantas tolerantes acumulam na sua biomassa concentrações consideráveis de elementos, não sendo no entanto acumuladores específicos, e minimizam os efeitos de toxicidade causados pelos mesmos (Bleeker *et al.*, 2002). Assim, as espécies tolerantes podem ser consideradas acumuladoras ou indicadoras de acordo com a capacidade relativa em absorver, translocar e concentrar os metais na planta (Baker, 1981).

Outro parâmetro que pode ser usado na avaliação do comportamento de acumulação das plantas é o coeficiente de absorção biológica (CAB), que caracteriza a

intensidade de absorção de um elemento químico pela planta. Kovalevskii (1969) definiu este coeficiente como:

$$\text{CAB} = \frac{\text{Concentração do elemento na planta}}{\text{Concentração total do elemento no substrato}}$$

Os valores de CAB podem variar entre 0,001 e 100,0 sendo divididos em cinco grupos, nomeadamente:

- Absorção intensa: CAB entre 10-100
- Absorção forte: CAB entre 1-10
- Absorção intermédia: CAB entre 0,1-1
- Absorção fraca: CAB entre 0,01-0,1
- Absorção muito fraca: CAB entre 0,001-0,01

Dado que a concentração dos elementos químicos na planta está dependente da fracção disponível e não do teor total no solo, Batista *et al.* (2003) sugeriram uma adaptação a este coeficiente. Esta modificação consistiu na substituição da concentração total do elemento químico no solo pela fracção de troca, que está disponível para as plantas, e pelo uso do somatório da concentração do elemento nas folhas e nas raízes. A expressão alterada é a seguinte:

$$\text{CAB (a)} = \frac{\text{Concentração do elemento nas folhas} + \text{concentração do elemento nas raízes}}{\text{Concentração do elemento na fracção de troca no substrato}}$$

Assim, este coeficiente pode reflectir melhor o comportamento das plantas dado que mostra a variação das concentrações do elemento nas plantas face ao teor que está realmente disponível no solo.

A acumulação de elementos químicos nas plantas pode provocar uma série de efeitos negativos para a mesma nomeadamente ao nível fisiológico ou morfológico. A amplitude da resposta pode variar em função da intensidade e tempo de exposição ao elemento, formas químicas existentes no solo e espécie da planta (Bourrelier *et al.*, 1998). Assim, embora os efeitos nas plantas não sejam específicos sabe-se que elevadas concentrações de chumbo inibem a respiração e fotossíntese (Kabata-Pendias e Pendias, 1984), interferem na mitose e na absorção de água e podem provocar distúrbios nutricionais (Paiva *et al.*, 2002). Por outro lado, o cobre, quando em excesso, pode provocar efeitos fitotóxicos designadamente ao nível da permeabilidade da membrana, estrutura da cromatina, síntese de proteínas, actividade enzimática, fotossíntese, respiração e activação da senescência (Sandmann e Böger, 1980).

No entanto, as plantas tolerantes conseguem sobreviver em locais com elevadas concentrações de elementos químicos porque desenvolveram mecanismos de resistência ao stresse. A tolerância pode-se expressar através das estratégias de exclusão, desintoxicação ou tolerância bioquímica (Levitt, 1980; Baker e Walker, 1981; Baker, 1984; Pang *et al.*, 2003). A exclusão é considerada como a restrição na absorção dos elementos ou a limitação da sua translocação para as partes aéreas.

A desintoxicação e a tolerância bioquímica são estratégias que protegem a planta contra as alterações celulares produzidas face à acumulação dos elementos. Assim, a desintoxicação funciona através da quelatação dos elementos químicos no citoplasma e compartimentação no vacúolo enquanto que a tolerância bioquímica ocorre através da síntese de substâncias não-enzimáticas e enzimas antioxidativas, que protegem a planta do excesso de espécies oxidativas produzidas a partir da acumulação dos elementos químicos (Bourrelier *et al.*, 1998; Cao *et al.*, 2004; Sharma e Dubey, 2005)

A capacidade de tolerância de uma população de plantas é uma das características mais importantes que determina a estrutura, densidade e desenvolvimento da vegetação em área mineiras (Simon, 1978). O nível de tolerância varia consoante a espécie de planta e o respectivo elemento químico.

É de notar que existem plantas que crescem em locais contaminados e não-contaminados possuindo desta forma respostas diferentes consoante o grau de contaminação. Estas plantas são designadas por pseudometalófitas (Baker, 1989).

Embora a “verdadeira” tolerância resulte de mecanismos fisiológicos controlados geneticamente, existem evidências de que a tolerância pode ser perdida (Baker e Walker, 1989) ou induzida através de um tratamento evolutivo em variações fenotípicas (Brown e Martin, 1981). Assim, alguns factores ambientais adversos ou induzidos pela acção do Homem (por exemplo elevadas concentrações de elementos vestigiais no solo) podem provocar fenómenos de evolução ou mudanças drásticas na adaptação das plantas. Em 1992, Schmid apresentou alguns exemplos de populações que variavam fenotipicamente consoante as condições existentes no local.

1.5 Remediação de solos

Segundo Ernst (1996), duas práticas podem ser aplicadas na remediação de locais contaminados: *ex situ*, isto é, remoção do solo contaminado, transporte e limpeza fora do local onde se encontra a contaminação; *in situ*, isto é, a descontaminação é feita no próprio local.

Para a selecção da técnica a usar é fundamental possuir o máximo de informação sobre o problema, abrangendo uma série de áreas disciplinares. Assim, segundo Adriano *et al.* (1998) a escolha da técnica depende das informações obtidas relativamente aos seguintes pontos:

- Caracterização do local: tamanho da área afectada, localização e historial da área permite uma visualização geral do problema podendo servir também, para a estimativa aproximada dos custos;
- Caracterização do solo: fornece informações acerca do comportamento dos contaminantes, distribuição dos mesmos nas fracções do solo e sua disponibilidade e, conseqüentemente, o grau de dificuldade na remediação do local;
- Concentração dos elementos químicos contaminantes: permite estimar a gravidade do problema e o possível método de remediação a usar.

1.5.1 Técnicas Físico-químicas

A remediação de áreas contaminadas através de técnicas físico-químicas pode ser efectuada através de diversos métodos descritos, sumariamente, no Quadro 1.

A remediação através destas técnicas possui custos elevados e só é apropriada em pequenas áreas, onde é necessária uma descontaminação rápida e completa (Martin e Bardos, 1996). Geralmente, estes processos deslocam os materiais contaminados para outro local, causando riscos de contaminação secundária e aumentando ainda mais os custos do tratamento (Cunningham *et al.*, 1996). Além disso, a mistura de mais de um contaminante na área a remediar pode dificultar a eficiência e escolha de uma destas técnicas.

Alguns métodos, designadamente a lavagem de solos, requerem trabalhos de engenharia e custos significativos tendo, simultaneamente, efeitos adversos na actividade biológica, estrutura do solo e fertilidade (Purford e Watson, 2003). Nestes casos, é sempre necessária a restauração do ambiente inicial o que geralmente não é realizado. Assim, tecnologias de tratamento de locais contaminados, designadamente as

áreas mineiras, com processos físicos e/ou electroquímicos são mais caros e apenas parcialmente efectivos.

Quadro 1 – Tecnologias disponíveis para remediação de áreas contaminadas por metais (adaptado de Khan *et al.*, 2004).

Tecnologias	Caracterização
Solidificação	Adição de agentes solificadores que agregam os contaminantes às partículas do solo formando misturas duras, não-porosas e não-lixiviáveis
Tratamento térmico ou volatilização dos poluentes	O solo é aquecido de modo a permitir a volatilização do elemento
Lavagem	Lavagem do solo com uma solução ácida ou quelatizante
Lixiviação	Adição de soluções ácidas ou quelatizantes de modo a provocar a solubilização ou indisponibilidade dos elementos
Remoção de componentes do solo	Remoção de partículas finas que são as mais propícias a conter elevadas concentrações de elementos
Encapsulação	Cobrir o solo contaminado com material impermeável
Electrocinética	Introdução de corrente eléctrica que provoca a deslocação dos elementos sob a forma iónica para os eléctrodos
Incorporação de aditivos ou correctivos no solo	Redução da biodisponibilidade

Apesar da contaminação afectar o crescimento, a distribuição e a fenologia das espécies vegetais, a vegetação é uma alternativa para a recuperação de ambientes degradados pelo excesso desses elementos devido à sua capacidade de acumulação ou

de tolerância (Salt *et al.*, 1995). Flathman e Lanza (1998) consideram que os métodos que envolvem plantas são os mais exequíveis e económicos na reabilitação das áreas mineiras. A utilização desta alternativa ecológica estimula o retorno das condições normais do solo, o ciclo da matéria orgânica e a estrutura do solo. Assim, é notória a redução da erosão superficial devido à acção das raízes das plantas e ainda à cobertura do solo efectuada pela sua parte aérea.

1.5.2 Fitorremediação

A fitorremediação é uma técnica que usa plantas para remover, transformar ou acumular diversos poluentes tais como, metais pesados, compostos orgânicos ou radioquímicos, que se encontram nos solos, sedimentos, águas superficiais ou profundas e, em alguns casos, na atmosfera (Susarla *et al.*, 2002; Lasat, 2002; Dinardi *et al.*, 2003). Os estudos científicos que visam a utilização de plantas na remediação de locais contaminados têm aumentado nas últimas décadas. Por outro lado, é socialmente aceite pelas comunidades envolventes e outras entidades devido a minimizar o impacto visual das áreas degradadas.

De um modo geral, a fitorremediação de locais contaminados permite uma remediação conferindo várias vantagens, nomeadamente: utilização *in situ*, manutenção da actividade biológica e estrutura do solo, baixo custo, sem danos visuais e, em alguns casos, reconversão dos elementos químicos para formas menos tóxicas (Baker *et al.*, 1994; Cunningham *et al.*, 1995).

A fitorremediação pode ser dividida em várias categorias apresentadas no Quadro 2. A escolha de uma destas tecnologias depende da natureza dos contaminantes, características do local e dimensão da contaminação (Cunningham *et al.*, 1995; Lasat, 2002).

Quadro 2 – Tecnologias associadas à fitorremediação (adaptado de Pulford e Watson, 2003).

Processos	Caracterização
Fitoacumulação/fitoextração	Remoção do contaminante do solo e sua acumulação nos tecidos das plantas
Fitodegradação/Fitotransformação	Degradação de certos contaminantes ou transformação em formas menos tóxicas
Fitovolatilização	Remoção do contaminante e posterior transformação numa forma volátil
Rizodegradação	Degradação dos contaminantes através da actividade bacteriana ou fúngica que ocorre na rizosfera de certas plantas vasculares
Fitoestabilização	Estabilização do meio e minimização da migração de contaminantes

Assim, o uso de espécies tolerantes e com elevada produção de biomassa pode contribuir de uma forma mais eficaz para a remediação de áreas fortemente contaminadas, como são as áreas mineiras (Hooper e Vitousek, 1997). Segundo Baker (1987), a sobrevivência das espécies tolerantes está relacionada com a capacidade destas em tolerar a toxicidade do elemento. Por outro lado, têm a vantagem de se adaptar a outros factores de *stress* nomeadamente, restrição de nutrientes e água característicos das áreas mineiras (Tordoff *et al.*, 2000; Wong, 2003).

Segundo Valgronsveld *et al.* (1995) a fitoestabilização tem sido usada para a vegetalização de áreas de exploração mineira. O crescimento de plantas tolerantes nas condições adversas dos locais mineiros pode aumentar o conteúdo em matéria orgânica, recuperação da estrutura do solo, redução da erosão, aumento da capacidade de retenção de água, desenvolvimento de comunidades de microfauna relevante nos processos biológicos do solo e principalmente, a possível imobilização dos elementos (Tordoff *et al.*, 2000). A redução da mobilidade dos elementos pode limitar a sua dispersão através

da água ou vento (Pichtel e Salt, 1998) e, conseqüentemente, a contaminação de áreas adjacentes incluindo o lençol freático.

Por outro lado, o uso específico de espécies pioneiras pode permitir a modificação do ambiente degradado facilitando a colonização de outras comunidades de plantas. Em suma, o melhoramento das condições da área através do controlo da poluição, estabilização do local e minimização do impacto visual são algumas das vantagens desta prática.

O sucesso da fitoestabilização depende do nível de contaminação, do tipo de elementos e concentração, do nível de disponibilidade dos mesmos relacionado com os aspectos enunciados anteriormente, da capacidade das plantas de acumular e estabilizar o solo (Ernst, 1996) e ainda de se adaptar às condições do meio. A escolha apropriada das plantas para a estabilização, crescimento e colonização do local contaminado é de extrema importância para o processo de remediação. É de evidenciar, todavia, a preocupação da manutenção da dinâmica natural do ecossistema tentando escolher plantas tolerantes autóctones.

1.6 Caracterização de *Cistus ladanifer* L.

Cistus ladanifer L. (Figura 1) é um arbusto da Família Cistaceae, fortemente aromática cujas partes aéreas são extremamente viscosas sendo usadas na produção de láudano e óleo de *Cistus* para a indústria farmacêutica e perfumaria.

É encontrada num vasto gradiente de latitude, altitude, clima e tipo de solos no Sudoeste da Europa e Norte de África. Relativamente a Portugal Continental, esta planta aparece espontaneamente em quase todo o território. A tolerância e adaptabilidade de *Cistus ladanifer* a diferentes tipos de solos, incluindo solos derivados de serpentinitos

caracterizados por elevados níveis de cobalto, crómio e níquel, baixos valores de Ca/Mg e deficiência de água, foram demonstradas por Alados *et al.* (1999).



Figura 1 – Fotografia de uma planta de *Cistus ladanifer*.

O seu potencial evolutivo para a adaptação a ambientes extremos é bem conhecido no Mediterrâneo, onde o clima é caracterizado por elevadas temperaturas no Verão e longos períodos de seca. Segundo Simões (2002), esta espécie está provida de características e mecanismos específicos de adaptação aos factores ambientais de stresse a que geralmente estão sujeitas designadamente, limitações de água e nutrientes, excesso de luz e temperatura e, solos fracamente desenvolvidos. Esta capacidade adaptativa às variações das condições ambientais está relacionada com mecanismos bem desenvolvidos para a conservação de água e nutrientes (Nuñez-Oliveira *et al.*, 1996).

Bolaños e Guinea (1949) afirmam que as plantas de *Cistus* actuam como espécies pioneiras, sem o desenvolvimento das quais as restantes comunidades vegetais não se podem estabelecer. Esta planta compete com sucesso, em condições desfavoráveis, com outras espécies podendo assim cobrir rapidamente locais em que, por vezes, tenham ocorrido mudanças drásticas do meio, designadamente por acção do

fogo (Delgado *et al.*, 2001). O comportamento feno-morfológico de *Cistus ladanifer* (Figura 2) é caracterizado por um crescimento vegetativo sazonal no ápice, entre Abril e o fim de Setembro.

	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
A												
B												
C												
D												
E												

Figura 2 – Representação esquemática das sucessivas fases da fenologia de *Cistus ladanifer*. A: crescimento vegetativo; B: floração; C: frutificação; D: dispersão das sementes; E: germinação (Adaptado de Talavera *et al.*, 1993).

A sua taxa de crescimento é elevada quando as condições o permitem, produzindo biomassa considerável em relativamente pouco tempo (Nuñez *et al.*, 1989). Este facto foi também confirmado por Patón *et al.* (1998) que observou, em populações naturais, plantas com dois anos de idade que produziam aproximadamente 1700 kg de matéria seca por hectare de biomassa de folhagem.

As folhas podem possuir características morfológicas, anatómicas e fisiológicas distintas sendo considerada uma espécie com dimorfismo foliar. Estas modificações morfológicas e estruturais desempenham um papel muito importante na regulação do equilíbrio energético e na manutenção de água no interior da planta. Segundo Nuñez-Oliveira *et al.* (1996) a redução da área foliar e aumento da esclerofilia foliar durante os Verões secos contribui para a diminuição da transpiração, a intensa translocação dos nutrientes e máximo de *litterfall* (termo que descreve a totalidade dos órgãos da planta que caem no substrato do coberto vegetativo).

A floração ocorre entre Março e Maio nas extremidades axiais das folhas superiores da última estação e a maturação das cápsulas dá-se no início do Verão nomeadamente, entre Maio e Julho (Talavera *et al.*, 1993). Estes dois processos coincidem com o período relativamente húmido e maior actividade fotossintética já que, são processos que requerem elevadas quantidades de energia e água. As flores duram um só dia sendo a polinização cruzada.

Cistus ladanifer é considerada uma espécie que obrigatoriamente regenera por sementes (*obligate seeders*). A produção de cápsulas com um elevado número de sementes de pequenas dimensões, com vasta longevidade e germinação heterogénea conduz a uma estratégia de germinação oportunista (Pérez-Garcia, 1997). As sementes são posteriormente libertadas durante um longo período devido a sucessivas deiscências dos lóculos, em resposta às condições de seca seguidas de períodos húmidos. A gradual libertação das sementes pode ser interpretada como uma estratégia oportunista favorável para o aumento da viabilidade de germinação e estabilização das sementes no solo (Bastida e Talavera, 2002).

Em cada população, só uma pequena porção das sementes (normalmente menos de 25%) possui um tegumento brando (*softcoated seeds*), pode germinar em cada ano, enquanto que a fracção maior possui um tegumento forte (*hardcoated seeds*) e se acumula no solo (Thanos e Georghiou, 1988). Posteriormente, estas sementes conseguem persistir durante longos períodos até que o seu estado de latência é quebrado. A existência de um tegumento forte pode oferecer uma protecção extra que, conseqüentemente, resultará numa maior longevidade das sementes no solo. A existência da fracção de sementes *soft-coated* pode assegurar a manutenção da existência de populações de *Cistus*, em locais sem distúrbios (Thanos e Georghiou, 1988). *Hardcoatedness* é um tipo de dormência presente nas sementes que é

caracterizado pela presença de um tegumento impermeável à água. A capacidade de produzir sementes com diferentes estados de dormência é, muito provavelmente, o mecanismo pelo qual o *Cistus ladanifer* se adapta a novas situações ambientais e assegura a sua sobrevivência através da aptidão de germinação das sementes ao longo do tempo (Pérez-García, 1997).

A germinação das sementes pode dar-se numa vasta gama de condições de temperatura e luz, no entanto não possui qualquer adaptação de dispersão das mesmas. A facilidade em penetrarem e se acumularem no solo pode estar relacionada com as pequenas dimensões das sementes (Fenner, 1985).

Embora as sementes de *Cistus ladanifer* possam germinar na ausência de fogo, Delgado *et al.* (2001) verificou que tratamentos de pré-aquecimento das sementes (5 minutos a 100 °C ou 15 minutos a 100 °C) aumentavam a proporção de sementes germinadas quando comparadas com o tratamento controlo, representado pela ausência de pré-aquecimento ($78\pm 16\%$, $67\pm 12\%$ e $19\pm 17\%$, respectivamente). Resultados semelhantes também foram obtidos por outros investigadores entre os quais Pérez-García (1997) e Thanos *et al.* (1992). A quebra do estado de dormência das sementes pelo fogo é justificada pela ruptura do tegumento através da dilatação e contracção das células (Murdoch e Ellis, 1992). Por outro lado, o fogo altera o espectro de luz solar ao nível do solo conduzindo à alteração da qualidade da luz que controla a germinação via conversão do fitocrómio (Smith, 1982).

Todas estas características presentes nas sementes são vantagens ecológicas nas condições climáticas Mediterrâneas, designadamente Verões quentes e secos e propensão ao fogo.

1. Enquadramento do estudo

Para o presente estudo foi seleccionada uma área contaminada, Mina de São Domingos, e duas áreas potencialmente não contaminadas, Pomarão e da Serra do Caldeirão, para controlo. Assim, esta selecção das áreas de estudo foi feita tendo em conta o seu grau de contaminação, a exposição do terreno e as condições climáticas. Devido à variabilidade relativa dos materiais do substrato nos locais e respectivas áreas seleccionadas procedeu-se à divisão e delimitação das mesmas em três parcelas de 10x15 metros. Deste modo, as diferentes variáveis estudadas foram analisadas em cada área de amostragem, comparando os valores obtidos nas parcelas de cada local, e entre as três áreas, através da comparação das médias das parcelas.

Por outro lado, a escolha do *Cistus ladanifer* deveu-se ao facto de ser um arbusto bem adaptado às condições Mediterrâneas e que existe quer em áreas degradadas e contaminadas quer em áreas não-contaminadas.

Durante o desenvolvimento das plantas as alterações sazonais podem induzir adaptações diferentes face às alterações do ambiente. A sua importância aumenta quanto maiores forem as variações e a intensidade dos períodos de stresse. Deste modo, o estudo sazonal das alterações no *Cistus ladanifer* pode contribuir para um melhor conhecimento desta espécie durante o seu desenvolvimento.

1.1 Caracterização das áreas de amostragem

1.1.1 Mina de São Domingos

A área mineira de São Domingos possui aproximadamente 16 km² e está localizada no Sudeste de Portugal Continental fazendo parte da Faixa Piritosa Ibérica – FPI (Figura 3). A Faixa Piritosa Ibérica constitui o maior Distrito Mineiro Europeu para

metais básicos. Esta mina situa-se na Serra de São Domingos a 17 km da Vila de Mértola e pertence às Freguesias de Corte do Pinto e de Santana de Cambas, no Concelho de Mértola e Distrito de Beja.



Figura 3 – Localização geográfica da mina de São Domingos e Pomarão (adaptado de <http://maps.google.com/>).

A história de exploração mineira em São Domingos data da época pré-romana e romana. As evidências arqueológicas e análises realizadas às escombrelas mostraram que as explorações de metais preciosos e ouro, na época pré-romana, eram realizadas à superfície. A análise da duração da exploração mineira Romana foi estimada por vários autores através das escórias e sua composição química (Quental *et al.*, 2002). O volume

desta exploração ultrapassou os 150 000 m³ de minério (Gaspar, 1998). No período pós-romano houve o abandono gradual da mina devido, possivelmente, a não ser economicamente viável a exploração (Quental *et al.*, 2002)

A segunda fase da exploração começou em meados do século XIX com o estabelecimento de uma concessão provisória pela empresa “Sociedade Mineira La Sabina” e início do plano mineiro. Posteriormente, esta empresa arrenda a licença de exploração para a empresa “Mason & Barry” iniciando-se a construção de uma típica vila mineira. Nesta mina ocorreram dois processos de exploração: a céu aberto e a mineração interior, até cerca de 400 metros de profundidade (Matos *et al.*, 2003). O método de lavra a céu aberto iniciou-se com a remoção da terra que cobria uma massa mineral, o *gossan*, de cima para baixo através de uma grande corta. Este método de exploração trouxe um enorme impacto ambiental a esta zona, do qual resulta a paisagem actual (Figura 4).



Figura 4 – Corta da mina de São Domingos.

O céu aberto resultante da extracção do minério possui aproximadamente 122 metros de profundidade e está parcialmente preenchido com águas ácidas, cujo pH varia entre 1,7 e 2,9 (Matos *et al.*, 2003).

Depois de retiradas grandes quantidades de minério com elevado teor de cobre que era directamente transportado para Inglaterra, a qualidade do minério torna-se imprópria para exportação devido ao seu baixo teor neste elemento. Assim, em 1867 a construção de um importante estabelecimento metalúrgico na Achada da Gama (Figura 5) teve como intuito o tratamento dos minérios pobres em cobre (Matos *et al.*, 2003). Os processos usados produziam gases ricos em SO₂, As, Sb e Tl que provocaram graves problemas na flora e fauna existentes. Depois, deu-se o abandono das instalações devido a dificuldades técnicas e custos elevados no tratamento de materiais pobres (Quental *et al.*, 2002).



Figura 5 – Ruínas do estabelecimento metalúrgico na Achada do Gama.

No início do século XX a evolução da indústria do ácido sulfúrico promoveu a extracção deste ácido a partir da pirite e o aumento da exploração de alguns minérios. O impacto contínuo da exploração da mina e o processamento do minério marcaram profundamente a região. Esta ampla área proporcionou mais de 25 milhões de toneladas de cobre concentrado das quais 9,9 milhões de toneladas eram de pirite (Gaspar, 1998).

Os problemas ambientais não se resumem ao foco de exploração mineira mas também, a uma vasta faixa que abrange os 50 km² (Joaquim *et al.*, 2003b). Segundo a classificação da perigosidade ambiental em áreas mineiras da Faixa Piritosa Ibérica, a mina de São Domingos possui um grau elevado devido à grande quantidade de escombrelas com elevados teores de elementos químicos e ainda pela presença de áreas, de dimensões consideráveis, cobertas por mais de 5 Mton de resíduos de rocha encaixante da mineralização, 5 Mton de minério e aproximadamente 2 Mton de escórias (Oliveira *et al.*, 2002; Matos e Martins, 2006).

O clima é tipicamente mediterrâneo caracterizando-se por longos Verões quentes e secos que alternam com curtos Invernos moderadamente frios e húmidos. Na Figura 6 apresentam-se algumas características climáticas da zona (temperatura e precipitação) obtidas por estimativa da análise dos mapas de variação espacial, disponíveis no site do Instituto de Meteorologia e Geofísica (<http://www.meteo.pt>).

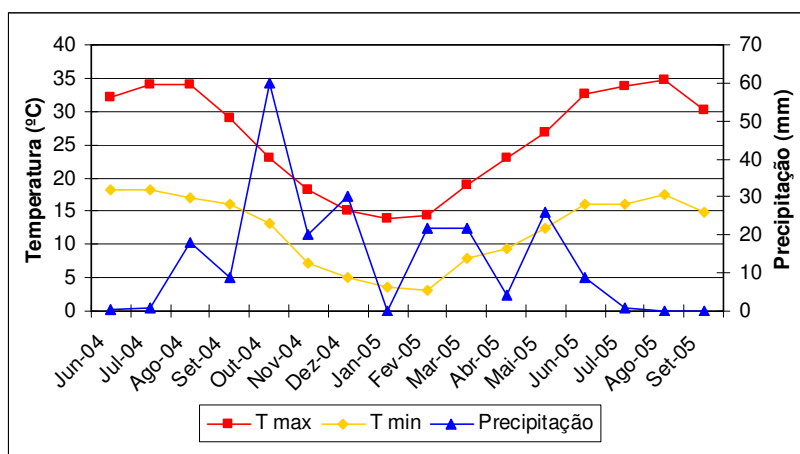


Figura 6 – Características climáticas da área da mina de São Domingos.

A área de estudo situa-se na zona envolvente da mina (Figura 7) onde, o solo é muito delgado e se desenvolveu sobre escombrelas de *gossan* e de rocha encaixante. São solos incipientes e por isso fracamente desenvolvidos. A comunidade vegetal existente no local de amostragem está descrita no Quadro 3.



Figura 7 – Localização da área de estudo na mina de São Domingos.

Quadro 3 – Plantas identificadas nas parcelas da área de amostragem da mina de São Domingos.

Parcela SD01	Parcela SD02	Parcela SD03
<i>Cistus ladanifer</i>	<i>Cistus ladanifer</i>	<i>Cistus ladanifer</i>
<i>Erica australis</i>	<i>Carlina corymbosa</i>	<i>Anagallis arvensis</i>
	<i>Cistus monspeliensis</i>	<i>Carlina corymbosa</i>
	<i>Cistus salviifolius</i>	<i>Cistus salviifolius</i>
	<i>Daphne gnidium</i>	<i>Daphne gnidium</i>
	<i>Erica australis</i>	<i>Erica australis</i>
	<i>Rumex induratus</i>	<i>Rumex induratus</i>
		<i>Senecio sp.</i>

1.1.2 Pomarão

O porto do Pomarão está localizado no Sudeste de Portugal Continental a 18 km da mina de São Domingos, na margem esquerda do rio Guadiana (Figura 3).

No século XIX foram construídos pelos ingleses um porto e uma linha de caminho de ferro entre São Domingos e o Pomarão. Assim, após extracção do minério da mina de São Domingos este era transportado até ao Porto do Pomarão onde embarcava com destino a Inglaterra. Actualmente, ainda se podem observar materiais

provenientes da mina ao longo do transecto, por onde passava o comboio, e na zona do antigo porto.

O clima desta zona é também tipicamente Mediterrâneo apresentando as mesmas características gerais que as da mina de São Domingos (Figura 6). Os solos existentes nesta área desenvolveram-se a partir de Xistos incluídos no Grupo de Formação de Mértola, do Flysh do Baixo Alentejo (Carta Geológica de Portugal, Folha 46-D Mértola, 1990).

O local de amostragem situou-se a aproximadamente 2 km do porto do Pomarão, próximo da antiga linha de comboio (Figura 8). De modo a minimizar a possível contaminação existente devido ao transporte do minério naquele troço foi estipulada uma zona tampão, aproximadamente de 25 metros, entre o local de amostragem e a zona onde passava a linha do comboio.



Figura 8 – Área de amostragem do Pomarão.

No Quadro 4 apresentam-se as espécies vegetais existentes nas parcelas deste local de amostragem.

O maciço rochoso que forma a serra estende-se de Alferce, a Este de Monchique, até às margens do Guadiana. Os solos desenvolvem-se sobre o complexo de xistos argilosos e grauvaques datados do Carbónico marinho e Devónico. Os solos são classificados como Litossolos eutrícos sendo por isso solos esqueléticos (espessura reduzida), pouco férteis, com pouca matéria orgânica e baixo teor de nutrientes com excepção do potássio (Plano de Ordenamento da zona envolvente às áreas áridas na região do Barranco do Velho, 2001).

Na Figura 10 apresentam-se as temperaturas, mínima e máxima, e a precipitação que se obtiveram por estimativa da análise dos mapas de variação espacial, disponíveis no site do Instituto de Meteorologia e Geofísica (<http://www.meteo.pt>).

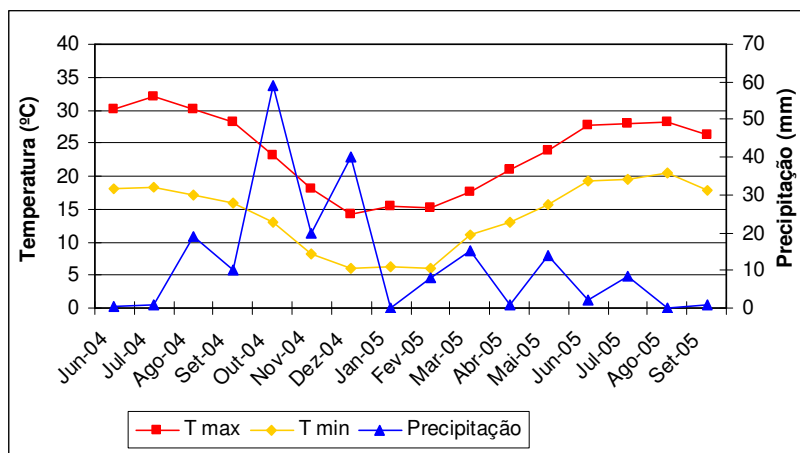


Figura 10 – Dados climáticos referentes à Serra do Caldeirão.

A área de amostragem situou-se no Barranco do Velho, aldeia incluída na Serra do Caldeirão (Figura 11). A comunidade vegetal existente nas parcelas de amostragem apresenta-se no Quadro 5.

Quadro 5 – Plantas identificadas nas parcelas da área de amostragem da Serra do Caldeirão.

Parcela C06	Parcela C05	Parcela C04
<i>Cistus ladanifer</i>	<i>Cistus ladanifer</i>	<i>Cistus ladanifer</i>
<i>Andryala sp.</i>	<i>Avena sp.</i>	<i>Andryala sp.</i>
<i>Arbutus unedo</i>	<i>Andryala sp.</i>	<i>Asteraceae sp.</i>
<i>Avena sp.</i>	<i>Arbutus unedo</i>	<i>Arbutus unedo</i>
<i>Brachypodium sp.</i>	<i>Carlina racemosa</i>	<i>Avena sp.</i>
<i>Briza maxima</i>	<i>Centhaurium erythraea</i>	<i>Briza minima</i>
<i>Calluna vulgaris</i>	<i>Cistus crispus</i>	<i>Briza maxima</i>
<i>Carlina racemosa</i>	<i>Cistus salviifolius</i>	<i>Carlina racemosa</i>
<i>Cistus populifolius</i>	<i>Chenopodiaceae sp.</i>	<i>Cistus crispus</i>
<i>Cistus salviifolius</i>	<i>Cytisus grandiflorus</i>	<i>Cistus salviifolius</i>
<i>Cytisus grandiflorus</i>	<i>Dactylis sp.</i>	<i>Cytisus grandiflorus</i>
<i>Dactylis glomerata</i>	<i>Dittrichia revoluta</i>	<i>Erica umbellata</i>
<i>Erica umbellata</i>	<i>Galactites tomentosa</i>	<i>Galactites tomentosa</i>
<i>Halimium sp.</i>	<i>Helichrysum stoechas</i>	<i>Helichrysum stoechas</i>
<i>Helichrysum stoechas</i>	<i>Lavandula luisieri</i>	<i>Jasione montana</i>
<i>Lavandula luisieri</i>	<i>Lithodora prostrata</i>	<i>Lavandula luisieri</i>
<i>Phagnalon saxatile</i>	<i>Jasione montana</i>	<i>Picris sp.</i>
<i>Picris sp.</i>	<i>Pulicaria odora</i>	<i>Poaceae sp.</i>
<i>Pinus pinaster</i>	<i>Pulicaria paludosa</i>	<i>Pulicaria odora</i>
<i>Pulicaria odora</i>	<i>Quercus suber</i>	<i>Quercus suber</i>
<i>Quercus suber</i>	<i>Stauracanthus boivinii</i>	<i>Stauracanthus boivinii</i>
<i>Stauracanthus boivinii</i>	<i>Thapsia villosa</i>	<i>Thapsia villosa</i>
<i>Urginea maritima</i>	<i>Ulex argenteus</i>	<i>Ulex argenteus</i>



Figura 11 – Área de amostragem na Serra do Caldeirão.

2. Materiais e Métodos

2.1 Solo

2.1.1 Colheita e preparação das amostras de solo

A amostragem dos solos foi realizada nos mesmos locais que as plantas sendo colhidas amostras compósitas da camada superficial do solo. Assim, em cada parcela fizeram-se 9 covas onde foram colhidas amostras de solo dos primeiros 20 centímetros (Figura 12), sempre que possível.

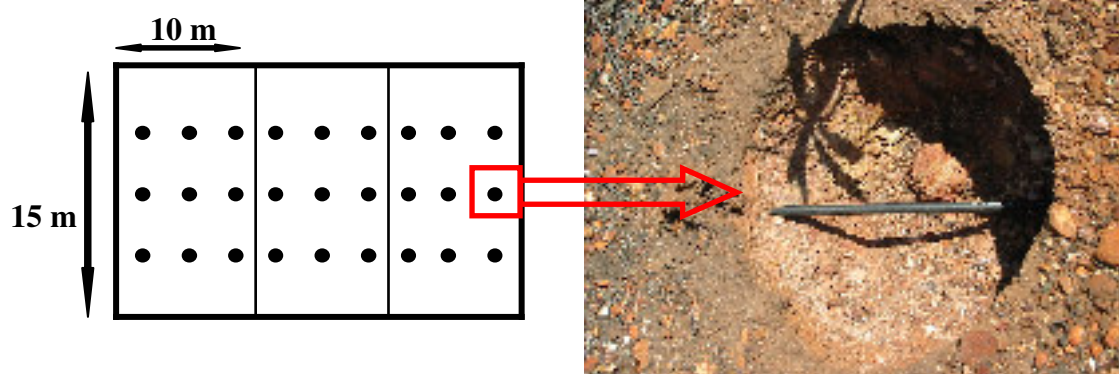


Figura 12 – Representação esquemática da amostragem dos solos.

As diferentes amostras foram transportadas para o laboratório em sacos plástico fechados devidamente identificados. As amostras de solo foram homogeneizadas manualmente e secas ao ar durante uma semana. Depois foram peneiradas com um crivo de malha de 2 mm obtendo-se assim duas fracções granulométricas diferentes (inferior e superior a 2 mm). Estas fracções foram posteriormente guardadas em sacos de plástico fechados sendo a fracção <2 mm a utilizada para as análises laboratoriais.

2.1.2 Caracterização física, química e mineralógica

As amostras de solo foram caracterizadas nos Laboratórios de Pedologia e de Geoquímica do Departamento de Ciências do Ambiente do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa. Nas amostras de solo (fracção <2 mm) foi realizada uma análise granulométrica por crivagem e sedimentação de acordo com a Lei de Stokes (Póvoas e Barral, 1992). Os solos foram ainda caracterizados para os seguintes parâmetros: pH em água e em cloreto de potássio determinado numa suspensão solo/água e solo/KCl na proporção 1:2,5 (p/v) (Póvoas e Barral, 1992); carbono orgânico total pelo método de combustão por via húmida - Springer e Klee (Póvoas e Barral, 1992); fósforo e potássio assimiláveis pelo método de Egner-Riehm (Póvoas e Barral, 1992); azoto total pelo método de Kjeldahl (Póvoas e Barral, 1992); capacidade de troca catiónica e catiões de troca pelo método do acetato de amónio a pH 7 (Póvoas e Barral, 1992); alumínio de troca pelo método do cloreto de potássio (Póvoas e Barral, 1992); ferro e alumínio livres: fracção associada a óxidos não-cristalinos pelo método de Tamm (Schwertmann, 1964) e fracção associada a óxidos totais pelo método De Endredy (1963); manganês livre pelo método proposto por Chao (1972).

A caracterização mineralógica da fracção argilosa (<2 µm) foi realizada por difracção de raios X em amostras orientadas, utilizando radiação monocromática CuK α .

2.1.2.1 Análise granulométrica

A análise granulométrica tem como objectivo quantificar as partículas minerais elementares do solo, agrupadas em classes de dimensões, de modo a definir-se a composição granulométrica das respectivas amostras.

Inicialmente, realizaram-se algumas análises preliminares de modo a verificar a existência de bióxido de manganês, sais solúveis e carbonatos. Se estes componentes estivessem presentes, o que não foi o caso, teria sido necessário proceder à sua eliminação de modo a viabilizar a dispersão das partículas e seu isolamento, segundo as classes granulométricas definidas pela Escala de Atterberg.

Análise preliminar

Bióxido de manganês: deitou-se num vidro de relógio uma colher de amostra e juntou-se algumas gotas de água oxigenada a 6%. A presença de uma efervescência forte indica a existência de bióxido de manganês ou, menos frequente, de ferro no estado ferroso.

Sais solúveis: Colocou-se num tubo de ensaio uma colher de amostra adicionando-se 7 ml de água destilada e 3 gotas de ácido acético a 25%. Agitou-se durante 1 minuto e filtrou-se. Depois, mediu-se para um tubo de ensaio 1,5 ml do extracto anterior, juntou-se 3 gotas de nitrato de prata a 5% e ainda completou-se o volume até 4 ml. Uma turvação forte indica um teor elevado de sulfatos.

Carbonatos: Num vidro de relógio colocou-se uma colher de amostra e algumas gotas de ácido clorídrico a 10%. A presença de efervescência indica a existência de carbonatos.

Preparação das amostras para dispersão

Posteriormente a estas análises realizou-se a preparação da amostra para a dispersão. Para isto, pesaram-se 20 g de solo (< 2 mm) seco a 100-105 °C e procedeu-se à eliminação dos componentes, anteriormente citados, que existiam.

Oxidação da matéria orgânica: realizou-se através da adição à amostra de solo de 15 ml de água destilada e 15 ml de água oxigenada a 30%. Deixou-se repousar durante a noite levando-se depois os copos a banho-maria. Quando necessário, adicionou-se pequenas quantidades de água oxigenada até que o sobrenadante ficasse límpido e incolor. Posteriormente, adicionou-se aproximadamente 300 ml de água destilada e deixou-se ferver até eliminar o excesso de água oxigenada.

Dispersão e separação das fracções

Adicionou-se à amostra tratada 20 ml de solução dispersante de hexametáfosfato de sódio e aproximadamente 400 ml de água destilada. Agitou-se as amostras durante 16 horas. Posteriormente, passaram-se as amostras através de um crivo de 0,2 mm para o cilindro de sedimentação. A amostra retida no crivo que corresponde à areia grossa foi seca na estufa a 100-105 °C sendo pesada a fracção, depois de arrefecida.

O cilindro de sedimentação foi cheio de água destilada até 1 litro, agitado por inversões sucessivas durante 1 minuto e colocado num local firme sem variações de temperatura. Antes de terminar o tempo de sedimentação (Anexo I), mergulhou-se uma pipeta de Robinson de 25 ml a 10 cm de profundidade para se colher o limo+ argila. O tempo de sucção da amostra referente ao limo+argila foi de 6 segundo. Este processo foi novamente realizado para a recolha da argila, tendo em conta o tempo de sedimentação desta (Anexo I) e um tempo de sucção de 12 segundo. Os volumes colhidos, juntamente com a água de lavagem da pipeta, guardaram-se num pesa-filtros, previamente secos e tarados, e secaram-se durante 24 horas, na estufa a 100-105 °C. Depois as amostras de limo+argila e argila arrefeceram no exsiccador sendo pesadas. Realizou-se também um ensaio em branco com 20 ml de solução dispersante para 1000 ml.

Para a obtenção da areia fina decantou-se a suspensão do cilindro de sedimentação até 5 cm do fundo e transferiu-se o líquido residual. Adicionou-se a este resíduo água destilada até atingir 12 cm do fundo, agitou-se, deixou-se sedimentar durante o tempo indicado no Anexo I e decantou-se até o líquido atingir 2 cm do fundo. Repetiu-se esta operação até que o líquido sobrenadante ficasse límpido. Passou-se o resíduo (areia fina) para um copo, previamente seco e tarado, e secou-se na estufa a 100-105 °C. Após arrefecimento no exsiccador pesou-se novamente.

2.1.2.2 pH em água e em cloreto de potássio

Adicionou-se a 10 g de solo (<2 mm) 25 ml de água destilada ou de uma solução de cloreto de potássio a 0,1 M e agitou-se durante uma hora manualmente. Após calibração do potenciômetro com as soluções pH 4,0 e 7,0 realizou-se a leitura das amostras agitadas depois de passados 60 segundos ou estabilização do valor.

2.1.2.3 Conteúdo do carbono orgânico total

A determinação do carbono orgânico tem extrema importância devido a permitir estimar o teor total de matéria orgânica do solo. Isto deve-se ao facto de se partir do pressuposto que a matéria orgânica possui em média 58% de carbono. Assim, depois de se multiplicar o teor de carbono pelo factor de Van Bemmelen (1,724) obtém-se o valor aproximado de matéria orgânica.

Pesaram-se 0,15 a 5 g de solo seco de cada amostra (<2 mm) de forma a corresponder a 80 mg de carbono. Em seguida, adicionou-se 2 g de dicromato de potássio, misturou-se bem e acrescentou-se 40 ml da solução de ácido sulfúrico na proporção de 270 ml de água destilada para 350 ml de ácido sulfúrico a 96%. Aqueceu-

se a solução num bico de Bunsen até ebulição fraca mergulhando-o, posteriormente, num banho de óleo aquecido a uma temperatura entre 157 °C e 160 °C, durante 10 minutos. Este passo foi realizado de modo a evitar que a temperatura ultrapassasse estes limites devido a proporcionar a decomposição do dicromato. Depois de decorrido o tempo transferiu-se o conteúdo para um balão volumétrico de 200 ml, deixou-se arrefecer e completou-se finalmente, o volume com água destilada. Desta solução foram retirados 50 ml juntando-se 10 ml de ácido orto-fosfórico a 85% e 10 gotas de indicador difenilamina. De seguida foi titulado com uma solução de sulfato ferroso a 0,5 M.

2.1.2.4 Conteúdo em fósforo e potássio assimiláveis

Para a extracção do fósforo e potássio assimiláveis pesou-se 5 g de solo (<2 mm) seco a 100-105 °C e adicionou-se 100 ml de solução extractante de ensaio (contém solução de lactato de amónio a 0,1 M e ácido acético a 0,4 M). Em seguida agitaram-se as amostras durante 2 horas sendo depois filtradas por um filtro Whatman n.º 42. Quando o extracto se apresentou muito corado, devido à presença de matéria orgânica, adicionou-se 20 g de carvão activado e 500 ml de ácido clorídrico a 0,3 M agitando-se durante 2 horas. Posteriormente filtrou-se e lavou-se com água destilada até não existirem cloretos (teste com AgNO_3). No extracto resultante fez-se a determinação do fósforo e potássio assimiláveis.

Assim, para o doseamento do fósforo mediu-se 5 ml dos extractos e adicionou-se 20 ml da solução de ensaio para desenvolvimento da cor que continha ácido sulfúrico, molibdato de amónio, ácido ascórbico e tartarato de potássio e antimónio. Homogeneizou-se os extractos deixando-se repousar pelo menos 30 minutos. A quantificação do fósforo foi realizada num espectrofotómetro UV/VIS com comprimento de onda de 882 nm após calibração com soluções de pentóxido de fósforo.

Por outro lado, o doseamento do potássio nos extractos foi realizado por espectrofotometria de absorção atómica.

2.1.2.5 Conteúdo em azoto total

A quantificação do azoto total realizou-se a partir de um Sistema completo de Kjeldahl o qual é constituído por três unidades: digestão, destilação por arrastamento de vapor e titulação com microbureta automática com sensibilidade de 0,01 ml.

Para a digestão pesou-se 1 g de solo (<2 mm) seco a 100-105 °C para um tubo de digestão. Em seguida adicionou-se cerca de 1,5 g de mistura catalizadora, contendo 50 g de óxido vermelho de mercúrio, 20 g de selénio e 1000 g de sulfato de sódio anidro, e 10 ml de ácido sulfúrico a 95-97%. Homogeneizou-se o conteúdo colocando-se o tubo, com exaustor acoplado e ligado a uma trompa de água, na unidade de digestão aquecida entre 370 °C e 420 °C. Após 5 minutos reduziu-se o fluxo da trompa de água. A digestão completou-se quando, depois de frio o sobrenadante ficou incolor. Posteriormente adicionou-se 75 ml de água destilada e agitou-se cuidadosamente.

Para a destilação colocou-se o tubo de digestão e o erlenmeyer contendo 25 ml de solução de ácido bórico a 1% nos respectivos lugares da unidade de destilação fechando-se a porta de protecção. Em seguida, adicionou-se, por intermédio da alavanca própria, a solução de hidróxido de sódio a 40% e abriu-se a alavanca relativa ao vapor de água. Depois da viragem de cor (rosa a verde) do líquido do erlenmeyer deixou-se destilar cerca de 150 ml. Destilou-se também os ensaios em branco.

Finalmente a titulação do amoníaco, fixado pela solução de ácido bórico, realizou-se com a solução titulada de ácido clorídrico a 0,05 M, usando a microbureta automática. Os ensaios em branco também foram titulados da mesma maneira.

2.1.2.6 Capacidade de troca catiónica e catiões de troca

Num funil com placa porosa de vidro colocou-se um filtro Whatman n.º 40 e uma camada de 0,5 cm de espessura de areia lavada e calcinada. Misturou-se aproximadamente 5 g de amostra de solo e 10 g de areia e colocou-se sobre o sistema anterior sendo coberto por uma nova camada de areia de 0,5 cm de espessura. Quando a condutividade eléctrica no extracto 1:2,5 era maior que $0,5 \text{ dSm}^{-1}$, lavou-se o sistema anterior, por percolação com 100 ml de etanol a 48%. A seguir, saturou-se as amostras com amónio, por percolação, pela adição de 100 ml de acetato de amónio 1 M a pH 7,0 recolhendo-se o percolado num balão de 100 ml (A). Este volume foi completado pela adição de solução de acetato de amónio. Os catiões de troca encontram-se deste modo na solução contida no balão.

De modo a remover o excesso de amónio da amostra contida na alonga, percolou-se esta com 100 ml de etanol a 96% e desprezou-se o percolado. A troca do amónio pelo potássio realizou-se por percolação com 100 ml de solução de cloreto de potássio a 1 M acidificada e recolha do percolado num balão de 100 ml (B). O volume foi completado com água destilada.

Catiões de troca

A determinação dos catiões de troca foi realizada nas diluições ou nos próprios extractos, nos balões (A) e nos ensaios em branco. Nas diluições dos extractos e nos ensaios em branco foram adicionados 1500 ppm de estrôncio de modo a anular possíveis interferências sendo completado os volumes com a solução de acetato de amónio a 1 M. A partir da determinação dos catiões individuais calculou-se a soma dos catiões de troca (S).

Capacidade de troca catiónica

Num balão de destilação juntou-se 25 ml da solução (B) ou o ensaio em branco e 5 ml de hidróxido de sódio a 35% e realizou-se uma destilação por arrastamento de vapor de água. Durante cerca de 7 minutos o destilado foi recolhido num erlenmeyer contendo 10 ml de ácido bórico a 2%, a que se adicionou previamente umas gotas de indicador misto. A seguir, titulou-se o destilado com uma solução de ácido clorídrico 0,01 M até a cor virar de verde para rosa. A capacidade de troca catiónica corresponde ao número de centimole de amónio fixados em substituição dos catiões de troca. O grau de saturação com catiões foi obtido a partir dos valores obtidos de capacidade de troca catiónica (T).

2.1.2.7 Alumínio de troca

Pesou-se 5 g de solo (<2 mm), adicionou-se 50 ml da solução de cloreto de potássio 1 M agitando, posteriormente, durante 1 hora. Após decorrido o tempo as soluções foram centrifugadas durante 15 minutos, a 2500 rpm. O líquido sobrenadante foi filtrado (Whatman n.º 42) recolhendo-se o filtrado e perfazendo-se até 100 ml com a solução extractante. O alumínio foi doseado por espectrofotometria de absorção atómica em chama.

2.1.2.8 Método de extracção do ferro e alumínio livres

2.1.2.8.1 Fracção associada aos óxidos não cristalinos

Agitou-se durante 4 horas, ao abrigo da luz, 1 g de amostra de solo (< 2mm) e 40 ml da solução extractante, solução de Tamm (oxalato de amónio 0,175 M e ácido oxálico 0,1 M, a pH 3,2). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 5

minutos e filtradas com papel de filtro n.º 42 acertando-se a solução para 50 ml em balões volumétricos.

2.1.2.8.2 Fracção associada aos óxidos cristalinos e não cristalinos – fracção total

Pesou-se 1 g de amostra de solo (<2 mm) e adicionou-se 40 ml da solução extractante, solução de Tamm. Em seguida, as amostras foram sujeitas a radiação U.V. com uma potência aproximada de 300 W durante o tempo necessário de modo a perderem todo o tom avermelhado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos filtrando-se o sobrenadante. Os extractos obtidos foram tratados no sentido da destruição dos oxalatos a fim de evitar interferências nas leituras. Depois da destruição, o resíduo seco foi retomado em 1 ml de ácido clorídrico e água destilada e introduzido num balão volumétrico de 50 ml. O alumínio e ferro nas soluções foram determinados por espectrofotometria de absorção atómica.

2.1.2.9 Método de extracção do manganês livre

Agitou-se, durante 30 minutos, 1 g de solo (<2 mm) com 40 ml da solução extractante: solução de cloridrato de hidroxilamina 0,1 M numa solução de ácido nítrico 0,01 M. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos e filtradas.

Devido à interferência provocada pela hidroxilamina durante a leitura no espectrofotómetro de absorção atómica, as amostras foram tratadas de modo a destruir esta substância. Assim, depois do tratamento o resíduo seco foi retomado em 1 ml de ácido clorídrico e água destilada e introduzido num balão volumétrico de 50 ml. As amostras foram lidas por espectrofotometria de absorção atómica

2.1.3 Análise química total multielementar

A análise química total dos solos (fracção <2 mm) foi realizada pelos Laboratórios Actlabs no Canadá. A metodologia usada pelo laboratório enuncia-se de seguida.

Pesagem de 0,25 g de amostra de solo, adição de 10 ml de uma mistura de quatro ácidos $\text{HClO}_4 + \text{HNO}_3 + \text{HCl} + \text{HF}$ sendo em seguida aquecida a 200 °C, e posterior diluição em 10 ml de água regia. Para as soluções de extracção resultantes foram lidos os elementos Ag, Al, As, Au, Ba, Be, Bi, Br, Ca, Cd, Ce, Co, Cr, Cs, Cu, Eu, Fe, Hf, Hg, Ir, K, La, Lu, Mg, Mn, Mo, Na, Nd, Ni, P, Pb, Rb, S, Sb, Sc, Se, Sm, Sn, Sr, Ta, Tb, Th, Ti, U, V, W, Y, Yb e Zn por Espectrofotometria de Emissão Atómica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-EAS) e Análise por Activação de Neutrões Instrumental (INAA).

2.1.4 Determinação dos elementos químicos associados às várias fases de suporte nos solos

O estudo dos elementos associados às várias fases constituintes do solo é de extrema importância na avaliação da distribuição destes pelos vários constituintes do solo e sua consequente disponibilidade/indisponibilidade para serem absorvidos pelos organismos e/ou migrar para as águas de circulação.

A análise do zinco e do cobre prende-se com o facto de serem elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas contudo, em concentrações elevadas tornam-se tóxicos para as mesmas. O chumbo, arsénio e mercúrio são reconhecidos por afectarem a saúde pública, sendo por isso potencialmente tóxicos.

2.1.4.1 Fracção disponível

Utilizaram-se várias soluções extractantes de modo a obter a fracção disponível dos elementos químicos no solo para as plantas. Esta fracção corresponde aos elementos solúveis em água e aos elementos em posição de troca nas fases inorgânica e orgânica do solo. Para a obtenção desta última fracção usaram-se vários métodos, nomeadamente: Método do DTPA (Lindsay e Norvell, 1978), Método do acetato de amónio, Método do cloreto de cálcio e o Método do nitrato de cálcio, baseados na extracção com soluções neutras de sais (Kabata-Pendias, 2004). Para a conservação de todas as soluções obtidas juntou-se uma gota de ácido nítrico concentrado a cada uma sendo guardadas no frigorífico.

A análise das soluções resultantes foi efectuada em espectrofotometria de absorção atómica em chama (Zn e Pb), em câmara de grafite (Cu e Pb) ou através do Método de geração de hidretos (As e Hg). Antes da leitura em espectrofotometria de absorção atómica em câmara de grafite analisou-se, para cada solução extractante e elemento químico, a temperatura de pré-atomização e atomização mais adequada. No Quadro 6 apresentam-se as temperaturas que foram usadas.

Quadro 6 – Temperaturas de pré-atomização e atomização usadas consoante a solução extractante e elemento químico.

Elemento químico	Soluções extractivas	Temperatura de pré-Atomização (° C)	Temperatura de Atomização (° C)
Chumbo	DTPA	400	1400
	Acetato de amónio	650	1600
	Nitrato de cálcio	850	1800
Cobre	Água	1100	2400
	DTPA	1100	2500
	Acetato de amónio	1200	2300
	Cloreto de cálcio	1200	2300
	Nitrato de cálcio	1200	2500

2.1.4.1.1 Fracção solúvel em água

Agitou-se durante 6 horas 1 g de solo (<2 mm) em 40 ml de água destilada previamente desgasificada. Posteriormente, centrifugaram-se as amostras durante 30 minutos, a 15000 rpm, filtrando-se para um balão volumétrico de 50 ml.

2.1.4.1.2 Método do DTPA

Agitou-se 1 g de solo (<2 mm) com 25 ml de reagente de DTPA a 0,005 M durante 6 horas procedendo-se, em seguida, à sua centrifugação a 15000 rpm durante 30 minutos e filtração para um balão volumétrico de 50 ml.

2.1.4.1.3 Método do acetato de amónio

Esta metodologia foi semelhante à anterior distinguindo-se, unicamente, na solução inicial usada na agitação. Neste caso utilizou-se uma solução de acetato de amónio 1 M.

2.1.4.1.4 Método do cloreto de cálcio

Em 1 g de solo (<2 mm) adicionou-se 40 ml de solução de cloreto de cálcio 0,01 M agitando-se durante 6 horas. Após 30 minutos de centrifugação a 15000 rpm filtrou-se a solução resultante para um balão volumétrico de 50 ml.

2.1.4.1.5 Método do nitrato de cálcio

Esta metodologia foi semelhante à anterior distinguindo-se, unicamente, na solução inicial usada na agitação. Neste caso usou-se uma solução de nitrato de cálcio 0,5 M.

2.1.4.2 Fracção associada à matéria orgânica

Pesou-se 1 g de solo (<2 mm) e adicionou-se 40 ml de solução de pirofosfato de sódio a 0,1 M deixando a agitar durante 24 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas e filtradas sendo, ajustado o volume final para 50 ml com a mesma solução extractante.

A leitura dos elementos metálicos foi realizada através de espectrofotometria de absorção atómica em chama (Zn) e em câmara de grafite (Cu e Pb) enquanto que, o arsénio e o mercúrio foram quantificados através do método de geração de hidretos no espectrofotómetro de absorção atómica. Quando utilizada a técnica de espectrometria de absorção atómica em câmara de grafite verificou-se, para a solução extractante e elemento químico, a temperatura de pré-atomização e atomização mais adequada. No Quadro 7 apresentam-se as temperaturas que foram usadas.

Quadro 7 – Temperaturas de pré-atomização e atomização usadas com a solução extractante de pirofosfato de sódio e elemento químico.

Elemento químico	Temperatura de Pré-Atomização (°C)	Temperatura de Atomização (°C)
Chumbo	850	1700
Cobre	1200	2400

2.1.4.3 Fracção associada aos óxidos de ferro e alumínio

O método extractivo usado foi semelhante ao realizado para a obtenção dos óxidos cristalinos e não cristalinos de ferro e alumínio livres (secção 2.1.2.8). Em todas as amostras foram lidos o cobre, chumbo e zinco por espectrofotometria de absorção atómica em chama. O arsénio e mercúrio foram quantificados pelo método de geração de hidretos em espectrofotometria de absorção atómica.

2.1.4.4 Fracção associada aos óxidos de manganês

O método de extracção usado foi semelhante ao utilizado para a obtenção dos óxidos de manganês (secção 2.1.2.9). Os elementos foram quantificados através de espectrofotometria em chama (Pb e Zn), em câmara de grafite (Cu) ou pelo método de geração de hidretos em espectrofotometria de absorção atómica (As e Hg). Quando analisado através de espectrofotometria de absorção atómica em câmara de grafite verificou-se, para a solução extractante e elemento, a temperatura de pré-atomização e atomização mais adequada. No Quadro 8 apresenta-se as temperaturas que foram usadas.

Quadro 8 – Temperaturas de pré-atomização e atomização usadas com a solução de extracção de água acidulada e com elemento cobre.

Elemento químico	Temperatura de Pré-Atomização (°C)	Temperatura de Atomização (°C)
Cobre	1000	2300

2.2 Plantas

2.2.1 Selecção das plantas

As plantas de *Cistus ladanifer* apresentavam, nos locais de estudo seleccionados, alguma variabilidade na dimensão e na estrutura, devido possivelmente às condições ambientais e factores de origem endógena. Para homogeneizar a amostragem seleccionaram-se e identificaram-se 15 indivíduos em cada parcela que fossem fisionomicamente semelhantes e com dimensões representativas da população local.

2.2.2 Colheita e preparação das folhas e sementes

As folhas jovens e maduras de *Cistus ladanifer* (Figura 13) foram colhidas simultaneamente em duas épocas diferentes de modo a permitir a comparação entre as folhas com estádios de desenvolvimento diferentes colhidas na mesma época e, por outro lado, entre fases distintas do desenvolvimento da planta. A primeira campanha realizou-se na Primavera (Abril de 2005) enquanto que a segunda foi efectuada no Verão (Junho de 2005).

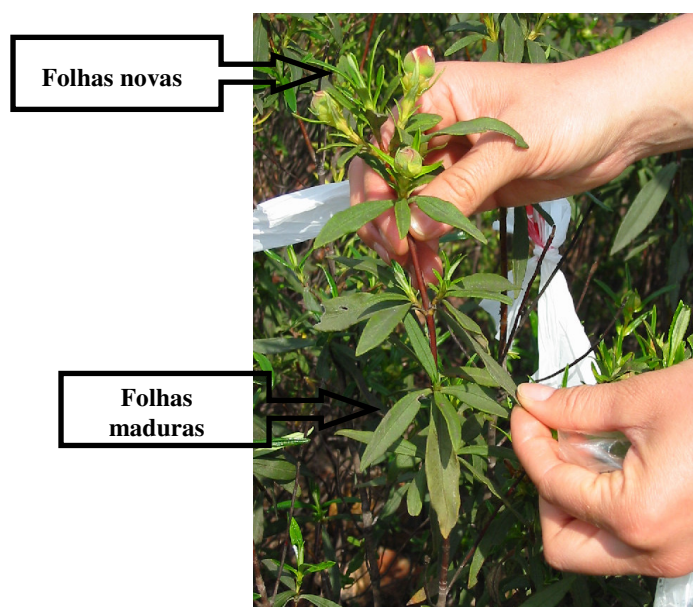


Figura 13 – Recolha das folhas de *Cistus ladanifer*.

Foram colhidas amostras compósitas de folhas para sacos de plástico previamente identificados, humedecidos e guardados numa arca isoladora de forma a minimizar as perdas de água por desidratação.

No laboratório, as amostras foram lavadas com água corrente e água destilada e retirado o excesso de água com papel absorvente. Em seguida, cada amostra foi dividida em duas fracções: uma destinada à análise do conteúdo em clorofilas e enzimas que foi introduzida em azoto líquido para rápido congelamento e minimização do risco de

alteração das substâncias existentes no interior das folhas e outra, para análise da área foliar, conteúdo em água, azoto total e quantificação do As, Cu, Pb, Hg e Zn.

Para a recolha das folhas senescentes em cada planta foi colocada em Abril de 2005 uma estrutura cónica em rede presa no caule principal da planta (Figura 14). No início do mês de Maio, as folhas foram colhidas, transportadas para o laboratório em sacos identificados e lavadas com água corrente e água destilada.



Figura 14 – Planta de *Cistus ladanifer* com a estrutura de recolha das folhas senescentes.

As folhas usadas para a quantificação dos elementos vestigiais e azoto total foram colocadas na estufa em envelopes de papel, permanecendo a uma temperatura de 70 °C até o seu peso se manter constante. Posteriormente, foram homogeneizadas através de uma moagem e guardadas em envelopes de papel devidamente identificados.

As sementes foram colhidas ainda na cápsula, devido às suas pequenas dimensões, em Agosto de 2005. Foram retiradas as sementes das cápsulas e divididas em duas porções que se destinaram à análise de viabilidade e, outra, para a quantificação dos elementos vestigiais. Esta última porção de sementes teve o mesmo tratamento que as folhas destinadas à mesma análise.

2.2.3 Análise da área foliar

Inicialmente, as folhas frescas de cada parcela foram digitalizadas com um scanner sendo depois calculada a área foliar através do programa ImageJ 1.33u disponível no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

2.2.4 Conteúdo em água

Após colheita das folhas de *Cistus ladanifer*, estas foram pesadas e seguidamente, colocadas na estufa em envelopes de papel à temperatura de 70 °C durante 48 horas. Depois das amostras estarem secas efectuou-se uma nova pesagem.

O cálculo da percentagem de água foi realizado do seguinte modo:

$$\% \text{ \u00c1gua} = ((\text{Peso fresco} - \text{Peso seco}) / \text{Peso fresco}) * 100$$

2.2.5 Conte\u00fado em clorofilas e caroten\u00f3ides

O conte\u00fado em pigmentos fotossint\u00e9ticos tem sido usado em grande escala como indicador da vitalidade nos v\u00e1rios tipos de organismos fotossint\u00e9ticos. Os pigmentos normalmente usados s\u00e3o a concentra\u00e7\u00e3o em clorofilas e concentra\u00e7\u00e3o de caroten\u00f3ides. As clorofilas e caroten\u00f3ides das folhas de *Cistus ladanifer* colhidas na Primavera e Ver\u00e3o de 2005 foram determinadas por colorimetria atrav\u00e9s da adapta\u00e7\u00e3o do m\u00e9todo de MacKinney (1941).

Pesaram-se 300 mg de folhas frescas mo\u00eddas e homogeneizaram-se com 6 ml de acetona a 80% num homogeneizador do tipo “Potter Elvehjen”, a 500g durante 15 minutos. Ap\u00f3s este tempo as folhas ficaram descoradas. Ao longo deste processo as amostras encontravam-se mergulhadas em gelo e protegidas da ac\u00e7\u00e3o da luz atrav\u00e9s da cobertura do tubo com papel de alum\u00ednio. Os tubos, cobertos com o mesmo papel,

centrifugaram-se a 2000g durante 15 minutos. Em seguida, retirou-se o sobrenadante dos tubos, adicionou-se 6 ml de acetona a 80% e procedeu-se a uma segunda centrifugação (15 minutos a 2000g). Finalmente, efectuou-se uma terceira centrifugação para redução das partículas em suspensão a 2000g durante 5 minutos. A leitura das amostras realizou-se num espectrofotómetro de UV-VIS nos comprimentos de onda de 480, 645 e 663 nm, utilizando acetona a 80% como branco.

A concentração dos pigmentos clorofilinos (mg/l) foi determinada utilizando as equação de MacKinney e a quantidade de carotenóides ($\mu\text{mol/g}$) através da equação de Kirk e Allen (1965).

$$\text{Clorofila a} = (12,7 * \text{Abs } 663 \text{ nm}) - (2,69 * \text{Abs } 645 \text{ nm})$$

$$\text{Clorofila b} = (22,9 * \text{Abs } 645 \text{ nm}) - (4,68 * \text{Abs } 663 \text{ nm})$$

$$\text{Clorofila total} = (8,02 * \text{Abs } 663 \text{ nm}) + (20,2 * \text{Abs } 645 \text{ nm})$$

$$\text{Carotenóides} = ((\text{Abs } 480 \text{ nm} + 0,114 * \text{Abs } 663 \text{ nm} - 0,638 * \text{Abs } 645 \text{ nm}) * \text{Volume} * 10^3) / (112,5 * \text{Peso da amostra})$$

2.2.6 Conteúdo em elementos químicos nas folhas e sementes

Os elementos químicos foram extraídos do material biológico (folhas e sementes) através de uma digestão ácida com ácido nítrico. Pesaram-se, em copos de Teflon, 100 mg de folhas e sementes e adicionou-se a cada copo 2 ml de ácido nítrico a 69%, onde permaneceram durante 10 horas a 150 °C. As amostras foram diluídas para um volume final de 10 ml com água Milli-Q.

A análise do cobre e chumbo foi realizada por espectrofotometria de absorção atómica em câmara de grafite enquanto que o zinco foi por espectrofotometria de absorção atómica em chama. Para a análise em câmara de grafite foi verificado inicialmente, para cada elemento químico, a temperatura de pré-atomização e

atomização mais adequada (Quadro 9). Por outro lado, o arsénio e o mercúrio foram quantificados pelo método dos hidretos no espectrofotómetro de absorção atómica.

Quadro 9 – Temperaturas de pré-atomização e atomização usadas consoante o elemento.

Elemento químico	Temperatura de Pré-Atomização (°C)	Temperatura de Atomização (°C)
Chumbo	500	1500
Cobre	1000	2300

De modo a certificar a metodologia foram também digeridas amostras de material de referência de folhas de choupo (NCS DC 73350). Os valores obtidos da sua leitura por espectrofotometria de absorção atómica em chama, em câmara de grafite e pelo método dos hidretos foram comparados com os valores certificados.

2.2.7 Conteúdo total em azoto nas folhas

O conteúdo total de azoto foi determinado pelo Laboratório na Corunha, Espanha, em um analisador elementar EA1108 – Carlo Erba Instruments sendo o padrão para quantificação do carbono, hidrogénio, azoto e enxofre a sulfanilamida.

As amostras pesadas com precisão, numa cápsula de estanho, foram analisadas por combustão instantânea num tubo de quartzo cheio de WO_3 e Cu, mantendo uma temperatura de 1020 °C. Os gases resultantes da combustão foram transportados através de uma corrente de hélio entre WO_3 , onde ocorreu a oxidação total, e depois com o Cu. Nesta última reacção foram reduzidos os óxidos de azoto a N_2 , os óxidos de enxofre a SO_2 e retido o excesso de oxigénio. Posteriormente, a mistura de gases formada (N_2 , CO_2 , H_2O e SO_2) passou por uma coluna para separação cromatográfica sendo, depois detectados os elementos num detector de condutividade térmica.

2.2.8 Determinação de enzimas das folhas

O estudo do comportamento das referidas enzimas foi realizado unicamente em duas parcelas por área de amostragem. Tal facto resultou da optimização dos meios, face ao tempo, com o objectivo de pormenorizar as análises de modo a avaliar a actividade enzimática em formas ligantes diferentes: fracção solúvel e iónica.

Para a extracção das enzimas das folhas, estas foram liofilizadas e posteriormente trituradas com azoto líquido. De modo a poder analisar as formas ligantes das enzimas realizou-se uma extracção sequencial onde se obteve a fracção de enzimas solúveis e a fracção de enzimas ligadas ionicamente à parede celular (Pang *et al.*, 2003; Ingham *et al.*, 1998). Assim, foram pesadas aproximadamente 0,5 g de folhas às quais foi adicionado 10 ml de tampão fosfato (pH 7,2) 50 mM que continha EDTA 1 mM e 1% (p/v) PVP(P), e homogeneizado durante 15 minutos a 4 °C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 22000g. O sobrenadante resultante foi medido e congelado rapidamente com azoto líquido sendo, posteriormente utilizado nos ensaios de quantificação da actividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), na fracção solúvel. No resíduo resultante da extracção da fracção solúvel adicionou-se 10 ml de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,2) que continha 1 mM de EDTA, 1% (p/v) PVP(P) e 1 M de cloreto de sódio. As amostras foram homogeneizadas durante 15 minutos a 4 °C sendo depois centrifugadas durante 10 minutos a 22000g. O sobrenadante resultante foi medido e congelado rapidamente com azoto líquido sendo utilizando posteriormente nos ensaios de quantificação da actividade das mesmas enzimas, na fracção iónica.

Para todas as enzimas foi verificada a saturação do substrato e a sua linearidade de comportamento perante os vários volumes.

2.2.8.1 Catalase

A determinação da catalase das folhas resultou de uma adaptação do método descrito por Wong e Whitaker (2003) e Chance e Maehly (1955).

Para a quantificação da actividade da catalase foram previamente preparadas soluções de tampão fosfato 0,1 M a pH 7,0 e de peróxido de hidrogénio 200 mM. Aquando da análise das amostras estas soluções estiveram a incubar a 25 °C durante aproximadamente 30 minutos. Em cada cuvete de quartzo foi adicionado 2 ml de tampão fosfato, 50 a 150 µl de amostra, 150 µl de peróxido de hidrogénio e o restante volume de água Milli-Q de modo a perfazer os 3 ml. O peróxido de hidrogénio foi o último a ser adicionado devido a iniciar imediatamente a reacção. A leitura das amostras realizou-se em contínuo num espectrómetro UV-VIS, a 240 nm, durante 2 minutos. Para o cálculo da actividade da catalase usou-se o coeficiente de extinção de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Verma e Dubey, 2003).

2.2.8.2 Guaiacol peroxidase

Para a determinação desta enzima guaiacol peroxidase fez-se uma adaptação das metodologias propostas por Yuan e Jiang (2003) e Chance e Maehly (1955).

As soluções de guaiacol 135 mM, o tampão de fosfato 0,1 M a pH 7,0, o peróxido de hidrogénio 200 mM e a água Milli-Q foram incubadas durante aproximadamente 30 minutos, a 25 °C. Adicionou-se numa cuvete 1,2 ml de tampão fosfato, 500 a 1000 µl de amostra, 30 µl de peróxido de hidrogénio, 200 µl de guaiacol e o restante volume de água Milli-Q para perfazer os 3 ml. O guaiacol foi o último a ser adicionado devido a iniciar logo a reacção. A leitura das amostras realizou-se num espectrómetro UV-VIS, a 420 nm, durante 5 minutos. Para o cálculo da actividade da

peroxidase usou-se o coeficiente de extinção de $0,0026 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Verma e Dubey, 2003).

2.2.8.3 Superóxido dismutase

A determinação da actividade da enzima superóxido dismutase (SOD) resultou de uma adaptação da metodologia de Sun e Zigman (1977) e Khopde *et al.* (2001).

Preparou-se uma solução de tampão carbonato-hidrogenocarbonato 0,1 M a pH 10,0 e uma solução de epinefrina 5 mM a pH 2,0. Durante o ensaio estas soluções juntamente com a água Milli-Q foram incubadas a 25 °C durante aproximadamente 30 minutos. Numa cuvete de quartzo foram adicionados 1,5 ml de solução tampão, de 25 a 100 µl de amostra, 300 µl de epinefrina e o restante volume até 3 ml de água. A epinefrina foi a última a ser adicionada devido à sua oxidação ser imediata. A leitura das amostras realizou-se num espectrómetro UV-VIS, a 320 nm, durante 1 minuto. Nestas mesmas condições também foi analisada a auto-oxidação da epinefrina sem a adição de qualquer enzima e o comportamento das amostras isoladas. Este último parâmetro foi determinado de modo a poder observar a ocorrência de outras reacções lidas no mesmo comprimento de onda. Uma unidade de actividade de SOD foi expressa como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da oxidação da epinefrina sob as condições experimentais usadas.

2.2.9 Análise da viabilidade das sementes

Para avaliar a viabilidade das sementes de *Cistus ladanifer* submeteram-se as mesmas a um pré-tratamento de choque térmico (permanência de 30 minutos a 100 °C). Segundo Corral *et al.* (1990) este pré-tratamento permite uma melhor germinação desta

espécie. Posteriormente, as sementes foram colocadas ordenadamente em caixas de Petri revestidas com papel de filtro humedecido com água destilada mantendo-se num local onde a temperatura rondava os 21 °C. Ao longo de 30 dias registou-se a evolução da germinação das sementes das populações provenientes das parcelas dos locais considerados contaminados e dos não contaminados. Definiu-se como critério de germinação quando se verificava uma emergência da radícula através do tegumento das sementes.

2.3 Análise estatística dos resultados

A análise estatística dos resultados foi realizada no programa SPSS 13.0 para o Windows. Para todas as variáveis avaliou-se a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias. Posteriormente, efectuou-se uma ANOVA para aferir as diferenças entre as parcelas e áreas de amostragem nas várias variáveis analisadas. Para verificar a possível influência dos teores dos elementos químicos presentes nas folhas nas diferentes variáveis fisiológicas e morfológicas estudadas realizou-se correlações bivariadas de Pearson. O nível de significância usado neste estudo foi de $P < 0,05$.

2.4 Considerações de ordem económica

A apreciação económica da técnica de fitoestabilização, com plantas de *Cistus ladanifer*, na área mineira de São Domingos baseou-se na adaptação da análise custo-efectividade. Esta análise compara alternativas exclusivas em que o resultado não vem expresso em termos monetários.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização física, química e mineralógica do solo

Para melhor compreensão da distribuição dos elementos químicos nas várias frações do solo fez-se a sua caracterização físico-química e mineralógica. Esta caracterização é de elevada importância já que, a existência de variações nas propriedades dos solos podem influenciar as taxas de transferência dos elementos químicos para as plantas (Ross e Kaye, 1994). Assim, nas amostras de solo desenvolvido sobre xistos ou sobre materiais de escombreira determinaram-se algumas características físicas, químicas e mineralógicas que são apresentadas no Quadro 10.

Ao nível do pH em água e em cloreto de potássio pode-se constatar que os valores de São Domingos são mais baixos e significativamente diferente dos das restantes áreas. Em São Domingos, o pH em água observado reflectiu a elevada acidez dos solos derivados dos materiais de escombreira devido, possivelmente, à natureza dos constituintes iniciais resultantes da oxidação dos sulfuretos.

Apesar da divisão por classes de fertilidade, tendo em conta os teores de P e K assimilável, ser limitada devido a não distinguir os tipos solo esta é utilizada em Portugal (Varenes, 2003). Tendo em conta o teor de P assimilável observou-se que, independentemente da área e parcela, os solos apresentavam uma fertilidade muito baixa (P assimilável ≤ 10 mg/kg). Por outro lado, em relação ao teor de K assimilável, os solos do Caldeirão e de São Domingos apresentaram fertilidade alta (K assimilável entre 86 e 170 mg/kg) enquanto que os do Pomarão e da parcela SD02 continham uma fertilidade média (41-85 mg/kg). Para ambos os elementos os solos do Caldeirão apresentaram teores superiores (P: 3,59-6,34 mg/kg; K: 143,13-168,26 mg/kg) que se distinguiram significativamente dos obtidos nos solos de São Domingos e do Pomarão.

Quadro 10 – Caracterização física, química e mineralógica dos solos contaminados da mina de São Domingos e nos solos referência da Serra do Caldeirão e Pomarão.

Parcelas	Mina de São Domingos			Caldeirão			Pomarão		
	SD01	SD02	SD03	C04	C05	C06	P07	P08	P09
pH (H₂O)	4,55	4,33	4,71	5,73	5,42	5,48	5,93	6,02	6,03
pH (KCl)	3,56	3,46	3,60	4,28	4,12	4,11	4,06	4,21	4,17
Areia grossa (g/kg)	210,6	256,1	239,9	138,8	152,5	197,9	290,8	284,2	267,5
Areia fina (g/kg)	230,2	221,8	242,7	445,7	406,3	316,8	334,1	315,1	335,2
Limo (g/kg)	248,4	227,9	224,6	260,3	259,3	278,9	218,7	235,2	235,2
Argila (g/kg)	310,7	294,2	292,7	155,2	181,9	206,4	156,4	165,4	162
P assimilável (mg/kg)	2,4	1,3	2,69	3,59	6,34	5,91	1,39	1,5	1,72
K assimilável (mg/kg)	123,4	83,26	110,74	168,26	143,13	149	79,74	82,8	82,07
N (mg/kg)	55,3	39,9	53,2	140,7	163,1	138,6	56,7	62,3	57,4
C orgânico (g/kg)	21,2	12	17,4	38,3	43,1	40,2	10,8	14,9	9,3
Catiões de troca (cmol_c/kg)									
Al troca	1,25	1,48	0,77	0,11	0,33	0,26	0,08	0,01	0,04
Ca	2,16	1,43	1,82	9,48	4,21	9,48	1,78	2,36	2,03
Mg	1,03	0,73	0,85	0,6	1,59	0,69	1,82	2,02	1,94
K	0,29	0,21	0,29	0,91	0,41	0,79	0,18	0,19	0,18
Na	0,08	0,08	0,06	0,19	0,08	0,21	0,05	0,09	0,07
S	3,56	2,45	3,02	11,18	6,29	11,17	3,83	4,66	4,22
CTC (cmol_c/kg)	10,74	8,7	8,49	14,47	16,23	14,82	7,66	8,22	7,47
V (%)	33,15	28,16	35,57	77,26	38,76	75,37	50,00	56,69	56,49

CTC: Capacidade de troca catiónica; S: Soma dos catiões de troca (excepto Al); V: Percentagem de saturação

A concentração de N nos solos também reflecte a fertilidade existente nos mesmos. Deste modo, nos solos do Caldeirão observou-se maior teor em azoto (138,6-163,1 mg/kg) que se distinguiu significativamente dos valores obtidos para os outros solos e que pode reflectir superior fertilidade em relação aos das restantes áreas. É de referir que as parcelas de São Domingos e Pomarão apresentaram valores semelhantes significativamente (53-63 mg/kg) sendo que a parcela SD02 foi a que obteve menor teor

de azoto (39,9 mg/kg). Estes baixos valores de N nestas áreas podem funcionar como um limitante do crescimento das plantas de *Cistus ladanifer*.

O carbono orgânico atingiu valores superiores na Serra do Caldeirão (38,3-43,1 mg/kg) o que pode estar relacionado com a maior cobertura de plantas existente nesses solos em relação aos das outras áreas (Quadro 5). É de notar todavia que os solos das parcelas de São Domingos apresentaram um teor mais elevado de carbono orgânico que os solos do Pomarão (12,0-21,2 e 9,3-14,9 g/kg, respectivamente) contudo, a diferença não foi estatisticamente significativa. Segundo o Manual de Culturas (2000), a classificação dos solos amostrados de acordo com o seu teor de carbono orgânico é média-baixa para São Domingos; média-alta para o Caldeirão e muito baixa-baixa para o Pomarão.

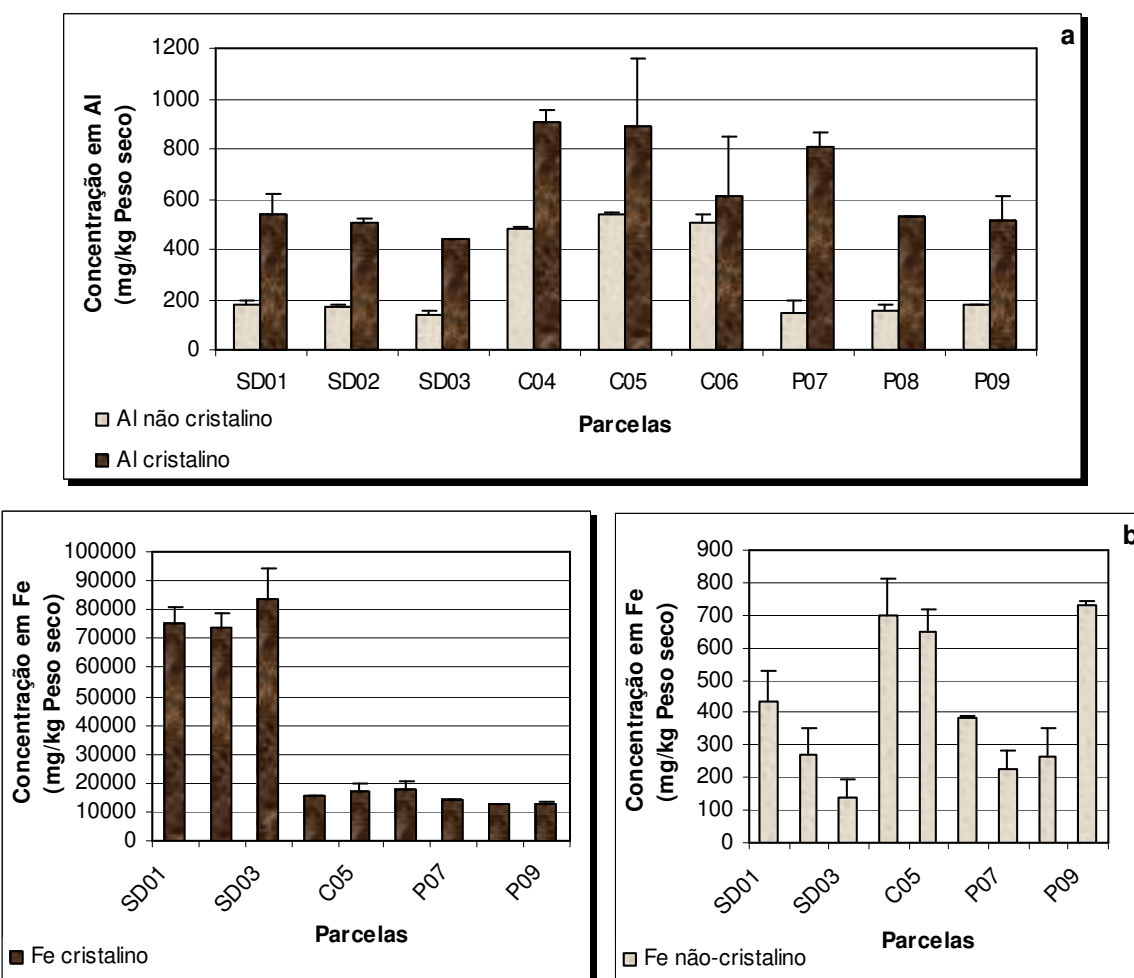
A capacidade de troca catiónica (CTC) também é um parâmetro de extrema importância já que, traduz a capacidade de retenção dos catiões na superfície das fases sólidas numa forma permutável, evitando a sua perda por lixiviação e mantendo-os disponíveis para as plantas. Assim, observou-se que os solos da Serra do Caldeirão apresentaram maior capacidade de troca catiónica (14,47-16,23 cmol_c/kg) seguida da área de São Domingos (8,49-10,74 cmol_c/kg) e Pomarão (7,47-8,22 cmol_c/kg), que indicaram semelhanças significativas. Isto pode estar relacionado com o conteúdo em matéria orgânica nos solos, que varia na mesma razão (Serra do Caldeirão > São Domingos > Pomarão) e provavelmente com o teor relativo dos diferentes minerais argilosos (Varenes, 2003).

Os dados da análise granulométrica indicam que a mina de São Domingos possuiu uma maior percentagem de materiais finos (mais de 50%) em relação às restantes áreas (cerca de 40%), o que pode contribuir para a maior adsorção dos elementos no solo. Segundo o diagrama triangular das classes de textura dos solos, os

solos da mina de São Domingos são Franco-argilo-limosa enquanto que os do Caldeirão e Pomarão são Franco-limosa. A identificação da fracção argilosa tem neste contexto um papel importante no comportamento do solo em particular na capacidade de retenção, específica ou não específica, quer de elementos essenciais para a planta quer vestigiais, os quais podem ser contaminantes (Neves *et al.*, 1999; Varennes, 2003).

A mineralogia da fracção argilosa (<2 µm) era qualitativamente semelhante na Serra do Caldeirão e no Pomarão onde se identificaram vermiculite, ilite, caulinite, quartzo, hematite e goethite. Estes minerais, com excepção da vermiculite, foram também identificados em São Domingos (Diagramas de Raio X no Anexo II).

Na Figura 15 (a,b,c) apresentam-se os teores de alumínio, ferro e manganês contidos nos óxidos e hidróxidos das diferentes áreas de estudo.



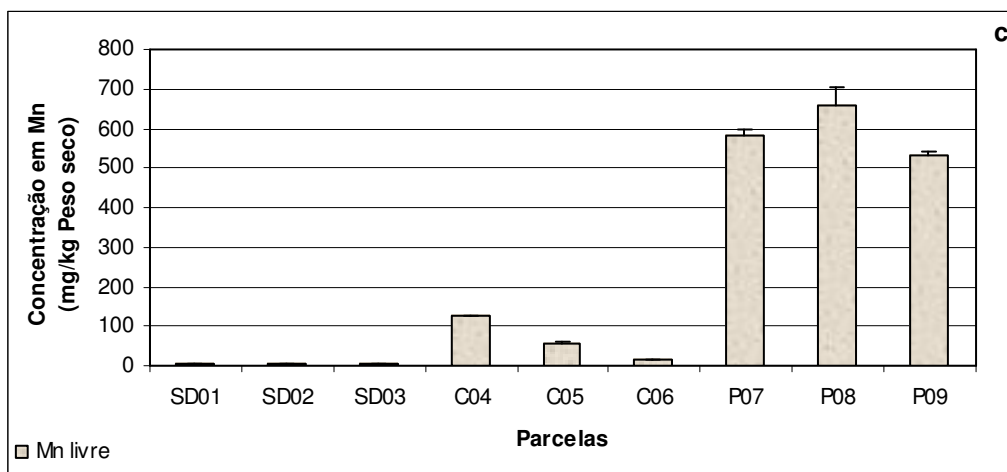


Figura 15 – Concentração em óxido e hidróxidos de alumínio (a) e ferro (b), cristalino e não cristalino, e manganês (c) nos solos contaminados da mina de São Domingos (SD) e nos solos referência da Serra do Caldeirão (C) e do Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

A quantidade de Al, Fe e Mn nos óxidos respectivos e normalmente designados como “livres”, variou consoante a área de amostragem contudo, a concentração dos óxidos cristalinos foi sempre em maior quantidade que a dos não-cristalinos. De uma forma geral, os solos do Caldeirão contêm as maiores concentrações de óxidos de Al (crist: 615,42-907,44 mg/kg; não crist: 478,25-538,95 mg/kg) e Fe não-cristalino (651,20-700,01 mg/kg), com excepção da parcela C06 que se distinguiu significativamente das restantes com o menor valor para o Fe não cristalino (384,19 mg/kg). É de evidenciar ainda que em relação ao Fe não-cristalino a parcela P09 destacou-se das restantes parcelas do Pomarão atingindo valores próximos dos encontrados para o Caldeirão (728,82 mg/kg).

Por outro lado, para os óxidos de Fe cristalinos não se observou uma heterogeneidade entre as parcelas sendo que, as de São Domingos apresentaram maiores teores do elemento (74,04-83,57 g/kg) em comparação com as restantes áreas onde o valor não ultrapassou os 20 g/kg. Estes valores de Fe elevados estão de acordo com os materiais nos quais os solos se desenvolveram, escombrelas de *gossan*, que são em grande parte constituídos por óxidos de Fe resultantes da alteração da pirite.

Os valores relativos aos óxidos de Mn também apresentaram grande discrepância entre as áreas designadamente, São Domingos com valores muito baixos (<5,2 mg/kg), entre 16,0 e 125,8 mg/kg na Serra do Caldeirão e por último, valores elevados no Pomarão (529,7-656,8 mg/kg). Comparando as parcelas pode-se constatar que os solos do Caldeirão foram os que apresentaram maior heterogeneidade podendo-se evidenciar, como no caso do Fe não-cristalino, a parcela C06 com menor valor (16,0 mg/kg). Os óxidos de Fe, Al e Mn possuem, em geral, elevada capacidade de adsorção de grande número de elementos metálicos contribuindo para a sua indisponibilidade e imobilização no solo (Bourrelier *et al.*, 1998).

De uma maneira geral, as diferenças existentes nos solos são resultantes dos materiais geológicos que lhes deram origem: *gossan* em São Domingos e Xistos no Caldeirão e Pomarão.

3.2 Análise química do solo

De modo a estudar a distribuição dos elementos no solo determinaram-se: os teores totais dos elementos, a fracção disponível através de cinco métodos (água, DTPA, acetato de amónio, cloreto de cálcio e nitrato de cálcio), a fracção associada aos óxidos de ferro, alumínio e manganês e fracção ligada à matéria orgânica.

3.2.1 Conteúdo total multielementar

Os teores totais do As, Cu, Hg, Pb e Zn apresentam-se no Quadro 11 estando os restantes os restante 46 elementos no Anexo III.

Analisando os teores de As, Cu e Pb observou-se que as parcelas de São Domingos foram as que apresentaram as maiores concentrações e, de uma maneira

geral, maior variabilidade entre as diferentes parcelas (As: 1940-3030 mg/kg; Cu: 210-237 mg/kg; Pb: 5280-9210 mg/kg). Deste modo, São Domingos apresentou diferenças significativas nos teores totais destes elementos quando comparado com o Caldeirão e Pomarão. Assim, para a área de São Domingos a concentração de As e Pb chegou a ser mais do que 100 vezes maior que a concentração obtida nas outras áreas enquanto que, para o Cu foi apenas de aproximadamente de três vezes.

Quadro 11 – Concentração total dos elementos nos solos contaminados da mina de São Domingos (SD) e em solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Parcelas	Elementos químicos (mg/kg)				
	As	Cu	Hg	Pb	Zn
SD01	2960	237	< 1*	7540	37
SD02	3030	231	< 1*	9210	36
SD03	1940	210	< 1*	5280	57
C04	18,4	87	< 1*	67	93
C05	19,8	54	< 1*	37	72
C06	18	43	< 1*	39	43
P07	16	99	< 1*	43	63
P08	16,3	104	< 1*	36	68
P09	15,5	171	< 1*	55	93

* Limite de detecção

Tendo em consideração os valores referidos por Kabata-Pendias e Pendias (1985) a concentração total dos elementos na mina de São Domingos ultrapassou os limites permitidos considerados como tóxicos (As: 5-10mg/kg; Cu: 60-125 mg/kg; Pb: 100-400 mg/kg) sendo evidente a necessidade de intervenção na área. Por outro lado, segundo a legislação portuguesa (Decreto-Lei nº 236/98) pode-se verificar que os teores obtidos para o Cu e Pb nos solos de São Domingos ultrapassam o valor referenciado (50 mg/kg para solos com $\text{pH} \leq 5,5$), principalmente para o Pb. Esta legislação não abrange o As no entanto, tendo em conta a legislação de outros países verificou-se que os teores

determinados nos solos da área mineira excederam o admissível para qualquer tipo de uso do solo:

- Alemanha: Parques/lazer 125 mg/kg, Comercial/industrial 140 mg/kg;
- França: Uso sensível 37 mg/kg, Uso não sensível 120 mg/kg;
- Reino Unido: Residencial com ou sem ingestão de culturas 20 mg/kg, Industrial/comercial 500 mg/kg;
- Comunidade Autónoma do País Basco: Residencial com ou sem horta 30 mg/kg; Parque 30 mg/kg; Comercial/industrial 200 mg/kg.

Quando se comparam os solos do Caldeirão e Pomarão para os mesmos elementos não foram observadas diferenças significativas. Ambas as áreas apresentaram valores inferiores ao valor máximo admitido, por Kabata-Pendias e Pendias (1985), para o Pb contudo, para Cu e As os teores totais ultrapassaram o limite inferior desta gama. Tendo em conta o Decreto-Lei nº 236/98 verificou-se que o teor de Pb estava dentro do considerado admissível (300 mg/kg para pH entre 5,5 e 7,0) contudo, para o Cu os solos do Pomarão ultrapassam valor máximo admissível de 100 mg/kg para solos com pH entre 5,5 e 7,0 (Decreto-Lei nº 236/98). Para o As, e segundo a legislação de outros países, os solos de ambas as áreas podem ter um uso múltiplo já que os seus teores estão abaixo do referenciado.

Devido às concentrações totais de Hg em todas as parcelas serem inferiores ao limite de detecção do aparelho (<1 mg/kg) não foi possível verificar se as áreas possuem concentrações consideradas como contaminantes (0,3-0,5 mg/kg) por Kabata-Pendias e Pendias (1985). No entanto, considerando o Decreto-Lei nº 236/98 pode

verificar-se que todas as áreas apresentaram teores aceitáveis (1 mg/kg para pH do solo $\leq 5,5$; 1,5 mg/kg para pH do solo $> 5,5$).

Relativamente ao Zn verificou-se que o solo do Pomarão possuía a maior concentração (63-93 mg/kg) no entanto, não existem diferenças significativas entre as áreas. A concentração de Zn nesta área (70-400 mg/kg) ultrapassou ligeiramente o limite inferior da gama de valores considerados como tóxicos por Kabata-Pendias e Pendias (1985). Este é o único caso onde São Domingos apresentou uma menor concentração do elemento químico em relação às restantes áreas estando nas concentrações consideradas normais (37-57 mg/kg). Por outro lado, nenhuma das áreas de amostragem excedeu o valor máximo admissível para o Zn pela legislação portuguesa (Decreto-Lei n° 236/98).

3.2.2 Fracção disponível

A fracção disponível dos elementos para as plantas está associada às formas solúveis em água ou adsorvidas no complexo de troca (Tavares *et al.*, 2003). Face a tal facto, a determinação desta fracção é muito importante para a compreensão do comportamento das plantas. As várias soluções aquosas usadas para extrair esta fracção dos elementos no solo podem retirar teores distintos devido a possuírem capacidade de complexação ou diferentes forças iónicas e/ou catiões de troca que proporcionam afinidades de troca diferentes e que podem representar o que sucede no momento de absorção dos elementos pelas plantas. A fracção disponível dos elementos analisados apresenta-se de seguida para os vários elementos.

3.2.2.1 Arsénio

Sendo o arsénio um elemento extremamente tóxico para os organismos torna-se importante a quantificação da fracção que existe disponível para os mesmos. As concentrações disponíveis deste elemento nos solos para as várias soluções extractantes apresentam-se na Figura 16.

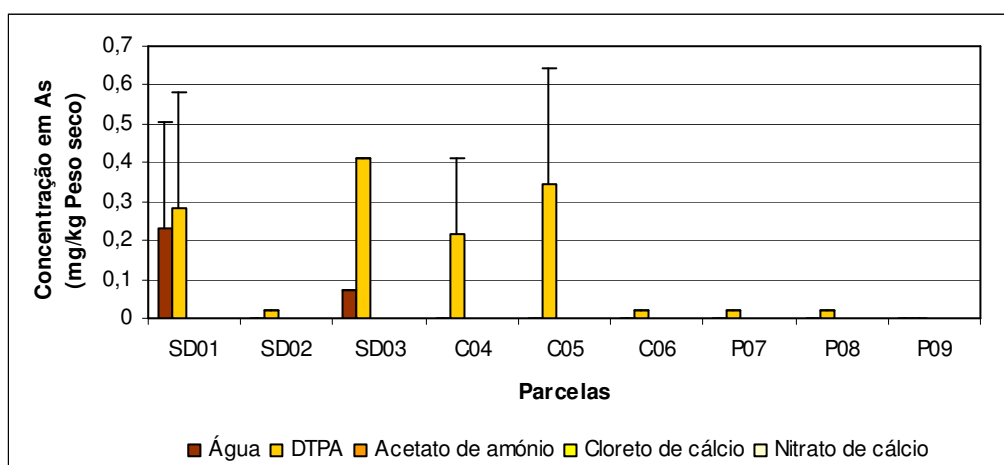


Figura 16 – Concentração da fracção disponível de arsénio em solos contaminados da mina de São Domingos (SD) e em solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P), utilizando diferentes soluções extractantes. Média \pm DP, n = 3.

De acordo com os resultados obtidos, o DTPA foi a solução extractante que extraiu maior quantidade de As nas diferentes áreas de amostragem. Nas restantes soluções de extracção este elemento estava abaixo do limite de detecção nas várias áreas, sendo excepção as parcelas SD01 e SD02, pertencentes a São Domingos, onde a fracção solúvel em água continha entre 0,23 e 0,07 mg/kg.

Embora se tenha constatado que os solos de São Domingos possuíam um maior teor total de As do que os solos do Caldeirão, o teor disponível deste elemento para as plantas em ambas as áreas foi estatisticamente semelhante (SD: 0,02-0,41 mg/kg; C: 0,02-0,35 mg/kg). Os solos do Pomarão apresentaram ainda menor quantidade de As disponível obtendo-se valores inferiores a 0,2 mg/kg

3.2.2.2 Chumbo

O chumbo é também um dos elementos contaminantes que ocorre em maior concentração nos solos da mina de São Domingos sendo conhecido os seus efeitos tóxicos para os organismos (Sharma e Dubey, 2005). Os dados relativos à disponibilidade deste elemento apresentam-se na Figura 17.

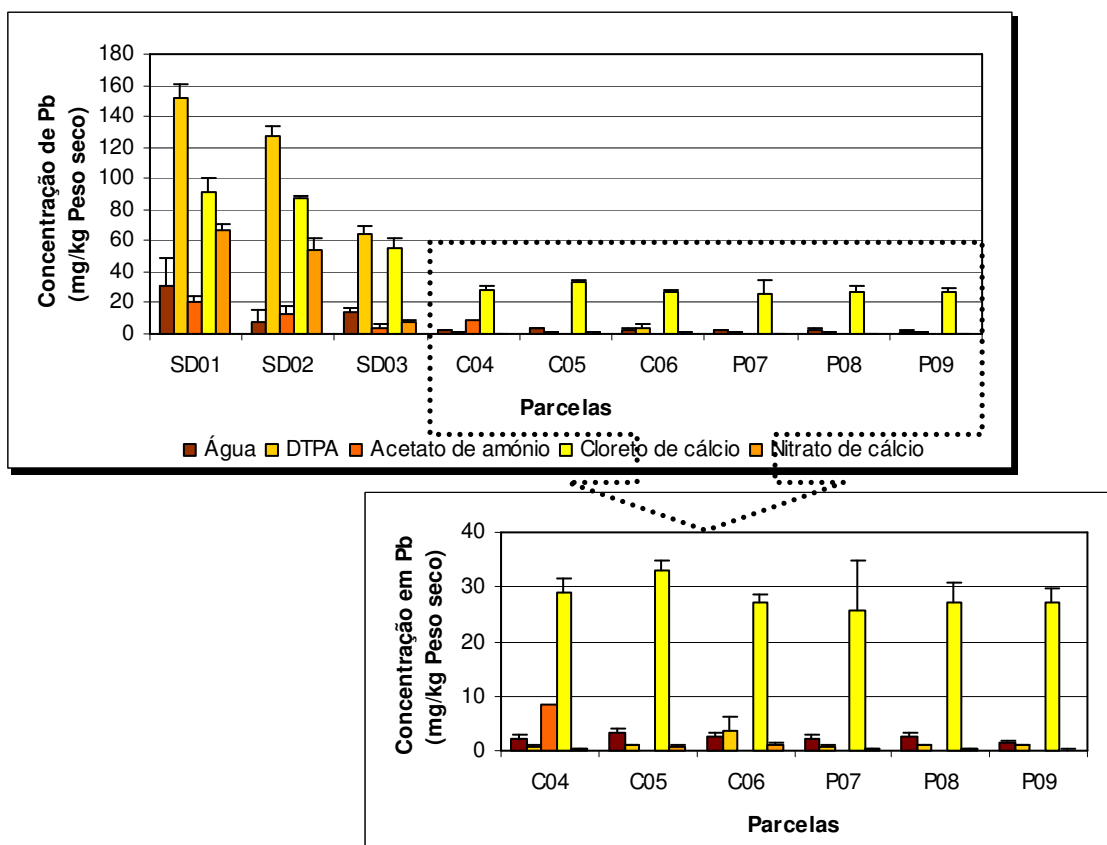


Figura 17 – Concentração da fracção disponível de chumbo em solos contaminados da mina de São Domingos (SD) e em solos não contaminados da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P), utilizando diferentes soluções extractantes. Média \pm DP, n = 3.

Pode observar-se uma variação na efectividade da solução extractante em relação aos solos das áreas amostradas. Isto é, a quantidade extraível com cada uma das soluções extractantes variou consoante a parcela e a área de amostragem.

É de referir que com a solução de acetato de amónio não foi extraído Pb nas áreas não contaminadas, Caldeirão e Pomarão, sendo excepção a parcela C04. Assim, a

solução que mais extraiu Pb nos solos de São Domingos foi o DTPA (64,17-152,08 mg/kg) no entanto, nas restantes áreas foi o cloreto de cálcio que extraiu quantidades semelhantes (C: 27,22-33,08 mg/kg; P: 25,63-27,27 mg/kg). Em ambos os casos, as quantidades extraídas distinguiram-se significativamente das obtidas com as restantes soluções. Esta variação pode estar relacionada com as características dos solos nomeadamente, a capacidade de troca catiónica. Assim, pode-se verificar que os solos do Caldeirão e Pomarão apresentaram maior CTC (Quadro 10) logo, superior retenção de cationes permutáveis, neste caso o cálcio.

Embora a quantidade disponível seja uma pequena fracção do teor total existente, verificou-se que em São Domingos esta fracção continua a ser superior à das outras áreas, independentemente da solução extractante. A diferença observada na fracção disponível entre a área de São Domingos e as restantes pode estar associada ao pH destes solos o qual promove uma maior disponibilidade do metal em solução. De facto, segundo Brümmer e Herms (1983) este elemento é mais solúvel a pH entre 4-5 do que a valores de pH entre 5 e 7.

Foi ainda observado que a área de São Domingos possuía maior heterogeneidade entre parcelas do que nas restantes áreas de amostragem. Esta heterogeneidade pode ser explicada por esta área de estudo corresponder a solos desenvolvidos sobre materiais de escombreira de *gossan* e de materiais encaixantes que são por isso, à partida, fortemente heterogéneos.

3.2.2.3 Cobre

Este elemento possui elevada importância para os organismos sendo essencial para o seu metabolismo em baixas concentrações porém, quando em concentrações elevadas pode comportar-se como tóxico (Varenes, 2003). Os valores determinados na

fracção disponível de Cu nos solos das diferentes áreas de estudo apresentam-se na Figura 18.

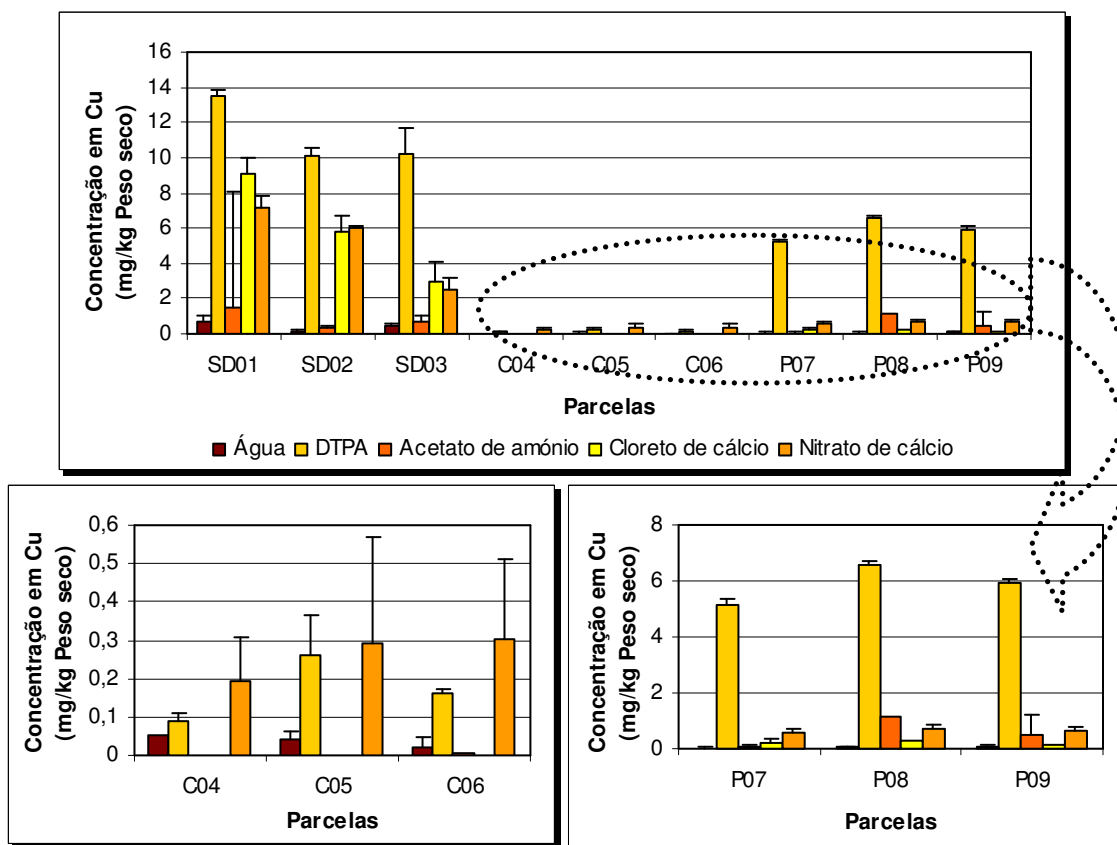


Figura 18 – Concentração da fracção disponível de cobre em solos contaminados da mina de São Domingos (SD) e em solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P), utilizando diferentes soluções extractantes. Média \pm DP, n = 3.

Comparando os valores obtidos para as diferentes soluções extractantes observou-se uma variação da sua efectividade em relação à área de amostragem. O DTPA foi a solução que extraiu maior concentração de Cu nos solos de São Domingos (10,07-13,45 mg/kg) e Pomarão (5,18-6,55 mg/kg) enquanto que, para o Caldeirão foi a solução de nitrato de cálcio (0,19-0,30 mg/kg).

De uma maneira geral, na área de São Domingos pode-se verificar heterogeneidade entre as parcelas, devido aos solos serem desenvolvidos sobre materiais de escombreira, sendo que a parcela SD01 obteve sempre as maiores

concentrações, independentemente da solução extractante usada. Contudo, é de referir que esta parcela não possui o maior teor total de Cu em relação às restantes parcelas (Quadro 11) o que sugere que a fracção disponível está mais relacionada com as características do solo do que com o teor total (Lázaro *et al.*, 2006).

Nos solos provenientes do Caldeirão não foi detectado Cu na solução de acetato de amónio ou cloreto de cálcio. Por último, nas parcelas do Pomarão as quantidades obtidas com cada uma das soluções extractantes foram semelhantes entre si demonstrando, deste modo, homogeneidade na área.

3.2.2.4 Mercúrio

O mercúrio é um elemento não-essencial que apresenta efeitos negativos para o Homem e Ambiente. Os dados relativos à fracção disponível deste elemento nas diferentes áreas, tendo em conta as distintas soluções extractantes apresentam-se na Figura 19.

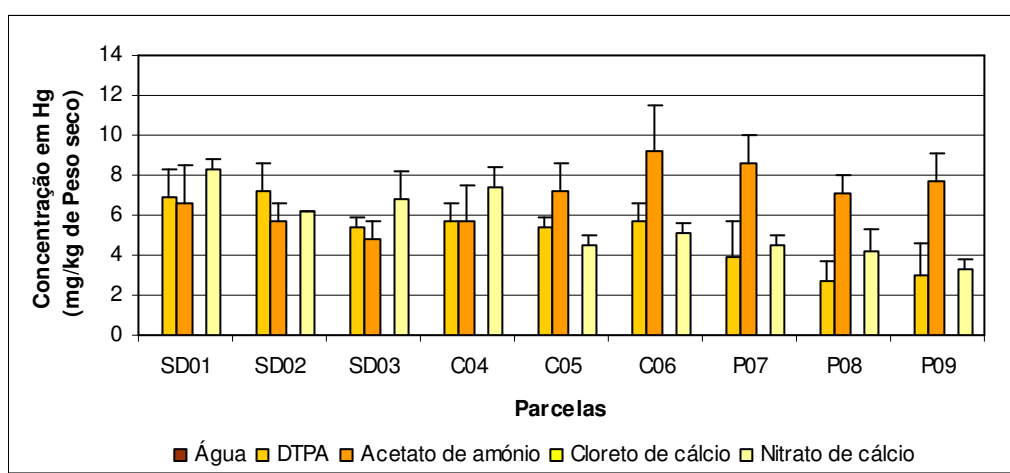


Figura 19 – Concentração da fracção disponível de mercúrio em solos contaminados da mina de São Domingos (SD) e em solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P), utilizando diferentes soluções extractantes. Média \pm DP, n = 3.

Relativamente ao Hg pode-se observar que na solução de cloreto de cálcio e na solução aquosa não se detectou qualquer quantidade deste elemento, independentemente da parcela de amostragem. Por outro lado, é de evidenciar que para as restantes soluções extractantes as quantidades retiradas foram sempre superiores ao valor do limite de detecção do aparelho usado para determinar o teor total (Quadro 11). Este facto pode relacionar-se com a existência de diferenças na sensibilidade dos métodos de análise e pela possível ocorrência de interferências espectrais devido à presença de NO₂, SO₂ ou O₃ (Micaroni *et al.*, 2000).

Embora as quantidades obtidas com as diferentes soluções extractantes sejam próximas entre as várias áreas, observou-se que a melhor efectividade na extracção foi a solução de nitrato de cálcio nos solos de São Domingos e o DTPA nos solos do Caldeirão e Pomarão. Pode-se verificar ainda a existência de homogeneidade entre as parcelas e áreas de amostragem.

3.2.2.5 Zinco

O zinco é um elemento fundamental para o desenvolvimento das plantas, pelo que a sua concentração no solo sob formas disponíveis para as plantas é crucial para o seu bom desenvolvimento. Porém, tal como o Cu pode em concentrações elevadas ser tóxico (Hall, 2002; Kamal *et al.*, 2004). As concentrações em Zn na fracção disponível no solo avaliado a partir de diferentes soluções extractantes apresentam-se na Figura 20.

Da análise das diferentes soluções extractantes observou-se que, independentemente da área de amostragem, a solução de cloreto de cálcio extraiu maior concentração de Zn porém, na solução de DTPA não se detectou este elemento. Comparando as quantidades obtidas para as três áreas com a solução extractante de cloreto de cálcio, observou-se que os solos de São Domingos apresentaram maior teor

de Zn (9,47-9,87 mg/kg) distinguindo-se significativamente dos solos do Caldeirão e (6,47-7,88 mg/kg) do Pomarão (5,27-8,45 mg/kg).

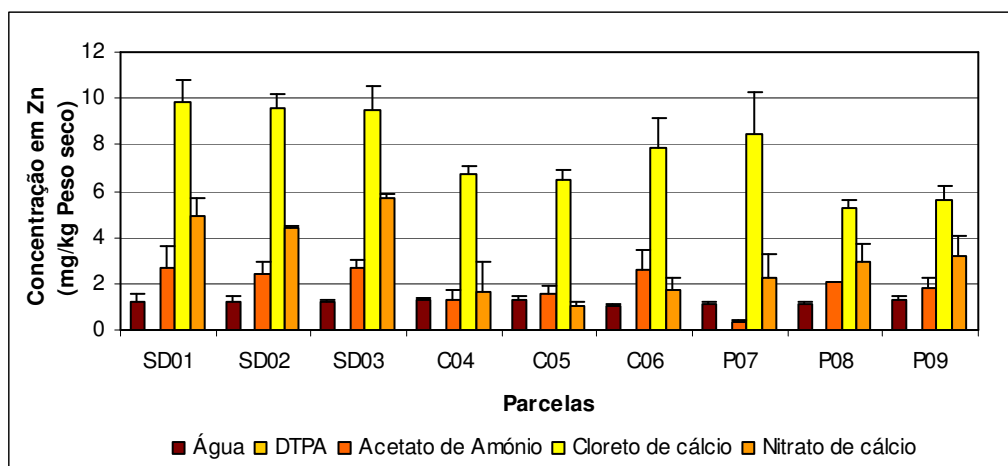


Figura 20 – Concentração da fracção disponível de zinco em solos contaminados da mina de São Domingos (SD) e em solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P), utilizando diferentes soluções extractantes. Média \pm DP, n = 3.

Em São Domingos os valores obtidos com as diferentes soluções extractantes foram sempre superiores às restantes áreas. Este facto pode relacionar-se com as características do solo que permitem que o Zn se encontre em formas solúveis ou adsorvidas no complexo de troca das fases sólidas do solo (Ross, 1994). As diferenças nos valores de pH e matéria orgânica entre São Domingos e as restantes áreas podem explicar a elevada disponibilidade deste elemento. Assim, para valores baixos de pH e matéria orgânica o teor disponível de um elemento é superior (Brümmer, 1986; Kabata-Pendias e Pendias, 1992; Neves *et al.*, 1999; Bleeker *et al.*, 2002).

De uma maneira geral, pode observar-se heterogeneidade entre parcelas e áreas com as várias soluções extractantes sugerindo que a fracção disponível se relaciona mais com as propriedades do solo do que com os teores totais obtidos.

Da análise dos resultados relativos à concentração dos vários elementos químicos pode-se constatar que valores totais reflectem unicamente a quantidade

acumulada nos solos e não a quantidade “real” que está disponível para os organismos ou para migrar, através do solo e substrato para os aquíferos ou ser lixiviados pelas águas de circulação superficial.

A concentração de elementos relativos à fracção disponível variou consoante as soluções extractantes usadas e áreas amostradas devido à existência de variações nas características de cada amostra de solo que podem ter induzido a um comportamento diferente.

3.2.3 Distribuição dos elementos pelas várias fracções do solo

3.2.3.1 Arsénio

As concentrações de arsénio nas várias fracções do solo podem ser observadas e comparadas na Figura 21 sendo que, a fracção residual foi obtida por diferença do teor total.

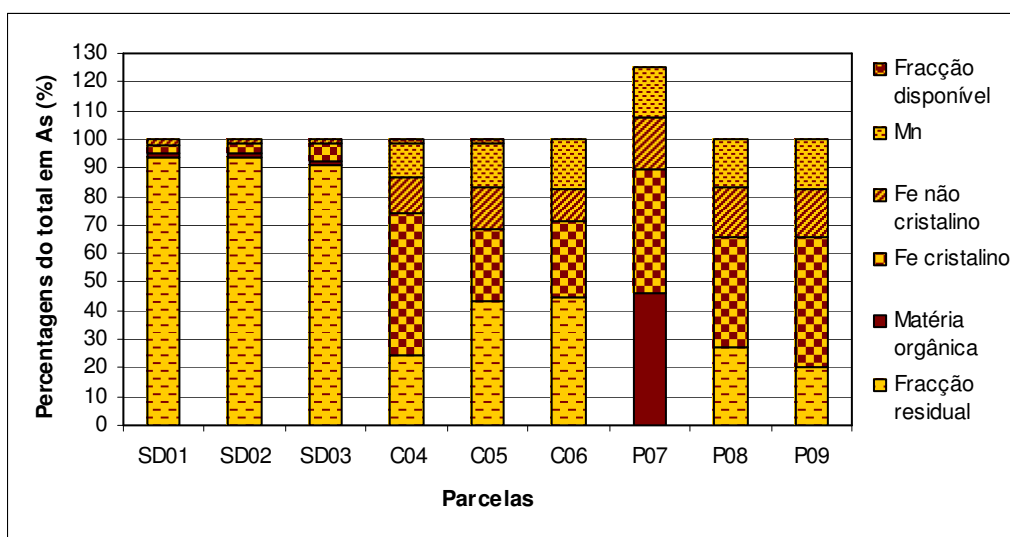


Figura 21 – Percentagens do total em arsénio associadas às diferentes fracções do solo contaminado da mina de São Domingos (SD) e dos solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Apesar dos solos de São Domingos possuírem teores extremamente elevados de As total, a percentagem da fracção disponível com solução de DTPA foi menor que 0,01% do teor total. Nesta área, este elemento encontrou-se maioritariamente ligado à fracção residual (91,19-93,97%) e, em menor escala, aos óxidos de Fe cristalino (3,0-6,1%).

A maior quantidade de As disponível, extraída com a solução de DTPA, ocorreu nos solos da área do Caldeirão onde os valores variaram entre 0,11 e 1,7% do teor total. Nestes solos, também o As ligado à fracção dos óxidos de Fe cristalino e fracção residual apresentou as maiores percentagens (25,23-49,65% e 24,21-44,40%, respectivamente) contudo, também é de realçar a contribuição da fracção dos óxidos de Mn que variou entre 12,06 e 17,11% do total. Os óxidos de manganês são capazes de promover a oxidação do As resultando a diminuição da sua mobilidade (Oscarson *et al.*, 1981)

Os dados obtidos por El Khatib *et al.* (1984) mostraram que os óxidos de Fe são bastante eficazes na imobilização deste metalóide (As). De facto, nos solos do Caldeirão a percentagem de As associado aos óxidos de Fe (cristalino e não-cristalino) perfaz de 38,38 a 62,56% do total. É de referir que os solos do Caldeirão foram os que apresentaram maior teor dos óxidos de Fe não cristalino (Figura 15).

No Pomarão a distribuição do As nas fases portadoras foi semelhante à dos solos do Caldeirão sendo excepção a parcela P07, que apresentou 46,09% associado à fracção da matéria orgânica. Nas restantes parcelas do Pomarão e do Caldeirão não foi detectado As associado à matéria orgânica. O excesso a 100% observado nesta parcela pode ser devido à extracção de algum As associado a formas de Fe, Al e Mn não cristalino mais susceptíveis a serem solubilizadas pelo pirofosfato (Gommy, 1997).

3.2.3.2 Chumbo

Na Figura 22 apresenta-se a distribuição do Pb nas diferentes fracções do solo sendo que, a fracção residual foi obtida por diferença do teor total.

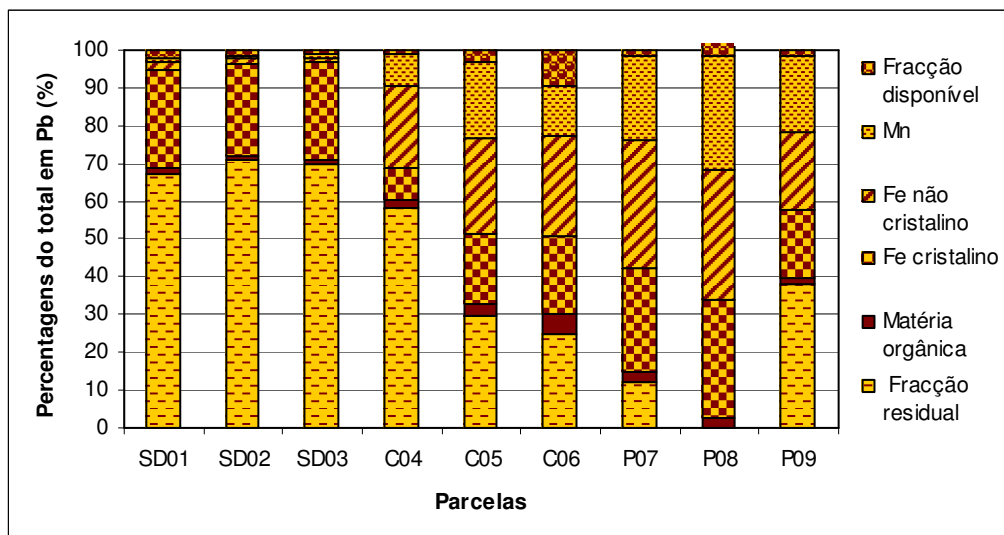


Figura 22 – Percentagens do total em chumbo associadas às diferentes fracções do solo contaminado da mina de São Domingos (SD) e dos solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Embora a fracção de Pb disponível, extraída com solução de DTPA, em São Domingos tenha atingido valores superiores aos dos outros solos esta fracção representa menos de 2% do teor total. Em contrapartida, no Caldeirão esta percentagem apresentou valores superiores que rondaram entre 1,27 e 9,27%. Os valores relativos às parcelas C05 e C06 podem estar sobrestimados devido a estarem mais próximos do caminho por onde passam alguns veículos rurais. Segundo Paoliello e Chasin (2001), 20 a 60% do chumbo particulado proveniente dos veículos é depositado próximo da fonte de emissão sob a forma de Pb-tetraetila, a qual é a forma existente mais solúvel. No Pomarão a fracção disponível varia entre 1,68 e 2,78% do total.

Da análise geral da distribuição do Pb pelas várias fases de suporte dos solos pode-se verificar que esta variou consoante a área de estudo. Assim, no Caldeirão o Pb estava mais ligado à fracção associada aos óxidos de Fe não cristalino (21,90-26,47%) e

residual (24,75-58,10%), tal como os resultados obtidos por Lázaro *et al.* (2006), sendo que as fracções ligadas ao Mn e ao Fe cristalino foram semelhantes (8,02-19,79% e 8,50-20,51%, respectivamente). Em São Domingos este metal ocorreu em maior percentagem na fracção residual (67,04-70,91%) e ligado ao Fe cristalino (24,21-26,07%).

Nos solos do Pomarão este elemento ligou-se aos diferentes óxidos de uma forma mais ou menos equivalente (Mn: 24,11%; Fe não crist.: 29,59%; Fe crist.: 25,61%) não havendo nenhuma fracção que se evidenciasse.

Em todas as áreas de estudo, os óxidos de Fe e Mn tiveram um papel fundamental na retenção/adsorção deste elemento, como já constatado por Tavares *et al.* (2000) em solos desenvolvidos em materiais ricos em Pb. Embora o Pb possua elevada afinidade com a matéria orgânica (Sharma e Duney, 2005) tal facto não foi observado nas áreas estudadas, as quais não apresentaram diferenças significativas entre si, o que provavelmente está relacionado com os baixos teores de matéria orgânica destes solos.

3.2.3.3 Cobre

A distribuição do Cu pelas fracções do solo provenientes das diferentes áreas amostradas apresenta-se na Figura 23 sendo que, a fracção residual foi obtida por diferença do teor total.

Apesar do solo de São Domingos possuir aproximadamente o dobro do teor total do que o Pomarão, as percentagens da fracção de Cu disponível com DTPA são semelhantes (SD: 4,36-5,68%; P: 3,46-6,29%). Os solos do Caldeirão também apresentaram um teor de Cu total no solo considerado tóxico para os organismos contudo, a fracção disponível foi menor que 0,5% diferenciando-se significativamente das restantes zonas.

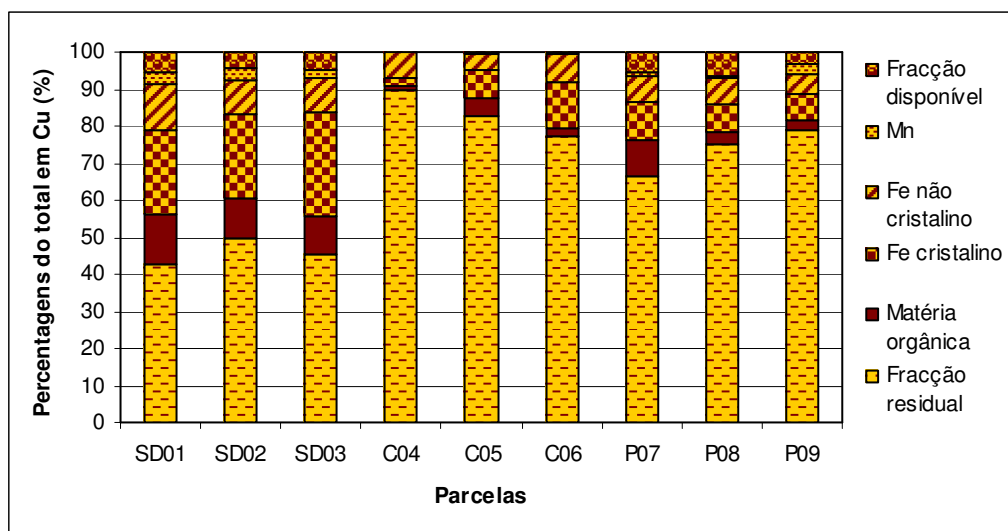


Figura 23 – Percentagens do total em cobre associadas às diferentes fracções do solo contaminado da mina de São Domingos (SD) e dos solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Pode-se ainda constatar que o Cu ocorre maioritariamente na fracção residual do solo, tais resultados estão de acordo com os obtidos por Lázaro *et al.* (2006). Assim, pode-se observar que no Caldeirão e Pomarão aproximadamente 80% do Cu está ligado à fracção residual do solo. Em São Domingos embora esta fracção também seja maioritária (45,92%), foi inferior à encontrada nas restantes áreas. Deste modo constatou-se que o comportamento do Cu nos solos foi diferente ao observado para o As e Pb já que, estes dois elementos apresentavam-se maioritariamente ligados à fracção residual do solo de São Domingos em vez do que nos solos do Caldeirão e Pomarão (Figura 22 e 23).

A distribuição do Cu pelas outras fracções nos solos não contaminados (Caldeirão e Pomarão) foi relativamente semelhante. Porém, nos solos contaminados de São Domingos a fracção de Cu associada aos óxidos de Fe cristalino foi superior à das fracções associadas aos óxidos de Fe não cristalino e matéria orgânica, cujas percentagens foram semelhantes (9,08-12,24% e 10,41-13,76%, respectivamente). Nas restantes áreas a fracção ligada aos óxidos de Fe não cristalino foi próxima à de São

Domingos havendo diferenças significativas na quantidade associada à matéria orgânica, óxidos de Mn e Fe cristalino.

De acordo com Mengel e Kirkby (1987), o Cu ao nível do solo apresenta uma forte ligação à matéria orgânica contudo, face às baixas quantidades de matéria orgânica existente nos solos amostrados, esta fracção apresentou uma percentagem baixa. De uma maneira geral, o Cu também apresentou menor afinidade com os óxidos de Mn, independentemente da área amostrada.

3.2.2.4 Mercúrio

Devido ao teor total de Hg no solo estar condicionado pelo limite de detecção não foi possível avaliar as percentagens deste elemento associadas às fases suporte do solo. No Quadro 12 apresentam-se os valores relativos ao teor de Hg ligado à matéria orgânica.

Quadro 12 – Teor em mercúrio associado à matéria orgânica no solo contaminado da mina de São Domingos (SD) e nos solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

Parcelas	Teor em Hg (mg/kg)
SD01	1,56 \pm 1,10
SD02	Nd
SD03	Nd
C04	0,44 \pm 0,31
C05	0,23 \pm 0,33
C06	4,34 \pm 0,79
P07	2,11 \pm 0,79
P08	2,67 \pm 0,001
P09	2,66 \pm 1,57

Nd – não detectável.

Os solos das parcelas de São Domingos e do Caldeirão apresentaram diferenças significativas entre si. Os teores obtidos nos solos de São Domingos foram os mais baixos em relação às restantes áreas sendo observado que, em duas parcelas não foi detectado este elemento. O Pomarão distinguiu-se significativamente das restantes áreas com teores superiores.

Relativamente ao Hg associado aos óxidos de Fe e Mn os valores obtidos foram inferiores ao limite de detecção, independentemente da área de amostragem.

3.2.2.5 Zinco

As percentagens relativas à quantidade total de Zn associado às diferentes fracções do solo apresentam-se na Figura 25 sendo que, a fracção residual foi obtida por diferença do teor total.

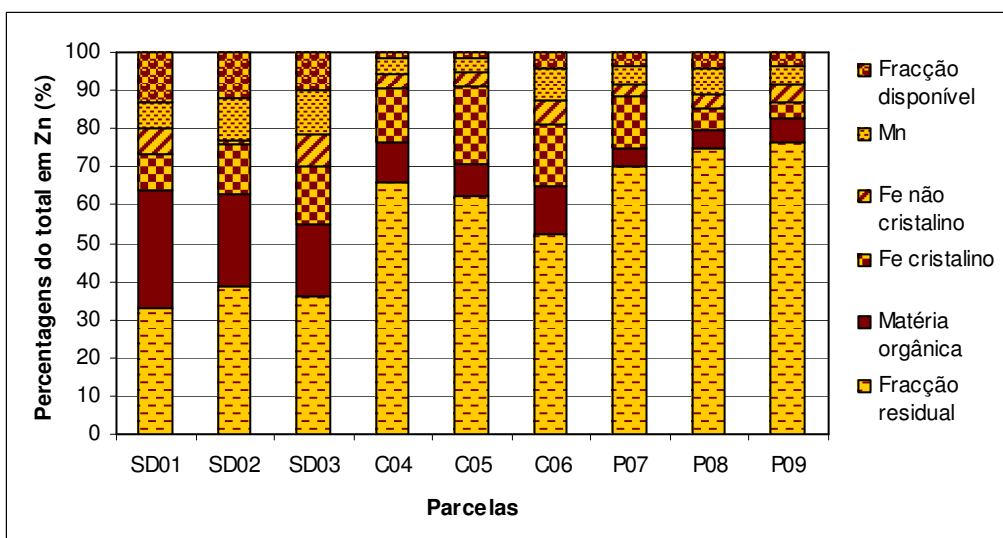


Figura 24 – Percentagens do total em zinco associadas às diferentes fracções do solo contaminado da mina de São Domingos (SD) e dos solos referência da Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

De uma análise geral pode-se verificar que a distribuição deste elemento nos solos de São Domingos foi diferente das outras áreas. Assim, apesar de o teor total em Zn ser menor em São Domingos a sua disponibilidade representou percentagens que

rondaram os 10% do total, numa solução de nitrato de cálcio. Nas outras áreas a fracção disponível na mesma solução foi menor tendo sido significativamente semelhantes entre si (1,41-4,07% no Caldeirão; 3,46-4,26% no Pomarão). Deste modo observou-se que São Domingos se distinguiu significativamente das restantes áreas.

Em São Domingos, a fracção associada à matéria orgânica e à fracção residual apresentaram as maiores contribuições (MO: 18,77-31,09%; R: 43,03-47,34%). Assim, o Zn está maioritariamente na fracção residual, o que está de acordo com os resultados obtidos por Lázaro *et al.* (2006). Por outro lado, as fracções ligadas aos óxidos de Fe e Mn apresentaram valores médios inferiores a 12%.

Os solos do Caldeirão e do Pomarão apresentaram elevados valores associados à fracção residual (52,48-65,92% e 69,91-76,35%, respectivamente), que são superiores aos de São Domingos para a mesma fracção. Relativamente às restantes fracções, pode-se verificar que nos solos do Pomarão o Zn estava distribuído uniformemente. Nos solos do Caldeirão, a presença de maiores concentrações em óxidos de Fe cristalino e matéria orgânica (Figura 15 e Quadro 10) determinaram maiores percentagens de Zn associadas a essas fracções, quando comparadas com o solo do Pomarão.

A quantidade de elementos associados às várias fases de suporte do solo variou consoante a área de amostragem e, conseqüentemente, características de cada solo. Tal facto induziu, possivelmente, uma distribuição distinta dos elementos no solo. No entanto, constataram-se semelhanças na distribuição do As e Pb e por outro lado, entre o Cu e Zn. De uma maneira geral, a distribuição do As e Pb foram semelhantes nos solos das diferentes áreas sendo que, em São Domingos estes elementos ligaram-se maioritariamente à fracção residual enquanto que no Caldeirão e no Pomarão foi a fracção associada aos óxidos que teve maior contribuição. Relativamente ao Cu e Zn, os

solos de São Domingos apresentaram estes elementos ligados maioritariamente à fracção residual e matéria orgânica porém, nos solos do Caldeirão e do Pomarão foi a fracção residual que apresentou maior percentagem do teor total.

3.3 Análise química das plantas

3.3.1 Conteúdo dos elementos nas folhas

A absorção, distribuição interna e concentração de elementos nos tecidos vegetais pode variar com espécie, variedade de uma mesma espécie e do elemento químico (Soares *et al.*, 2001) logo, os valores de elementos químicos obtidos nos diferentes tipos de folhas apresentam-se a seguir.

Os métodos de análise dos elementos químicos nas amostras de *Cistus ladanifer* foram certificados com material de referência (folhas de choupo). No Quadro 13 apresentam-se os dados obtidos da análise do material certificado.

Quadro 13 – Concentrações de As, Cu, Hg, Pb e Zn certificadas e obtidas pelo método usado no material de referência de folhas de choupo. Média \pm DP, n = 9.

Elemento químico	Valor certificado ($\mu\text{g/g}$)	Valor obtido na extracção ($\mu\text{g/g}$)
As	0,37 \pm 0,09	1,35 \pm 0,64
Cu	9,3 \pm 1,0	4,86 \pm 1,49
Hg	0,026 \pm 0,003	Nd
Pb	1,5 \pm 0,3	2,73 \pm 0,58
Zn	37,0 \pm 3,0	40,74 \pm 4,72

Nd – não detectável

Da análise dos dados apresentados no Quadro 13 pode-se constatar que os valores obtidos para o Cu e Hg foram inferiores aos certificados podendo indicar que o método extractivo foi insuficiente para este tipo de amostra. Por outro lado, a não

detecção do Hg pode também sugerir que o método de leitura não tenha sido suficientemente sensível para as quantidades existentes nas amostras.

Os valores de As e Pb foram superiores aos certificados o que indica a possível ocorrência de contaminação das amostras. Apesar de todo material ter sido lavado previamente antes da sua utilização, com uma solução ácida a 10% durante o mínimo de 24 horas, esta pode não ter sido suficiente. Por último, o Zn apresentou valores ligeiramente superiores aos certificados.

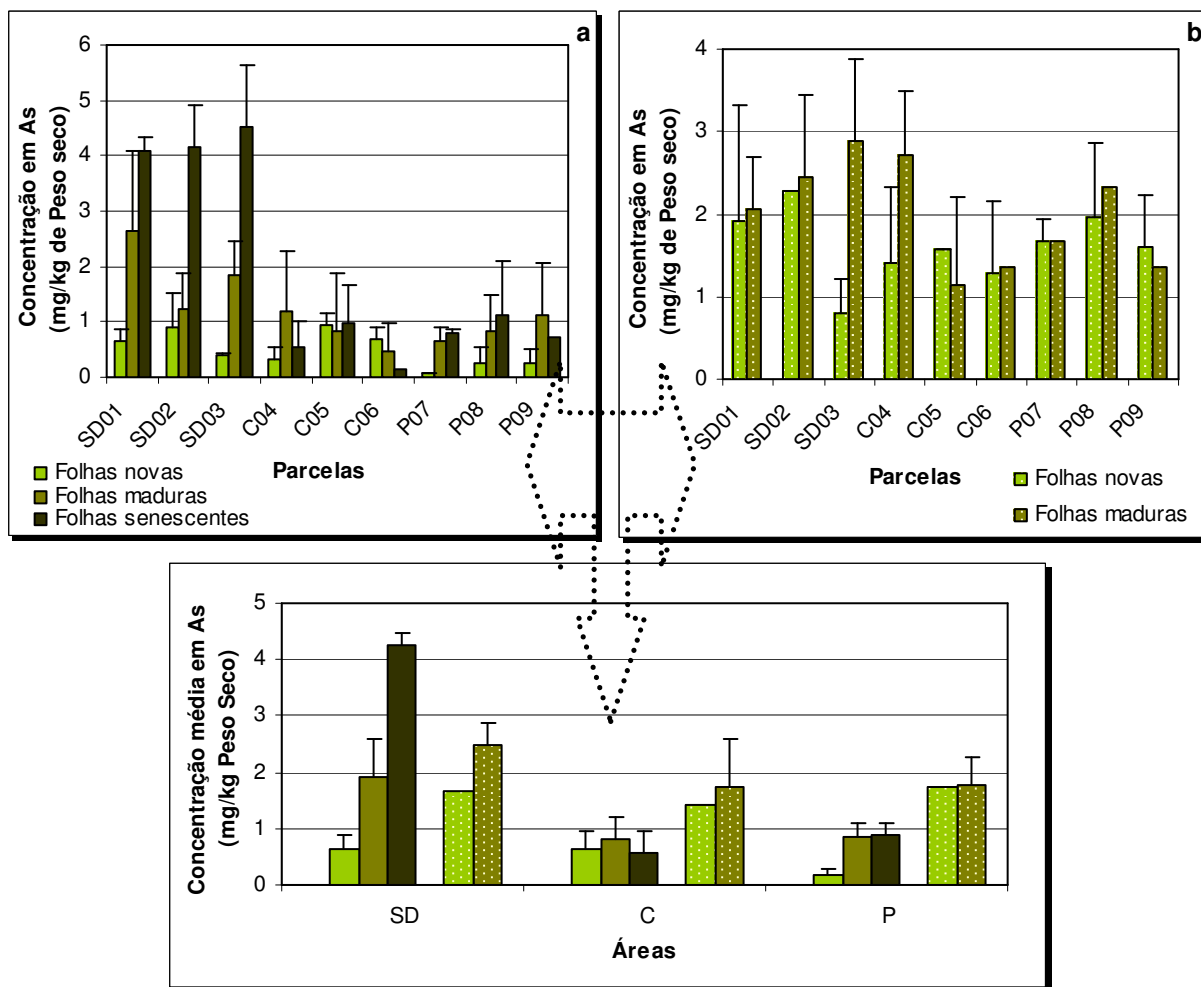
3.3.1.1 Arsénio

O arsénio não é um elemento essencial ao metabolismo vegetal sendo altamente tóxico para as plantas (Batista *et al.*, 2004). Como efeitos deste elemento nas plants podem-se citar inibição do crescimento (Stoeva e Bineva, 2003), alterações fisiológicas (Marim *et al.*, 1992; Stoeva e Bineva, 2003), redução da produtividade (Stepanok, 1998) e alteração do funcionamento de enzimas oxidativas (Stoeva e Bineva, 2003; Cao *et al.*, 2004).

3.3.1.1.1 Comparação das parcelas e áreas de amostragem

Na Figura 25 (a e b) apresentam-se os valores obtidos para o As nas folhas novas, maduras e senescentes de *Cistus ladanifer* colhidas na Primavera e Verão.

Na Primavera, a concentração de As nas folhas novas (Figura 25a) foi inferior a 1 mg/kg, independentemente da parcela e área de estudo o que pode sugerir uma baixa translocação do elemento para este tipo de folhas. Por outro lado, a tolerância a determinado elemento também pode estar associada à sua adsorção à parede celular ou à alteração da permeabilidade da membrana (Hall, 2002).



De uma maneira geral, o comportamento do As nas folhas de Primavera das parcelas de São Domingos e Pomarão foi semelhante sendo única exceção a parcela P09, onde não foi detectado As no solo (Figura 16). Este comportamento traduziu-se pelo aumento da concentração de As nas folhas maduras e senescentes no entanto, no Pomarão este acréscimo foi menos acentuado obtendo-se valores máximos que rondaram 1 mg/kg. Em São Domingos este aumento foi maior chegando a atingir, nas folhas senescentes, valores superiores a 4 mg/kg e que ultrapassam o limite de toxicidade para as plantas em geral que é, segundo Kabata-Pendias e Pendias (1985), de

2 mg/kg. A acumulação de As nas folhas senescentes parece sugerir uma estratégia de exclusão do elemento pela planta (Ernst *et al.*, 1992).

No Caldeirão observou-se uma variabilidade de comportamentos de acumulação de As consoante a parcela e, conseqüentemente, teor de As disponível no solo. Isto pode sugerir diferenças na absorção e/ou na translocação deste elemento dentro da planta (Soares *et al.*, 2001). Assim, de uma maneira geral as plantas na Primavera tiveram um comportamento de acumulação do As que se traduziu com o aumento do teor deste elemento das folhas novas para as maduras e, posteriormente, diminuição nas folhas senescentes. Em todos os tipos de folhas a quantidade de As estava sempre abaixo de 1 mg/kg.

No Verão, apesar de os teores de As nas folhas das diferentes parcelas (Figura 25b) serem superiores aos da Primavera, o comportamento de acumulação deste elemento manteve-se. Verificou-se desta forma que a concentração acumulada de As variou com a sazonalidade, tempo de exposição ao elemento e área de amostragem. As parcelas C06 e P09 foram as únicas exceções onde o comportamento de acumulação do As das folhas novas para as folhas maduras se inverteu, em relação ao observado na Primavera (Figura 25a). Este facto pode relacionar-se com os teores de As disponíveis no solo já que, estes eram os menores nas respectivas áreas de amostragem (Caldeirão e Pomarão).

Segundo Batista *et al.* (2004) o arsénio absorvido pelas estevas é transformado em formas orgânicas sendo englobado essencialmente nos tecidos vegetais já que, é facilmente trocado por azoto e fósforo nas vias metabólicas, formando compostos como arsenobetaína, arsenocolina e arseno-açúcares (Howard e Hunt, 1993).

Nas folhas novas colhidas no Verão, só a parcela SD02 (2,29 mg/kg) ultrapassou o valor considerado como tóxico (2 mg/kg peso seco) por Kabata-Pendias e Pendias

(1985) contudo, para as folhas maduras observaram-se concentrações tóxicas na área de São Domingos e nas parcelas C04 e P08, respectivamente das áreas do Caldeirão e Pomarão.

3.3.1.1.2 Fracção de As disponível para as plantas de *Cistus ladanifer*

Relacionando os teores de As disponível obtidos nos solos com as distintas soluções extractantes (Figura 16) e as concentrações do mesmo elemento nas folhas das plantas de *Cistus ladanifer* observou-se que a efectividade das soluções variou consoante o nível de contaminação. Assim, nos solos de São Domingos, onde os níveis de As foram elevados, a água foi a solução que obteve melhor correlação ($r=0,47$) no entanto, para os solos do Caldeirão e do Pomarão foi o DTPA ($r=0,48$; $r=0,30$, respectivamente).

Deste modo, apesar de os solos de São Domingos apresentarem teores totais de As extremamente elevados (Quadro 11) a fracção disponível para as plantas não excedeu 0,23 mg/kg, a qual corresponde a uma percentagem inferior a 0,01% do teor total. A maior quantidade de As disponível para as plantas foi observada nos solos do Caldeirão (0,01-0,35 mg/kg) onde os valores variam entre 0,11% e 1,75% do teor total.

Os solos do Pomarão apresentaram as menores concentrações de As disponível no entanto, é de referir que a distribuição não uniforme deste elemento pelas parcelas pode estar dependente da proximidade da antiga linha-férrea, pela qual se transportava o minério até ao Porto do Pomarão. Assim, as parcelas próxima da linha-férrea (P07, P08) apresentaram a mesma percentagem de As disponível (0,12%) contudo, na parcela mais afastada (P09) não foi detectado As disponível.

3.3.1.1.3 Índice de acumulação do As nas plantas de *Cistus ladanifer*

Os valores obtidos no índice de acumulação do As nas plantas de *Cistus ladanifer* segundo Farago e Merha (1991) constam no Quadro 14.

Quadro 14 – Valores obtidos para o índice de acumulação de As nas plantas de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Parcelas	Índice de acumulação*
SD01	0,00
SD02	0,00
SD03	0,00
C04	0,08
C05	0,06
C06	0,05
P07	0,06
P08	0,08
P09	0,07

*índice de acumulação = concentração do elemento na planta/concentração do elemento no solo

Considerando este índice pode-se afirmar que em nenhuma das áreas de estudo as plantas *Cistus ladanifer* se comportaram como acumuladoras de As já que, todos os valores obtidos para o referido índice foram <1. Contudo, é de notar que este índice utiliza o teor total do elemento no solo que não corresponderá, como referimos anteriormente, à quantidade que estará disponível para os organismos.

Assim, apesar de os valores de As disponível nos solos serem semelhantes entre as várias áreas (Figura 16) as plantas de São Domingos apresentaram o dobro da concentração de As do das plantas das outras áreas. Logo, embora a população de São Domingos não seja, segundo Farago e Merha (1991), acumuladora esta concentrou maior quantidade de As nas suas folhas.

3.3.1.2 Chumbo

O chumbo é um contaminante que se acumula nos solos e que é facilmente absorvido pelas plantas contudo, não é um elemento essencial para estas causando vários sintomas de fitotoxicidade quando em concentrações elevadas (Sharma e Dubey, 2005).

3.3.1.2.1 Comparação das parcelas e áreas de amostragem

Os teores deste elemento nas diferentes folhas de *Cistus ladanifer* colhidas na Primavera e Verão apresentam-se na Figura 26 (a e b).

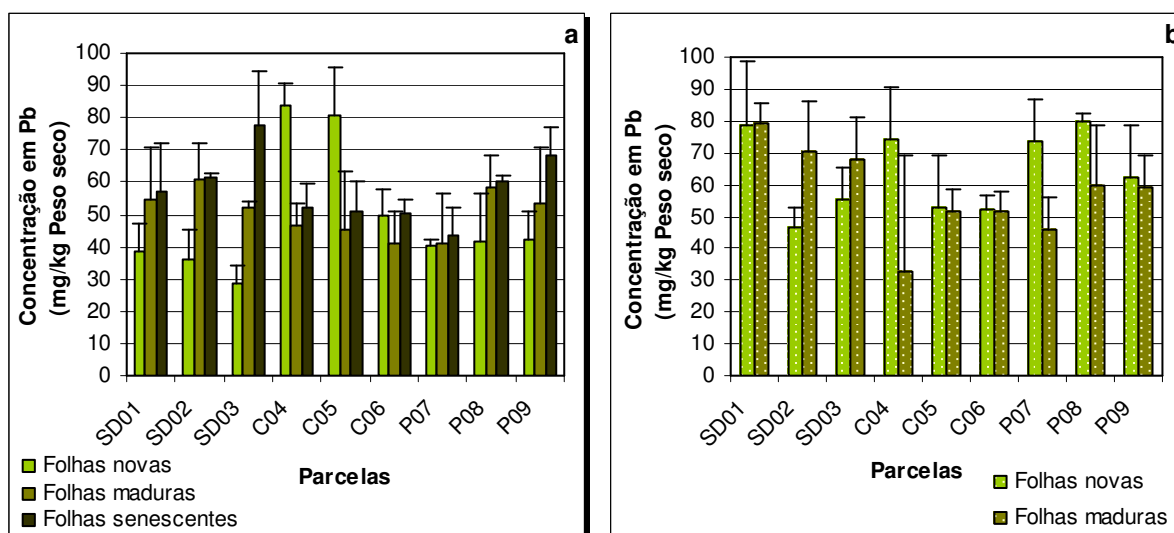


Figura 26 – Concentração em chumbo em folhas novas, maduras e senescentes de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera (a) e Verão (b), provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média ± DP, n = 3.

O comportamento de acumulação do Pb nas folhas de Primavera de *Cistus ladanifer* (Figura 26a) difere consoante a área de amostragem contudo, dentro de cada área observou-se semelhanças entre as parcelas.

A tendência de aumento do teor de Pb das folhas novas para as senescentes também foi observada nas folhas originárias do Pomarão, sendo as concentrações

semelhantes entre o Pomarão e São Domingos. É de referir que embora o comportamento e concentração de Pb nas folhas das duas áreas sejam semelhantes as concentrações de Pb disponível para as plantas foram diferentes. Face a isto, pode-se sugerir que as plantas de São Domingos possuem uma forte capacidade de retenção do Pb, provavelmente nas raízes, que lhes permite sobreviver em locais contaminados. Esta retenção do Pb pode basear-se na ligação em locais de troca iónica localizados na parede celular ou na precipitação extracelular, principalmente sob a forma de carbonatos, e sua deposição também na parede celular (Sharma e Dubey, 2005).

As folhas de Primavera da população da Serra do Caldeirão apresentaram maior teor de Pb nas folhas novas (49,45-84,13 mg/kg) em relação aos estádios mais desenvolvidos das folhas, que pode ser devido às maiores quantidades de Pb disponível no solo. Em presença de elevadas concentrações de Pb, a estrutura da endoderme nas raízes pode ser alterada e conseqüentemente a sua função de barreira (limitação da translocação) conduzindo a entrada de Pb para os tecidos vasculares e, posteriormente, para a parte aérea (Sharma e Dubey, 2005). A discrepância entre os teores das folhas novas das diferentes parcelas desta área pode também estar relacionada com a proximidade a um caminho por onde passam veículos rurais já que, o Pb particulado proveniente dos veículos é depositado maioritariamente na proximidade da fonte de emissão (Paoliello e Chasin, 2001).

Para as folhas maduras colhidas na Primavera no Caldeirão, os valores foram semelhantes entre as parcelas, e mais baixos que nas folhas novas, verificando-se um aumento da concentração das folhas maduras para as senescentes (Maduras: 41,3-46,71 mg/kg; Senescentes 50,15-52,19 mg/kg). Este facto pode sugerir a existência de grande mobilidade do Pb na planta devido às formas de Pb existentes no interior da planta (Yang *et al.*, 1993). A acumulação dos elementos químicos não depende unicamente da

sua absorção mas, também, da sua retenção no interior dos tecidos vegetais (Greger, 1999). Em trabalhos realizados por Liu *et al.* (2003) também foram observadas diferenças na translocação do Pb em plantas de diferentes culturas de arroz.

As variações de comportamento do Pb nas plantas de *Cistus ladanifer* podem também relacionar-se com as condições climáticas existentes já que, as populações de São Domingos e Pomarão (locais mais secos) diferiram das do Caldeirão (local relativamente mais húmido).

Nas folhas colhidas no Verão (Figura 26b), as parcelas de São Domingos e do Caldeirão apresentaram a mesma tendência de acumulação que a observada na Primavera. Assim, em São Domingos o teor em Pb aumentou com o desenvolvimento das folhas porém, no Caldeirão diminuiu. Analisando as parcelas destas áreas, pode observar-se que os teores de Pb obtidos nas folhas maduras (SD: 67,81-79,37 mg/kg; C: 32,74-51,63 mg/kg) foram semelhantes entre as parcelas de cada área contudo, as folhas novas não apresentaram homogeneidade entre elas, distinguindo-se as parcelas SD01 (78,69 mg/kg) e C04 (74,18 mg/kg) com maior teor.

Por outro lado, comparando as concentrações entre as duas estações constatou-se que, de uma maneira geral, em ambos os tipos de folhas de São Domingos os teores de Pb aumentaram em relação à Primavera enquanto que no Caldeirão desceram. Isto conduziu a que a concentração nas folhas novas fosse semelhante em São Domingos e no Caldeirão (SD: 46,50-78,69 mg/kg; C: 52,34-74,18 mg/g).

No Pomarão, o padrão de comportamento de acumulação verificado nesta estação foi o inverso do da Primavera porém, semelhante em todas as parcelas. Deste modo pode-se observar um decréscimo da concentração do Pb com o desenvolvimento das folhas. Em relação às concentrações obtidas, verificou-se que as folhas desta área continham mais Pb no Verão que na Primavera (Novas: 62,56-80,17 mg/kg; Maduras:

46,04-59,70 mg/kg). Este acréscimo foi nítido nas folhas novas de Verão já que, ultrapassou o teor de Pb das folhas novas colhidas nesta estação em todas as parcelas de São Domingos (55,25-78,69 mg/kg).

Verificou-se desta forma uma variabilidade na concentração do Pb em relação à sazonalidade. Martin e Coughtrey (1982) também observaram este aumento da concentração de Pb da Primavera para o Verão em aveleiras.

De uma maneira geral pode-se verificar que todos os tipos de folhas, independentemente da área de amostragem e época de recolha, atingiram a faixa de valores de Pb considerada como fitotóxica (30-300 mg/kg) por Kabata-Pendias e Pendias (1992). A única excepção foi nas folhas novas de Primavera da parcela SD03 cujo valor (28,86 mg/kg) se aproximou do limite. Tal facto pode dever-se ao Pb ser considerado um elemento facilmente absorvido pelas raízes (Sharma e Dubey, 2005) e que pode ser acumulado em quantidades significativas pelas plantas dependendo da sua forma (Miller e Koeppe, 1971).

3.3.1.2.2 Fracção de Pb disponível para as plantas de *Cistus ladanifer*

Analisando os teores de Pb disponíveis no solo, obtidos com as distintas soluções extractantes (Figura 17), observou-se que a solução que se correlaciona melhor com a quantidade de Pb existente nas folhas das plantas de *Cistus ladanifer* variou consoante a área de amostragem. Assim, para a mina de São Domingos foi o acetato de amónio que apresentou correlação mais alta ($r=0,93$) no entanto, para as amostras do Pomarão e Serra do Caldeirão foram respectivamente, o DTPA ($r=0,96$) e o cloreto de cálcio ($r=0,60$) as soluções extractantes com as quais as correlações foram mais elevadas.

Embora os solos da mina de São Domingos tenham apresentado teores totais de Pb superiores (Quadro 11) a quantidade disponível para as plantas foi de 4,32 a 19,98 mg/kg, a qual representou menos de 0,27% do teor total do elemento. Para o Pomarão a quantidade disponível de Pb no solo foi a menor das três áreas (0,77-1,00 mg/kg), correspondendo a uma percentagem inferior a 2% do teor total de Pb no solo. Em contrapartida, no Caldeirão esta percentagem apresentou os maiores valores (28,92 e 33,08 mg/kg), o que corresponde a uma variação entre 43,16 e 89,41% do teor total. Estas variações podem ser devidas à influência das características dos constituintes do solo na retenção deste elemento, nomeadamente do teor em matéria orgânica.

3.3.1.2.3 Índice de acumulação do Pb nas plantas de *Cistus ladanifer*

Usando o índice proposto por Farago e Merha (1991) que avalia a acumulação dos elementos na planta, face à presença de elevadas concentrações de elementos químicos nos solos, obtiveram-se os valores constantes do Quadro 15.

Quadro 15 – Valores obtidos para o índice de acumulação de Pb nas plantas de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Parcelas	Índice de acumulação*
SD01	0,01
SD02	0,01
SD03	0,01
C04	0,89
C05	1,56
C06	1,25
P07	1,17
P08	1,67
P09	0,99

*índice de acumulação = concentração do elemento na planta/concentração do elemento no solo

A análise deste índice permite identificar diferenças intra e inter-populações. Na mina de São Domingos as plantas de *Cistus ladanifer* apresentaram-se como não-acumuladoras de Pb, devido ao índice de acumulação calculado ser <1. O comportamento observado nas plantas de São Domingos também foi verificado em estudos realizados na área mineira de Aljustrel por Alvarenga *et al.* (2004).

As populações do Caldeirão e Pomarão apresentaram-se como acumuladoras e não-acumuladoras consoante a parcela de estudo. É de referir que as plantas que se comportaram como não acumuladoras (C04 e P09) pertenciam às parcelas que continham maior teor total de Pb na respectiva área (Quadro 11) contudo, relativamente à fracção disponível possuíam uma concentração intermédia.

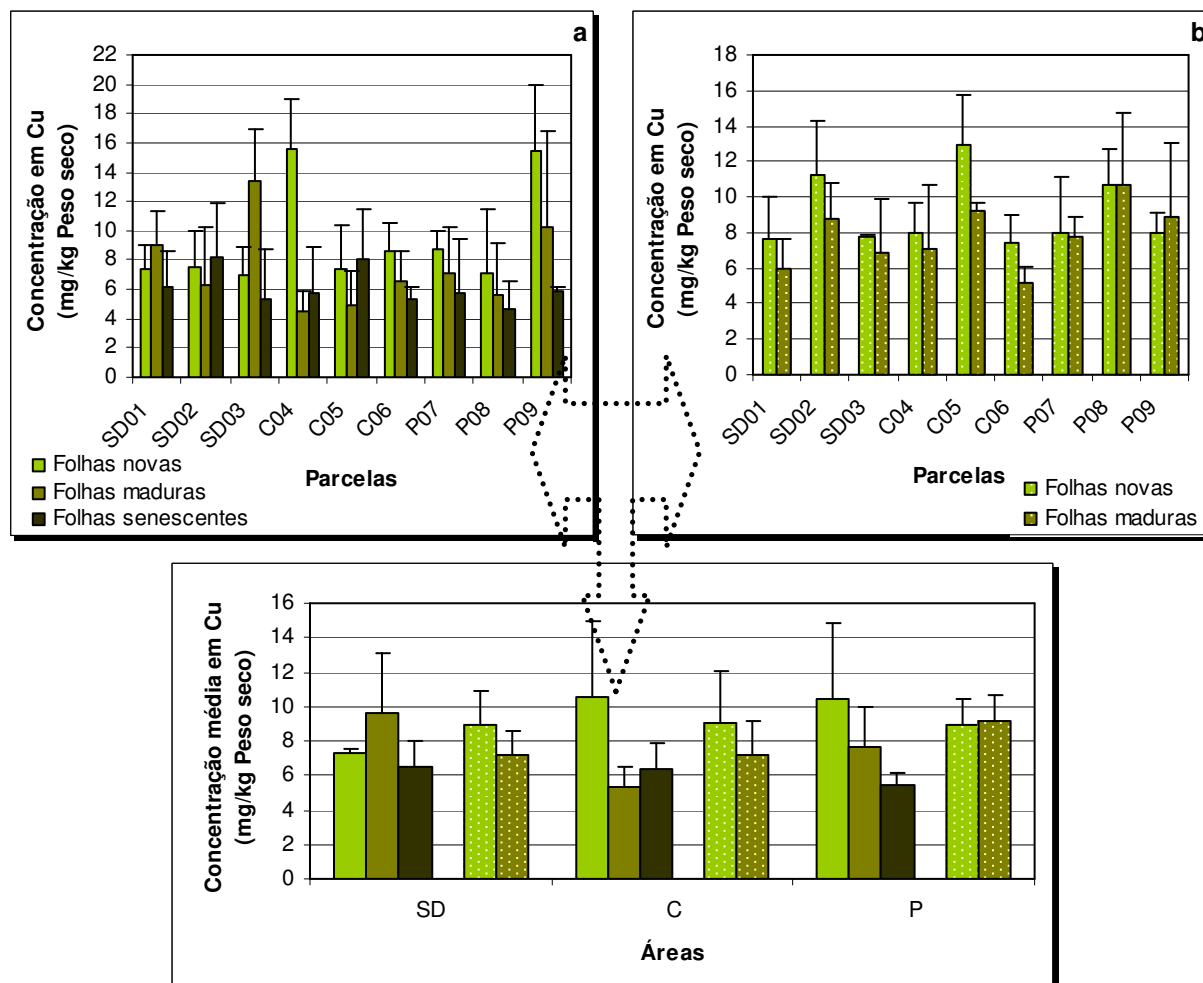
As variações encontradas podem sugerir que as plantas de *Cistus ladanifer* possuem comportamentos e adaptações que variam consoante o nível de contaminação existente e a forma na qual o elemento se encontra no solo.

3.3.1.3 Cobre

O cobre é um metal essencial que participa em vários processos fisiológicos das plantas no entanto, quando em quantidades elevadas pode produzir efeitos de fitotoxicidade (Yruela, 2005). Por outro lado, e segundo o mesmo autor, a indisponibilidade deste elemento no solo também pode alterar o desenvolvimento das plantas.

3.3.1.3.1 Comparação das parcelas e áreas de amostragem

As quantidades de Cu obtidas nas várias folhas de *Cistus ladanifer* apresentam-se na Figura 27 (a e b).



Os dados da Figura 27a indicam que o comportamento de acumulação do Cu nas plantas de *Cistus ladanifer* na Primavera variou consoante a área de amostragem. Por outro lado, dentro de cada área só o Pomarão apresentou homogeneidade deste comportamento nas diferentes parcelas.

As folhas novas de Primavera provenientes de São Domingos apresentaram os teores de Cu mais baixos em relação às restantes áreas de amostragem (6,94-7,53 mg/kg), porém semelhantes entre as parcelas. O comportamento de acumulação do Cu nas plantas da parcela SD02 foi diferente do observado nas restantes parcelas devido, possivelmente, à ocorrência de distintas estratégias de transporte do Cu face às

mudanças dos seus teores no solo (Yruela, 2005). De uma maneira geral, nas folhas maduras o teor de Cu aumentou para um valor médio de 9,57 mg/kg diminuindo, posteriormente, nas folhas senescentes (6,55 mg/kg).

Embora no Caldeirão e Pomarão as folhas novas de Primavera apresentassem concentrações semelhantes (7,39-15,56 mg/kg e 7,16-15,57 mg/kg respectivamente) a sua tendência nas folhas mais desenvolvidas diferiu. A acumulação do Cu nas plantas do Caldeirão variou consoante a parcela de estudo devido, possivelmente, à existência de diferenças na sua absorção, transporte no xilema e acumulação nas células das folhas (Clemens *et al.*, 2002).

Numa das parcelas do Caldeirão (C06) e no Pomarão pode observar-se uma diminuição progressiva do teor de Cu das folhas novas às senescentes (C06: Maduras 6,59 mg/kg; Senescentes 5,36 mg/kg; P: Maduras 5,63-10,21 mg/kg; Senescentes 4,58-5,81 mg/kg). Nas restantes parcelas do Caldeirão esta diminuição só se verificou até às folhas maduras (Maduras: 4,46-4,98 mg/kg; Senescentes: 5,78-8,10 mg/kg). É ainda de salientar que a parcela P09 obteve os maiores teores de Cu bem como as folhas novas de C04, em relação às restantes parcelas, devido a possuir superior quantidade disponível de Cu no solo.

Nas folhas colhidas no Verão (Figura 27b) pode-se verificar que as concentrações de Cu nas folhas e o seu comportamento de acumulação se alteraram em relação ao observado na Primavera. Assim, a concentração em Cu nas folhas novas de São Domingos aumentou para um valor médio de 8,88 mg/kg enquanto que nas maduras desceu para um valor médio de 7,20 mg/kg, em relação às folhas de Primavera. Nas restantes áreas as alterações foram inversas ao observado em São Domingos.

Por outro lado é de salientar que em todas as parcelas de São Domingos e do Caldeirão se verificou um decréscimo do teor em Cu das folhas novas às folhas maduras

(SD: Novas 7,73-11,23 mg/kg; Maduras 5,96-8,78 mg/kg; C: Novas 7,38-12,91 mg/kg; Maduras 5,13-9,23 mg/kg).

No Pomarão o comportamento de acumulação do Cu no Verão variou em relação ao observado na Primavera, não havendo uma homogeneidade entre as parcelas. Tal facto pode sugerir diferente mobilidade do elemento dentro da planta devido a afinidades distintas entre a forma do elemento e os transportadores ou agentes quelantes (Dučić e Polle, 2005). De uma maneira geral, observou-se um pequeno aumento da concentração em Cu das folhas novas para as folhas maduras (Novas: 8,87 mg/kg; Maduras: 9,11 mg/kg) porém, este não foi significativo.

Deste modo pode-se afirmar que a variabilidade na concentração do Cu em relação à sazonalidade variou consoante o tipo de folha e área de amostragem. Em ambas as estações, as várias populações de *Cistus ladanifer* apresentaram comportamentos de distribuição e acumulação do Cu diferentes podendo sugerir a existência de mecanismos de transporte distintos face às mudanças do meio.

Em ambas as estações de recolha verificou-se que o conteúdo em Cu, independentemente do tipo de folha e parcela de estudo, não ultrapassou o valor tóxico de 20 mg/kg (Kabata-Pendias e Pendias, 1992) nem atingiu os níveis de carência de 4 mg/kg (Alloway, 1995).

3.3.1.3.2 Fracção de Cu disponível para as plantas de *Cistus ladanifer*

Da comparação entre as diferentes soluções extractantes da fracção disponível (Figura 18) verificou-se que para os solos do Caldeirão e do Pomarão existia uma forte correlação entre a quantidade de Cu extraída com a água e a quantidade do mesmo elemento nas folhas das plantas (respectivamente, $r=0,96$ e $r=1,00$). A quantidade de Cu disponível para as plantas de *Cistus ladanifer* nestas áreas não contaminadas foi

semelhante (C: 0,02-0,05 mg/kg; P: 0,03-0,1 mg/kg) correspondendo a menos de 0,07% do teor total, em ambos os casos.

Para a mina de São Domingos nenhuma das soluções extractantes se correlacionou positivamente com a concentração existente nas plantas de *Cistus ladanifer*, o que pode sugerir um mecanismo de exclusão face às elevadas concentrações existentes no solo.

3.3.1.3.3 Índice de acumulação do Cu nas plantas de *Cistus ladanifer*

Usando o índice proposto por Farago e Merha (1991) para a avaliação da acumulação do Cu nas plantas de *Cistus ladanifer*, obtiveram-se os valores apresentados no Quadro 16.

Quadro 16 – Valores calculados para o índice de acumulação do Cu nas plantas de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Parcelas	Índice de acumulação*
SD01	0,03
SD02	0,04
SD03	0,04
C04	0,10
C05	0,16
C06	0,16
P07	0,08
P08	0,08
P09	0,06

*índice de acumulação = concentração do elemento na planta/concentração do elemento no solo

Apesar de os teores totais de Cu no solo variarem consoante a parcela e área de amostragem pode-se constatar que as plantas de *Cistus ladanifer* se comportam de igual modo, como plantas não acumuladoras. Resultados semelhantes foram obtidos por Alvarenga *et al.* (2004) em estudos feitos na área mineira de Aljustrel.

3.3.1.4 Mercúrio

Devido à elevada toxicidade do Hg torna-se importante a sua análise nos organismos nomeadamente nas plantas. Este elemento não foi detectado nas plantas analisadas com a metodologia usada pois, os vários tipos de folhas colhidas na Primavera e Verão das diferentes parcelas das áreas de amostragem estavam abaixo do limite de detecção do aparelho. Deste modo, teria sido interessante analisar também a quantidade deste elemento nas raízes de forma a verificar se existe restrição da sua absorção ou na translocação para a parte aérea.

3.3.1.5 Zinco

O zinco é um metal essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas porém, elevadas concentrações podem provocar sintomas de toxicidade (Hall, 2002 Kamal *et al.*, 2004).

3.3.1.5.1 Comparação das parcelas e áreas de amostragem

A análise da concentração em Zn nos diferentes tipos de folhas apresenta-se na Figura 28 (a e b).

Através dos dados obtidos na Figura 28a pode-se observar uma homogeneidade do comportamento de acumulação do Zn nas folhas de Primavera nas parcelas de cada área e, distinguir duas tendências diferentes: uma em São Domingos e Pomarão e, a outra, no Caldeirão.

Embora as concentrações de Zn nas folhas de Primavera da área de São Domingos tenham sido maiores (Novas: 81,10-133,40 mg/kg; Maduras: 142,73-176,90 mg/kg; Senescentes: 164,10-219,83 mg/kg) do que nas folhas do Pomarão (Novas:

60,13-82,97 mg/kg; Maduras: 85,80-101,80 mg/kg; Senescentes: 95,17-109,43 mg/kg), o aumento do Zn com o desenvolvimento das folhas foi semelhante. Esta acumulação nas folhas senescentes pode sugerir uma estratégia de exclusão do Zn aquando da queda das folhas (Ernst *et al.*, 1992) funcionando também como indutora da produção de etileno promotor da senescência (Fuher, 1988).

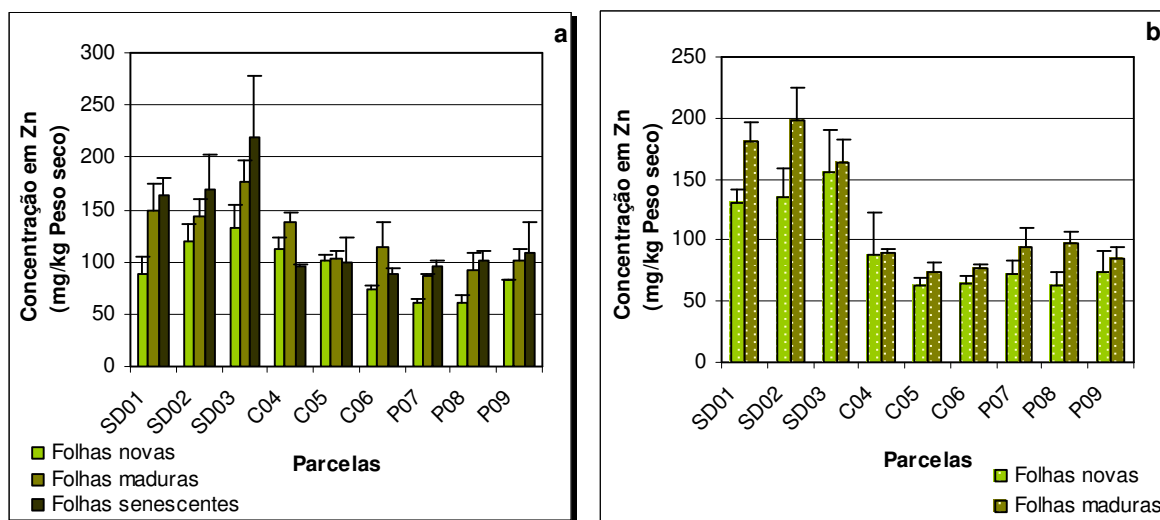


Figura 28 – Concentração em zinco em folhas novas, maduras e senescentes de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

No Caldeirão verificou-se um aumento da concentração de Zn das folhas novas (73,33-112,27 mg/kg) para as maduras (102,77-137,37 mg/kg) e uma diminuição para as folhas senescentes (87,33-99,37 mg/kg). Assim observou-se que as folhas novas e senescentes apresentaram concentrações de Zn semelhantes.

Analisando os resultados em relação à sua toxicidade constatou-se que só alguns tipos de folhas colhidas na Primavera e de determinadas parcelas excediam o limite considerado como tóxico (100-400 mg/kg) por Kabata-Pendias e Pendias (1985). De uma maneira geral, as folhas de São Domingos, as folhas maduras do Caldeirão e as senescentes do Pomarão apresentaram uma concentração considerada como tóxica.

Porém, é de salientar que existem folhas que apresentaram concentrações próximas do limite mínimo da gama de toxicidade (100 mg/kg).

Nas folhas colhidas no Verão (Figura 28b) observou-se uma homogeneidade no comportamento de acumulação do Zn nas áreas e parcelas, traduzida num aumento da concentração do Zn das folhas novas para as folhas maduras. Relativamente à quantidade de Zn verificaram-se diferenças em São Domingos e no Caldeirão quando comparadas com as concentrações das folhas da Primavera. Assim, em São Domingos a quantidade de Zn nas folhas de Verão foi maior que nas de Primavera (Novas: 130,47-155,40 mg/kg; Maduras: 164,30-198,30 mg/kg) sendo a única área onde as folhas excederam a gama de concentrações considerada como tóxica por Kabata-Pendias e Pendias (1985). Martin e Cougtry (1982) também verificaram um comportamento semelhante ao das folhas de esteva de São Domingos isto é, a concentração de Zn em folhas de aveleira foi maior no Verão do que no princípio do ano. A elevada tolerância das plantas de *Cistus ladanifer* pode ser atribuída à ligação do Zn à membrana da célula e à sua precipitação com proteínas que o eliminam através de processos metabólicos (Ross, 1994).

No Caldeirão a concentração de Zn nas folhas de Verão diminuiu em relação à obtida nas de Primavera (Novas: 63,60-84,43 mg/kg; Maduras: 74,00-89,07 mg/kg) porém, no Pomarão as concentrações obtidas foram semelhantes nas duas estações (Novas: 63,37-74,53 mg/kg; Maduras: 85,40-97,00 mg/kg).

3.3.1.5.2 Fracção de Zn disponível para as plantas de *Cistus ladanifer*

Da análise dos teores de Zn obtidos nas folhas das plantas de *Cistus ladanifer* e nas diferentes soluções extractantes da fracção disponível do solo (Figura 20) verificou-se que, para todas as áreas de amostragem, a solução aquosa obteve a melhor correlação

(SD: $r=0,66$; C: $r=0,61$; P: $r=1,00$). Isto pode estar relacionado com as características do solo que permitem que o Zn se encontre em formas facilmente solúveis (Ross, 1994).

Embora o teor total de Zn nos solos do Caldeirão e do Pomarão tenha alcançado o considerado tóxico por Kabata-Pendias e Pendias (1985) pode-se observar que a sua disponibilidade foi baixa e igual à obtida em São Domingos (SD: 1,18-1,25 mg/kg; C: 1,05-1,28 mg/kg; P: 1,15-1,30 mg/kg). A fracção disponível obtida em todas as áreas correspondeu a uma percentagem menor de 1,2% do teor total.

3.3.1.5.3 Índice de acumulação do Zn nas plantas de *Cistus ladanifer*

Os valores calculados para o índice de acumulação (Quadro 17) proposto por Farago e Merha (1991) permitem avaliar a capacidade do *Cistus ladanifer* para a acumulação do Zn.

Quadro 17 – Valores calculados para o índice de acumulação do Zn em plantas de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Parcelas	Índice de acumulação*
SD01	3,71
SD02	4,14
SD03	2,76
C04	1,15
C05	1,18
C06	1,90
P07	1,24
P08	1,15
P09	0,93

*índice de acumulação = concentração do elemento na planta/concentração do elemento no solo

Embora existam diferenças na acumulação do Zn nos diferentes tipos de folhas, as plantas oriundas das distintas áreas não apresentaram diferenças no índice de acumulação. Assim, em todas as parcelas, excepto a P09 do Pomarão, as plantas de

Cistus ladanifer comportaram-se como plantas acumuladoras já que, o valor do índice foi >1 . O mesmo resultado foi observado em trabalhos realizados por Lázaro *et al.* (2006). Estes dados podem ser justificados pela fácil absorção pelas plantas deste elemento do solo como referido por Harrison e Chirgawi (1989).

Por outro lado, as plantas da parcela P09 comportaram-se como não-acumuladoras (<1) como verificado em Alvarenga *et al.* (2004) embora o valor do índice de acumulação seja muito próximo da unidade (0,93). Assim, ao contrário dos resultados obtidos por Alvarenga *et al.* (2004), as plantas de *Cistus ladanifer* estudadas nas áreas de São Domingos, Pomarão e Caldeirão podem, no geral, ser classificadas como acumuladoras de Zn.

3.3.2 Conteúdo dos elementos nas sementes

De modo a avaliar a mobilidade e acumulação dos elementos químicos na planta analisaram-se também as sementes, estruturas essenciais ao desenvolvimento de novas plantas de *Cistus ladanifer* e vegetalização das áreas mineiras. A seguir encontram-se os valores obtidos para cada um dos elementos estudados

3.3.2.1 Arsénio

Face à toxicidade deste elemento e aos seus efeitos nas plantas analisaram-se as sementes provenientes das diferentes áreas de amostragem de modo a avaliar a sua potencial utilização no processo de vegetalização de áreas mineiras. Os resultados obtidos apresentam-se na Figura 29.

As concentrações de arsénio nas sementes colhidas nas várias parcelas apresentaram diferenças significativas, nomeadamente as colhidas nas parcelas SD03 e

C04 que apresentaram teores superiores. É de referir que apesar de os teores em As nas sementes serem semelhantes entre as áreas de amostragem, as sementes do Pomarão obtiveram valores menores (1,26-1,58 mg/kg) apresentando as sementes de São Domingos as maiores concentrações (1,68-2,85 mg/kg).

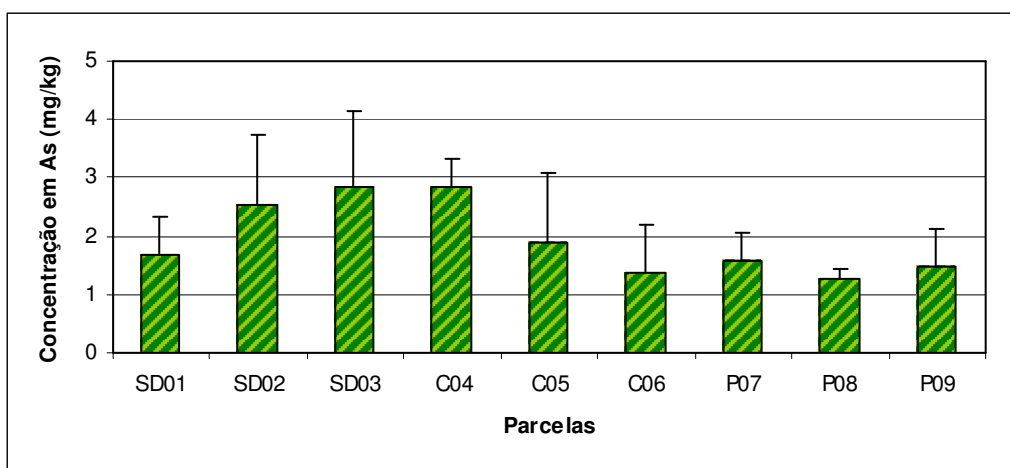


Figura 29 – Concentração em arsénio em sementes de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média ± DP, n = 3.

O comportamento deste elemento nos vários tipos de folhas e sementes de *Cistus ladanifer* apresentam-se de seguida:

- São Domingos:

Folhas senescentes > folhas maduras de Verão > sementes > folhas maduras de

Primavera > folhas novas de Verão > folhas novas de Primavera

- Serra do Caldeirão:

Sementes > folhas maduras de Verão > folhas novas de Verão > folhas maduras de

Primavera > folhas novas de Primavera > folhas senescentes

- Pomarão:

Folhas maduras de Verão > folhas novas de Verão > sementes > folhas maduras de

Primavera > folhas senescentes > folhas novas de Primavera

Deste modo pode-se observar que as plantas de *Cistus ladanifer* possuem comportamentos diferentes consoante a área de amostragem sugerindo uma elevada adaptabilidade face às diversas condições existentes nos locais. No entanto, é ainda de referir que, de uma maneira geral, as plantas de São Domingos e Pomarão possuem comportamentos relativamente semelhantes devido a estarem sujeitas às mesmas condições climáticas.

3.3.2.2 Chumbo

A toxicidade deste elemento traduz-se numa inibição da germinação das sementes (Sharma e Dubey, 2005), logo a sua quantificação é importante para a explicação da sua viabilidade. Os valores determinados nas sementes provenientes das várias áreas de estudo apresentam-se na Figura 30.

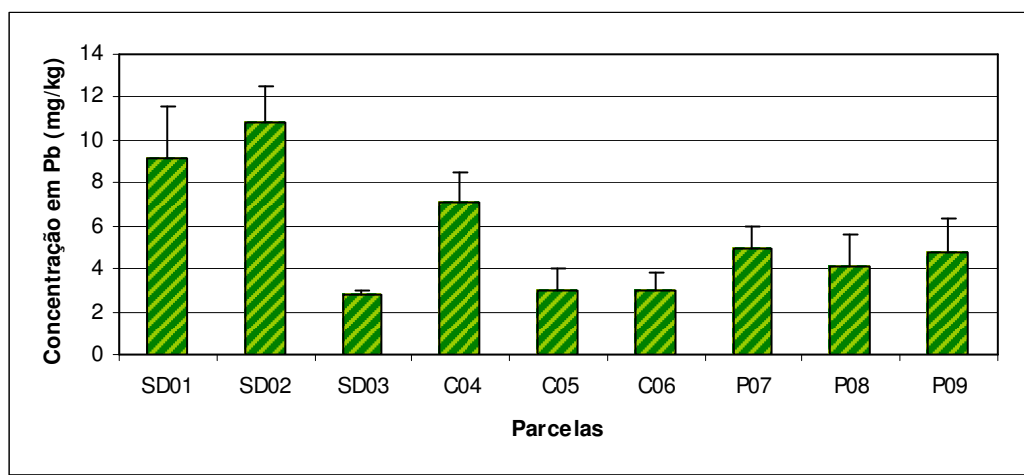


Figura 30 – Concentração em chumbo em sementes de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

Os teores em Pb nas sementes das várias parcelas apresentaram diferenças significativas devido aos teores superiores a 7 mg/kg obtidos nas parcelas SD01, SD02 e C04. É de notar que o Pomarão foi a área onde se observou menor heterogeneidade

entre as parcelas. No Caldeirão, a parcela C04 foi a mais próxima do caminho rural apresentando maior concentração em Pb nas sementes, tal como aconteceu com as folhas. Em São Domingos a variação existente entre as parcelas pode estar associada à heterogeneidade da matriz já que, são solos desenvolvidos sobre *gossan*. Apesar das sementes colhidas na área de São Domingos apresentarem, de uma maneira geral, valores superiores de Pb não se observaram diferenças significantes entre as três áreas (SD: 2,84-10,87 mg/kg; C: 2,97-7,05 mg/kg; P: 4,14-4,97 mg/kg).

O comportamento do Pb nas diferentes estruturas da planta de *Cistus ladanifer* é apresentado de seguida:

- São Domingos

Folhas maduras de Verão > folhas senescentes > folhas novas de Verão > folhas maduras de Primavera > folhas novas de Primavera > sementes

- Serra do Caldeirão

Folhas novas de Primavera > folhas novas de Verão > folhas senescentes > folhas maduras de Verão > folhas maduras de Primavera > sementes

- Pomarão

Folhas novas de Verão > folhas senescentes > folhas maduras de Verão > folhas maduras de Primavera > folhas novas de Primavera > sementes

Analisando a acumulação deste elemento nas folhas e sementes de *Cistus ladanifer* observaram-se diferenças consoante a área de amostragem contudo, as sementes foram as estruturas que obtiveram sempre menores concentrações, como apontado por Sharma e Dubey (2005) e Liu *et al.* (2003). Segundo estes últimos autores todas as estruturas desenvolvidas antes das sementes podem inibir a translocação deste

elemento. As plantas de *Cistus ladanifer* provenientes de São Domingos e Pomarão apresentaram comportamentos relativamente semelhantes traduzidos por menores teores de Pb nas folhas colhidas na Primavera. Tal facto pode sugerir a existência de mecanismos de sobrevivência diferentes face às condições climáticas relativamente mais secas desses dois locais de amostragem.

3.3.2.3 Cobre

Os micronutrientes, designadamente o cobre, embora necessários em pequenas quantidades são essenciais para a planta completar o seu ciclo vegetativo. As quantidades de cobre detectadas nas sementes oriundas das distintas áreas ilustram-se na Figura 31.

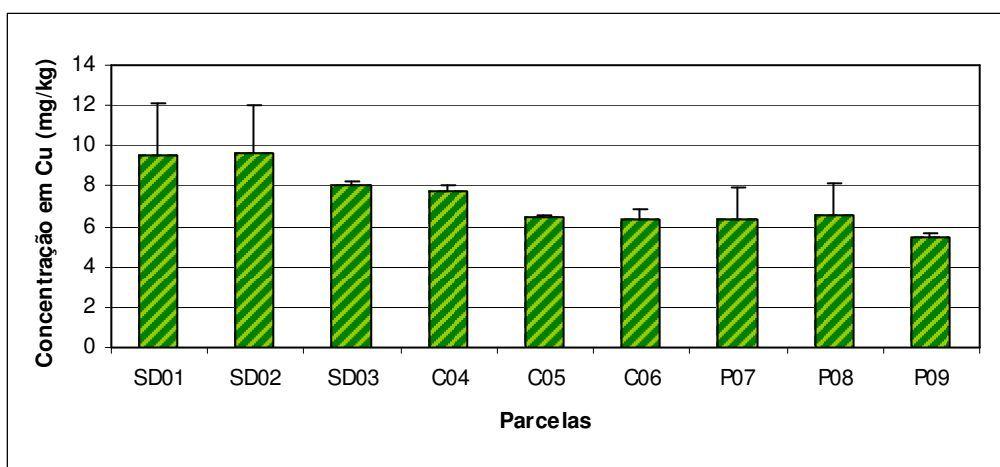


Figura 31 – Concentração em cobre em sementes de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

As sementes das parcelas SD01 e SD02 do São Domingos apresentaram concentrações de Cu superiores a 9,57 mg/kg havendo diferenças significativas entre as parcelas. Nas sementes do Caldeirão e Pomarão obtiveram-se valores de Cu semelhantes (C: 6,36-7,74 mg/kg; P: 5,48-6,58 mg/kg) não havendo variação entre as

parcelas. Assim, pode observar-se que as sementes colhidas em São Domingos apresentaram teores mais altos de Cu do que as colhidas nas restantes áreas.

O comportamento de acumulação do Cu nas folhas e sementes de *Cistus ladanifer* das diferentes áreas de amostragem apresenta-se de seguida:

- São Domingos

Folhas maduras de Primavera > sementes > folhas novas de Verão > folhas novas de Primavera > folhas maduras de Verão > folhas senescentes

- Serra do Caldeirão

Folhas novas de Primavera > folhas novas de Verão > folhas maduras de Verão > sementes > folhas senescentes > folhas maduras de Primavera

- Pomarão

Folhas novas de Primavera > folhas maduras de Verão > folhas novas de Verão > folhas maduras de Primavera > sementes > folhas senescentes

A acumulação do Cu pelas estruturas estudadas variou consoante a área de amostragem, sendo que em São Domingos e Pomarão apresentaram menores teores deste elemento nas folhas senescentes. Esta variabilidade de comportamentos pode sugerir a existência de diferentes estratégias de sobrevivência consoante as condições existentes no local.

3.3.2.4 Mercúrio

Nas sementes de todas as áreas de amostragem não foi detectável este elemento. Pode-se sugerir, de igual forma que para as folhas, a quantificação deste elemento através de outro método de análise.

3.3.2.5 Zinco

Este elemento, tal como o cobre, embora necessário ao desenvolvimento das plantas quando presente em elevadas concentrações pode causar inibições ao funcionamento das plantas. Na Figura 32 apresentam-se os valores relativos ao teor de Zn nas sementes das distintas áreas de amostragem.

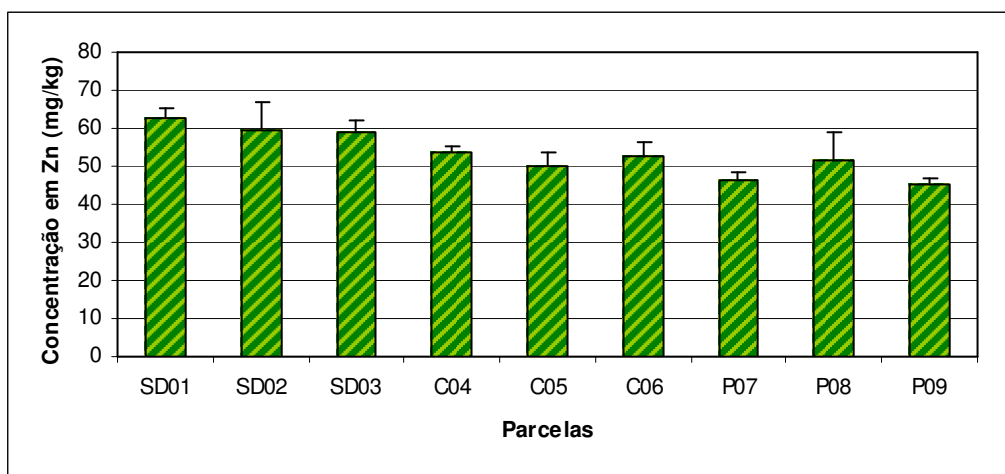


Figura 32 – Concentração em zinco em sementes de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

Os teores de Zn nas sementes não apresentaram diferenças significativas entre as parcelas de cada área de amostragem. As sementes de São Domingos foram as que apresentaram maior concentração em Zn (58,77-62,73 mg/kg) distinguindo-se, significativamente, das restantes áreas onde os valores foram semelhantes (C: 50,00-53,67 mg/kg; P: 45,47-51,43 mg/kg). É de salientar que apesar de se ter observado esta distinção entre as áreas a fracção disponível de Zn no solo foi semelhante em todos os locais.

A distribuição do Zn pelas várias estruturas das plantas de *Cistus ladanifer* é a seguinte:

- São Domingos e Pomarão

Folhas senescentes > folhas maduras de Verão > folhas maduras de Primavera > folhas novas de Verão > folhas novas de Primavera > sementes

- Caldeirão

Folhas maduras de Primavera > folhas novas de Primavera > folhas senescentes > folhas maduras de Verão > folhas novas de Primavera > sementes

Comparando a mobilidade do Zn nas plantas de *Cistus ladanifer* provenientes dos vários locais amostrados verificou-se que as plantas de São Domingos e do Pomarão apresentavam exactamente o mesmo comportamento que no entanto, se distinguiu do das plantas do Caldeirão. Esta variabilidade entre as áreas estudadas é influenciada, possivelmente, pelas condições climáticas existentes nas áreas e, em menor escala, pelos teores de Zn no solo.

3.4 Viabilidade das sementes

O excesso de elementos químicos no solo e nas plantas pode ser limitante da capacidade de germinação das sementes (Kabata-Pendias e Pendias, 1992). Assim, torna-se importante a avaliação da viabilidade das sementes de modo a conhecer a possibilidade de uso das sementes da própria área mineira na sua vegetalização. Os resultados relativos à germinação das sementes provenientes das plantas das várias áreas de estudo apresentam-se no Quadro 18 e Figura 33.

Analisando a evolução da germinação das sementes de *Cistus ladanifer* (Figura 33) verificou-se que, de uma maneira geral, foram necessários cerca de cinco dias para se iniciar este processo, independentemente da área de amostragem. A parcela P09 foi

uma exceção a este comportamento tendo-se observado sementes germinadas unicamente após 17 dias.

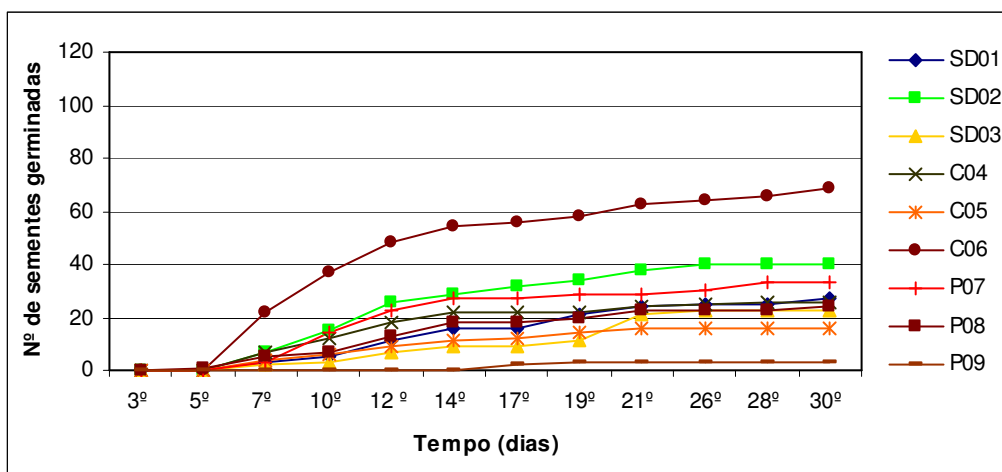


Figura 33 – Número de sementes germinadas de *Cistus ladanifer* provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Após este período de iniciação do processo de germinação verificou-se um progressivo aumento do número de sementes germinadas em todas as parcelas. Numa das parcelas do Caldeirão (C06) este aumento foi muito acentuado surgindo no 7º dia 22 sementes germinadas enquanto que nas restantes parcelas se verificou que unicamente germinaram entre três a sete sementes. É também de notar que esta parcela apresentou, entre o 19º e 21º dia, 50% de sementes germinadas enquanto que, as restantes parcelas do Caldeirão e das outras áreas não obtiveram este valor nem no final do período de análise (SD: 19-33%; C: 13-22%; P: 3-28%).

Comparando as parcelas no final do período de estudo pode-se observar elevada heterogeneidade na germinação das sementes dentro de cada área. Assim, independentemente do grau de contaminação existente nos solos, há variabilidade na germinação de sementes de *Cistus ladanifer* dentro da mesma população, tal facto também foi observado por Pérez-Garcia (1997). A produção de sementes com distinta

capacidade de germinação é uma das estratégias de sobrevivências mais importantes face às condições ambientais imprevisíveis (Gutterman, 1994).

Quadro 18 – Número total de sementes de *Cistus ladanifer* germinadas após 30 dias provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P).

Áreas	N.º total de sementes germinadas
SD	30
C	37
P	20

Analisando as áreas de amostragem (Quadro 18) pode-se verificar que não existiram diferenças significativas entre o número total de sementes germinadas (SD: 30,3%; C 38,7%; P: 20,7%) logo, as concentrações de elementos químicos nas sementes parecem não influenciar a germinação das mesmas.

3.5 Área foliar

A área das folhas pode estar associada às características fisiológicas e morfológicas da própria planta ou à influência dos factores externos. Na Figura 34 (a e b) apresentam-se as áreas foliares médias estimadas nas diferentes áreas de estudo na Primavera e Verão.

As áreas relativas a cada tipo de folha, colhidas na Primavera (Figura 34a), foram semelhantes entre as parcelas das respectivas áreas de amostragem. Por outro lado, verificou-se que as folhas maduras mostraram maior área, independentemente da área de amostragem, do que as novas observando-se dimorfismo foliar como indicado por Nuñez-Olivera *et al.* (1996). Assim, embora vários parâmetros possam influenciar a

diferença de tamanho entre os dois tipos de folhas, a razão primordial deve ser a existência de um maior período de expansão nas folhas maduras.

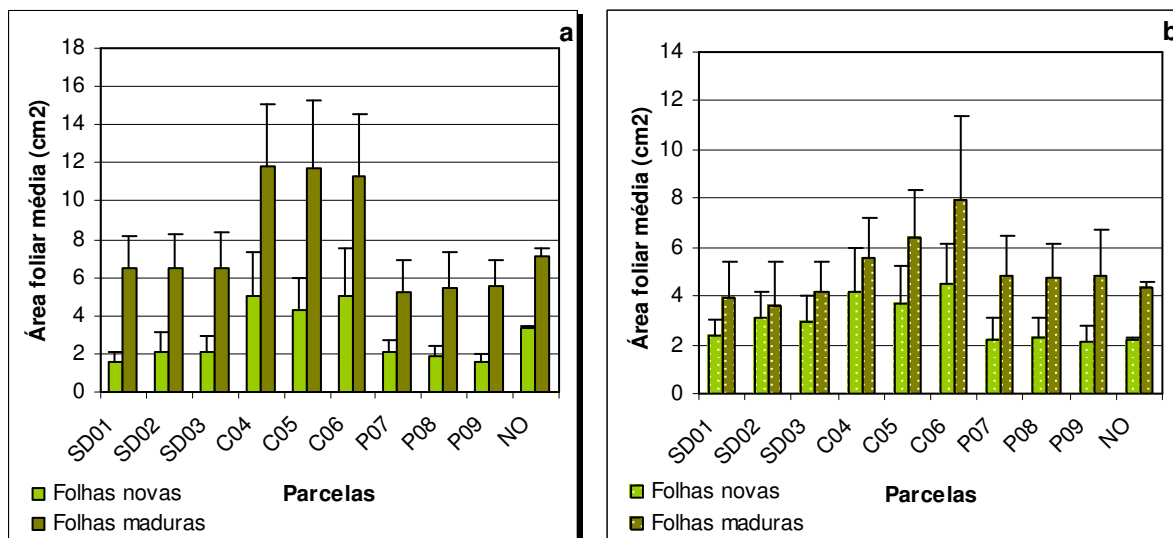


Figura 34 – Área foliar de folhas novas e maduras de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera (a) e no Verão (b), provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = [39;120]. NO – Valores obtidos por Nuñez-Olivera et al. (1996).

O início do desenvolvimento das folhas novas na Primavera dependeu do local de amostragem tendo sido na Serra do Caldeirão mais cedo do que na Mina de São Domingos e Pomarão. Este facto pode estar relacionado com as condições de maior humidade existentes no Caldeirão. Os resultados obtidos para a área das folhas novas indicaram diferenças significativas entre o Caldeirão, que foi onde apresentaram o maior valor (4,30-5,00 cm²) e as restantes áreas de amostragem. Embora os valores para a área foliar das plantas da mina de São Domingos e Pomarão sejam baixos é de referir que o Pomarão foi o local onde as folhas apresentaram menor valor (1,59-2,10 cm²).

Também é de salientar que os valores obtidos foram distintos do medido (3,3 cm²) por Nuñez-Olivera *et al.* (1996) para plantas da mesma espécie. Comparando os valores da área foliar das plantas de *Cistus ladanifer* colhidas nas áreas estudadas com as destes autores observou-se que as plantas do Caldeirão possuíam folhas novas de Primavera de maiores dimensões enquanto que as das restantes áreas foram menores.

As áreas das folhas maduras de Primavera apresentaram diferenças significativas em todas as áreas de estudo. Neste caso, as folhas oriundas do Caldeirão também apresentaram as maiores áreas (11,34-11,85 cm²) seguidas das de São Domingos (6,46-6,48 cm²) e, por último, as do Pomarão (5,23-5,51 cm²). A área foliar estimada em São Domingos e Pomarão foi novamente inferior à apresentada por Nuñez-Olivera *et al.* (1996) para as folhas maduras (7,1 cm²). As folhas maduras das plantas do Caldeirão apresentaram área foliar superior, como as folhas novas, ao indicado por estes autores, devido possivelmente à existência de maior fertilidade e água no solo.

Os valores mais baixos das áreas obtidas nas folhas maduras colhidas na Primavera em São Domingos e no Pomarão podem estar relacionadas com as condições climáticas existentes na região e variações do solo que determinam o conteúdo de água disponível ou quantidade de elementos absorvidos pelas plantas e presentes nas folhas. Assim, a redução do tamanho das folhas novas e maduras de São Domingos pode estar relacionado com a quantidade de As ($r=-0,910$) e Pb ($r=-0,719$) das folhas, já que possuem as maiores concentrações daqueles elementos em relação às restantes áreas (Figuras 25a e 26a). Resultados obtidos com *Pistia stratiotes* também mostraram diminuição da área foliar aquando do aumento do teor em Pb nas folhas (Odjegba e Fasidi, 2004).

No Pomarão, o tamanho das folhas novas pode ter sido influenciado pelo teor em Pb ($r=-0,988$) presente nas folhas pois, a planta é uma acumuladora deste elemento. Iqbal e Moshtaq (1987) indicaram que a acumulação do Pb retarda o crescimento da planta o qual se traduz também por uma redução da área foliar. Nas folhas maduras a diminuição da área parece não estar relacionada com nenhum dos elementos estudados mas, possivelmente, com a quantidade de água disponível no solo.

Nas folhas colhidas no Verão (Figura 34b) continuou a observar-se valores semelhantes entre as parcelas da respectiva área de estudo. Também, as folhas maduras apresentaram maiores áreas que as folhas novas – dimorfismo foliar (Nuñez-Olivera *et al.*, 1996).

As folhas novas colhidas no Verão nas plantas da Serra do Caldeirão evidenciaram novamente maiores áreas (3,67-4,46 cm²), sendo estas significativamente diferentes das restantes áreas. Para a mina de São Domingos e Pomarão as áreas obtidas para as mesmas folhas foram similares (SD: 2,35-3,10 cm²; P: 2,13-2,28 cm²) e, de uma maneira geral, muito próxima do valor de área foliar (2,2 cm²) referido por Nuñez-Olivera (1996) para as folhas novas de *Cistus ladanifer*. A P09 foi a única parcela onde as plantas apresentaram área foliar menor (2,13 cm²) que o indicado por estes autores. Comparando o valor indicado por Nuñez-Olivera *et al.* (1996) e os obtidos no Caldeirão verificou-se, de igual forma que na Primavera, que as áreas foliares foram superiores (3,67-4,46 cm²) ao referenciado.

As folhas maduras das plantas do Caldeirão apresentaram novamente no Verão os maiores valores de área foliar (5,54-7,98 cm²) seguidas das do Pomarão (4,71-4,84 cm²) e de São Domingos (3,61-4,18 cm²). Deste modo, observou-se que as áreas foliares das do Caldeirão se distinguiram significativamente das de São Domingos porém, semelhantes com o Pomarão. Segundo Nuñez-Olivera *et al.* (1996) as folhas maduras de *Cistus ladanifer* apresentam uma área média de 4,3 cm² assim, analisando os dados obtidos neste estudo verificou-se que as folhas das plantas do Caldeirão apresentaram área foliar maior que o indicado por estes autores enquanto que as de São Domingos foram inferiores. Os baixos valores de áreas foliares obtidos para as plantas de São Domingos, também observado na estação primaveril, podem estar relacionados

com o teor de Zn presente nas folhas maduras ($r=-0,999$), baixa fertilidade ou pela água disponível no solo.

Comparando as áreas foliares estimadas nas duas campanhas de recolha das folhas novas verificou-se que estas eram semelhantes não traduzindo por isso uma variação sazonal significativa. Nas folhas maduras, com excepção das do Pomarão, esta variação sazonal foi observada, como sugerido por Correia (2002) e Nuñez-Olivera *et al.* (1996). Deste modo, pode verificar-se que em São Domingos e Caldeirão as folhas colhidas no Verão apresentaram menor área foliar que as da Primavera. Esta diminuição da área foliar deve estar relacionada com o início da estação seca e a subida das temperaturas, sendo assim uma vantagem adaptativa para a redução da superfície de transpiração (Simões, 2002).

3.6 Conteúdo em água nas folhas

Na Figura 35 (a e b) apresentam-se os conteúdos de água nas folhas de *Cistus ladanifer* colhidas na Primavera e Verão.

O conteúdo em água das folhas de Primavera de *Cistus ladanifer* (Figura 35a) foi semelhante nas parcelas de cada área porém, variou consoante a área de amostragem e tipo de folha. De uma maneira geral, as folhas novas apresentaram um maior conteúdo em água que as folhas maduras, pois as suas necessidades em água e nutrientes são maiores em fase de crescimento.

As folhas colhidas na Primavera em São Domingos diferiram significativamente das restantes áreas, contendo sempre um teor menor em água (Novas 63,08-67,26%; Maduras: 59,46-60,88%). Isto pode estar relacionado com as condições climáticas e a disponibilidade de água no solo, que deverá ser menor nesta área, ou pela concentração de As presente nas folhas maduras ($r=-0,938$) que pode ter induzido a alteração do

mecanismo de absorção de água. Segundo Sharma e Dubey (2005) a alteração do conteúdo em água na planta na presença de Pb, pode ser devido à diminuição da área foliar e tamanho das células-guarda, indução do fecho estomático e ainda pelo decréscimo da concentração de compostos (por exemplo ABA) que promovem a turgescência das células.

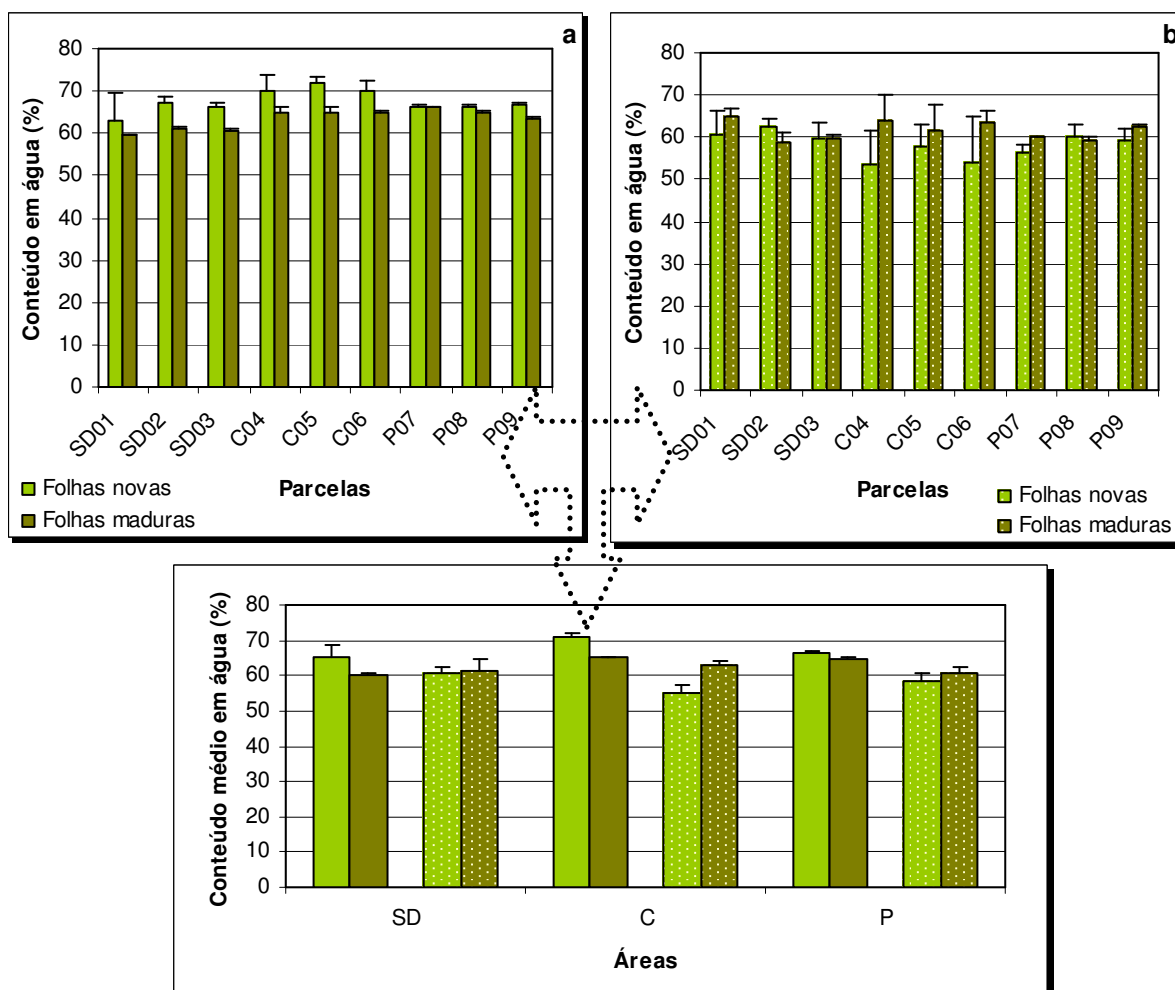


Figura 35 – Conteúdo em água em folhas novas e maduras de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera (a) e (b), provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

Por sua vez, as folhas colhidas na estação primaveril nas parcelas do Pomarão (Novas: 66,42-66,97%; Maduras: 63,44-66,07%) apresentaram valores semelhantes às folhas do Caldeirão, não havendo diferenças significativas entre o teor de água das

folhas destes locais. Nas parcelas do Caldeirão verificou-se para as folhas novas e maduras um valor superior (Novas: 70,14-71,85%; Maduras: 64,78-65,08%) ao das folhas das restantes áreas devido, possivelmente, às condições climáticas e consequente maior disponibilidade de água nesta zona.

No Verão, o teor em água nas folhas colhidas nas diferentes parcelas de amostragem (Figura 35b) diminuiu quando comparadas com o das folhas colhidas na Primavera, sendo exceção as folhas maduras da parcela SD02 de São Domingos. Esta ocorrência em São Domingos pode ser explicada pela acentuada queda de folhas que se observou durante o período de Verão. Assim, a queda de folhas ou até de pequenos ramos apicais, juntamente com a diminuição da área foliar podem permitir a minimização da água que seria perdida por transpiração.

Os conteúdos de água em ambos os tipos de folhas colhidas foram semelhantes entre as parcelas da respectiva área de amostragem. Por outro lado, a tendência de acumulação de água nas folhas colhidas no Verão variou em relação à observada na Primavera sendo que, na estação quente, as folhas maduras possuíam maior teor de água que as novas. Exceção a este facto, foi observado nas parcelas SD02 e P08 (SD02: Novas 62,69% Maduras 58,61%; P08: Novas 60,0% Maduras 59,63%). Deste modo, pode inferir-se que em São Domingos e Pomarão a acumulação de água nas folhas variou consoante a parcela devido às características do solo e sua capacidade de retenção de água.

De uma maneira geral, os resultados obtidos nas folhas novas (SD: 60,99 %; C: 55,01 %; P: 58,44 %) e maduras (SD: 61,01 %; C: 62,92 %; P: 60,66 %) desta estação foram semelhantes entre si. Apesar de todo o mecanismo de defesa contra as perdas de água possuir extrema importância para a sobrevivência destas plantas mediterrâneas este

parece não ter sido directamente influenciado pelas concentrações dos elementos estudados nas folhas.

3.7 Conteúdo em Pigmentos

3.7.1 Clorofilas

A monitorização da concentração total de clorofilas pode ser usada como um indicador em relação à acumulação dos elementos tóxicos nas plantas (Manios *et al.*, 2003). Segundo Abdel-Basset (1995) é ainda de salientar as mudanças nos dois componentes clorofilinos, *clorofila a* e *clorofila b*, devido ao facto de um elemento químico poder afectar isoladamente cada um destes componentes sem, no entanto, afectar o outro.

Nas Figuras 36 e 37 (a e b) apresentam-se as variações dos pigmentos clorofilinos em folhas colhidas na Primavera e Verão das diferentes áreas de amostragem.

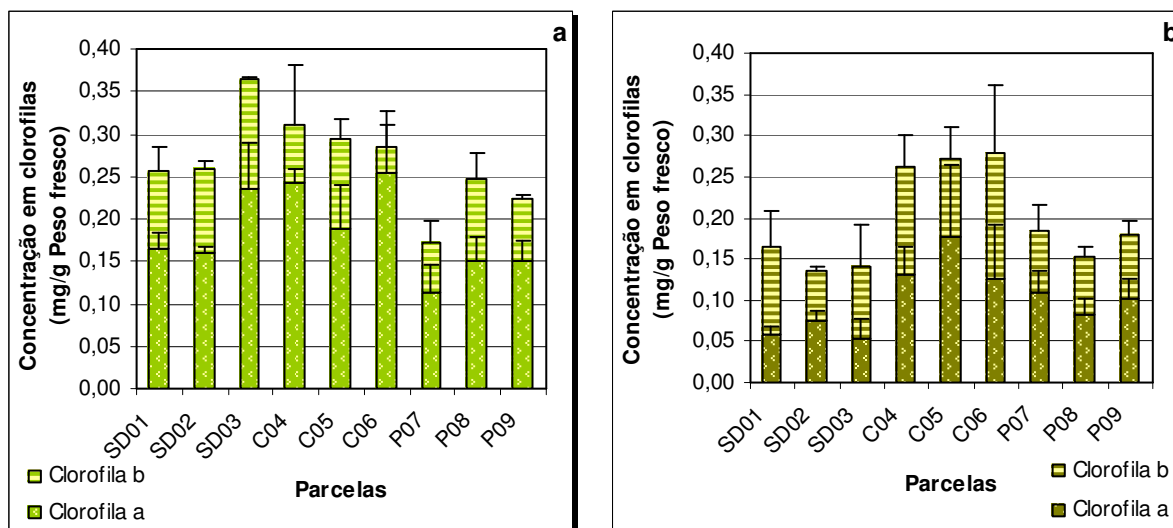


Figura 36 – Concentração em clorofila total e *clorofila a* e *b* em folhas novas (a) e maduras (b) de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média ± DP, n = 3.

Da análise dos resultados (Figura 36 a e b) podem-se observar variações nos componentes clorofilinos, em ambos os tipos de folhas de Primavera, consoante a área de amostragem e respectivas parcelas. A concentração de clorofila total nas folhas novas de Primavera foi, de um modo geral, maior que nas folhas maduras coincidindo com o sugerido por Nuñez-Olivera *et al.* (1996) para a mesma espécie de planta. Excepção a isto foi a parcela P07 onde os valores obtidos nas diferentes folhas foram semelhantes (Novas 0,172 mg/g; Maduras: 0,185 mg/g).

Os teores de clorofila total obtidos para as folhas novas de Primavera das parcelas do Caldeirão foram semelhantes entre si porém, analisando as áreas de São Domingos e Pomarão observou-se que as folhas das parcelas SD03 (0,364 mg/g) e P07 (0,172 mg/g) se distinguiram significativamente das folhas das restantes parcelas da mesma área. De uma maneira geral, os teores de clorofila total das folhas novas provenientes das várias áreas de amostragem não apresentaram diferenças significativas entre si (SD: 0,256-0,364 mg/g; C: 0,284-0,311 mg/g; P: 0,172-0,247 mg/g).

Relativamente às folhas maduras, as concentrações totais em clorofila obtidas nas parcelas de cada área de amostragem foram semelhantes entre si. As folhas do Caldeirão apresentaram maior teor total de clorofila (0,261-0,278 mg/g) distinguindo-se, significativamente, das folhas das restantes áreas que apresentaram valores semelhantes (SD: 0,137-0,166 mg/g; P: 0,152-0,185 mg/g). Estes baixos valores para as folhas de São Domingos e Pomarão podem estar relacionados com o elevado nível de radiação solar, temperatura do ar e baixa humidade que ocorre nas áreas conduzindo à diminuição do conteúdo em clorofilas (Maslova e Popova, 1993) a qual permite uma redução da actividade metabólica a um nível mínimo (Correia, 2002).

Em todas as áreas de amostragem observou-se um decréscimo da concentração da clorofila total das folhas novas para as maduras contudo, este comportamento só foi

significativo nas folhas provenientes de São Domingos. Este decréscimo acentuado da clorofila total pode estar relacionado com a acumulação de algum elemento nas folhas já que, segundo Abdel-Basset *et al.*, (1995) a acumulação de metais pesados nos tecidos das plantas conduz ao decréscimo da biomassa e da concentração de clorofilas nas folhas. Este declínio pode ser explicado pela inibição da biossíntese de clorofilas (Storbart *et al.*, 1985) ou pela degradação das mesmas devido a um aumento da actividade da clorofilase (Drazkiewicz, 1994). Assim, a diminuição observada em São Domingos parece estar relacionada com o teor em Pb nas folhas ($r=-0,971$) sendo observável também que variações destes dois parâmetros nas respectivas parcelas coincidem (Figura 26a). Esta alteração na composição de pigmentos provoca efeitos directos sobre a fotossíntese e, conseqüentemente, sobre a produtividade das plantas (Peixoto *et al.* 2005).

As folhas novas provenientes das parcelas do Pomarão e São Domingos apresentaram uma concentração de *clorofila a* semelhante (SD: 0,160-0,164 mg/g; P: 0,112-0,150 mg/g) sendo excepção a parcela SD03 (0,235 mg/g). Este valores distinguiram-se dos obtidos nas folhas do Caldeirão (0,188-0,255 mg/g), os quais foram semelhantes entre as parcelas. As folhas maduras provenientes das parcelas de São Domingos e Pomarão também apresentaram valores de *clorofila a* semelhantes (SD: 0,059-0,075 mg/g; P: 0,083-0,108 mg/g) no entanto, a área do Caldeirão mostrou diferenças entre as parcelas. Assim, foram as folhas maduras de São Domingos que obtiveram valores inferiores de *clorofila a* sendo, também, significativamente diferentes das do Caldeirão (0,127-0,178 mg/g).

Embora se tenha observado em todas as áreas uma evidente diminuição da concentração da *clorofila a* das folhas novas para as folhas maduras, notou-se que esta redução só foi significativa em São Domingos. Esta diminuição brusca em São

Domingos parece estar relacionada com o teor de Pb ($r=-0,951$) presente nas folhas (Figura 26a) sendo que, este elemento foi o que influenciou em maior escala a redução do conteúdo total de clorofilas. Segundo Abdel-Basset *et al.*, (1995) a acumulação de metais tem um efeito negativo na razão *clorofila alb* sendo explicado por uma rápida hidrólise da *clorofila a* em relação à *clorofila b*. Assim, o Pb pode ter acelerado a degradação da clorofila (Luna *et al.*, 1994)

Relativamente à *clorofila b* verificou-se que as folhas novas provenientes das parcelas do Caldeirão foram as únicas que apresentaram diferenças significativas. Assim, as folhas da parcela C06 do Caldeirão distinguiram-se das restantes devido a possuírem menor concentração deste componente (0,029 mg/g) contudo, este facto parece não estar associado à acumulação de nenhum dos elementos estudados. De uma maneira geral, os valores de *clorofila b* nas folhas novas e maduras foram semelhantes entre as diferentes áreas de amostragem. Porém, pode-se observar que as folhas maduras do Caldeirão mostraram maior concentração deste componente (0,094-0,151 mg/g) o que as diferenciou das provenientes dos restantes locais (SD: 0,062-0,106 mg/g; P: 0,68-0,77 mg/g). Esta diferença pode-se relacionar com as condições climáticas (elevado nível de radiação solar, temperatura do ar e baixa humidade) das áreas de São Domingos e Pomarão, as quais provocam a diminuição do conteúdo deste componente e, conseqüentemente a actividade metabólica a um nível mínimo (Correia, 2002).

Apesar das variações na concentração de *clorofila b* com o desenvolvimento da folha terem variado entre as parcelas, estas não foram significativas. Excepção a este facto foi o aumento observado nas folhas da parcela C06. De uma maneira geral observou-se que em São Domingos e no Pomarão a concentração deste componente nas folhas diminuiu com o desenvolvimento das mesmas enquanto que no Caldeirão aumentou.

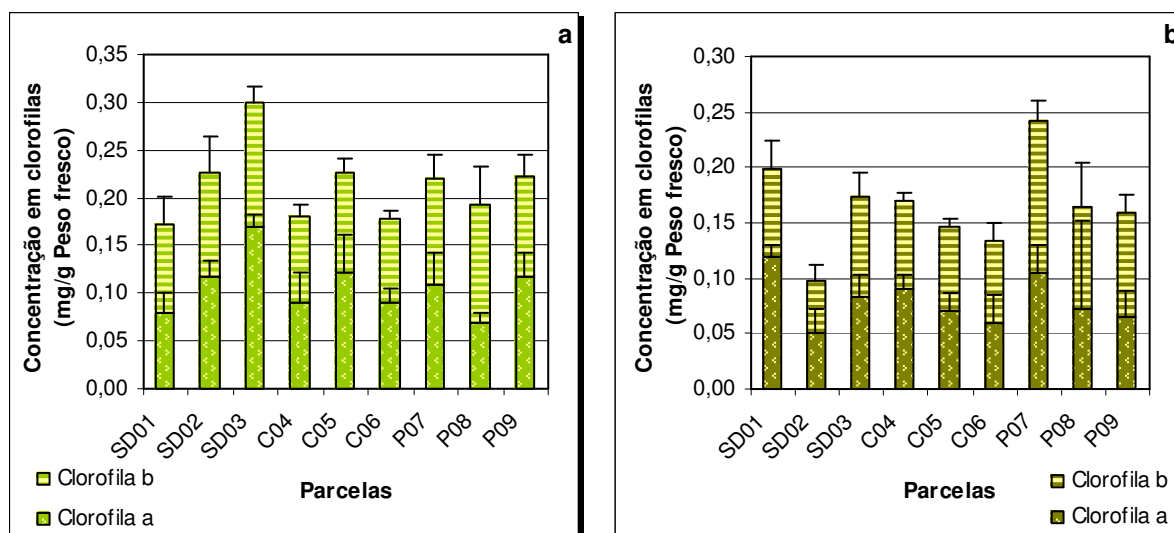


Figura 37 – Concentração em clorofila total e clorofila a e b em folhas novas (a) e maduras (b) de *Cistus ladanifer*, colhidas no Verão, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P),. Média ± DP, n = 3.

No Verão, os teores de clorofila total (Figura 37 a e b) das folhas de São Domingos e das folhas maduras do Pomarão (Figura 37b) apresentaram diferenças significativas entre as parcelas.

Os valores de clorofila total das folhas de Verão das diferentes áreas de amostragem apresentaram a mesma tendência que na Primavera, a qual era traduzida por uma maior concentração de clorofila total nas folhas novas do que nas folhas maduras. Excepção a esta tendência foi o observado na parcela SD01 (Novas: 0,172; Maduras: 0,198 mg/g) e P07 (Novas: 0,221 mg/g; Maduras: 0,241 mg/g) que coincidiu com o sugerido por Nuñez-Olivera *et al.* (1996) para plantas da mesma espécie. Por outro lado, pode-se também verificar que este decréscimo do teor total em clorofilas das folhas novas para as maduras foi mais acentuado nas parcelas de São Domingos (SD02: Novas 0,226 mg/g Maduras 0,098 mg/g; SD03: Novas 0,300 mg/g Maduras 0,173 mg/g) chegando a diminuir mais de 50%. Assim, as alterações observadas no teor de clorofila total das folhas novas para as maduras nas parcelas de São Domingos podem relacionar-se com o teor em Pb ($r=-0,638$) presente nas folhas dessa área de

amostragem (Figura 26b). De uma maneira geral, os teores totais de clorofila, independentemente do tipo de folha ou local de amostragem, foram semelhantes não demonstrando diferenças significativas (Novas C: 0,179-0,225 mg/g P: 0,193-0,222 mg/g; Maduras C: 0,134-0,169 mg/g; P: 0,158-0,241 mg/g).

Os teores em clorofila total nas folhas colhidas nos três locais de amostragem no Verão foram, de uma maneira geral, menores do que os obtidos nas folhas colhidas na Primavera, estando de acordo com os resultados obtidos para a mesma espécie por Correia (2002). No entanto, foram exceção as folhas maduras de São Domingos e Pomarão. A redução do teor total em clorofila entre as duas estações do ano pode estar associada à necessidade de maiores taxas fotossintéticas durante a Primavera já que, as plantas têm que dispensar grande parte do produto do seu metabolismo para o seu crescimento vegetativo. Por outro lado, segundo Kyparissis e Manetas (1993) a diminuição do teor em clorofilas no Verão pode contribuir como defesa suplementar à radiação absorvida.

Comparando estas alterações nas clorofilas entre as estações, em ambos os tipos de folhas, constatou-se que esta diminuição foi significativa unicamente nas folhas maduras do Caldeirão. Isto pode sugerir uma maior adaptabilidade das populações de São Domingos e Pomarão face a temperaturas mais altas e grande incidência de radiação solar, existente durante todo o ano nestas áreas.

Fazendo uma análise da concentração em *clorofila a* verificou-se que só as concentrações deste componente obtidas nas folhas colhidas nas parcelas de São Domingos apresentaram diferenças significativas (Novas: 0,080-0,169 mg/g; Maduras: 0,050-0,120 mg/g). De uma maneira geral, as folhas novas apresentaram maior concentração em *clorofila a e b* do que as folhas maduras porém, foram exceção a concentração em *clorofila a* na parcela SD01 (Novas: 0,080 mg/g Maduras: 0,120

mg/g) e P08 (Novas: 0,069 mg/g; Maduras: 0,072 mg/g) e ainda a concentração em *clorofila b* na parcela P07 (Novas: 0,112 mg/g; Maduras: 0,137 mg/g).

As concentrações de *clorofila a* obtidas nas folhas das várias áreas de amostragem foram semelhantes contudo, é de salientar as maiores concentrações obtidas nas folhas novas da parcela SD03 (0,169 mg/g) e nas folhas maduras da parcela SD01 (0,120 mg/g). As variações na concentração deste componente das folhas novas para as maduras não foram significativas, sendo excepção o decréscimo observado nas parcelas SD02 e SD03. Tal facto pode relacionar-se com o teor em Pb ($r=-0,632$) presente nas folhas colhidas em São Domingos (Figura 26b).

Comparando as concentrações em *clorofila a* nas duas estações observou-se que as folhas novas e maduras colhidas na Primavera apresentaram de uma maneira geral concentração superior às folhas de Verão. Excepção a esta tendência só foi verificada nas folhas maduras das parcelas SD01 e SD03. Assim, as concentrações obtidas nas folhas do mesmo tipo de diferentes estações não apresentaram diferenças significativas, salvo no Caldeirão onde se observou um decréscimo acentuado. Este facto pode sugerir uma menor adaptabilidade da população do Caldeirão, em relação às populações de São Domingos e Pomarão, face à estação quente e seca.

Quanto à *clorofila b* observou-se que as concentrações das folhas novas e maduras das parcelas das várias áreas foram semelhantes (Novas: SD 0,092-0,131 mg/g; C: 0,089-0,103 mg/g; P: 0,106-0,124 mg/g; Maduras: SD 0,078-0,098; C: 0,074-0,079 mg/g; P: 0,093-0,137 mg/g), sendo de referir unicamente o baixo teor obtido nas folhas maduras da parcela SD02 (0,048 mg/g). Deste modo pode observar-se que de uma maneira geral os teores de *clorofila b* também foram semelhantes nas diferentes áreas de amostragem. Relacionando os teores deste componente e o desenvolvimento das folhas observou-se uma diminuição geral dos teores das folhas novas para as maduras, salvo

na parcela P07. No entanto, é de salientar que apenas o decréscimo observado nas folhas da parcela SD02 foi significativo.

Os valores de *clorofila b* nas duas épocas diferiram consoante o tipo de folha isto é, nas folhas novas de Primavera o conteúdo foi menor (excepto SD01 e C05) porém, nas folhas maduras a situação inverteu-se. As folhas maduras provenientes do Pomarão foram as únicas onde se evidenciou uma diferença significativa entre as épocas de colheita.

Fazendo uma análise global verificou-se que as folhas colhidas no Verão nas várias áreas não apresentaram diferenças significativas na sua concentração de pigmentos clorofilinos. Isto pode sugerir a existência de uma estratégia de tolerância eficaz à temperatura e radiação solar, nomeadamente a acumulação de antocianinas ou outros compostos que absorvem as radiações UV, flavonoides e fenóis. Assim, estes compostos podem actuar nas folhas como protectores de estruturas sensíveis a estes stress como são os cloroplastos e seus componentes (Alexieva *et al.*, 2001).

3.7.2 Carotenóides

O teor em carotenóides nas plantas pode desempenhar uma acção protectora dos pigmentos clorofilinos quando na presença de condições de stress (Kenneth *et al.*, 2000). Os resultados obtidos para este pigmento nas folhas de *Cistus ladanifer* colhidas na Primavera e Verão apresentam-se na Figura 38 (a e b).

Apesar de as folhas novas de Primavera (Figura 38a) provenientes da parcela C06 e P09 e as maduras da parcela SD03 e C04 se distinguirem das restantes, devido a apresentarem conteúdos superiores a 60 $\mu\text{mol/g}$ de carotenóides, observou-se que o teor destes pigmentos não apresentou diferenças significativas entre as áreas de amostragem.

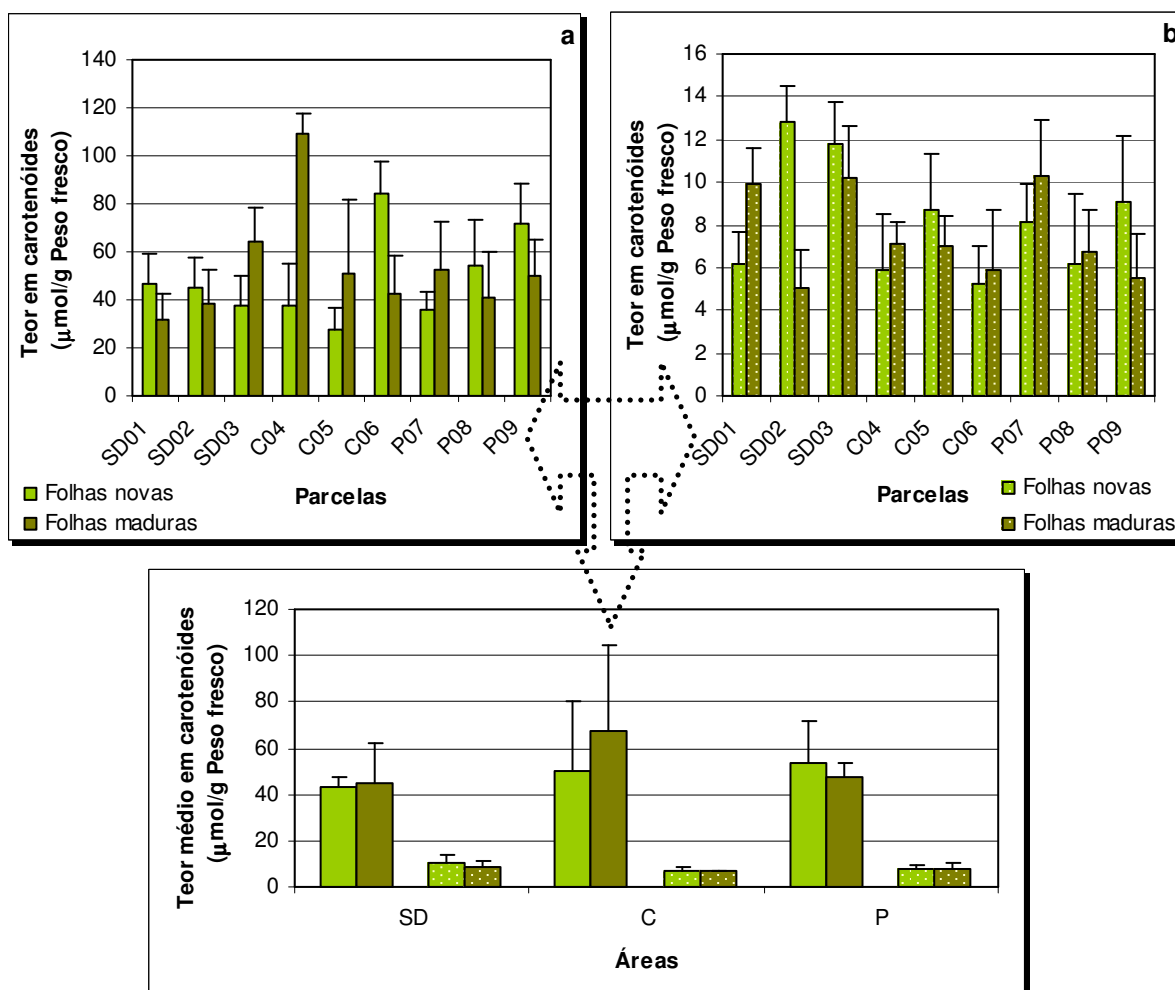


Figura 38 – Teor em carotenóides em folhas novas e maduras de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera (a) e Verão (b), provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

Tendo em conta os estádios de desenvolvimento das folhas de Primavera verificou-se que o teor em carotenóides das folhas novas para as maduras variou consoante as parcelas. O aumento mais acentuado em carotenóides entre estes tipos de folhas observou-se nas parcelas SD03 (Novas: 37,72 $\mu\text{mol/g}$; Maduras: 64,34 $\mu\text{mol/g}$) e C04 (Novas: 37,76 $\mu\text{mol/g}$; Maduras: 109,49 $\mu\text{mol/g}$) porém, o comportamento inverso só se verificou em C06 (Novas: 84,39 $\mu\text{mol/g}$; Maduras: 42,50 $\mu\text{mol/g}$).

De uma maneira geral, em São Domingos e no Caldeirão houve um aumento do conteúdo médio em carotenóides das folhas novas para as maduras enquanto que no Pomarão este comportamento foi inverso. As alterações do teor de carotenóides com o

desenvolvimento das folhas não foram significativas nas várias áreas de amostragem. Por outro lado, não foi observado uma nítida relação entre os teores de carotenóides e dos elementos químicos estudados nas folhas.

Nas folhas colhidas no Verão (Figura 38b), em cada área de amostragem, observou-se que o teor em carotenóides variou consoante o tipo de folha e parcela. No entanto, estas diferenças só foram significativas nas folhas novas da parcela SD01 (6,18 $\mu\text{mol/g}$) e nas folhas maduras da parcela SD02 (5,01 $\mu\text{mol/g}$) e P09 (5,54 $\mu\text{mol/g}$), todas com menor conteúdo do que as das outras parcelas. De uma maneira geral, os valores obtidos foram semelhantes entre as áreas porém, o Caldeirão foi sempre o local onde se encontrou menor teor médio deste pigmento nas folhas (Novas: 6,56 $\mu\text{mol/g}$; Maduras: 6,65 $\mu\text{mol/g}$), independentemente do tipo de folha, seguido do Pomarão (Novas: 7,79 $\mu\text{mol/g}$; Maduras: 7,51 $\mu\text{mol/g}$) e São Domingos (Novas: 10,26 $\mu\text{mol/g}$; Maduras: 8,37 $\mu\text{mol/g}$).

O teor de carotenóides obtido com o desenvolvimento das folhas no Verão variou consoante a área em estudo. Assim, em São Domingos e Pomarão as folhas novas apresentaram maior teor médio de carotenóides que as folhas maduras enquanto que no Caldeirão o comportamento foi inverso. Estas variações entre as folhas com desenvolvimento diferente não foram significativas nas áreas de amostragem no entanto, é de referir a parcela SD02 onde se verificou uma redução superior a 50%. Deste modo pode-se sugerir que as variações existentes nas folhas ao nível dos carotenóides se relacionam com as condições climáticas dos locais, reflectindo-se nomeadamente na fotoprotecção. Na parcela SD02 a diminuição drástica do conteúdo de carotenóides entre as folhas novas e maduras pode também estar associado ao aumento de As nas folhas ($r=-0,90$). A degradação de clorofilas e carotenóides é

observada frequentemente como resposta às elevadas concentrações de metais pesados (Luna *et al.*, 1994, Sherma e Dubey, 2005).

Comparando as duas épocas de colheita das folhas verificou-se que o conteúdo em carotenóides desceu acentuadamente da Primavera para o Verão, em ambos os tipos de folhas. Isto pode estar relacionado com o metabolismo interno das plantas de *Cistus ladanifer* face ao início do período seco e quente, nomeadamente na produção de flavonóides e compostos fenólicos. A concentração foliar destes compostos apresenta variação sazonal, tendo o seu máximo de produção no Verão e uma importante função protectora contra os efeitos das radiações UV-B nos pigmentos fotossintéticos ou DNA (Correia, 2002). Assim, a diminuição dos carotenóides pode ser compensada pelo aumento acentuado destes compostos.

3.8 Conteúdo em azoto

O azoto é um nutriente mineral que participa na constituição de diversas moléculas indispensáveis ao metabolismo tais como, proteínas, ácidos nucleicos, clorofilas, entre outros compostos (Varenes, 2003). A análise do teor deste componente está relacionada com a actividade fotossintética das plantas. Os resultados referentes à quantificação de azoto nas várias folhas colhidas na Primavera e Verão constam na Figura 39 (a e b).

Analisando as parcelas de cada área de amostragem observou-se que as concentrações em N de cada tipo de folha colhidas na Primavera (Figura 39a) foram semelhantes na respectiva área, sendo excepção os teores obtidos nas folhas novas do Caldeirão e nas folhas senescentes do Pomarão. Assim, os teores de N obtidos nas folhas novas da parcela C04 (18,80 mg/g) e nas folhas senescentes da parcela P09 (5,53 mg/g) distinguiram-se significativamente devido a apresentarem um teor em N superior

ao das folhas das restantes parcelas. Os teores de N nas folhas com diferentes desenvolvimento não apresentou diferenças nas parcelas e áreas de amostragem. Assim, em todas as parcelas observou-se uma diminuição do teor de N com o desenvolvimento da folha.

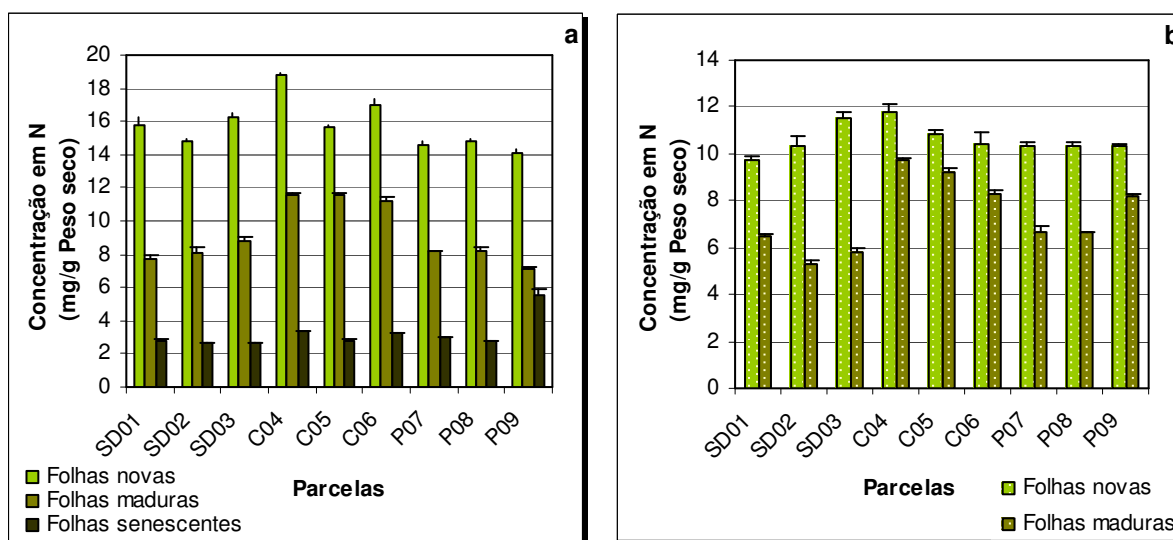


Figura 39 – Concentração em azoto em folhas novas, maduras e senescentes de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera (a) e Verão (b), provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média ± DP, n = 3.

Na Primavera, as concentrações máximas de N obtiveram-se nas folhas novas sendo, a área do Caldeirão o local onde se observaram as maiores concentrações de N nas folhas (15,62-18,80 mg/g). Por outro lado, as folhas do Pomarão apresentaram menor concentração de N (14,06-14,79 mg/g) reflectindo diferenças significativas relativamente à área do Caldeirão. As concentrações de N obtidas nas folhas maduras de São Domingos (7,67-8,83 mg/g) e do Pomarão (7,07-8,22 mg/g) foram significativamente diferentes das do Caldeirão, que apresentaram novamente uma maior concentração em N (11,26-11,60 mg/g). Uma vez que as concentrações de N estão correlacionadas com a eficiência da fotossíntese, os valores obtidos nas folhas novas e maduras sugerem que as plantas do Caldeirão apresentaram maior capacidade fotossintética em relação às das outras áreas de estudo o que terá contribuído para um

maior desenvolvimento das plantas. Esta diferença pode estar relacionada essencialmente com a disponibilidade de água no solo.

Com o desenvolvimento das folhas de Primavera verificou-se um decréscimo progressivo das concentrações de N, possivelmente devido à sua translocação para os novos tecidos (Varenes, 2003). Porém, é de evidenciar que em São Domingos e Pomarão o decréscimo de N das folhas novas para as maduras foi mais acentuado, pois o teor em N nas folhas maduras passou para cerca de metade do das folhas novas. Este comportamento das folhas nas áreas de São Domingos e Pomarão pode estar relacionado com os menores valores de N existentes nos solos (Quadro 10). Segundo Varenes (2003) o processo de remobilização acrescido de nutrientes pode atenuar as consequências adversas de uma baixa disponibilidade e absorção dos mesmos. Por outro lado, a alteração observada no conteúdo total em clorofilas destas áreas (Secção 3.7.1) pode ter um efeito directo sobre a fotossíntese, como sugerido por Peixoto *et al.* (2005).

Durante o processo de senescência ocorreu novo decréscimo de N não se observando diferenças significativas entre as áreas (SD: 2,64-2,79 mg/g; C: 3,21-3,82 mg/g; P: 2,76-5,53 mg/g). Segundo Gray (1983), Pugnaire *et al.* (1993) e Varenes (2003) o decréscimo das concentrações foliares principalmente de elementos com função metabólica importante, como é o caso do azoto, durante o desenvolvimento e senescência é devido à translocação dos elementos para outros tecidos e sua reutilização. É de notar que a maior descida no teor deste elemento foi observado nas plantas do Caldeirão sugerindo assim, uma maior capacidade de translocação e reutilização de nutrientes antes da abscisão foliar. Este decréscimo progressivo entre folhas de diferentes estádios de desenvolvimento foi significativo para todas as áreas. Comparando a reutilização do N nas distintas áreas, verificou-se que em São Domingos e no Pomarão as plantas de *Cistus ladanifer* se comportaram de uma forma semelhante

entre si, devido às menores quantidades de N disponíveis no solo, distinguindo-se das plantas do Caldeirão.

As concentrações de N obtidas nas folhas novas e maduras colhidas no Verão (Figura 39b) provenientes das distintas parcelas foram semelhantes em cada área de amostragem. No Pomarão as folhas novas continham valores mais baixos de N (10,29-10,36 mg/g) distinguindo-se significativamente das do Caldeirão (10,43-10,86 mg/g), seguindo portanto o comportamento das folhas colhidas na Primavera. Relativamente às folhas maduras do Caldeirão, estas apresentaram maior concentração em N (8,30-9,72 mg/g) que é significativamente diferente da das folhas das outras áreas, cujos valores relativamente próximos foram de 5,32-6,51 mg/g para São Domingos e 6,65-7,24 mg/g para o Pomarão.

Tal como na Primavera, as folhas novas colhidas no Verão apresentavam concentrações mais elevadas do que as maduras. Deste modo, pode observar-se uma diminuição do teor em N com o desenvolvimento da folha, tal facto representa, como na Primavera, um processo fundamental de minimização da perda, ou seja, maximização da eficiência de uso de elementos metabolicamente essenciais.

Comparando as épocas de recolha das folhas, verificou-se que embora o comportamento do N nos vários tipos de folhas tenha sido semelhante os teores diferiram. Assim, independentemente da área de amostragem e tipo de folha, constatou-se que as folhas de Primavera possuíam maiores concentrações daquele elemento do que as de Verão, o que está de acordo com os resultados obtidos por Correia (2002). A parcela P09 foi a única parcela onde não se observou este aumento verificando-se porém, que os valores não apresentavam diferenças significativas entre as parcelas. Segundo o mesmo autor, esta diminuição do teor de N nas folhas no Verão demonstra o típico comportamento de uma planta adaptada às condições Mediterrâneas, isto é, uma

maior actividade fotossintética que coincide com o desenvolvimento das plantas e das condições climáticas amenas na Primavera, a qual depois diminui face ao início do período quente e seco do Verão.

3.9 Enzimas

Um dos efeitos mais importantes das elevadas concentrações de elementos nas plantas é a produção de espécies oxidativas que induzem o chamado stresse oxidativo, o qual pode alterar o metabolismo das plantas (Dietz *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2004). No combate a este tipo de stresse as plantas podem desenvolver um sistema de defesa antioxidativo que inclui algumas enzimas, nomeadamente a catalase, a peroxidase e a superóxido dismutase (Pang *et al.*, 2003; Verma e Dubey, 2003). Deste modo, este sistema contribui para a protecção de macromoléculas essenciais e, conseqüentemente, dos processos onde intervêm (Singh *et al.*, 2004).

Algumas enzimas podem ocorrer em duas formas ou fracções diferentes consoante o modo como se podem extrair da célula: a fracção solúvel, a qual pode ser extraída com um tampão de baixa força iónica, e a fracção iónica, a qual apenas é extraída com um tampão de elevada força iónica, normalmente, um tampão contendo 1 M de NaCl. Esta distinção de comportamentos, em termos de extracção, está relacionada com o tipo de interacção existente com a parede celular. Assim, a forma solúvel ocorrerá maioritariamente na forma livre no citoplasma e organelos (Ingham *et al.*, 1998) não estando ligada à parede celular (McDougall e Morrison, 1995) enquanto que, a forma iónica se encontrará associada ionicamente a componentes particulares como a parede celular (Moulding *et al.*, 1987; McDougall e Morrison, 1995) e alguns organelos por exemplo mitocôndrias (Haard, 1973). Em certos casos, algumas enzimas podem ainda ocorrer sob uma terceira forma denominada por

covalente. Esta fracção está ligada covalentemente à parede celular não se conseguindo extrair com tampões de força iónica elevada, ficando assim no resíduo sólido obtido no final da extracção da fracção iónica. Apesar da importância da distribuição da actividade de diversas enzimas pelas fracções solúvel e iónica muito pouco é conhecido sobre o seu comportamento nomeadamente na presença de elementos vestigiais.

3.9.1 Catalase

A catalase é uma enzima que está envolvida na remoção dos radicais livres em situações de stresse nas plantas (Feierabend e Engel, 1986). Os valores obtidos para a actividade da catalase nas folhas novas e maduras de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera e Verão, nas diferentes áreas de amostragem constam nas Figuras 40 e 41 (a e b).

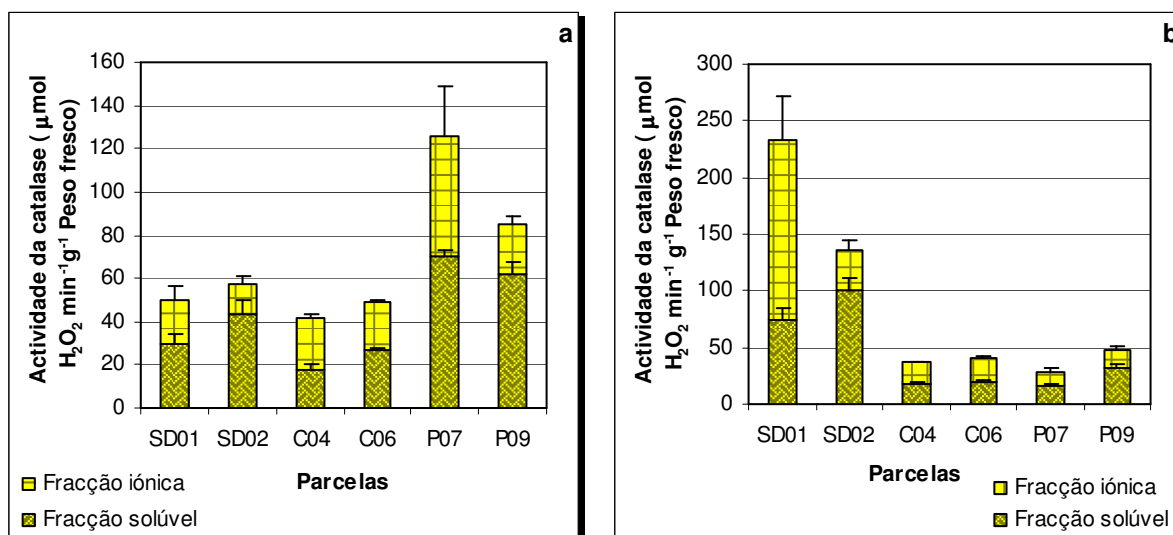


Figura 40 – Actividade da catalase em folhas novas (a) e maduras (b) de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm SD. n = 3.

Em todas as parcelas as folhas novas e maduras colhidas na Primavera (Figura 40a e b) apresentaram actividade da catalase nas fracções solúvel e iónica sendo que, o

comportamento das folhas novas para as maduras, em ambas as fracções, foi semelhante nas parcelas da mesma área.

Relativamente à actividade da catalase na fracção solúvel das folhas novas e maduras observou-se que estas não apresentavam diferenças significativas entre as parcelas da mesma área. As folhas do Pomarão apresentaram as maiores actividades nas folhas novas (63,42-70,33 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) as quais se distinguiram significativamente das do Caldeirão (17,63-27,01 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Por outro lado, as folhas maduras de São Domingos apresentaram maior actividade da catalase (73,59-100,22 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{g}^{-1}$) distinguindo-se significativamente das folhas das outras áreas, as quais mostraram valores semelhantes (C: 17,41-18,86 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; P: 16,71-32,01 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Analisando os valores da catalase das folhas novas e maduras, verificou-se um decréscimo da actividade enzimática na fracção solúvel com o desenvolvimento das folhas no Pomarão e no Caldeirão contudo, em São Domingos observou-se o inverso. É de salientar que só as alterações observadas na actividade enzimática nas folhas de São Domingos e Pomarão foram significativas.

Em São Domingos o aumento acentuado da actividade da catalase das folhas novas para as maduras pode estar associado ao acréscimo da concentração de Zn ($r=0,704$), o qual poderá ter induziu a actividade antioxidante desta enzima.

No Pomarão o decréscimo da actividade da catalase na fracção solúvel das folhas novas para as maduras poderá relacionar-se com o aumento do teor em Zn ($r=-0,749$), que apesar de não ocorrer em concentração tóxica se encontra muito próximo do valor mínimo da gama de toxicidade nas folhas maduras (100 mg/kg). Como o conteúdo deste elemento aumenta com o desenvolvimento das folhas (Figura 30) pode-se sugerir que estas concentrações inibem o funcionamento desta enzima ou alteram a ligação das subunidades da enzima (Hertwig, 1992). No Caldeirão a diminuição da actividade da

catalase parece estar também relacionada com o aumento do teor em Zn ($r=-0,981$) porém, este comportamento não foi significativo devido a ambos os tipos de folhas apresentarem teores de cerca de 100 mg/kg que são considerados como tóxicos para as plantas. Em estudos feitos por Panda (2003) com *Taxithelium nepalense* também foi observado a inibição da catalase face à toxicidade do Zn.

Relativamente à actividade da catalase na fracção iónica observaram-se diferenças significativas nas folhas novas da parcela P07 (55,04 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e nas folhas maduras da parcela SD01 (159,12 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$), ambas com actividades da catalase superiores às restantes parcelas. O comportamento entre folhas novas e maduras foi homogéneo dentro de cada área porém, analisando as áreas uma a uma podem observar-se variações. Assim, a actividade da catalase na fracção iónica aumentou das folhas novas para as maduras em São Domingos contudo, no Caldeirão e Pomarão esta diminuiu.

Em São Domingos verificou-se uma subida significativa da actividade da catalase na fracção iónica (Novas 13,00-19,20 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Maduras: 35,11-159,12 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$), principalmente na parcela SD01, que pode relacionar-se com a acumulação de As ($r=0,751$).

A diminuição da actividade da catalase na fracção iónica observada no Pomarão (Novas: 55,04-22,88 $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Maduras: 11,24-15,67 $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) continua a ter melhor correlação com o teor em Zn nas folhas ($r=-0,778$) o que pode justificar a mesma tendência que a observada para a fracção solúvel desta enzima. Ambos os tipos de folhas do Caldeirão apresentaram baixa actividade da catalase nesta fracção (Novas: 21,79-23,76 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Maduras: 19,32-21,40 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) sendo que, a diminuição observada com o desenvolvimento da folha não foi significativo nem parece estar associado a nenhum dos elementos químicos estudados.

Relativamente à actividade total da catalase pode observar-se que nas folhas novas a contribuição dada pelas distintas fracções distinguiu significativamente a área do Pomarão, com a maior actividade ($85,30-125,37 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$), da área do Caldeirão, com a menor actividade ($41,39-48,81 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Por outro lado, São Domingos obteve a maior actividade total da catalase nas folhas maduras ($135,33-232,71 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) distinguindo-se significativamente do Caldeirão e Pomarão que apresentaram actividades semelhantes (C: $36,73-40,26 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$; P: $27,95-47,58 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$).

Deste modo, observou-se um aumento acentuado da actividade total da catalase das folhas novas para as maduras de São Domingos que pode relacionar-se com o aumento do teor em Zn ($r=0,717$). Este comportamento é similar ao verificado por Pang *et al.* (2003) em *Vetiveria zizanioides* L. aquando do aumento das concentrações de Zn e Pb nas plantas usando materiais provenientes de uma área mineira.

As folhas do Pomarão e Caldeirão apresentaram uma diminuição da actividade total da catalase com o desenvolvimento das mesmas porém, este comportamento só foi significativo para as do Pomarão. Os valores de catalase nas folhas de ambas as áreas parecem relacionar-se com o aumento do teor em Zn, de igual forma como observado para a fracção solúvel, apresentando deste modo correlações negativas superiores a 0,804.

Analisando a proporção de cada fracção na actividade enzimática total da catalase verificou-se que, de uma maneira geral, as folhas novas demonstravam na fracção solúvel uma maior actividade da catalase que na fracção iónica. Excepção a tal facto, foi observado na parcela C04 onde a actividade da fracção solúvel foi de 42,60% da actividade total da catalase. Assim, a fracção solúvel em São Domingos e Pomarão atingiu, respectivamente, percentagens médias de 68,5% e 64,6% da actividade

enzimática total e o Caldeirão apenas 55,3%. Isto pode sugerir a ocorrência do transporte dos elementos químicos para o citoplasma, acumulação em certos locais particularmente no vacúolo (Ross e Kaye, 1994) e actuação desta forma ligante da catalase face à acumulação dos mesmos.

Nas folhas maduras constataram-se algumas diferenças em relação às folhas novas nomeadamente, um decréscimo na percentagem da fracção solúvel na actividade total da enzima. As parcelas C04 e P07 mostraram comportamento diferente pois que a percentagem da fracção solúvel aumentou com o desenvolvimento das folhas no entanto, de uma forma não significativa (C04: Novas 42,60% Maduras 47,40%; P07: Novas 56,10% Maduras 59,80%). Esta alteração conduziu a que no Caldeirão e numa das parcelas de São Domingos a fracção iónica proporcionasse uma maior contribuição na actividade enzimática total (SD01 68,4%; C: 52,9%). Isto pode sugerir uma mudança de mecanismo de tolerância face ao aumento da concentração de elementos potencialmente tóxicos designadamente, a ligação iónica dos elementos químicos aos constituintes da parede celular de modo a restringir o transporte para o interior da célula (Gadd e White, 1989). Por último, as folhas maduras do Pomarão mostraram com a mesma tendência que nas folhas novas apresentando 63,5% da actividade da catalase na fracção solúvel.

No Verão, ambos os tipos de folhas colhidas nas diferentes parcelas (Figura 41a e b) apresentaram actividade da catalase nas fracções solúvel e iónica sendo que, a fracção solúvel apresentou em todos os casos maior actividade do que a fracção iónica.

Relativamente à actividade da catalase na fracção solúvel das folhas novas de Verão não se observaram diferenças significativas nos valores das folhas das parcelas da mesma área de amostragem. As folhas novas do Pomarão apresentaram valores menores de actividade enzimática ($31,19-33,96 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) que se distinguiram

significativamente dos obtidos nas outras áreas, os quais semelhantes entre si (SD: 65,0-65,24 μmol de H_2O_2 $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$; C: 65,48-68,02 μmol de H_2O_2 $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Por outro lado, nas folhas maduras verificaram-se diferenças significativas na actividade da catalase das parcelas da área do Caldeirão e Pomarão, devido aos elevados valores das parcelas C04 (93,98 μmol de H_2O_2 $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$) e P07 (64,48 μmol de H_2O_2 $\text{min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

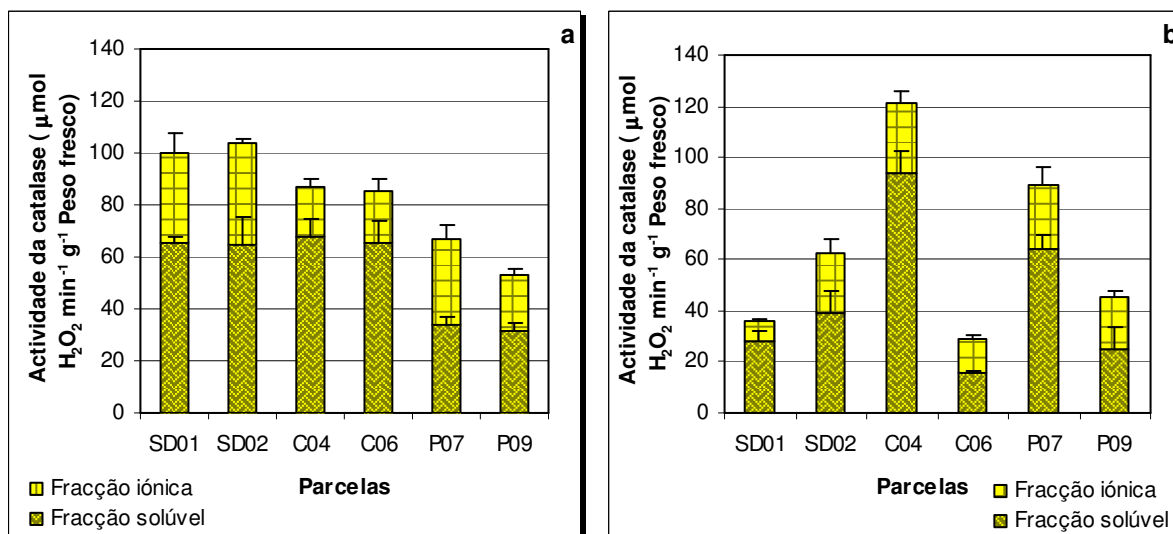


Figura 41 – Actividade da catalase em folhas novas (a) e maduras (b) de *Cistus ladanifer*, colhidas no Verão, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

A alteração da actividade da catalase na fracção solúvel de um tipo de folha para outro no Verão variou consoante a parcela nas áreas do Caldeirão e Pomarão porém, em São Domingos observou-se uma diminuição geral. Assim, observou-se que a actividade da catalase solúvel diminuiu de uma maneira geral das folhas novas para as maduras, sendo excepção as parcelas C04 e P07. Esta variabilidade de comportamentos na actividade enzimática desta fracção parece não estar relacionada com nenhum dos elementos químicos estudados.

Tendo em conta a actividade da catalase na fracção iónica observou-se que as folhas novas de Verão apresentaram valores semelhantes entre as parcelas da mesma área. A actividade nesta fracção nas folhas novas foi superior em São Domingos (35,07-

38,79 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) diferenciando-se, significativamente das folhas do Caldeirão que mostraram actividade inferior (19,03-19,65 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Nas folhas maduras observaram-se diferenças significativas entre as parcelas de São Domingos e Caldeirão (SD: 7,56-23,58 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$; C: 12,94-26,94 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). De uma maneira geral, a actividade da catalase nas folhas maduras foi semelhante nas várias áreas de estudo, quer nesta fracção quer na fracção solúvel.

A actividade da catalase na fracção iónica em folhas de distintos estádios de desenvolvimento teve um comportamento semelhante entre as áreas podendo-se observar um decréscimo geral, como observado na fracção solúvel. É de salientar que no Caldeirão e no Pomarão as actividades da catalase na fracção iónica também não se correlacionaram com nenhum dos elementos químicos estudados. Por outro lado, o decréscimo significativo da actividade desta enzima em São Domingos pode ter sido induzido pelos elevados teores em Pb ($r=-0,616$) ou em As ($r=-0,621$) nas folhas.

Comparando a actividade total da catalase nas folhas novas observou-se que as parcelas não apresentavam diferenças significativas dentro da respectiva área de amostragem. O Pomarão apresentou menor actividade total nas folhas novas (53,0-66,92 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) distinguindo-se esta área de São Domingos e do Caldeirão, que apresentaram valores semelhantes (SD: 100,31-103,79 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$; C: 85,13-87,06 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). Nas folhas maduras a actividade total apresentou diferenças significativas nas parcelas do Caldeirão e Pomarão. Assim, pode-se afirmar que as parcelas C04 e P07 se distinguiram das restantes parcelas apresentando maiores actividades totais (C04: 120,93 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; P07: 88,87 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

A actividade total da catalase das folhas novas para as maduras diminuiu de uma maneira geral, no entanto nas parcelas C04 e P07 observou-se o inverso. Esta

semelhança de comportamentos entre a actividade da catalase na fracção solúvel, iónica e total e o desenvolvimento das folhas pode sugerir que o funcionamento da catalase no Verão é influenciado, principalmente, pelo stresse hídrico ou o aumento das radiações UV-B. Os resultados obtidos por Alexieva *et al.* (2001) mostraram a inibição da actividade da catalase quando plantas de *Pisum sativum* e *Triticum aestivum* foram sujeitas a estes tipos de stresse. Em São Domingos a diminuição da actividade total parece ter sido também influenciada pelo aumento do teor em As ($r=-0,727$), como observado na fracção iónica.

Analisando a distribuição de cada fracção na actividade total verificou-se que, em ambos os tipos de folhas, a fracção solúvel foi semelhante não apresentando diferenças significativas entre as áreas (Novas: 54,8-77,5%; Maduras: 64,0-70,6%). Constatou-se desta forma que embora as folhas maduras possuam, de uma maneira geral, menor actividade total da catalase que as folhas novas, as fracções de catalase apresentaram distribuições semelhantes. Isto pode sugerir que as alterações nas concentrações de elementos químicos nas folhas não induziram uma mudança da actuação da catalase nas folhas com diferente desenvolvimento devido, possivelmente, à interacção de outros agentes antioxidantes.

Comparando as duas estações constatou-se que de uma maneira geral as folhas de Verão demonstraram maior actividade da catalase que as da Primavera. Este facto pode relacionar-se com a intervenção da catalase não só como mecanismo de tolerância às elevadas concentrações de elementos mas também ao stresse hídrico e térmico.

3.9.2 Peroxidase

A peroxidase é considerada como uma enzima envolvida na defesa de stresse nas plantas (Gaspar *et al.*, 1991). Nas Figuras 42 e 43 (a e b) apresentam-se os valores relativos à actividade da peroxidase nas folhas colhidas na Primavera e Verão.

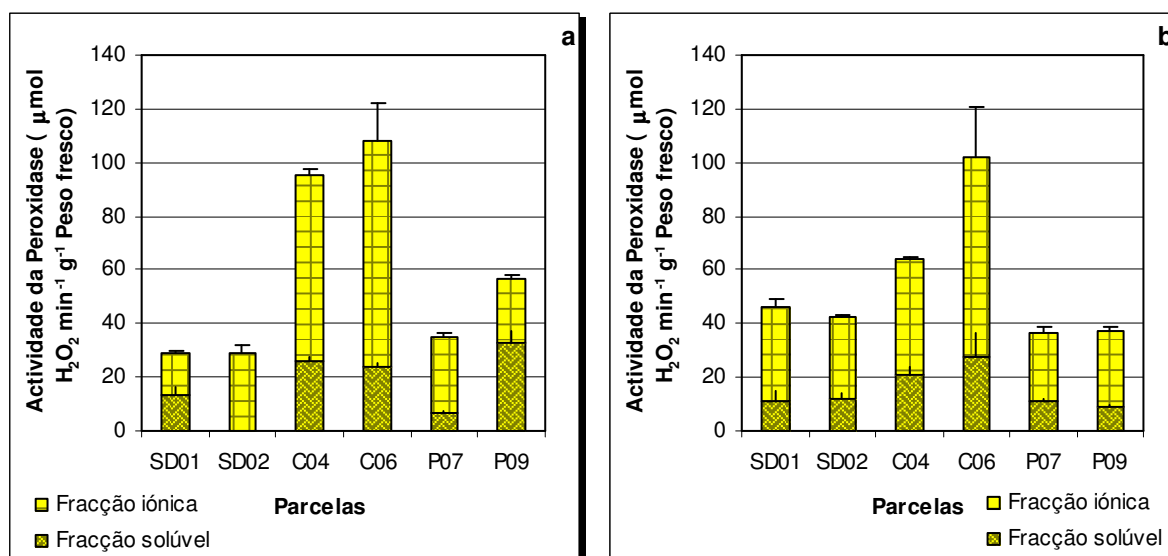


Figura 42 – Actividade da peroxidase em folhas novas (a) e maduras (b) de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

De uma maneira geral, as folhas colhidas na Primavera (Figura 42a e b) apresentaram actividade da peroxidase nas fracções solúvel e iónica, sendo excepção as folhas novas da parcela SD02 que só demonstraram actividade na fracção iónica. Segundo Carpin *et al.* (2001) a peroxidase pode exibir diferentes interacções com os constituintes das células. Por outro lado, em ambos os tipos de folhas das diferentes áreas a actividade da peroxidase na fracção iónica foi maior que na fracção solúvel, podendo deste modo indicar que a peroxidase se encontra maioritariamente associada à parede celular (Carpin *et al.*, 2001).

Nas folhas novas a actividade da peroxidase na fracção solúvel apresentou diferenças significativas nas parcelas do Pomarão (6,94-32,50 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$) e

de São Domingos. Analisando as três áreas observou-se que as folhas novas de São Domingos apresentaram menores actividades da peroxidase, que não ultrapassavam as 13,53 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$, diferenciando-se deste modo significativamente das actividades da peroxidase solúvel nas folhas do Caldeirão (23,76-25,86 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Nas folhas maduras as actividades da peroxidase foram semelhantes entre as parcelas da respectiva área de amostragem. O Caldeirão apresentou nas folhas maduras maior actividade da peroxidase (21,01-27,74 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) do que nas outras áreas, tal como foi observado nas folhas novas. Assim, observou-se que esta área se distinguiu significativamente das restantes áreas, cujos valores da peroxidase foram semelhantes entre si (SD: 11,03-11,67 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; P: 9,12-10,93 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

De uma maneira geral, ocorreu uma diminuição da actividade da peroxidase na fracção solúvel das folhas novas para as maduras nas diferentes áreas de amostragem. Contudo, é de salientar que as variações ocorridas nas actividades desta enzima entre as folhas novas e maduras variaram consoante a parcela, não sendo significativas excepto para a parcela P09. Esta variabilidade de comportamentos observados em todas as áreas parece relacionar-se com o aumento do teor de Zn ($r > -0,7$) nas folhas e sua proximidade aos valores considerados tóxicos. Assim, para o Caldeirão e Pomarão observou-se que na presença de concentrações de Zn nas folhas menores de 100 mg/kg a actividade da peroxidase aumenta, contudo para valores de Zn superiores àquele valor esta diminui. Para São Domingos o comportamento foi semelhante a este porém, a concentração de Zn que induziu a inibição da peroxidase foi de aproximadamente 150 mg/kg. Estes factos sugerem que teores mais elevados de Zn inibem a actividade desta enzima bem como a da catalase, variando consoante o grau de tolerância das plantas. Comportamentos semelhantes a este onde ocorre a inibição destas duas enzimas face ao

aumento de Zn nas folhas foram documentados por Panda (2003) e Choudhury e Panda (2004).

A actividade da peroxidase na fracção iónica foi maior ao da fracção solúvel, variando com percentagens de 60 a 100% da actividade total, o que pode indicar que a enzima está maioritariamente associada à parede celular (Carpin *et al.*, 2001).

Nas folhas novas e maduras colhidas nas diferentes parcelas as actividades da peroxidase na fracção iónica foram semelhantes dentro de cada área de amostragem. No Caldeirão, ambos os tipos de folhas apresentaram actividades superiores na fracção iónica (Novas: 69,73-84,03 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Maduras: 43,12-74,58 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) diferenciando-se significativamente das outras áreas onde a actividade da peroxidase apresentou valores semelhantes.

Em São Domingos e no Caldeirão observou-se uma semelhança nas variações da actividade da peroxidase na fracção iónica das folhas novas para as maduras, em ambas as parcelas da respectiva área. No Pomarão a tendência da actividade desta enzima com o desenvolvimento das folhas variou consoante a parcela. Assim, em São Domingos e Pomarão a actividade da peroxidase aumentou das folhas novas para as maduras porém, no Caldeirão o comportamento foi inverso. Embora nas folhas de São Domingos se tenha observado um aumento não significativo da actividade da peroxidase na fracção iónica, este pode estar associado ao aumento do teor em Zn nas folhas ($r=0,857$). No Caldeirão o comportamento da actividade da peroxidase foi oposta à observada em São Domingos contudo relacionou-se com o mesmo elemento. Assim, o aumento do Zn ($r=-0,821$) provocou, possivelmente, a inibição da actividade desta enzima. No Pomarão a actividade da peroxidase na fracção iónica parece não se relacionar com nenhum dos elementos químicos estudados.

Relativamente à actividade total da peroxidase os valores obtidos nas folhas novas e maduras foram semelhantes entre as parcelas da mesma área. A maior actividade total da peroxidase nos dois tipos de folhas foi observada novamente na área do Caldeirão (Novas: 95,59-107,79 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; Maduras: 64,13-102,32 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Estas actividades distinguiram-se significativamente das observadas nas folhas novas e maduras de São Domingos e Pomarão as quais não ultrapassaram as 57 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$.

As variações da actividade total da peroxidase entre os dois estádios de desenvolvimento das folhas foram pequenas e não significativas, contudo podem distinguir-se comportamentos diferentes entre os locais. Em São Domingos constatou-se um aumento da actividade que está associada ao acréscimo da fracção solúvel devido, possivelmente, ao aumento do teor em Zn ($r=0,846$) que induz a libertação da peroxidase localizada nas paredes celulares, tal como referido por Gaspar *et al.*, (1982) para o Pb. No Pomarão o comportamento da actividade desta enzima variou consoante a parcela estando relacionado com o aumento do teor de Zn nas folhas e seu valor limite de toxicidade (100 mg/kg), tal como observado para a fracção solúvel. A actividade total da peroxidase nas folhas do Caldeirão parece não se relacionar com nenhum dos elementos químicos estudados.

Assim, constatou-se que a distribuição da actividade da peroxidase pelas várias fracções se manteve, de uma maneira geral, constante nas folhas sendo excepção clara a parcela SD02. Isto parece sugerir que a actividade desta enzima está também relacionada com outras formas de stresse.

No Verão, a actividade da peroxidase nas diferentes fracções variou consoante o tipo de folha e área de amostragem (Figura 43a e b). Isto é, as folhas novas de São Domingos e Pomarão só apresentaram actividade enzimática na fracção iónica enquanto

que nas folhas maduras a actividade desta enzima foi observada em ambas as fracções, iónica e solúvel, excepto na parcela SD02. Este comportamento pode estar associado ao funcionamento de diferentes isoenzimas da peroxidase que, segundo Pennel e Greppin, (1994) estão intimamente ligadas aos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas.

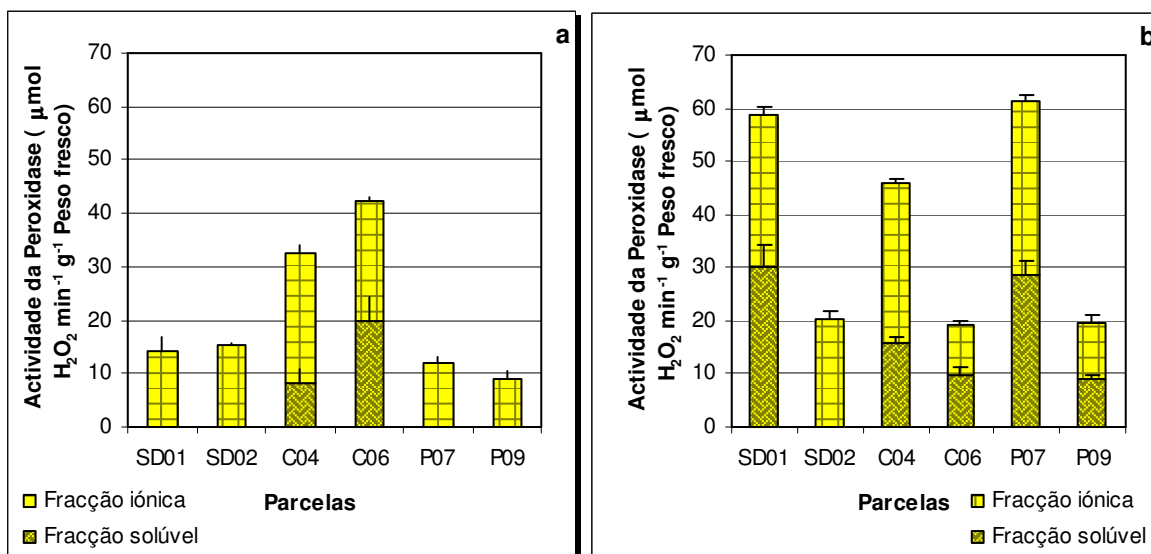


Figura 43 – Actividade da peroxidase em folhas novas (a) e maduras (b) de *Cistus ladanifer*, colhidas no Verão, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

Nas folhas novas colhidas no Verão só foi observada actividade da peroxidase na fracção solúvel nas parcelas do Caldeirão sendo que os valores obtidos apresentaram diferenças significativas entre si ($8,41\text{-}19,96 \mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ g}^{-1}$). A ausência de actividade da peroxidase na fracção solúvel das folhas novas de São Domingos e Pomarão está, possivelmente, relacionada com o aumento da radiação absorvida pelas folhas e da temperatura que se faz sentir nestas regiões. O stresse oxidativo aumenta pelo acréscimo acentuado da temperatura e das radiações conduzindo deste modo a uma alteração da actividade enzimática devido à desnaturação da proteína (Vierling, 1991).

Nas folhas maduras, as actividades da peroxidase na fracção solúvel foram semelhantes entre São Domingos e Pomarão porém, as parcelas de cada uma das áreas apresentaram diferenças significativas entre si (SD: nd-30,08 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; P: 8,88-28,43 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Desta forma, pode observar-se um aumento da actividade na fracção solúvel das folhas novas para as maduras de São Domingos e Pomarão sendo excepção a parcela SD02. No Caldeirão, as alterações da actividade da peroxidase nesta fracção com o desenvolvimento das folhas variaram consoante a parcela. O comportamento da actividade da peroxidase na fracção solúvel de todas as áreas de amostragem parece não estar relacionado com nenhum dos elementos químicos estudados sugerindo que, a actividade desta enzima se associa ao aumento da temperatura e radiação. As variações observadas entre as áreas relacionam-se possivelmente com o estado de desenvolvimento das folhas e intensidades destes factores (Egert e Mitevini, 2002; Larkindale *et al.*, 2005).

Relativamente à actividade da peroxidase na fracção iónica constatou-se que nas folhas novas de São Domingos e Pomarão esta coincidiu com a actividade total. As actividades da peroxidase nas folhas novas das parcelas de cada área foram semelhantes entre si contudo, analisando as áreas observou-se diferenças significativas entre todas (SD: 14,40-15,20 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; C: 22,42-24,00 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; P: 9,06-11,90 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$).

Embora nas folhas maduras a contribuição da fracção iónica na actividade total tenha diminuído observaram-se aumentos na actividade desta enzima em todas as áreas, com excepção da parcela C06 que foi a única onde se observou diminuição da actividade da peroxidase. Assim, o comportamento observado na actividade da peroxidase na fracção iónica das folhas novas para as maduras das distintas áreas de

amostragem parece não estar relacionado com nenhum dos elementos químicos estudados mas, possivelmente, com as condições climáticas das áreas.

A actividade total da peroxidase nas folhas novas não apresentou diferenças significativas entre as parcelas de cada área de amostragem. Assim, o Caldeirão apresentou maior actividade total (32,41-42,38 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$) distinguindo-se das restantes áreas onde a actividade total foi menor que 15 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$. Esta diferença pode dever-se ao facto de São Domingos e Pomarão apenas apresentarem actividade da peroxidase na fracção iónica. Nas folhas maduras observou-se que as actividades totais variavam consoante a parcela, no entanto comparando as áreas de amostragem os valores foram semelhantes nas várias áreas (SD: 20,15-58,75 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; C: 19,33-46,07 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$; P: 19,66-61,52 $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{g}^{-1}$). Assim, constatou-se a ocorrência de um acréscimo geral da actividade total desta enzima entre as folhas novas e maduras relacionando-se por um lado com o aparecimento da actividade na fracção solúvel nas folhas maduras de São Domingos e Pomarão e, por outro, com o aumento da actividade na fracção iónica em todas as áreas.

Comparando a actividade total em ambos os tipos de folhas nas duas estações observou-se que as folhas de Primavera continham uma maior actividade desta enzima, particularmente nas folhas novas. Este comportamento pode sugerir um acréscimo na defesa contra o stresse oxidativo já que a planta está na fase de desenvolvimento e, consequentemente, fotossinteticamente mais activa.

3.9.3 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (SOD) é considerada como uma enzima chave na defesa antioxidativa a qual determina directamente a concentração de espécies oxidativas

reactivas (ROS) e de peróxido de hidrogénio (Asada, 1992). Por outro lado, este produto pode ser removido pela actividade da catalase e peroxidase. Os resultados relativos à actividade desta enzima nas folhas colhidas na Primavera e Verão encontram-se nas Figuras 44 e 45 (a e b).

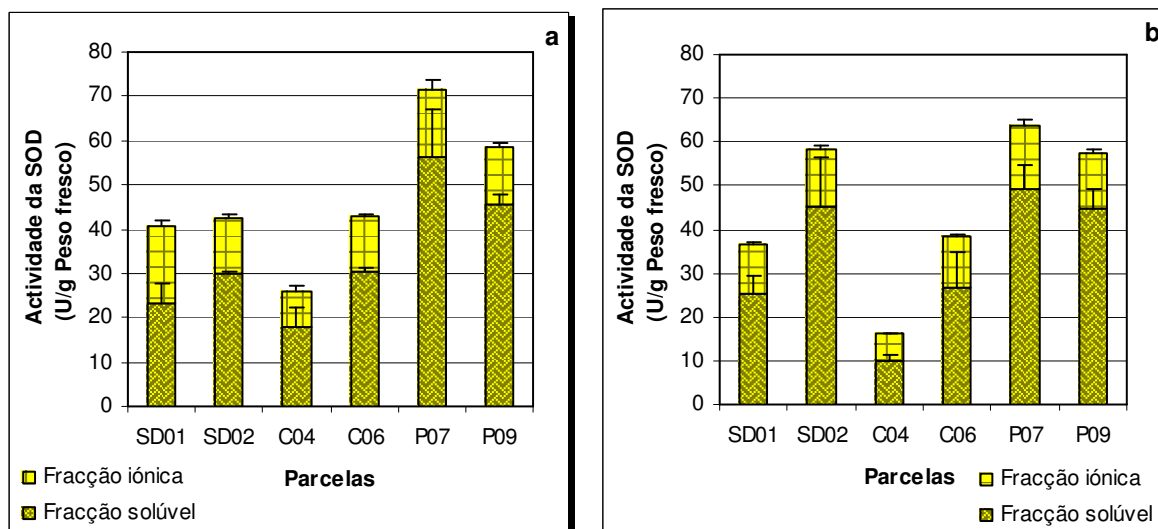


Figura 44 – Actividade da superóxido dismutase em folhas novas (a) e maduras (b) de *Cistus ladanifer*, colhidas na Primavera, provenientes da mina de São Domingos (SD), Serra do Caldeirão (C) e Pomarão (P). Média \pm DP, n = 3.

Em todas as parcelas observou-se actividade da SOD nas fracções solúvel e iónica, independentemente do tipo de folha colhida na Primavera (Figura 44a e b). Em todos os casos a fracção solúvel apresentou maior percentagem da actividade total entre 56-79% nas folhas novas e 61-77% nas folhas maduras. Deste modo pode-se observar que a distribuição da actividade pelas duas fracções foi semelhante nos dois tipos de folhas.

A actividade da SOD na fracção solúvel das folhas novas das diferentes parcelas de cada área foi semelhante no entanto, nas folhas maduras houve distinções entre as parcelas do Caldeirão. Apesar do Pomarão apresentar actividade superior na fracção solúvel das folhas novas (45,49-56,34 U/g), distinguindo-se significativamente das restantes áreas que mostraram valores próximos (SD: 23,16-29,88 U/g; C: 17,79-30,36

U/g), a contribuição desta fracção na actividade total não variou consoante a área. Nas folhas maduras o Pomarão continuou a apresentar maior actividade da SOD (44,68-49,44 U/g) mostrando desta forma diferenças significativas com as do Caldeirão (10,11-26,80 U/g). Sendo que as folhas do Pomarão não apresentaram, em nenhum dos casos, as maiores concentrações dos elementos estudados este resultado pode sugerir uma distinção na distribuição de outros elementos no interior das células e/ou uma maior sensibilidade em relação às restantes áreas (Cao *et al.*, 2004).

As variações observadas na actividade da SOD na fracção solúvel das folhas novas para as maduras foram homogéneas e não significativas nas parcelas de cada área de amostragem. Assim, registou-se um aumento de 10,13% da actividade enzimática nas folhas de São Domingos e uma diminuição, respectivamente, de 3,96% e 0,64% nas folhas do Caldeirão e do Pomarão. Isto pode sugerir que a actividade observada na fracção solúvel é menos sensível a pequenas variações da concentração dos elementos químicos potencialmente tóxicos devido, possivelmente, à ocorrência de outro mecanismo de tolerância.

No Pomarão o decréscimo da actividade da SOD das folhas novas para as maduras pode estar relacionado com o aumento do teor de Pb ($r=-0,694$) na fracção solúvel e consequente inibição do funcionamento da SOD.

Apesar de em São Domingos e no Caldeirão o comportamento da actividade da SOD na fracção solúvel entre os dois tipos de folhas ter sido inverso este parece relacionar-se, em ambos os casos, com o teor de Zn nas folhas. No Caldeirão, o aumento do teor em Zn provocou uma diminuição da actividade da SOD na fracção solúvel ($r=-0,735$) devido à inibição da enzima, como documentado para outras plantas por Gallego *et al.* (1996) e Panda e Khan (2004). Por outro lado, as plantas de São Domingos parecem possuir uma menor sensibilidade ao teor de Zn já que,

concentrações maiores deste elemento e o aumento destas induzem um acréscimo da actividade da SOD ($r=0,921$). O aumento da actividade da SOD face ao Cu e Zn também foi documentado em musgos (Cunny *et al.*, 2004), líquenes (Panda, 2003) e macrófitas (Panda e Khan, 2004).

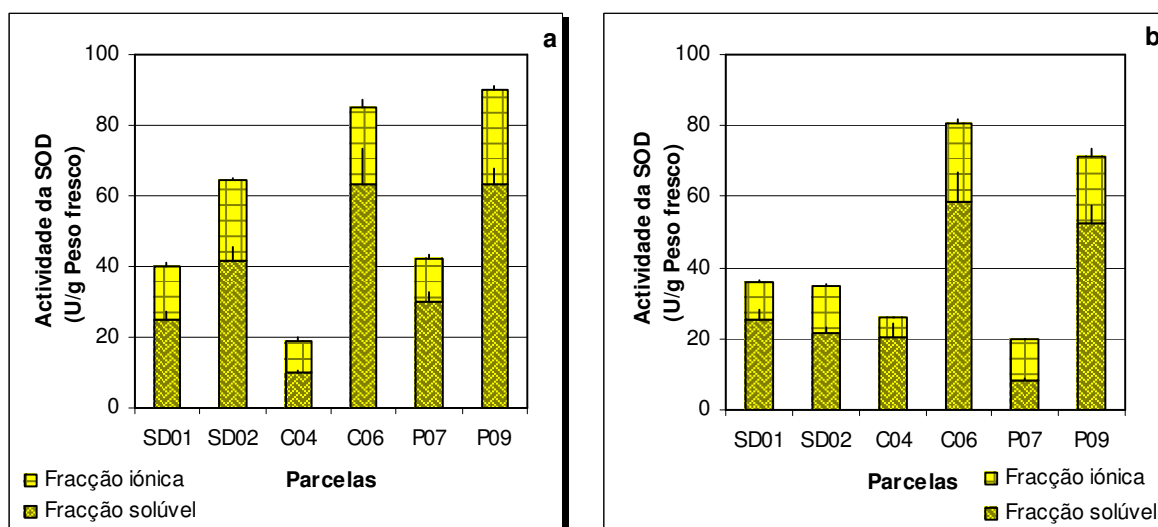
Relativamente à fracção iónica, as actividades da SOD obtidas em ambos os tipos de folhas foram semelhantes entre parcelas da respectiva área de amostragem. As actividades da SOD nas folhas novas e maduras de São Domingos e do Pomarão foram próximas (Novas - SD: 12,78-17,71 U/g; P: 13,10-14,97 U/g; Maduras - SD: 11,36-12,84 U/g; P: 12,64-14,51 U/g) e significativamente diferentes das obtidas nas folhas do Caldeirão (Novas: 7,99-12,45 U/g; Maduras: 6,21-11,42 U/g).

A baixa actividade da SOD na fracção iónica pode ser compensada pela elevada actividade da peroxidase que foi determinada nesta mesma fracção. Constatou-se que o elemento correlacionado, em cada área de amostragem, com a actividade de SOD foi o mesmo que na peroxidase, ou seja, o Zn. Esta inter-relação no funcionamento de várias enzimas antioxidantes também foi verificada com o As em *Pteris vittata* L. (Cao *et al.*, 2004).

Relativamente à actividade total da SOD as diferenças obtidas entre as parcelas foram unicamente nas folhas maduras de São Domingos e Caldeirão. A maior actividade total da SOD foi determinada nas folhas do Pomarão (Novas: 58,68-71,31 U/g; Maduras: 57,32-63,95 U/g). É de notar que a actividade nas folhas novas desta área se distinguiu significativamente da observada no Caldeirão (25,78-42,81 U/g) e São Domingos (40,88-42,66 U/g), no entanto nas folhas maduras tal facto só foi observado nas folhas do Caldeirão (16,33-38,21 U/g). De uma maneira geral, observou-se que a actividade total da SOD aumentou das folhas novas para as maduras de São Domingos enquanto que no Caldeirão e Pomarão aquela actividade diminuiu.

Em São Domingos e Caldeirão o comportamento da actividade total da SOD nas folhas com diferentes desenvolvimentos relacionou-se com o teor em Zn, como também observado nas fracções solúvel e iónica. Assim, o aumento do teor em Zn nas folhas induziu o aumento da actividade enzimática total nas folhas de São Domingos ($r=0,727$) porém, nas do Caldeirão provocou a inibição da enzima ($r=-0,762$). Tais factos sugerem que apesar de as plantas de ambas as áreas serem acumuladoras as provenientes de São Domingos toleram maiores concentrações de Zn nas folhas. Por outro lado, as alterações observadas entre as folhas do Pomarão sugerem que o aumento do teor de Pb nas folhas ($r=-0,749$) inibe a actividade a actividade total da SOD. Segundo Sharma e Dubey (2005) a inibição enzimática pelo Pb resulta da interacção com os grupos funcionais da proteína alterando a sua função.

Os valores da actividade total da SOD para as folhas novas e maduras foram semelhantes não mostrando diferenças significativas o que pode sugerir que a actividade da SOD não intervém directamente na tolerância a elevadas concentrações de elementos químicos no *Cistus ladanifer*.



As folhas colhidas no Verão (Figura 45a e b) demonstraram actividade de SOD em ambas as fracções, solúvel e iónica, independentemente do local de colheita. Nesta estação a actividade na fracção solúvel continua a ser maior que na fracção iónica possuindo nas folhas novas entre 54 e 74% e nas maduras entre 62 e 78% da actividade total. O único caso onde não se verificou esta situação foi nas folhas maduras provenientes da parcela P07 onde a fracção solúvel foi apenas de 41,33%. Em ambos os tipos de folhas observaram-se diferenças significativas na actividade da SOD na fracção solúvel das parcelas do Caldeirão e Pomarão. Apesar de as folhas novas e maduras de São Domingos apresentarem menores actividades da SOD na fracção solúvel não houve distinção entre as áreas de amostragem.

Analisando as variações ocorridas na actividade da SOD na fracção solúvel entre as folhas novas e maduras do Verão observou-se que estas variavam consoante a parcela. Assim, de uma maneira geral observou-se uma diminuição da actividade enzimática em São Domingos e Pomarão e um aumento desta no Caldeirão. Em São Domingos a diminuição da actividade da SOD parece estar relacionada com o aumento de Pb ($r=-0,768$) ou de As ($r=-0,667$) o qual provoca a inibição da enzima. No Caldeirão, a actividade parece não estar relacionada com nenhum dos elementos estudados já que os valores das correlações foram sempre inferiores a 0,5. No Pomarão os comportamentos observados na actividade da SOD com o desenvolvimento das folhas foram inversos ao do Caldeirão contudo, também não se relacionaram com nenhum dos elementos estudados. Tal facto pode indicar que esta enzima intervém também na tolerância ao tempo quente, seco e com maior incidência da radiação solar.

A uniformidade observada nos dados de todas as áreas de amostragem sugere a existência de outro mecanismo de tolerância face às concentrações dos elementos químicos estudados.

A actividade da SOD na fracção iónica apresentou diferenças significativas em ambos os tipos de folhas colhidas nas parcelas do Caldeirão (Novas: 8,51-21,76 U/g; Maduras: 5,49-22,50 U/g) e ainda nas folhas novas do Pomarão (12,08-26,42 U/g). Analisando os dados da actividade enzimática das três áreas verificou-se uma diminuição geral da actividade da SOD das folhas novas para as maduras sendo que todos os valores obtidos foram semelhantes entre as áreas. Em São Domingos e no Caldeirão o decréscimo da actividade enzimática na fracção iónica parece relacionar-se com o aumento do teor nas folhas de As ($r=-0,856$) e Zn ($r=-0,629$), respectivamente. No Pomarão o comportamento observado não se relacionou com nenhum dos elementos estudados, como também observado na fracção solúvel, sugerindo que a diminuição da actividade desta enzima é compensada pela actuação de outro mecanismo de tolerância antioxidativa.

Em relação à actividade total da SOD nas folhas novas e maduras das diferentes áreas de amostragem os valores obtidos foram, de uma maneira geral, semelhantes contudo, no Caldeirão e Pomarão as parcelas apresentaram diferenças significativas entre si (Novas – C: 18,62-85,02 U/g P: 42,10-90,00 U/g; Maduras – C: 25,98-80,89 U/g P: 19,84-71,42 U/g). As maiores actividades totais da SOD foram observadas nas folhas novas do Pomarão e nas folhas maduras do Caldeirão. Por outro lado, constatou-se que em São Domingos e Pomarão ocorreu uma diminuição da actividade total enquanto que no Caldeirão esta se manteve, no entanto estas variações não foram significativas.

A diminuição observada na actividade total da SOD nas folhas de São Domingos pode estar associada ao aumento do teor em Pb ($r=-0,776$) devido, possivelmente, a ter substituído o cofactor da enzima alterando a sua função tal como referido por Sharma e Dubey (2005). Sendo que, o comportamento da actividade desta enzima nas folhas do

Caldeirão e Pomarão foi distinto e não se relacionou com nenhum dos elementos estudados pode sugerir-se que esta enzima é inibida na presença de maiores temperaturas e radiações, observadas no Pomarão.

Comparando as duas estações do ano verificou-se que os valores da actividade da SOD foram semelhantes em ambos os tipos de folhas. As folhas novas de Verão apresentaram, independentemente da área de estudo, actividade superior àquela que se observou na Primavera enquanto que, nas folhas maduras tal só se verificou no Caldeirão. Isto pode sugerir que nas folhas novas de *Cistus ladanifer* a actividade da SOD está envolvida na defesa contra o stresse hídrico e radiações UV-B enquanto que, nas folhas maduras este mecanismo pode ser substituído ou complementado por outro mecanismo quando a intensidade do stresse é maior.

3.10 Considerações de ordem económica

Devido à sua complexidade, as decisões económicas sobre descontaminação e remediação/restauração do ambiente são difíceis, tanto para as entidades governamentais como para as privadas.

A estimativa mundial para os gastos anuais com a descontaminação ambiental podem rondar entre 25 a 30 biliões de dólares (Dinardi *et al.*, 2003). Este mercado, actualmente estável nos Estados Unidos, tende a crescer em muitos mais países já que os investimentos para tratamento de resíduos crescem à medida que aumentam as exigências da sociedade e as leis aplicadas se tornam mais rígidas.

Embora algumas tecnologias químicas e físicas estejam disponíveis para o tratamento de locais contaminados, a selecção depende da eficiência e aplicabilidade bem como, do custo associado a todo o processo. Estas tecnologias são na maioria dos

casos muito específicas sendo a sua escolha dificultada quando a complexidade do sistema a tratar aumenta.

A imobilização ou extração de metais através de técnicas físico-químicas possui custos elevados devido a incluir diferentes tratamentos inerentes à tecnologia tais como: planificação, construção de infra-estruturas ou arrendamento, escavação, transporte, entre outras. O custo deste tipo de técnicas pode variar consoante o tipo de solo, forma e concentração dos contaminantes, tamanho da área e localização da mesma. Assim, este tipo de limpeza pode rondar entre 1000 (Cunningham, 1996) e os três milhões de dólares por tonelada de solo (Chaney *et al.*, 1995). Estes valores podem aumentar ainda quando são incluídos processos de reabilitação das condições biológicas tais como fertilidade e restauração ambiental. Porém, algumas das características biológicas podem ser perdidas ou de difícil recuperação traduzindo deste modo um prejuízo para o sistema. Por outro lado, estas tecnologias não têm em conta o sistema no seu conjunto havendo frequentemente a intervenção desequilibrada num dos elementos (por exemplo solo ou água) a qual poderá provocar, inevitavelmente, uma afectação nos outros recursos naturais do meio envolvente.

Nas últimas décadas a fitorremediação tem adquirido grande interesse tanto no sector público como privado. Assim, segundo Glass (1998), nos últimos 10 anos surgiram inúmeras companhias nos Estados Unidos e na Europa que exploram a fitorremediação para fins lucrativos (Phytotech e BioPlanta), ou indústrias multinacionais que empregaram esta técnica nos seus próprios sítios contaminados (Union Carbide, Monsanto e Rhone-Poulanc).

A remediação através da cobertura vegetal é uma alternativa às tecnologias convencionais sendo considerada como um método mais eficiente na estabilização física dos resíduos mineiros e redução dos efeitos da poluição (Bargagli, 1998). Porém, a

avaliação económica desta técnica torna-se complexa devido a alguns efeitos serem de difícil estimativa monetária.

A análise custo-efectividade é um método de avaliação económica utilizado quando a análise custo-benefício é difícil de implementar, como é este caso. Assim, a análise custo-efectividade compara alternativas exclusivas em que o resultado não é expresso em termos monetários.

O processo de fitorremediação acarreta vários benefícios para o local devido a conduzir a uma melhoria das condições naturais tais como: a actividade biológica e estrutura do solo, imobilização e possível diminuição dos elementos químicos contaminantes, minimização da erosão e aumento do teor em matéria orgânica e capacidade de retenção de água. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que o *Cistus ladanifer* pode crescer em locais contaminados, como é a mina de São Domingos, não causando inconvenientes para o meio envolvente.

Para rentabilizar o processo de vegetalização de áreas com elevadas concentrações de elementos químicos é indicado o uso de uma flora tolerante a estas condições extremas, preferencialmente autóctone ou espontânea da região e com potencial interesse económico (Ernst, 1996). Deste modo, a combinação do processo de vegetalização com *Cistus ladanifer* juntamente com um uso múltiplo da área pode reduzir os custos de implementação e monitorização da área e gerar um benefício económico.

A quantificação dos benefícios de um sistema de uso múltiplo requer a estimativa do melhoramento das condições biofísicas do local e da mais valia económica que pode trazer este serviço. Os benefícios do uso do processo de fitorremediação podem abranger vários grupos identificados no Quadro 19.

O uso de *Cistus ladanifer* na vegetação do local pode proporcionar uma melhoria à região já que, a sua utilização pode ser quase integral contribuindo para a sua rentabilidade económica. As folhas são fortemente viscosas e aromáticas podendo ser usadas na produção de láudano e essência para a indústria farmacêutica e perfumaria, caso a qualidade destes produtos não seja alterada. A quantidade de resina de láudano excretada pode atingir de 10 a 14% por unidade de peso seco (Correia, 2002) e, embora a esteva não seja uma espécie produtora de néctar produz muito e excelente pólen.

Quadro 19 – Grupos beneficiados com o uso do processo de fitorremediação na Mina de São Domingos.

Grupo	Possível benefício obtido
Agricultura	Com a minimização da migração dos elementos potencialmente tóxicos, as áreas envolventes ficam menos susceptíveis a possuir elevadas concentrações de contaminantes que podem diminuir a produção agrícola ou a pastorícia
Indústria	Caso o óleo de láudano ou a essência da esteva não tenha sido alterada com as concentrações dos contaminantes, estes produtos podem ser comercializados As sementes também podem ser outro produto comercializado para vegetação de locais contaminados
Turismo	Valorização do património mineiro, atractivo paisagístico e turístico
Sociedade	Saúde pública

A recuperação ambiental da mina de São Domingos pode ser considerada como um dos passos para a valorização do património mineiro, já que esta área possui um potencial didáctico e geológico forte (Matos *et al.*, 2002). Assim, a estabilização do meio através do uso de plantas pode combinar uma minimização da contaminação no ambiente natural e na saúde pública e um atractivo ao nível paisagístico. Por outro lado, o uso desta área mineira como vertente didáctica, científica e turística poderá também induzir um aumento na economia da região.

4. Conclusões

Embora os dados sobre o teor total em elementos químicos no solo sejam de uma maneira geral abundantes estes não reflectem uma informação detalhada da sua distribuição pelas diferentes fases constituintes do solo e, conseqüentemente do sistema solo-água-plantas. Assim, a determinação do teor total de qualquer elemento apenas proporciona uma indicação da concentração existente no solo amostrado. Contudo, o valor total é usado em diversos países como parâmetro da maioria da legislação para a protecção e qualidade do solo. Assim, os solos podem requerer um processo de remediação caso a sua concentração num ou vários elementos exceda o limite estipulado como máximo admissível.

Os dados das concentrações extraíveis dos elementos químicos na solução do solo ou em posição de troca nas fases sólidas orgânicas e inorgânicas do solo podem ser muito úteis no prognóstico da sua disponibilidade, efeitos tóxicos nas plantas e na actividade biológica do solo. Por outro lado, também pode ser usados como indicadores do potencial risco que o contaminante exerce no ambiente e saúde pública.

A compartimentação dos elementos químicos entre a fase sólida do solo e a solução do solo determina a sua mobilidade e disponibilidade. A compreensão da mobilidade e disponibilidade dos elementos para as plantas é o primeiro passo para uma possível implementação eficiente de um programa de remediação, com especial ênfase na minimização de riscos para o ambiente e saúde pública. Assim, os resultados obtidos mostraram que:

- A teores altos de elementos químicos no solo, nomeadamente os teores de As e Pb nos solos de São Domingos, podem corresponder baixas taxas de disponibilidade desses mesmos elementos e conseqüentemente menor perigo

para os organismos, devido aos elementos estarem ligados fortemente a certas fracções do solo;

- A distribuição dos elementos pelas diferentes fracções do solo relaciona-se com as características do próprio solo e de cada elemento.

O uso dos vários métodos de extracção para a avaliação da fracção disponível permitiu comparar a eficiência de cada método consoante o elemento e solo amostrado. Assim, verificou-se que a melhor correlação entre a quantidade extraída com determinada solução extractante e a concentração na planta variou com a área de amostragem e o elemento químico.

De modo a poder observar a influência das condições ambientais foi de extrema importância comparar a área mineira com duas outras áreas não contaminadas onde, as características climáticas fossem semelhantes ou distinta da área de São Domingos.

Os resultados deste estudo mostraram que as plantas de *Cistus ladanifer* são capazes de sobreviver em locais com diferentes níveis de contaminação e de acumular quantidades consideravelmente elevadas de alguns elementos químicos na parte aérea sem, no entanto, demonstrar efeitos no seu desenvolvimento. Deste modo, pode-se considerar que esta espécie é uma pseudometalófita já que, consegue crescer de igual modo em locais contaminados e não contaminados.

A elevada plasticidade desta planta conduziu a uma série de comportamentos adaptativos relacionados com o clima mediterrânico e com a situação de stresse a elevada concentração de elementos contaminantes. As respostas das folhas de *Cistus ladanifer* face às concentrações de elementos dependeram do seu estágio de desenvolvimento e das características do local onde crescem.

Relativamente à distribuição interna na planta e acumulação dos elementos constataram-se variações consoante o elemento químico, época de recolha e população. Estas variações podem sugerir diferenças na capacidade de retenção dos elementos absorvidos ou na translocação dos mesmos para os vários órgãos da planta. A distribuição dos elementos pelas diferentes partes da planta, e a consequente ligação destes a diferentes ligandos devido à sua elevada afinidade, é uma estratégia comum na prevenção da fitotoxicidade, tal como defendido por Singh *et al.* (2004).

Por outro lado, os resultados das análises químicas mostraram que, apesar das folhas em alguns casos atingirem, para alguns casos, valores considerados tóxicos para alguns elementos, as plantas não se comportaram como acumuladoras, é o caso do Pb na área de São Domingos. É de salientar ainda que no Caldeirão e no Pomarão as plantas desta espécie apresentaram variabilidade de comportamentos face a este mesmo elemento (acumuladoras e não-acumuladoras) dentro da própria população. Para o Zn todas as populações de *Cistus ladanifer* se comportaram como acumuladoras sendo também observado que, na população do Pomarão havia plantas não-acumuladoras. Para os restantes elementos esta espécie pode ser considerada como não-acumuladora.

As diferenças observadas na absorção dos elementos por estas plantas podem estar relacionadas com variações no seu genótipo ou na capacidade de elas próprias determinarem a absorção quando em presença de elevadas concentrações de elementos. O comportamento apresentado pelas plantas de *Cistus ladanifer* provenientes de São Domingos pode resultar do facto destas plantas terem surgido naturalmente na área mineira, pois segundo Watanabe (1997), a vegetação que cresce em áreas contaminadas representa importante fonte potencial de ecótipos tolerantes à contaminação e apresenta-se adaptada ao ambiente de stresse que aí se faz sentir.

A acumulação dos elementos estudados nas folhas pareceu afectar negativamente a área foliar e o conteúdo em clorofilas, no entanto o teor em carotenóides, em azoto e em água não foi significativamente afectado. O efeito de cada elemento nestes parâmetros variou com o tipo de folha, época de recolha e população.

Por outro lado, a absorção e concentração de elementos químicos pode induzir stress oxidativo nas plantas de *Cistus ladanifer* devido ao aumento da produção de radicais livres. A variação da actividade de cada uma das enzimas face aos diferentes elementos revelou uma resposta específica das enzimas para cada elemento. Esta resposta pode depender da sensibilidade da população, isto é, a mesma concentração de um elemento pode induzir um funcionamento diferente das enzimas. Assim, a população de São Domingos pareceu demonstrar menor sensibilidade ao teor de elementos acumulados nas folhas já que, em alguns casos, concentrações consideradas tóxicas para a generalidade das plantas não induziram a inibição da actividade enzimática. Para as populações do Caldeirão e Pomarão a presença de concentrações mais baixas, relativamente às obtidas para São Domingos, provocou o declínio da actividade das enzimas.

A capacidade das plantas de *Cistus ladanifer* aumentarem a protecção antioxidativa de modo a combaterem os efeitos negativos da acumulação dos elementos, pareceu ser limitada para alguns casos já que a exposição a maiores concentrações resultava na diminuição da actividade e não no aumento.

Todavia é de notar que não foram analisadas as possíveis interacções químicas entre os elementos logo, os comportamentos observados podem também estar relacionados com este facto. Embora seja de conhecimento geral que o excesso de elementos químicos no solo afecta o desenvolvimento das plantas é difícil dizer, principalmente num local como a Mina de São Domingos onde os níveis de

contaminação englobam vários elementos, se o impacto de um determinado elemento é devido à sua incorporação nos tecidos vegetais ou se está relacionado com efeitos indirectos na absorção ou metabolismo de outros elementos. Assim, o estudo dos mecanismos de tolerância de plantas desenvolvidas em solos enriquecidos por vários elementos químicos é um processo complexo não sendo demonstrado neste estudo se o mesmo mecanismo defende a planta contra diferentes elementos (co-tolerância) ou se existem mecanismos específicos para cada elemento.

Os resultados relativos às sementes permitiram uma informação importante para execução de um programa de vegetalização da área mineira, no entanto sugere-se a execução de outros estudos de modo a conseguir obter os melhores resultados neste tipo de programa. Assim, os dados obtidos revelaram a possibilidade de uso das sementes de plantas que crescem no próprio local.

Face aos resultados obtidos pode-se considerar o uso de plantas de *Cistus ladanifer* na vegetalização de áreas mineiras. Por outro lado, sendo uma espécie autóctone e pioneira pode contribuir para a pedogénese e recuperação das características dos solos incipientes e ainda a possibilidade de instalação de outras espécies vegetais. Desta forma pode considerar-se o uso desta espécie em possíveis projectos de remediação de zonas mineiras.

Para o desenvolvimento desta tecnologia é necessário continuar a estudar e identificar novas espécies de plantas que naturalmente resistam e acumulem elementos e possam fornecer uma boa cobertura do solo de modo a minimizar a erosão hídrica e eólica.

5. Bibliografia

- Abdel-Basset, R.; Issa, A. A.; Adam, M. S. (1995), Chlorophyllase Activity: Effect of Heavy Metals and Calcium, *Photosynthetica* 31, 421-425. *In: Thrassyvolous, M.; Stentiford, E. I.; Millner, P. A.* (2003), The Effect of Heavy Metals Accumulation on the Chlorophyll Concentration of *Typha latifolia* Plants, Growing in a Substrate Containing Sewage Sludge Compost and Watered with Metaliferus Water, *Ecological Engineering* 20, 65-74.
- Abreu, M. M. (1999), Comportamento das Fases Sólidas no Sistema Sólido-líquido, Apontamentos para a Disciplina de Geoquímica do Ambiente, Edição da Associação de Estudantes do Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.
- Alados, C. L.; Navarro, T.; Cabezudo, B. (1999), Tolerance Assesment of *Cistus ladanifer* to Serpentine Soils by Development Stability Analysis, *Plant Ecology* 143, 51-66.
- Alexieva, V.; Sergier, I.; Mappelli, S.; Karanov, E. (2001), The Effect of Drought and Ultraviolet Radition on Growth and Stress Marked in Pea and Wheat, *Plant Cell Environment* 24, 1337-1344.
- Alloway, B. J. (1990), Heavy Metals in soils (eds.), Blackie, Londres, 339. *In: Prasad, M. N.; Hagemeyer, J.,* Heavy Metal Stress in Plants From Molecules to Ecosystems, Springer, Berlim, 401.
- Alloway, B. J. (1995), Heavy Metals in Soils (eds.), Blackie, Londres, 368. *In: Batista, M. J.; Abreu, M. M.; Serrano Pinto, M.* (2003), Distribuição da Esteva, *Cistus ladanifer* L., em Solos com Défice e Excesso de Cobre na Região Mineira de Neves Corvo, *Memórias e Notícias*, nº 28 Nova Série, 343-357.

- Alvarega, P. M.; Araújo, M. F.; Silva, J. A. L. (2004), Elemental Uptake and Root-leaves Transfer in *Cistus ladanifer* L. Growing in a Contaminated Pyrite Mining Area (Aljustrel-Portugal), *Water, Air, and Soil Pollution* 152, 81-96.
- Armienta, M. A.; Rodríguez, R.; Cenicerros, N.; Juárez, F.; Cruz, O. (1996), Distribution, Origin and Fate of Chromium in Soils in Guanajuato, Mexico, *Environmental Pollution* 91, 391-397. *In: Joaquim, C.; Abreu, M. M.; Fernandes, M. L. (2003a), Fraccionamento do Crómio no Horizonte Ap de um Solo Lixissolo Férrico e de um Luvisso Estagnico após Enriquecimento em Cr (III), Anais do Instituto Superior de Agronomia* 49, 179-191.
- Asada, K. (1992), Ascorbate Peroxidase – a Hydrogen Peroxide-scavenging Enzyme in Plants, *Physiologia Plantarum* 85, 235-241.
- Bargagli, R. (1998), Trace Metals in Terrestrial Plants: An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery, Springer-Verlag, Berlin, 324. *In: Madejón, P.; Mrillo, J. M.; Marañón, T.; Cabrera, F.; López, R. (2002), Bioaccumulation of As, Cu, Fe and Pb in Wild Grasses Affected by Aznalcóllar Mine Spill (SW Spain), The Science of Total Environment* 290, 105-120.
- Baker, A. J. M. (1981), Accumulators and Excluders-strategies in the Response of Plants to Heavy Metals, *Journal Plant Nutrition* 3, 643-654.
- Baker, A. J. M.; McGrath, S. P.; Sidoli, C. M. D; Reeves, R. D. (1994), The Possibility of in Situ Heavy Metal Decontamination of Polluted Soils Using Crops of Metal-accumulating Plants, *Resources Conservation*, 1141-1149. *In: Pulford, I. D; Watson, C. (2003), Phytoremediation of Heavy Metal-contaminated Land by Trees, Environment International* 29, 529-540.
- Baker, A. J. M.; Walker, P. L. (1989), Physiological Responses of Plants to Heavy Metals and the Quantification of Tolerance and Toxicity, *Chemical Speciation and*

- Bioavailability* 1, 7-17. In: Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley publishers, Bristol, 469.
- Barber, S. A.; Lee, R. B. (1974), The Effect of Microorganisms on Absorption of Manganese by Plants, *New Phytologist* 73, 97-106. In: Lasat, M. M. (2002), Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms, *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Bastida, F.; Talavera, S. (2002), Temporal and Spatial Patterns of Seed Dispersal in Two *Cistus* Species (Cistaceae), *Annals of Botany* 89, 427-434.
- Batista, M. J. (2003), Comportamento de Elementos Químicos no Sistema Rocha-solo-sedimento-planta na Área Mineira de Neves Corvo: Implicações Ambientais, Tese de Doutorado do Departamento de Geociências da Universidade de Aveiro.
- Batista, M. J.; Abreu, M. M.; Serrano Pinto, M. (2003), Distribuição da Esteva, *Cistus ladanifer* L., em Solos com Défice e Excesso de Cobre na Região Mineira de Neves Corvo, *Memórias e Notícias*, nº 28 Nova Série, 343-357.
- Batista, M. J.; Abreu, M. M.; Serrano Pinto, M. (2004), Comportamento do Arsénio (III) e (V) em Dois Litossolos e em Estevas na Área Mineira de Neves Corvo, *Revista de Ciências Agrárias* XXVII, n.º 1, 291-300.
- Biddappa, C. C.; Chino, M.; Kumazawa, K. (1982), Migration of Heavy Metals in Two Japanese Soils, *Plant Soil* 66, 299-316. In: Brümmer, G. W. (1986), The Importance of Chemical “Speciation” in Environmental Processes, Springer-Verlag, Berlin.
- Bienfait, H. F.; Duivenvoorden, J.; Verkerke, W. (1982), Ferric Reduction by Roots of Chlorotic Bean Plants: Indications for Enzymatic Process, *Journal of Plant Nutrition* 5, 451-456. In: Lasat, M. M. (2002), Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms, *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.

- Bingham, F. T.; Strong, J. E.; Sposito, G. (1983), Influence of Chloride Salinity on Cadmium Uptake by Swiss Chard, *Soil Science* 135, 160-165.
- Bleeker, P. M.; Assunção, A. G. L.; Teiga, P. M.; Koe, T.; Verkleij, J. A. C. (2002), Revegetation of Acidic, As-contaminated Jales Mine Spoil Tips Using a Combination of Spoil Amendments and Tolerant Grasses, *The Science of the Total Environment* 300, 1-13.
- Bolaños, M. M.; Guinea, E. (1949), Jarales y Jaras (Cistografia Hispanica). Boletim do M. A. – IFIE 49. Ed. Ares, Madrid. *In*: Simões, M. P. D (2002), Dinâmica de Biomassa (carbono) e Nutrients em *Cistus salviifolus* L. e *Cistus ladanifer* L. – Influência nas características do solo. Tese de doutoramento na Universidade de Évora.
- Boon, D. Y.; Soltanpour, P. N. (1992), Lead, Cadmium, and Zinc Contamination of Aspen Garden Soils and Vegetation, *Journal of Environmental Quality* 21, 82-86.
- Bourelhier, P. H.; Berthelin, J.; Pédro, G. (1998), Dynamique des Éléments en Traces dans les Sols : Mobilité et Transferts vers les Eaux Souterraines et les Plantes, Contamination des Sols par le Éléments en Traces : Les Risques et leur Gestion, Académie des Sciences 42, Lavoisier Tec&Doc., Paris, 440.
- Brown, H.; Martin, M. H. (1981), Pre-treatment Effects of Cadmium on the Roots Growth of *Holcus lanatus* L., *New Phytologist* 89, 621-629.
- Brümmer, G. W. (1986), Heavy Metal Species, Mobility and Availability in Soils, The Importance of Chemical “Speciation” in Environmental Processes, Springer-Verlang Berlin, 169-192.
- Brümmer, G. W.; Herms, U. (1983), Influence of Soil Reaction and Organic Matter on Solubility of Heavy Metals in Soils, Effects of Accumulation of Air Pollutants in

- Forest Ecosystems, D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Alemanha 243. In: Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley publishers, Bristol, 469.
- Bural, G. I.; Dixon, D. G.; Glick, B. R. (2000), Plant Growth-promoting Bacteria that Decrease Heavy Metal Toxicity in Plants, *Canadian Journal of Microbiology* 46, 237-245. In: Lasat, M. M. (2002), Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms, *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Cao, X.; Ma, L. Q.; Tu, C. (2004), Antioxidative Responses to Arsenic in the Arsenic-hyperaccumulator Chinese Brake Fern (*Pteris vittata* L.), *Environmental Pollution* 128, 317-325.
- Carpin, S.; Crèvecoeur, M.; Meyer, M.; Simon, P.; Greppin, H.; Pennel, C. (2001), Identification of a Ca²⁺-Pectate Binding Site on an Apoplastic Peroxidase, *The Plant Cell* 13, 511-520.
- Chance, B.; Maehly, A. C. (1955), Assay of Catalases and Peroxidases, *Methods in Enzymology* 2, 764-817.
- Chao, T. T. (1972), Selective Dissolution of Manganese Oxides from Soils and Sediments with Acidified Hydroxylamine Hydrochloride, *Soil Science* 36, 764-768.
- Choudhury, S.; Panda, S. K. (2004), Induction of Oxidative Stress and Ultrastructural Changes in Moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under Lead and Arsenic Phytotoxicity, *Current Science* 87, 342-348. In: Panda, S. K; Choudhury, S. (2005), Changes in Nitrate Reductase Activity and Oxidative Stress response in the Moss *Polytrichum commune* Subjected to Chromium, Copper and Zinc Phytotoxicity, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 191-197.
- Clemens, S.; Bloss, T.; Vess, C.; Neumann, D.; Nies, D. H.; zur Nieden, U. (2002), A Transporter in the Endoplasmic Reticulum of *Schizosaccharomyces pombe* Cells Mediates Zinc Storage and Differentially Affects Transition Metal Tolerance,

- Journal of Biological Chemistry* 277, 18215-18221. In: Dučić, T.; Polle, A. (2005), Transport and Detoxification of Manganese and Copper in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 103-112.
- Colpaert, J. V.; van Assche, J. A. (1992), Zinc Toxicity in Ectomycorrhizal *Pinus sylvestris*, *Plant Soil* 143, 201-211. In: Ernst, W. H. O. (1996), Bioavailability of Heavy Metals and Decontamination of Soils by Plants, *Applied Geochemistry* 11, 163-167.
- Corral, R.; Pita, J. M.; Pérez-García, F. (1990), Some Aspects of Seed Germination in Four Species of *Cistus* L., *Seed Science Technology* 18, 321-325. In: Pérez-García, F. (1997), Germination of *Cistus ladanifer* Seeds in Relation to Parent Material, *Plant Ecology* 133, 57-62.
- Correia, O. (2002), Os *Cistus*: as Espécies do Futuro?. In: Loução, K. A. (2002), Fragmentos de Ecologia, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Escolar Editora, Portugal, 97-119.
- Cunningham, S. D.; Berti, W. R.; Huang, J. W. (1995), Phytoremediation of Contaminated Soils, *Environmental Biotechnology* 13, 393-397.
- Cunningham, S. D.; Anderson, T. A.; Schwab, P.; Hsu, F. C. (1996), Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants, *Advance in Agronomy* 56, 55-114.
- Cuny, D.; Van Halluwyn, C.; Shirali, P.; Zerimech, F.; Jerome, L.; Haguenoer, J. M. (2004), Cellular Impact of metal Trace Elements in Terricolous Lichen *Diploschistes muscorum* (Scop.) R. Sant. – Identification of Oxidative Stress Biomarker, *Water, Air and Soil Pollution* 152, 55-69. In: Panda, S. K; Choudhury, S. (2005), Changes in Nitrate Reductase Activity and Oxidative Stress response in the Moss *Polytrichum commune* subjected to Chromium, Copper and Zinc Phytotoxicity, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 191-197.

Decreto-Lei nº 236/98, Diário da República I, série A nº 176/98 de 1 de Agosto de 1998: 3676-3721.

De Endredy, A. S. (1963), Estimation of Free Iron Oxides in Soils and Clays by Photolytic Method, *Clay Mineralogy Bulletin* 9, 209-217.

Delgado, J. A.; Serrano, J. M.; Lopez, F.; Acosta, F. J. (2001), Heat Shock, Mass-dependent Germination and Seed Yield as Related Components of Fitness in *Cistus ladanifer*, *Environmental Experimental Botany* 46, 11-20.

Dietz, K. J.; Krämer, U.; Baier, M. (1999), Free Radicals and Reactive Oxygen Species (ROS) as Mediators of Damage During Heavy Metal Stress. *In*: Prasad, M. N. V.; Hagemeyer J., Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems, Springer, Berlin, 73-97.

Dinardi, A. L.; Formagi, V. M.; Coneglian, C. M. R.; Brito, N. N.; Sobrinho, G. D.; Tonso, S.; Pelegrini, R. (2003), Fitorremediação, Actas do III Fórum de Estudos Contábeis, Rio Claro, Brasil.

Dinelli, E.; Lombini, A. (1996), Metal Mobility and Plant Uptake in Copper Sulphide Mine Spoil Dump (Vigonzano Mine, Northern Apennines, Italy), *Mineralogica Petrographica Acta XXXVII*, 125-140. *In*: Dinelli, E.; Lombini, A. (1996), Metal Distributions in Plants Growing on Copper Mine Spoils in Northern Apennines, Italy: the Evaluation of seasonal Variations, *Applied Geochemistry* 11, 375-385.

Dinelli, E.; Lombini, A. (1996), Metal Distributions in Plants Growing on Copper Mine Spoils in Northern Apennines, Italy: the Evaluation of seasonal Variations, *Applied Geochemistry* 11, 375-385.

Dosskey, M. G.; Adriano, D. C. (1993), Trace Element Toxicity in VA-mycorrhizal Cucumber Grown on Weathered Coal Fly Ash, *Soil Biology Biochemistry* 25, 1547-

1552. In: Ernst, W. H. O. (1996), Bioavailability of Heavy Metals and Decontamination of Soils by Plants, *Applied Geochemistry* 11, 163-167.
- Drazkiewz, M. (1994), Chlorophyll - Ocurrence, Functions, Mechanisms of Action, Effects of Internal and External Factors, *Photosynthetica* 30, 321-331. In: Sharma, P.; Dubey, R. S. (2005), Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.
- Dučić, T.; Polle, A. (2005), Transport and Detoxification of Manganese and Copper in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 103-112.
- Dueck, Th. A.; Visser, P.; Ernst, W. H. O.; Schat, H. (1986), Vesicular-arbuscular Mycorrhizae Decrease Zinc-toxicity to Grasses Growing in Zinc-polluted Soil, *Soil Biology Biochemistry* 118, 331-333. In: Ernst, W. H. O. (1996), Bioavailability of Heavy Metals and Decontamination of Soils by Plants, *Applied Geochemistry* 11, 163-167.
- Egert, M; Mitevini, M. (2002) Influence of Drought on Some Physiological Parameters Symptomatic for Oxidative stress in Leaves of Chives (*Allium schoenoprasum*), *Environmental and Experimental Botany* 48, 43-49.
- El Katib, E. A.; Benner, O. L.; Wright, R. J. (1984), Arsenite Sorption and Desorption in Soils, *Soil Science Society of America Journal* 48, 1025-1030.
- Ernst, W. H. O. (1996), Bioavailability of Heavy Metals and Decontamination of Soils by Plants, *Applied Geochemistry* 11, 163-167.
- Ernst, W. H. O.; Verkleij, A. A. C.; Schat, H. (1992), Metal tolerance in plants, *Acta Botanica Neerlandica* 41, 229-248.
- Farago, M. E.; Merha, A. (1991), Uptake of Elements by copper-tolerant Plant *Armeria maritime*, Metal Compounds in Environment and Life – Interrelation Between Chemistry and Biology, Proceedings of the Fourth Hans Wolfgang Nürnberg

- Memorial Workshop. *In: Alvarega, P. M.; Araújo, M. F.; Silva, J. A. L. (2004), Elemental Uptake and Root-leaves Transfer in Cistus ladanifer L. Growing in a Contaminated Pyrite Mining Area (Aljustrel-Portugal), Water, Air, and Soil Pollution* 152, 81-96.
- Feierabend, J.; Engel, S. (1986), Photoinactivation of Catalase in Vitro and in Leaves, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 251, 567-576. *In: Verma, S.; Dubey, R. S. (2003), Lead Toxicity Induces Lipid Peroxidation and Alters the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing rice plants, Plant Science* 164, 645-655.
- Fenner, M. (1985), Seed Ecology, Chapman and Hall, Londres, 151. *In: Thanos, C. A.; Georghiou, K.; Kadis, C.; Pantazi, C. (1992), Cistaceae: a Plant Family with Hards Seeds, Israel Journal of Botany* 41, 251-263.
- Flathman, P. E.; Lanza, G. R. (1998), Phytoremediation: Current Views on Emerging Green Technology. *Journal of Soil Contamination* 7, 415-432. *In: Pang, J.; Chan, G. S. Y.; Zhang, J.; Liang, J.; Wong, M. H. (2003), Physiological Aspects of Vertiver Grass for Rehabilitation in Abandoned Metalliferous Mine Wastes, Chemosphere* 52, 1559-1570.
- Freitas, H.; Prasad, M. N. V.; Pratas J. (2004), Plant Community Tolerant to Trace Elements Growing on the Degraded Soils of São Domingos Mine in South East of Portugal: Environmental Implications, *Environment International* 30, 65-72.
- Fuhrer, J. (1988), Ethylene Biosynthesis and Cadmium Toxicity in Leaf Tissue of Beans *Phaseolus vulgaris* L., *Plant Physiology* 70, 162-167.
- Gadd, G. M.; White, C. (1989), Heavy Metal and Radionuclide Accumulation and Toxicity in Fungi and Yeasts, Cambridge Press, 364. *In: Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley Publishers, Bristol, 469.*

- Galán, E.; Gómez, A. J. L.; González, I.; Fernández-Caliani, J. C.; Morales, E.; Giráldez, I. (2003), Heavy Metal Partitioning in River Sediments Severely Polluted by Acid Mine Drainage in the Iberian Pyrite Belt, *Applied Geochemistry* 18, 409-421.
- Gallego, S. M.; Benavides, M. P.; Tomaro, M. L. (1996), Effect of Heavy Metal Ion Excess on Sunflower Leaves: Evidences for Involvement of Oxidative Stress, *Plant Science* 121, 151-159.
- Gaspar, T.; Penel, C.; Hagege, H.; Greppin, H. (1991), Peroxidase in Plant Growth, Differentiation and Development Processes, University M. Curie, Sklodowska, 281.
- In:* Verma, S.; Dubey, R. S. (2003), Lead Toxicity Induces Lipid Peroxidation and Alters the Activities of Antioxidant Enzymes in Growing rice plants, *Plant Science* 164, 645-655.
- Gaspar, O. (1998), História da Mineração dos Depósitos de Sulfuretos Maciços Vulcanogénicos da Faixa Piritosa Portuguesa, *Boletim de Minas* 35, n.º 4, 401-414.
- In:* Freitas, H.; Prasad, M. N. V.; Pratas J. (2004), Plant community tolerant to trace elements growing on the degraded soils of São Domingos mine in the south east of Portugal: environmental implications. *Environmental International* 30, 65-72.
- Glass, D. J. (1998), The 1998 United States Market for Phytoremediation, D. Glass Associates, Needham, 139. *In:* Dinardi, A. L.; Formagi, V. M.; Coneglian, C. M. R.; Brito, N. N.; Sobrinho, G. D.; Tonso, S.; Pelegrini, R. (2003), Fitorremediação, Actas do III Fórum de Estudos Contábeis, Rio Claro, Brasil.
- Godzik, B. (1993), Heavy Metal Contents in Plants from Zinc Dumps and Reference Area, *Polish Botanical Studies* 5, 113-132. *In:* Sharma, P.; Dubey, R. S. (2005), Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.

- Gommy, C. (1997), Optimisation d'un Schema de Speciation des Metaux Pb, Zn, Cd et Cu: Application a des Sols Pollues du Nord de la France, Tese de Doutorado de l'Université de Technologie de Compiègne.
- Gray, J. T. (1983), Nutrient Use by Evergreen and Deciduous Shrubs in Southern California, *Journal of Ecology* 71, 21-41. In: Simões, M. P.; Madeira, M.; Gazarini, L. (2004) Variação Sazonal e Espacial da Partição de Biomassa e Nutrientes em *Cistus Salviifolius* L., *Revista de Ciências Agrárias* XXVII, 481-493.
- Greger, M. (1999), Metal Availability and Bioconcentration in Plants. In: M. N. Prasad; J. Hagemeyer, Heavy Metal Stress in Plants From Molecules to Ecosystems, Springer, Berlim, 1-27.
- Gutterman, Y. (1994), Strategies of Seed Dispersal and Germinations in Plants Inhabiting Deserts, *Botanical Review* 60, 373-425. In: Pérez-García, F. (1997), Germination of *Cistus ladanifer* Seeds in Relation to Parent Material, *Plant Ecology* 133, 57-62.
- Haard, N. F. (1973), Upsurge of Particular Peroxidase in Ripening Banana Fruit, *Phytochemistry* 12, 555-560. In: Ingham, L. M.; Parker, M. L.; Waldron, W. (1998), Peroxidase: Changes in Soluble and Bound Forms during Maturation and Ripening of Apples, *Physiologia Plantarum* 102, 93-100.
- Hall, J. L. (2002), Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance, *Journal of Experimental Botany* 53, 1-11.
- Harrison, R. M.; Chirgawi, M. B. (1989), The Assessment of Air and Soil as Contributors of same Trace Metals to Vegetable Plants – Experiments with Field Grown Plants, *The Science of the Total Environment* 83, 47-63. In: Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley publishers, Bristol, 469.

- Hertwig, B.; Streb, P.; Feierabend, J. (1992), Light Dependence of Catalase Synthesis and Degradation in Leaves and Influence of Interfering Stress Conditions, *Plant Physiology* 100, 1547-1553. In: Sharma, P.; Dubey, R. S. (2005), Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.
- Hooper, D. U.; Vitousek, P. M. (1997), The Effects of Plants Composition and Diversity on Processes, *Science* 277, 1302-1305. In: Pratas, J.; Prasad, M. N. V.; Freitas, H.; Conde, L. (2005), Plants Growing in Abandoned Mines of Portugal are Useful for Biogeochemical Exploration of Arsenic, Antimony, Tungsten and Mine reclamation, *Journal of Geochemical Exploration* 85, 99-107.
- Howard, A. G.; Hunt, L. E. (1993), Coupled Photo-oxidation Hydride AAS Detector for the HPLC of Arsenic Compounds, *Analitica Chemica* 65, 2995-2998. In: Batista, M. J.; Abreu, M. M.; Serano Pinto, M. (2004), Comportamento do Arsénio (III) e (V) em Dois Litossolos e em Estevas na Área Mineira de Neves Corvo, *Revista de Ciências Agrárias XXVII*, n.º 1, 291-300.
- Ingham, L. M.; Parker, M. L.; Waldron, W. (1998), Peroxidase: Changes in Soluble and Bound Forms during Maturation and Ripening of Apples, *Physiologia Plantarum* 102, 93-100.
- Iqbal, J.; Mushtaq, S. (1987), Effect of Lead on Germination, Early Seedling Growth, Soluble Protein and Acid Phosphatase Content in *Zea mays*, *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* 30, 853-856. In: Sharma, P.; Dubey, R. S. (2005), Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.
- Joaquim, C.; Abreu, M. M.; Fernandes, M. L. (2003a), Fraccionamento do Crómio no Horizonte Ap de um Solo Lixissolo Férrico e de um Luvissole Estagnico após Enriquecimento em Cr (III), *Anais do Instituto Superior de Agronomia* 49, 179-191.

- Joaquim, C.; Abreu, M. M.; Vairinho, M. (2003b), Bioavailability of Chemical Elements in Soils and Sediments Contaminated by the Sulphide Mine Exploitation, Actas do 2º International Workshop on Bioavailability of Soil Pollutants and Risk Assessment, Suíça.
- Kaasalainen, M.; Yli-Halla, M. (2003), Use Sequential Extraction to Assess Metal Partitioning in Soils, *Environmental Pollution* 126, 225-233. In: García, G.; Zanuzzi, A. L.; Faz, A. (2005), Evaluation of Heavy Metal Availability Prior to an *in situ* Soil Phytoremediation Program, *Biodegradation* 16, 187-194.
- Kabata-Pendias, A. (2004), Soil-plant Transfer of Trace Elements – an Environmental Issue, *Geoderma* 122, 143-149.
- Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. (1985), Trace Elements in Soil and Plants, CRC Press, Boca Raton, Londres, 315.
- Kabata-Pendias, A.; Pendias, H. (1992), Trace Elements in Soil and Plants, CRC Press, Boca Raton, Londres, 365.
- Kamal, M.; Ghaly, A. E.; Mahmoud, N.; Côté, R. (2004), Phytoaccumulation of Heavy Metals by Aquatic Plants, *Environment Internacional* 29, 1029-1039.
- Kelley, B. C.; Tuovinen, O. H. (1988), Microbial Oxidation of Minerals in Mine Tailings, Chemistry and Biology of Solids Waste: Dredged Material and Mine Tailings, 33-53. In: Ernst, W. H. O. (1996), Bioavailability of Heavy Metals and Decontamination of Soils by Plants, *Applied Geochemistry* 11, 163-167.
- Kenneth, E.; Pallet, K. E.; Young, J. (2000), Carotenoids, Antioxidants in Higher Plants, CRC Press, Boca Raton, Florida, 60-81. In: Singh, S.; Snha, S; Saxena, R.; Pandey, K.; Bhatt, K. (2004), Translocation of Metals and its Effects in the Tomato Plants Grown on Various Amendments of Tannery Waste: Evidence for Involvement of Antioxidants, *Chemosphere* 57, 91-99.

- Kennish, M. J. (1992), *Ecology of Estuaries: Anthropogenic Effects*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 416. *In*: Odjegba, V. J.; Fasidi, I. O. (2004), Accumulations of Trace Elements by *Pistia stratiotes*: Implications for Phytoremediation, *Ecotoxicology* 13, 637-646.
- Khan, F. I.; Husain, T.; Hejazi, R. (2004), An Overview and analysis of site Remediation Technologies, *Journal of Environment Management* 71, 95-122.
- Khopde, s. M.; Priyadarsini, K. I.; Mohan, H.; Gawandi, V. B.; Satav, J. G.; Yakhmi, J. V.; Banavaliker, M. M.; Biyani, M. K.; Mittal, J. P. (2001), Characterizing the Antioxidant Activity of Amla (*Phyllanthus emblica*) Extract, *Current Science* 81, 185-190.
- Kirk, J. T. O.; Allen, R. L. (1965), Dependence of Chloroplast Pigment Synthesis on Protein Synthesis: Effects of Actidione, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 21, 523-530.
- Köster, W.; Merkel, D. (1983), Beziehungen Zwischen den Gehalten an Zink, Cadmium, Blei und Kupfer in Böden und Pflanzen bei Anwendung Unterschiedlicher Bodenuntersuchungsmethoden, *Landwirtsch Forsch Sonderh* 39, 245-254. *In*: Ross, S. (1994), *Toxic Metals in Soil-plant Systems*, Wiley publishers, Bristol, 469.
- Kovalevskii, A. L. (1969), Some Observations in Biogeochemical Parameters (in Russian), *Trudy Buryat Inst Estest Venn Nauk* 2, 195-214. *In*: Nagaraju, A.; Karimulla, S. (2002), Accumulation of Elements in Plants and Soils in and around Nellore Mica Belt, Andra Pradesh, India – Biogeochemical Study, *Environmental Geology* 41, 852-860.

- Krzaklewski, W.; Pietrzykowski, M. (2002), Selected Physico-chemical Properties of Zinc and Lead Ore Tailings and their Biological Stabilization, *Water, air and Soil Pollution* 141, 125-142.
- Larkindale, J.; Hall, J. D.; Knight, M. R.; Vierling, E. (2005), Heat Stress Phenotypes of Arabidopsis Mutants Implicate Multiple Signaling Pathways in the Acquisition of Termotolerance, *Plant Physiology* 148, 882-897.
- Lasat, M. M. (2002), Phytoextraction of Toxic Metals: A Review of Biological Mechanisms, *Journal of Environmental Quality* 31, 109-120.
- Lázaro, J. D.; Kidd, P. S.; Martínez, C. M. (2006), A Phytogeochemical Study of the Trás-os-Montes Region (NE Portugal): Possible Species for Plant-based Soil Remediation Technologies, *Science of the Total Environment* 354, 265-277.
- Levitt, J. (1980), Responses of Plants to Environmental Stresses, Academic Press, Nova York, 497. In: Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems Wiley publishers, Bristol, 469.
- Lindsay, W. L.; Norvell, W. A. (1978), Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese and Copper, *Soil Science* 42, 421-428.
- Liu, J.; Lim K.; Xu, J., Zhang, Z.; Ma, T.; Lum X.; Yang, J.; Zhu, Q. (2003), Lead Toxicity, Uptake and Translocation in Different Rice Cultivars, *Plant Science* 165, 793-802.
- Luna, C. M.; González, C. A.; Trippi, V. S. (1994), Oxidative Damage Caused by an Excess of Copper in Oat Leaves, *Plant Cell Physiology* 35, 11-115.
- MacKinney, G. (1941), Absorption of Light by Chlorophyll Solutions, *Journal of Biological Chemistry* 144, 315-323.
- Manios, T.; Stentiford, E. I.; Miller, P. A. (2003), The Effect of Heavy Metals Accumulation on the Chlorophyll Concentration of *Typha latifoli* Plants, Growing in

- Substrate Containing Sewage Sludge Compost and Watered with Metaliferus Water, *Ecological Engineering* 20, 65-74.
- Manual de Fertilização das culturas (2000), Edições INIA-Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva, 221. *In*: Varennes, A. (2003), Produtividade dos Solos e do Ambiente (eds.), Escolar Editora, Lisboa, 490.
- Marin, A. R.; Masscheleyn, P. H.; Patrik, J. (1992), The Influence of Chemical Form and Concentration of Arsenic on Rice Growth and Tissue Arsenic Concentration, *Plant Soil* 139, 175-183.
- Martin, I; Bardos, P. A. (1996), A Review of Full Scale Treatment Technologies for the Remediation of Contaminated Land, Richmond Surrey: EPP Publications. *In*: Pulford, I. D; Watson, C. (2003), Phytoremediation of Heavy Metal-contaminated Land by Trees, *Environment International* 29, 529-540.
- Martin, M. H.; Coughtrey, P. J. (1982), Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution, Chapman and Hall, Londres, 475. *In*: Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley publishers, Bristol, 469.
- Maslova, T. G.; Popova, I. A. (1993), Adaptative Properties of the Plant Pigment Systems, *Photosynthetica* 29, 195-203.
- Matos, J. X.; Martins, L. P. (2006), Reabilitação Ambiental de Áreas Mineiras do Sector Português da Faixa Piritosa Ibérica: Estado da Arte e Prespectivas Futuras, *Boletín Geológico y Minero* 117, 289-304.
- Matos, J. X; Oliveira, J. M. S.; Farinha, J. B.; Ávila, P.; Rosa, C.; Leite, M. R. M.; Daniel, F.; Martins, L. (2002), Património Mineiro Português: Estado Actual da Herança Cultural de um País Mineiro, Actas do Congresso Internacional sobre Património Geológico e Mineiro, IGM/SEDPGYM, Beja, 539-554.

- Matos, J. X.; Petersen, E. U.; Chávez, W. X. (2003), Environmental Geochemistry Field Course – Iberian Pyrite Belt, Society of Economic Geologists Guidebook.
- McBride, M. B. (1989) Reactions Controlling Heavy Metal Solubility in Soils, *Advances in Soil Sciences* 10, 1-56. In: M. N. Prasad; J. Hagemeyer, Heavy Metal Stress in Plants From Molecules to Ecosystems, Springer, Berlim, 401.
- McDougall, G. J.; Morrison, I. M. (1995), Ionically-bound and Covalently-bound Wall Peroxidases Differ in their Substrate Specificity, *Biochemical Society Transaction* 23, 150S.
- Mengel, K.; Kirkby, E. A. (1987), Principles of Plant Nutrition, Internacional Potash Institute, Berne, 655.
- Micaroni, R. C. C. M; Bueno, M. I. M. S.; Jardim, W. F. (2000), Compostos de Mércurio. Revisão de Métodos de Determinação, Tratamento e Descarte, *Química Nova* 23, 487-495.
- Miller, R. J; Koeppe, D. E. (1971), Accumulation and Physiological Effects of Lead in Corn, *Procedimentos da Universidade de Missouri, Columbia* 4, 186-193. In: Sharma, P.; Dubey, R. S. (2005), Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.
- Moulding, P. H.; Grant, H. F.; McLeilan, K. M.; Robinson, D. S. (1987), Heat Stability of Soluble and Ionically Bound Peroxidases Extracted from Apples, *Internacional Journal of Food Science and Technology* 22, 391-391.
- Murdoch, A. J.; Ellis, R. H. (1992), Longevity, Viability and Dormancy, Seeds: The Ecology of Regeneration in Plant Communities, CAB International, Wallingford, 193-229. In: Delgado, J. A.; Serrano, J. M.; Lopez, F.; Acosta, F. J. (2001), Heat Shock, Mass-dependent Germination and Seed Yield as Related Components of Fitness in *Cistus ladanifer*, *Environmental Experimental Botany* 46, 11-20.

- Nagaraju, A.; Karimulla, S. (2002), Accumulation of Elements in Plants and Soils in and around Nellore Mica Belt, Andhra Pradesh, India – A Biogeochemical Study, *Environmental Geology* 41, 852-860.
- Navas, A.; Lindhorfer, H. (2003), Geochemical Speciation of Heavy Metals in Semiarid Soils of Central Ebro Valley (Spain), *Environmental International* 29, 61-68.
- Neves, O.; Abreu, M. M.; Basto, M. J.; Matias M. J. (1999), Contribuição para o Estudo da Contaminação Resultante da Exploração e Abandono da Mina de Urânio da Cunha Baixa. II. Solos, Actas II Congresso de Geoquímica / XI Semana de Geoquímica de Lisboa, Portugal, 189-192.
- Núñez, E.; Cabeza, J.; Escudero, J. C. (1989), Relación entre la Biomasa de Jarales y su Rendimiento Energetico por Pirolisis, *Options Méditerranéennes* 3, 345-350.
- Núñez-Olivera, E.; Martínez-Abaigar, J.; Escudero, J. C. (1996), Adaptability of Leaves of *Cistus ladanifer* to Widely Varying Environmental Conditions, *Functional Ecology* 10, 636-646.
- Odjegba, V. J.; Fasidi, I. O. (2004), Accumulations of Trace Elements by *Pistia stratiotes*: Implications for Phytoremediation, *Ecotoxicology* 13, 637-646.
- Oliveira, J. S.; Farinha, J.; Matos, J. X.; Ávila, P.; Rosa, C.; Machado, M.; Daniel, F.; Martins, L.; Leite, M. (2002), Diagnóstico Ambiental das Principais Áreas Mineiras Degradadas do País, *Boletim de Minas do IGM* 39-2, 67-85. In: Matos, J. X.; Martins, L. P. (2006), Reabilitação Ambiental de Áreas Mineiras do Sector Português da Faixa Piritosa Ibérica: Estado da Arte e Prespectivas Futuras, *Boletín Geológico y Minero* 117, 289-304.
- Oscarson, D. W.; Huang, P. M.; Defosse, C.; Herbillon, A. (1981), Oxidative Power of Mn (IV) and Fe (III) Oxides with Respect to As (III) in Terrestrial and Aquatic Environments, *Nature* 191, 50-51.

- Paiva, H. N.; Carvalho, J. G.; Siqueira, J. O. (2002), Influência da Aplicação de Doses Crescentes de Chumbo sobre o Teor e Conteúdo de Nutrientes em Mudanças de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), *Scientia Forestalis* 61, 40-48.
- Panda, S. K. (2003), Heavy Metal Phytotoxicity Induces Oxidative Stress in a Moss, *Taxithelium* sp., *Current Science* 84, 631-663.
- Panda, S. K.; Khan, M. H. (2004), Changes in Growth and Superoxide Dismutase Activity in *Hydrilla Verticillata* L. under Abiotic Stress, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 16, 115-118.
- Pang, J.; Chan, G. S. Y.; Zhang, J.; Liang, J.; Wong, M. H. (2003), Physiological Aspects of Vertiver Grass for Rehabilitation in Abandoned Metalliferous Mine Wastes, *Chemosphere* 52, 1559-1570.
- Paoliello, M. M. B.; Chasin, A. A. M. (2001), Ecotoxicologia do Chumbo e seus Compostos, Série Cadernos de Referência Ambiental, Vol. 3.
- Patón, D.; Azocar, P.; Tovar, J. (1998), Growth and Productivity in Forage Biomass in Relation to the Age Assessed by Dendrochronology in the Evergreen Shrub *Cistus ladanifer* (L.) Using Different Regression Models, *Journal of Arid Environments* 38, 221-235.
- Peixoto, P. H. P.; Pimenta, D. S.; Antunes, F. (2005), Efeitos do Flúor em Folhas de Plantas Aquáticas de *Salvinia auriculata*, *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40, 727-734.
- Pennel, C.; Greppin, H. (1994), Binding of Plant Isoperoxidases to Pectin in the Presence of Calcium, *Febs Letters* 343, 51-55.
- Pérez-García, F. (1997), Germination of *Cistus ladanifer* Seeds in Relation to Parent Material, *Plant Ecology* 133, 57-62.

- Pitchel, J.; Salt, C. A. (1998), Vegetative Growth and Trace Metal Accumulation on Metalliferous Wastes, *Journal of Environmental Quality* 27, 618-624.
- Plano de Ordenamento da Zona Envolvente às Áreas ardidas na região do Barranco do Velho, Gabinete Técnico Florestal, Barranco do Velho, 2001.
- Póvoas, I.; Barral, M.F. (1992), Métodos de Análise de Solos, Comunicações do Instituto de Investigação Científica Tropical, Série de Ciências Agrárias, N.º 10, Instituto de investigação Científica Tropical, Lisboa.
- Pratas, J. A. M. S. (1996), Aplicações de Prospecção geoquímica, Tese de Doutoramento, Universidade de Coimbra.
- Pugnaire, F. I.; Chapin, F. S. (1993), Controls over Nutrient Resorption from Leaves of Evergreen Mediterranean Species, *Ecology* 74, 124-129.
- Pulford, I. D; Watson, C. (2003), Phytoremediation of Heavy Metal-contaminated Land by Trees, *Environment International* 29, 529-540.
- Quental, L.; Bourguignon, A.; Sousa, A. J.; Batista, M. J.; Brito, M. G.; Tavares, T.; Abreu, M. M.; Vairinho, M.; Cottard, F (2002), MINEO Southern Europe environment test site: Contamination/impact Mapping and Modelling, Relatório Final, 131.
- Ross, S. (1994), Toxic Metals: Fate and Distribution in Contaminated Ecosystem. *In:* Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley publishers, Bristol, 190-243.
- Ross, S.; Kaye, M. (1994), The Meaning of Metal Toxicity in Soil-plant Systems. *In:* Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley Publishers, Bristol, 28-61.

- Sabaté, S.; Sala, A.; Gracia, C. (1999), Leaf Traits and Canopy Organization. *In: F. Rodà, J. Retana, C. A. Gracia, J. Bellot, Ecology of Mediterranean Evergreen Oak, Springer-Verlag, Berlim, 121-133.*
- Sandmann, G.; Böger, P. (1980), Copper-mediated Lipid Peroxidation Processes in Photosynthetic Membranes, *Plant Physiology* 66, 797-800. *In: Vinit-Dunand, F.; Epron, D.; Alaoui-Sossé, B.; Badot, P. (2002), Effects of Copper on Growth and Photosynthesis of Mature and Expanding Leaves in Cucumber Plants, Plant Science* 162, 53-58.
- Schmid, B. (1992), Phenotypic Variation in Plants, *Evolutionary Trends in Plants* 6, 45-60. *In: Ross, S. (1994), Toxic Metals in Soil-plant Systems, Wiley Publishers, Bristol, 469.*
- Schwertmann, U. (1964), Differenzierung der Eisenoxide des Bodens. *Z., Planzenernährung, Düngung, Bodenkund*, 105 (3), 194-202. *In: Póvoas, I.; Barral, M. F. (1992), Métodos de Análise de Solos, Comunicações do Instituto de Investigação Científica Tropical, Série de Ciências Agrárias, N.º 10, Instituto de investigação Científica Tropical, Lisboa.*
- Sengupta, M. (1993), Environmental Impacts of Mining: Monitoring, Restoration and Control, CRC Boca Raton, Florida, 494. *In: Freitas, H.; Prasad, M. N. V.; Pratas, J. (2004), Plant Community Tolerant to Trace Elements Growing on the Degraded Soils of São Domingos Mine in the South East of Portugal: Environmental Implications. Environmental International* 30, 65-72.
- Sharma, P.; Dubey, R. S. (2005), Lead Toxicity in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 35-52.

- Simões, M. P. (2002), Dinâmica de Biomassa (carbono) e Nutrientes em *Cistus salviifolus* L. e *Cistus ladanifer* L. – Influência nas características do solo. Tese de doutoramento na Universidade de Évora.
- Simões, M. P.; Madeira, M.; Gazarrini, L. (2001), Efeitos Potenciais de Arbustos do Género *Cistus* L. na Recuperação de Solos, *Revista de Ciências Agrárias* XXIV, 347-360.
- Simon, E. (1978), Heavy Metals in Soils, Vegetation Development and Heavy Metal Tolerance in Plant Populations from Metalliferous Areas, *New Phytologist* 81, 175-188.
- Singh, S.; Sinha, S; Saxena, R.; Pandey, K.; Bhatt, K. (2004), Translocation of Metals and its Effects in the Tomato Plants Grown on Various Amendments of Tannery Waste: Evidence for Involvement of Antioxidants, *Chemosphere* 57, 91-99.
- Smith, H. (1982), Light Quality, Photoperception and Plant Strategy, *Annual Review of Plant Physiology* 33, 481-518. In: Loução, K. A. (2002), Fragmentos de Ecologia (eds.), Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Escolar Editora, Portugal, 326.
- Soares, C. R. F. S; Accioly, A. M. A; Marques, T. C. L. L. S. M; Siqueira, J. O.; Moreira, F. M. S. (2001), Acumulo e Distribuição de Metais Pesados nas Raízes, Caules e Folhas de Mudas de Árvores em Solo Contaminado por Rejeitos de Indústria de Zinco, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13, 302-315.
- Sparks, D. L. (1995), Environmental Soil Chemistry, Academic Press, Nova York, 267.
- Stepanok, V. (1998) The Effect of Arsenic on the Yield and Elemental Composition of Agricultural crops, *Agrokhimiya* 12, 57-63. In: Stoeva, N.; Bineva, T. (2003), Oxidative Changes and Photosynthesis in Oat Plants Grown in As-contaminated Soil, *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29, 87-95.

- Stoeva, N.; Bineva, T. (2003), Oxidative Changes and Photosynthesis in Oat Plants Grown in As-contaminated Soil, *Bulgarian Journal of Plant Physiology* 29, 87-95.
- Storbart, A. K.; Griffiths, W. T.; Ameen-Bukhari, I.; Sherwood, R. P. (1985), The Effect of Cd²⁺ on the Biosynthesis of Chlorophyll in Leaves of Barley, *Physiologia Plantarum* 63, 293-298.
- Sun, M.; Zigman, S. (1977), An Improved Spectrophotometric Assay for Superoxide Dismutase Based on Epinephrine Autoxidation, *Analytical Biochemistry* 90, 81-89.
- Susarla, S.; Medina, V; McCutcheon, S. C. (2002), Phytoremediation: an Ecological Solution to Organic Chemical Contamination, *Ecological Engineering* 18, 647-658.
- Taiz, L.; Zeiger, E. (2002), Plant Physiology, Sunderland, MA: Sinauer, 427. In: Pilon-Smits, E. (2005), Phytoremediation, *Annual Revision Plant Biology* 56, 15-39.
- Talavera, S.; Gibbs, P. E.; Herrera, J. (1993), Reproductive Biology of *Cistus ladanifer* (Cistaceae), *Plant Systematics and Evolution* 186, 123-134.
- Tavares, M. T.; Abreu, M. M.; Vairinho, M. M. (2000), Especificação do Pb e do Zn em Luvisolos Crômicos, inserido no livro de resumos do Encontro Anual da Sociedade Portuguesa da Ciência do Solo: O uso do solo e da água, Universidade de Évora.
- Tavares, M. T.; Abreu, M. M.; Quental, L. M.; Vairinho, M. M. (2003), Influência do Chumbo e do Zinco na Absorção de Potássio, Fósforo, Magnésio, Cálcio e Sódio pela Oliveira, *Anais do Instituto Superior de Agronomia* 49, 167-177.
- Taylor, R. W; Ibeabuchi, I. O.; Sistani, K. R.; Shuford, J. W. (1992), Accumulation of some Metals by Legumes and their Extractability from Acid Mine Spoils, *Journal of Environmental Quality* 21, 176-180.
- Thanos, C. A.; Georghiou, K. (1988), Ecophysiology of Fire-stimulated Seeds Germination in *Cistus incanus* ssp. *creticus* (L.) Heywood and *C. salvifolius* L.

- Plant, Cell Environmental* 11, 841-849. In: Pérez-García, F. (1997), Germination of *Cistus ladanifer* Seeds in Relation to Parent Material, *Plant Ecology* 133, 57-62.
- Thanos, C. A.; Georghiou, K.; Kadis, C.; Pantazi, C. (1992), Cistaceae: a Plant Family with Hards Seeds, *Israel Journal of Botany* 41, 251-263.
- Tilstone, G. H. and Macnair, M. R., (1997), The Consequence of Selection for Copper Tolerance on the Uptake and Accumulation of Copper in *Mimulus guttatus*, *Annals of Botany* 80, 747-751. In: Kamal, M., Ghaly, A. E., Mahmoud, N., Côte, R., Phytoaccumulation of Heavy Metals by Aquatic Plants, *Environment International*, 2004.
- Tordoff, G. M.; Baker, A. J. M.; Willis, A. J. (2000), Current Approaches to the Revegetation and Reclamation of Metalliferous Mine Wastes, *Chemosphere* 41, 219-228.
- Vangronsveld, J.; van Assche, F.; Clijsters, H. (1995), Reclamation of Bare Industrial Area Contaminated by Non-ferrous Metals: *in situ* Immobilisation and Revegetation, *Environmental Pollution* 87, 51-59. In: Archer, M, J. G.; Caldwell, R. A. (2004), Response of Six Australian Plant Species to Heavy Metal Contamination at an Abandoned Mine Site, *Water, Air, and Soil Pollution* 157, 257-267.
- Varenes, A. (2003), *Produtividade dos Solos e do Ambiente* (eds.), Escolar Editora, Lisboa, 490.
- Verma, S.; Dubey, R. S. (2003), Lead Toxicity Induces Lipid Peroxidation and Alters the activities of antioxidant Enzymes in Growing Rice Plants, *Plant Science* 164, 645-655.
- Vierling, E. (1991), The Roles of Heat Shock Proteins in Plants, *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 579-620. In: Larkindale, J; Hall, J. D.; Knight, M. R.; Vierling, E. (2005), Heat Stress Phenotypes of Arabidopsis Mutants

- Implicate Multiple Signaling Pathways in the Acquisition of Termotolerance, *Plant Physiology* 148, 882-897.
- Watanabe, M. E. (1997), Phytoremediation on the Brink of Commercialization, *Environmental Science and Technology* 31, 182-186.
- Werner, C.; Ryell, R. J.; Correia, O.; Beyschlag, W. (2001), Structural and Functional Variability within the Canopy and its Relevance for Carbon Gain and Stress Avoidance, *Acta Oecologica* 22, 129-138.
- Wong, D. W. S.; Whitaker, J. R. (2003), Catalase. *In:* Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. (2003), Handbook of Food Enzymology, Marcel Dekker, Inc., Nova York, , 389-401.
- Wong, M. H. (2003), Ecological Restoration of Mine Degraded Soils With Emphasis on Metal Contaminated Soils. *Chemosphere* 50, 775-780.
- Wong, M. H.; Lan, C. Y.; Gao, L.; Chen, H. M. (1999), Current Approches to Managing and Remediating Metal Contaminated Soils in China, Actas do 5º Internacional Conference on the Geochemistry of Trace Elements, Austria.
- Yang, J. R.; Bao, Z. P.; Zhang, S. Q. (1993), The Distribution and Binding of Cd and Pb in Plant Cell, *China Environmental Science* 13, 263-268. *In:* Liu, J.; Lim K.; Xu, J., Zhang, Z.; Ma, T.; Lum X.; Yang, J.; Zhu, Q. (2003), Lead Toxicity, Uptake and Translocation in Different Rice Cultivars, *Plant Science* 165, 793-802.
- Yruela, I. (2005), Copper in Plants, *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17, 145-156.
- Yuan; Jiang (2003), Peroxidase. *In:* Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S. (2003), Handbook of Food Enzymology, Marcel Dekker, Inc., Nova York, 389.

6. Anexos