



**INGRID FERNANDA SANTANA ALVARENGA**

**FISIOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA DE  
ESPÉCIES VEGETAIS PARA A  
DETERMINAÇÃO DO VALOR DE PREVENÇÃO  
DE CÁDMIO EM SOLOS**

**LAVRAS – MG**

**2014**

**INGRID FERNANDA SANTANA ALVARENGA**

**FISIOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA DE ESPÉCIES VEGETAIS PARA  
A DETERMINAÇÃO DO VALOR DE PREVENÇÃO DE CÁDMIO EM  
SOLOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

**LAVRAS – MG**

**2014**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e  
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Alvarenga, Ingrid Fernanda Santana.

Fisiologia e ecotoxicologia de espécies vegetais para a  
determinação do valor de prevenção de cádmio em solos / Ingrid  
Fernanda Santana Alvarenga. – Lavras : UFLA, 2014.

180 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Bibliografia.

1. Elemento-traço. 2. Análise de crescimento. 3. Fotossíntese. 4.  
Fitotoxidez. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.41

**INGRID FERNANDA SANTANA ALVARENGA**

**FISIOLOGIA E ECOTOXICOLOGIA DE ESPÉCIES VEGETAIS PARA  
A DETERMINAÇÃO DO VALOR DE PREVENÇÃO DE CÁDMIO EM  
SOLOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Fisiologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2014.

Dr. João José Granate de Sá e Melo Marques UFLA

Dr. José Donizeti Alves UFLA

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2014**

À dona do meu maior amor, minha irmã, Ismênia  
DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus, mentor da minha vida, por todas as oportunidades concedidas e por colocar em meus caminhos pessoas tão especiais que me auxiliaram nessa etapa.

Aos meus pais Reinaldo e Elaine, pelo exemplo de caráter, por serem fontes inesgotáveis de amor e meus melhores amigos. Por acreditarem nos meus sonhos, me incentivando e mostrando o caminho correto para realizá-los. Vocês ensinaram a minha irmã e a mim o verdadeiro significado de família e esse é o maior tesouro que poderíamos ter!

A minha irmã Ismênia, a quem eu amo mais que a mim mesma e esse amor me motiva a tentar a ser uma pessoa melhor todos os dias.

Ao professor Luiz Roberto Guimarães Guilherme, pela orientação, ensinamentos, apoio, incentivo, confiança e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao Dr. João José G. S. M. Marques e à Dr. Donizeti, membros da banca, pela atenção e importantes contribuições.

A todos os amigos, funcionários e professores do Departamento de Ciência do Solo / UFLA, pela força, conhecimentos transmitidos e agradável convivência.

Aos alunos de iniciação científica, por colaborarem para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da UFLA, à CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq, pela bolsa de estudo e apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Enfim, a todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO GERAL

Os elementos-traço, entre eles o Cd, estão presentes naturalmente nos solos em diferentes concentrações, mas estes teores estão sofrendo incremento devido a processos antrópicos. A crescente conscientização sobre a poluição do solo no Brasil levou o Conselho Nacional do Meio Ambiente a desenvolver uma legislação nacional (Diretiva Conama 420/2009) propondo valores de referência para avaliar a qualidade do solo. Estes valores foram definidos como "valor de referência de qualidade", "prevenção" e "investigação". Valores de prevenção visam determinar a adição limite de elementos-traço ao solo para que não comprometam as qualidades de suas funções. Esses valores foram estabelecidos para todo o país, mas cada Estado deveria desenvolver pesquisas, para validar o valor proposto (por exemplo, 1,3 mg Cd kg<sup>-1</sup> de solo). Minas Gerais ainda não possui o valor de prevenção para Cd estabelecido. Com base nisso, foram realizados experimentos com plantas, a fim de propor um valor-alvo para Cd em solos brasileiros, utilizando-se uma abordagem fisiológica e ecotoxicológica combinada para a avaliação de risco. O experimento foi realizado utilizando-se dois solos representativos do Estado de Minas Gerais (Latossolo e Cambissolo). Os testes seguiram a normativa OECD-208, com quatro espécies de plantas sensíveis ao metal. As plantas foram expostas a doses de Cd crescente (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4 mg kg<sup>-1</sup>) durante 21 dias. Além das variáveis comumente avaliadas neste tipo de estudos, foram medidos também os seguintes parâmetros para a avaliação de risco: germinação, crescimento das plantas, atividade enzimática, concentração de Cd na folha, índice de clorofila, trocas gasosas, fluorescência, além de análises ultraestruturais. Em seguida, calculou-se a concentração efetiva que inibe 50% dos parâmetros avaliados (EC50) e derivado um valor perigoso para 5% dos parâmetros (HC5), que é definido como a concentração que protege 95% dos parâmetros. Os sintomas de toxicidade foram mais severos nas plantas do Latossolo em comparação com o Cambissolo. De posse dos EC50 aceitos, foram obtidos os HC5 (mg Cd kg<sup>-1</sup> solo seco) de 2,15 (Latossolo), 10,35 (Cambissolo) e 2,65 (para ambos os solos). Os diferentes HC5 obtidos estão principalmente associados com as propriedades do solo que afetam a fração de Cd disponível. O último valor está de acordo com o valor anterior para Cd em solos brasileiros (3,0 mg Cd kg<sup>-1</sup>, para São Paulo). Concluiu-se sugerindo que a adição de novos parâmetros fisiológicos como variáveis adicionais para avaliar os riscos ecológicos de solos contaminados pode ser relevante para a melhoria da sensibilidade dos ensaios com plantas. Além disso, levando em consideração a heterogeneidade dos solos brasileiros, recomenda-se ter uma gama de valores com base nas diferentes propriedades do solo.

Palavras-chave: Elemento-traço. Crescimento. Fotossíntese. Fitotoxicidez.

## GENERAL ABSTRACT

Trace elements, such as Cd, are naturally present in soils at different concentrations. However, these concentrations are increasing due to anthropogenic activities. The increasing consciousness regarding soil pollution in Brazil has led the Brazilian Environmental Council to develop a national legislation (Directive Conama 420/2009) proposing reference values for assessing soil quality. These values were set as “quality reference value”, “prevention” and “investigation”. The prevention values aim to determine the limit of trace elements additions to the soil so that they do not compromise soil quality and function. These values are an instrument for risk management and have been set countrywide. However, each State should develop appropriate research in order to validate the proposed nationwide value (e.g., 1.3 mg Cd kg<sup>-1</sup> soil). Minas Gerais, Brazil still has no Cd prevention value established. Based on this, we performed experiments with plants in order to propose a target value for Cd in Brazilian soils, using a combined physiological and ecotoxicological approach for risk assessment. The experiment was conducted using two representative soils from the State of Minas Gerais (Oxisol and Inceptisol). The tests followed the OECD-208 normative, using four plant species sensitive to the metal. The plants were exposed to increasing doses of Cd (0.4; 0.72; 1.29; 2.3; 4.1; 13.6; 24.4 mg kg<sup>-1</sup>) during 21 days. In addition to the variables commonly evaluated in these types of studies, we also measured the following parameters for risk assessment: germination, plant growth, enzymatic activity, Cd concentration in the leaf, chlorophyll index, gas exchanges, fluorescence, as well as ultra-structural analyses. Next, we calculated the effective concentration that inhibits 50% of each evaluated parameter (EC50) and derived a hazardous concentration for 5% of the parameters (HC5), which is defined as the concentration expected to protect 95% of the parameters. The toxicity symptoms were more severe in plants cultivated in the Oxisol when compared with the Inceptisol. With the accepted EC50 values, we obtained the HC5 values (mg Cd kg<sup>-1</sup> dry soil) of 2.15 (Oxisol), 10.35 (Inceptisol), and 2.65 (for both soils). The different values obtained for HC5 are mainly associated with soil properties affecting the available Cd fraction in the soil. The last value is in accordance with the previous value defined for Cd in Brazilian soils (3.0 mg Cd kg<sup>-1</sup>, set for São Paulo). We conclude suggesting that the addition of new physiological parameters as additional variables to evaluate ecological risks of contaminated soils may be relevant for improving the sensitivity of trials with plants. In addition, considering the high heterogeneity of Brazilian soils, we recommend a range of values based on different soil properties.

Keywords: Trace element. Growth. Photosynthesis. Phytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

Figura 1	Germinabilidade (%) apresentadas como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd ..... 54
Figura 2	Índice de velocidade de emergência (IVE) apresentados como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd ..... 56
Figura 3	Concentração de Cd no solo letal a 50% (EC50) das sementes de arroz, feijão, milho e rabanete em Latossolo e Cambissolo ..... 58
Figura 4	Altura da parte aérea apresentadas como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd ..... 60
Figura 5	Área foliar apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd..... 64
Figura 6	Matéria fresca da parte aérea apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd ..... 66
Figura 7	Matéria fresca da raiz apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd ..... 67
Figura 8	Matéria fresca total apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd ..... 68

Figura 9	Matéria seca da parte aérea apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd .....	70
Figura 10	Matéria seca da raiz apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd .....	71
Figura 11	Matéria seca total apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd .....	72
Figura 12	Desmutase do superóxido (SOD) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd	76
Figura 13	Catalase (CAT) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd.....	77
Figura 14	Peroxidase do ascorbato (APX) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd	78
Figura 15	Teor de Cd nas folhas apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd .....	80
Figura 16	Efeito tóxico das doses crescentes de Cd em Latossolo e Cambissolo após 21 dias de experimento as letras A, B, C, E e F são de <i>Phaseolus vulgaris</i> e D de <i>Zea mays</i> .....	86

### CAPÍTULO 3

Figura 1	Índice SPAD apresentadas como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd.....	105
Figura 2	Fotossíntese líquida (A) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd em Latossolo.....	108
Figura 3	Fotossíntese líquida (A) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Cambissolo.....	110
Figura 4	Condutância estomática (gs) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Latossolo .....	113
Figura 5	Condutância estomática (gs) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Cambissolo.....	114
Figura 6	Transpiração (E) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Latossolo .....	116
Figura 7	Transpiração (E) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Cambissolo .....	117
Figura 8	Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz em função de doses crescentes de Cd.....	119

Figura 9	Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão em função de doses crescentes de Cd.....	120
Figura 10	Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de milho em função de doses crescentes de Cd .....	121
Figura 11	Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de rabanete em função de doses crescentes de Cd .....	122
Figura 12	Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz em função de doses crescentes de Cd.....	124
Figura 13	Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão em função de doses crescentes de Cd.....	125
Figura 14	Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de milho em função de doses crescentes de Cd.....	126
Figura 15	Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de rabanete em função de doses crescentes de Cd .....	127

#### **CAPÍTULO 4**

Figura 1	Eletromicrografia de transmissão de <i>Phaseolus vulgaris</i> mostrando as células do mesofilo cultivadas sem condições de estresse no Latossolo (controle) .....	145
----------	---	-----

Figura 2	Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesofilo de <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivados na concentração de 13,6 mg kg <sup>-1</sup> de Cd no Latossolo .....	146
Figura 3	Eletromicrografia de transmissão de <i>Zea mays</i> mostrando as células do mesofilo cultivadas sem condições de estresse no Latossolo (controle).....	148
Figura 4	Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesofilo de <i>Zea mays</i> cultivados na concentração de 13,6 mg kg <sup>-1</sup> de Cd no Latossolo .....	150
Figura 5	Eletromicrografia de transmissão de <i>Phaseolus vulgaris</i> mostrando as células do mesofilo cultivadas sem condições de estresse no Cambissolo (controle).....	152
Figura 6	Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesofilo de <i>Phaseolus vulgaris</i> cultivados na concentração de 24,4 mg kg <sup>-1</sup> de Cd no Latossolo .....	153
Figura 7	Eletromicrografia de transmissão de <i>Zea mays</i> mostrando as células do mesofilo cultivadas sem condições de estresse no Cambissolo (controle) .....	154
Figura 8	Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesofilo de <i>Zea mays</i> cultivados na concentração de 24,4 mg kg <sup>-1</sup> de Cd no Latossolo .....	155

## **CAPÍTULO 5**

Figura 1	Gráfico da distribuição da sensibilidade das espécies para EC50 (concentração efetiva que causa danos a 50% das espécies) para Latossolo .....	173
----------	--	-----

Figura 2	Gráfico da distribuição da sensibilidade das espécies para EC50 (concentração efetiva que causa danos a 50% das espécies) para Cambissolo.....	174
Figura 3	Gráfico da distribuição da sensibilidade das espécies para EC50 (concentração efetiva que causa danos a 50% das espécies) para Latossolo e Cambissolo .....	174

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

Tabela 1	Espécies sensíveis para testes de ecotoxicidade com elementos-traço .....	32
----------	---	----

### CAPÍTULO 2

Tabela 1	Fertilidade do Latossolo e Cambissolo .....	47
Tabela 2	Textura do Latossolo e Cambissolo .....	47
Tabela 3	Número de folhas e diâmetro do coleto (DC) de arroz, feijão, milho e rabanete cultivadas em doses crescentes de Cd em Latossolo e Cambissolo.....	62
Tabela 4	Índices LOEC ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e NOEC ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de arroz, feijão, milho e rabanete, cultivadas em Latossolo e Cambissolo .....	84

### CAPÍTULO 3

Tabela 1	Fertilidade do Latossolo e Cambissolo .....	101
Tabela 2	Textura do Latossolo e Cambissolo .....	101
Tabela 3	Índices LOEC ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e NOEC ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de arroz, feijão, milho e rabanete, cultivadas em Latossolo e Cambissolo .....	130

### CAPÍTULO 4

Tabela 1	Fertilidade do Latossolo e Cambissolo .....	142
Tabela 2	Textura do Latossolo e Cambissolo .....	142

### CAPÍTULO 5

Tabela 1	Fertilidade do Latossolo e Cambissolo .....	166
Tabela 2	Textura do Latossolo e Cambissolo .....	166

Tabela 3	Valores de EC50 calculados de diversos parâmetros para Latossolo e Cambissolo.....	170
Tabela 4	Valores de HC5 para Latossolo, Cambissolo e ambos os solos ...	175
Tabela 5	Valor de prevenção de Cd para Latossolo, Cambissolo e ambos os solos.....	176

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO .....	20
2.1	Elementos-traço .....	21
2.2	Elementos-traço em solo.....	22
2.3	Cádmio em plantas .....	23
2.4	Valores de referência.....	27
2.5	Determinação dos valores de prevenção .....	30
	REFERÊNCIAS .....	34
	<b>CAPÍTULO 2 Avaliações fisiológicas de espécies sensíveis à toxicidade cultivadas em Latossolo e Cambissolo com concentrações crescentes de Cd .....</b>	<b>42</b>
1	INTRODUÇÃO.....	44
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	46
2.1	Teste de germinação .....	48
2.2	Análise de crescimento .....	49
2.3	Enzimas antioxidantes .....	49
2.4	Teor de Cd .....	51
2.5	Determinação de NOEC e LOEC .....	51
2.6	Análises estatísticas .....	52
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	53
4	CONCLUSÕES .....	88
	REFERÊNCIAS .....	89
	<b>CAPÍTULO 3 Desempenho ecofisiológico de espécies cultivadas em Latossolo e Cambissolo com concentrações crescentes de Cd .....</b>	<b>97</b>
1	INTRODUÇÃO.....	99
2	MATERIAL E MÉTODOS .....	100
2.1	Índice de Clorofila .....	101
2.2	Trocas gasosas .....	102
2.3	Fluorescência da clorofila <i>a</i> .....	102
2.4	Determinação de NOEC e LOEC.....	103
2.5	Análises estatísticas .....	103
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	104
4	CONCLUSÃO.....	132
	REFERÊNCIAS .....	133
	<b>CAPÍTULO 4 Alterações ultraestruturais de feijão e milho cultivados em diferentes doses de Cd no Latossolo e Cambissolo .....</b>	<b>137</b>
1	INTRODUÇÃO.....	139

<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	141
<b>2.1</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	143
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	144
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	156
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	157
	<b>CAPÍTULO 5 Derivação do valor de prevenção de Cd para os solos de Minas Gerais</b> .....	161
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	163
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	165
<b>2.1</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	168
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	169
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	178
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	179

## 1 INTRODUÇÃO

As ações antrópicas vêm modificando as condições de equilíbrio ambiental (ZHANG; LEE; JAHNG, 2012). A poluição do solo com elementos-traço (também denominados de metais pesados), pela intensificação das atividades industriais, agrícolas e urbanização, é um problema crescente e responsável por sérios impactos ao ambiente (ROMERO et al., 2013).

Diante desta realidade, os órgãos ou agências ambientais, utilizam análises técnicas e valores orientadores para tomada de decisões a respeito do gerenciamento de áreas contaminadas ou suspeitas de contaminação, levando em conta a utilização do solo sem ocasionar alterações de suas características e com isso, evitando perda de suas funções. Além disso, os aspectos de proteção à saúde humana, aos ecossistemas, recursos naturais e às propriedades públicas e privadas têm que ser contemplados.

A determinação de valores orientadores de qualidade do solo, embora em desenvolvimento no Brasil, já é bem estabelecida em países como Alemanha, Austrália, Estados Unidos, França, Itália, México e, principalmente, Holanda. O Estado de São Paulo foi o primeiro da Federação a estabelecer os Valores de Referência de Qualidade (VRQ), valores de prevenção (VP) e valores de investigação (VI) para solos e águas subterrâneas, os quais foram regulamentados no ano de 2001 e atualizados no ano de 2005 por meio da Decisão de Diretoria N°195-2005-E, de 23 de novembro. Os valores orientadores de São Paulo (VP e VI), com exceção do VRQ, foram os adotados na Resolução CONAMA N°420 de 28-12-2009 (Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA, 2009), para os demais estados brasileiros até que sejam estabelecidos valores orientadores regionais para solos e água subterrânea.

No Estado de Minas Gerais, os valores orientadores de qualidade do solo e das águas subterrâneas são regulamentados pela Deliberação Normativa

Conjunta COPAM/CERH-MG nº 02, de 08/09/2010 e pela Deliberação Normativa COPAM-MG nº 166, de 29/06/2011 (Minas Gerais, 2010). Minas Gerais, por meio da Fundação Estadual de Meio Ambiente - FEAM e convênio com universidades mineiras (UFLA, UFV, UFOP, UFU e CETEC), foi o segundo estado a estabelecer seus VRQs, e vem trabalhando na atualização dos VPs e VIs, por meio do Programa Solos de Minas, que é parte do Projeto Estruturador do Estado de Minas Gerais.

No entanto, não existe uma padronização metodológica que sirva como modelo para a determinação de valores de prevenção para solos do Estado de Minas Gerais. As plantas, que são importantes indicadores para determinação desses valores, absorvem elementos da solução do solo, sejam eles benéficos ou tóxicos, entretanto sabe-se que, certos elementos são absorvidos preferencialmente e que as características de absorção variam de planta para planta (FERNANDES, 2006). Quando há ocorrência de absorção de elementos tóxicos, as plantas tornam-se a principal forma de entrada destes compostos na cadeia alimentar (SOARES et al., 2005).

Dentre os elementos-traço, o cádmio foi objeto de estudo deste trabalho, na avaliação de valores de prevenção, pois, de forma direta ou indireta, inibe os processos fisiológicos das plantas (KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004), tais como: germinação de sementes, respiração, fotossíntese e distribuição de nutrientes, acarretando na perda de produção vegetal (SANITÀ DI TOPPI; GRABRIELLI, 1999).

Quando presentes, os sintomas visuais de toxidez são a resposta final de uma série de distúrbios metabólicos que se manifestam inicialmente em nível molecular, podendo atingir até modificações celulares para, posteriormente, manifestar-se em órgãos e organismos, quando os mesmos tornam-se visíveis (FERNANDES, 2006).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A poluição ambiental é, atualmente, um assunto mundialmente conhecido, devido aos problemas que tem causado diretamente ao bem estar e à qualidade de vida das pessoas. As principais fontes dessa poluição são a queima de combustíveis fósseis, mineração e fundição de minérios metálicos, resíduos urbanos, fertilizantes, pesticidas e esgotos (WEI; ZHOU, 2008).

A industrialização, segundo Rodrigues e Nalini Júnior (2009), destaca-se como uma das fontes poluidoras que mais dispersa elementos tóxicos, o que, aliado ao rápido crescimento populacional e a algumas atividades agrícolas, aumenta o grau de poluição em diversos ambientes naturais, acarretando profundas transformações no meio.

Entretanto, os produtos do agronegócio são de grande relevância para o Brasil, seja por sua importância nas exportações, ou pela capacidade de geração de renda, que equivale a cerca de um terço do produto interno bruto do Brasil (FIGUEIREDO; SANTOS; LIMA, 2012). Ao fato de os setores agrícolas e agroindustriais constituírem importante fonte de crescimento econômico, cresce diariamente a necessidade de investimentos em técnicas que permitam a melhoria da qualidade do solo e, conseqüentemente, dos produtos que nele serão produzidos.

Os fertilizantes minerais utilizados na agricultura para fornecimento de nutrientes para plantas podem ser fontes de contaminação com elementos-traço (ETs) (CAMPOS et al., 2005). Em alguns sistemas agrícolas, a entrada de ETs no solo pela aplicação de fertilizantes e insumos pode ser maior que as saídas através da absorção pelas plantas e lixiviação. Por isso o uso continuado destes insumos pode trazer acúmulo de ETs ao solo (MOLINA et al., 2009).

Embora alguns desses elementos sejam nutrientes necessários às plantas e aos seres vivos, caso ultrapassem as concentrações toleráveis, tornam-se

perigosos, podendo causar impactos negativos ao ecossistema e, inclusive, ameaçar a saúde humana (RODRIGUES; NALINI JÚNIOR, 2009). Esses ETs podem expressar seu potencial poluente pela possibilidade de transferência para a cadeia alimentar por meio das próprias plantas (SOARES et al., 2005), em que o consumo de vegetais e cereais é a principal fonte de ingestão de ETs por humanos (KABATA-PENDIAS; MUKHERJEE, 2007).

## 2.1 Elementos-traço

Na química ambiental, o termo elemento-traço ou, às vezes, metal pesado tem sido usado para tratar de alguns elementos (metais catiônicos e aniônicos) presentes em baixas concentrações (usualmente  $< 0,1\%$ ) em solos, plantas e animais, incluindo seres humanos (PIERZYNSKI; SIMS; VANCE, 1994; SPARKS, 1995). Já o termo metal pesado ainda não tem definição oficialmente proposta pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Entretanto, possui definições baseadas em propriedades químicas, número atômico, massa atômica e densidade, e por este motivo há confusões no uso deste termo (KABATA-PENDIAS, 2011). Dentre as definições, consideram-se metal pesado aqueles que possuem densidade superior a  $5 \text{ g cm}^{-3}$  (MALAVOLTA; MORAIS, 2006).

Alguns ETs são considerados essenciais por exercerem função biológica, enquanto outros não o são. Os principais ETs essenciais são, dentre outros: ferro (Fe), zinco (Zn), cromo (Cr), selênio (Se) e níquel (Ni), enquanto os ETs que não apresentam nenhuma função biológica são: arsênio (As), cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb) (BARKER; PILBEAM, 2007). De acordo com a Agency for Toxic Substances and Disease Registry- ATSDR (2011), os ETs não essenciais citados anteriormente encontram-se nas primeiras posições da lista de poluentes prioritários.

## 2.2 Elementos-traço em solo

Os elementos-traço estão presentes naturalmente nos solos, em concentrações variáveis de acordo com a sua gênese. No entanto, estas concentrações podem sofrer incremento devido a processos antrópicos, principalmente por fontes difusas. A maioria das informações disponíveis na literatura brasileira refere-se à fertilidade do solo e poucas se referem à questão ambiental.

Segundo Mattiazzo e Andrade (2000), trabalhos sobre comportamento de elementos-traço em solos, sua fitodisponibilidade com consequente passagem para a cadeia alimentar têm sido objetos de estudo bastante intensivos na literatura mundial.

Os elementos-traço interferem no funcionamento normal tanto das plantas como da biota do solo, inibindo uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos, afetando a produtividade e a sustentabilidade dos ecossistemas e induzindo danos, às vezes irreversíveis, ao “status” biológico, químico e físico do solo (KLAUBERG-FILHO et al., 2005). Em áreas contaminadas por esses elementos, são comuns danos como perda da cobertura vegetal, alteração na estrutura do solo, erosão, perda de nutrientes e de matéria orgânica, diminuição da densidade de propágulos e da atividade da microbiota (LIAO; XIE, 2007; VÁSQUEZ-MURRIETA et al., 2006).

O conhecimento das características, especialmente em relação aos teores naturais de elementos-traço do solo se faz necessário quando há a sua utilização para a agricultura, principalmente com aplicação de insumos que contenham esses elementos. O solo se comporta como um dissipador de metais pesados que chegam pela deposição aérea de partículas emitidas por atividades urbanas e industriais (BERMUDEZ et al., 2010; SCHUHMACHER; NADAL;

DOMINGO, 2009), bem como de práticas agrícolas (CHEN et al., 2008; DRAGOVIĆ; MIHAILOVIĆ; GAJIĆ, 2008).

A contaminação de solos por As, Cd, Pb e Hg, pode levar à contaminação das águas através de processos de lixiviação e escoamento superficial (GUILHERME et al., 2005), e de sedimentos através de processos de precipitação e adsorção (McBRIDE, 1994).

Ao avaliar entradas anuais de elementos-traço em terras agrícolas chinesas através de várias fontes, Luo et al. (2009) chegaram à conclusão que 58-85% de As, Hg, Pb, e Ni das entradas totais anuais foram derivadas de deposição atmosférica e apenas 8-25% e 5-30% de estrume animal e de fertilizantes, respectivamente. Em contraste, cerca de 69% de Cu e 51% de Zn eram de estrume animal. Para Cd, 55% das entradas foram de estrume animal, 35% da deposição atmosférica, e apenas 8% dos fertilizantes (adubos compostos principalmente). As principais fontes de Cr foram deposição atmosférica (43%), estrume animal (36%) e fertilizantes (20%).

### **2.3 Cádmio em plantas**

Quando presente no solo, mesmo em concentrações relativamente baixas, o Cd é absorvido pelas raízes das plantas e tende a se acumular em seus órgãos, sendo essa a principal forma de entrada na cadeia alimentar (STERCKEMAN; REDJALA; MOREL, 2011). Pressupõe-se que o pH e os cátions  $H^+$  e  $Ca^{2+}$  são os principais responsáveis pela absorção da Cd na solução do solo (REDJALA; STERCKEMAN; MOREL, 2009; STERCKEMAN; REDJALA; MOREL, 2011).

A acumulação de Cd causa desequilíbrio na absorção de minerais, em especial aqueles com a mesma valência, como Ca, Cu, Fe, Mn e Zn (DONG; WU; ZHANG, 2006). A diminuição do teor de Ca com a absorção de Cd pode

ser explicada pela competição dos sítios de adsorção nas paredes das células e para os locais de absorção no plasmalema (LINDBERG; LANDBERG; GREGER, 2004; PERFUS-BARBEOCH et al., 2002).

O aumento do teor de MDA (malondialdeído), produto da peroxidação de lipídeos, após a exposição ao Cd tem sido relatado em muitas espécies de plantas (CHAOUI et al., 1997; DONG; WU; ZHANG, 2006; MONTEIRO et al., 2009; PIOTROWSKA et al., 2010; SINGH; EAPEN; SOUZA, 2006; SMEETS et al., 2005). Além disso, foi relatado o acúmulo de prolina, indicadora de estresse ambiental, que também tem importante papel na proteção da planta (YANG et al., 2011). O Cd também reduz a absorção de nitrato e seu transporte das raízes para a parte aérea pela inibição da redutase do nitrato na raiz (HERNANDEZ; CARPENA-RUIZ; GARATE, 1996).

Um efeito claro pode ser evidenciado na germinação de sementes em solos com altos teores de cádmio, a atividade das  $\alpha$  e  $\beta$  amilases é significativamente reduzida, comprometendo a respiração (CHUGH; SAWHNEY, 1996), resultando na inibição do crescimento do eixo embrionário e da radícula (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; SHAW; SAHU; MISHRA, 2004).

O aparato fotossintético é um dos locais na planta mais afetado pelo excesso de Cd, pois esse pode causar danos às plantas tanto na fase fotoquímica quanto na fase bioquímica da fotossíntese (KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004). Na fase fotoquímica, os danos são mais severos no fotossistema II em comparação com o fotossistema I (CLIJSTERS; ASSCHE, 1985).

Esse elemento-traço interfere na fotossíntese também por alterar a atividade do ciclo de Calvin. A atividade de uma das principais enzimas responsáveis pela fixação do carbono, a Ribulose 1-5 bisfosfato carboxilase oxigenase, pode ser inibida por Cd, como foi mostrado em trabalhos com as

espécies: *Cajanus cajan* (SHEORAN; AGGARWALA; SINGH, 1990), *Oryza sativa* (LIDON; HENRIQUES, 1993), *Lolium perene* (MONNET et al., 2001).

O Cd interfere na síntese e degradação de pigmentos ligados à fotossíntese, como clorofilas e carotenoides (KURDIZEL; PRASAD; STRZALKA, 2004). Este elemento pode substituir o Mg da molécula de clorofila, resultando em perda da eficiência fotossintética. Além disso, pode causar mudanças na estrutura dos cloroplastos e no arranjo dos tilacoides (CHOUDHURY; PANDA, 2004; VITÓRIA; CUNHA; AZEVES, 2006).

O Cd, quando presente nas plantas, pode causar vários efeitos na atividade enzimática. O principal alvo de ação são enzimas e proteínas, que contêm grupos sulfidril (SH) unidos entre si por ligações dissulfeto. A presença do Cd leva à oxidação destes grupos que, reagindo com o enxofre, destroem as ligações dissulfeto, desnaturando a proteína. Alguns exemplos deste efeito foram descritos para as enzimas do Ciclo de Krebs na mitocôndria (SHAW; SAHU; MISHRA, 2004).

A catalase (CAT), presente principalmente nos peroxissomos, tem sua atividade reduzida na folha sob presença de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$  de Cd e aumento dos níveis de seu RNA mensageiro sugerindo que o Cd afeta a enzima a nível pós-transcricional (ROMERO-PUERTAS et al., 2006). Romero-Puertas et al. (2006) observaram redução na atividade das superóxido dismutases (SODs), (Mn-SOD e CuZn-SOD), bem como nos níveis de proteínas das duas isoformas em função do Cd. Estes autores afirmaram que esta redução pode ser devido a modificações no estado redox da glutatona ou devido à redução, induzida por Cd, na disponibilidade de manganês, cobre e zinco.

O aumento na concentração das EROs decorrentes da presença de níveis tóxicos de Cd podem produzir apoptose e dano ao DNA. Em plantas, um efeito indireto do Cd no DNA está associado com mudanças na atividade de enzimas

relacionadas à síntese de DNA e ao reparo de erros da replicação que podem ou não estar associados a um dano oxidativo (FILIPIC; HEI, 2004).

Somente a alteração da atividade das enzimas antioxidantes causada pela presença de Cd, já seria suficiente para explicar um estresse oxidativo, entretanto esse elemento-traço pode afetar o sistema de defesa antioxidativo não enzimático, como por exemplo, o da glutatona reduzida (GSH). Plantas sujeitas à presença do Cd podem apresentar declínio nos níveis de glutatona, o que deve ocorrer em função de um aumento na utilização de fitoquelatinas, ou através de sua interação direta com o Cd com consequente transporte para o vacúolo (PIETRINI et al., 2003).

Um dos sintomas típicos visíveis da toxicidade ao Cd é a clorose foliar (JIANG et al., 2005; KÜPPER et al., 2007). A clorose observada é maior em folhas novas quando comparadas com as mais velhas, indicando que folhas jovens absorvem mais Cd, ou que elas são mais vulneráveis à toxidez causada por este metal pesado (KÜPPER et al., 2007; KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004). A clorose pode ser devida a uma competição do Cd com o Fe por sítios de absorção na membrana plasmática (KABATA- PENDIAS; PENDIAS, 2000) ou com Mg (KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004), podendo, neste caso, afetar potencialmente a estabilidade das clorofilas. Trabalho realizado por Wang, Tao e Ren (2013), em que foi avaliada a germinação de milho em várias doses de Cd, mostra que os teores de clorofila *a* e principalmente o de clorofila *b*, reduzem-se com o aumento do teor do metal. Além disso, a relação dose-dependente de clorofila total também foi usada para determinar a concentração eficaz de 50% (CE50) e a concentração máxima admissível (MPC) (MOHAN; HOSETTI, 2006).

## 2.4 Valores de referência

Várias definições são utilizadas para o termo “Valores de Referência”. Dentre elas, citam-se “valores pré-estabelecidos que permitem determinar a ausência de contaminação ou conhecer o nível desta em solo” (BIONDI et al., 2011). Paye et al. (2010) apresentam uma definição proposta por Gough, Severson e Jackson (1994) como sendo os “valores orientadores que representam a medida da concentração natural de elementos químicos em solos sem influência humana”.

O fato dos teores naturais de metais estarem ligados diretamente ao material de origem, aos processos pedogenéticos e ao grau de desenvolvimento dos solos, faz com que a extrapolação de valores de referência para áreas diferentes daquelas utilizadas para a obtenção dos dados, torne-se um procedimento inadequado (BIONDI et al., 2011). Outro fator a ser elencado é a heterogeneidade do solo, que mesmo em micro escala, é responsável pelas dificuldades encontradas na obtenção de amostras representativas de um dado local. Além disso, os diferentes métodos analíticos empregados na quantificação dos elementos-traço geram resultados diferentes, o que justifica a utilização de material de referência para garantir a qualidade analítica (KABATA-PENDIAS, 2011).

A determinação dos teores naturais de elementos-traço no solo está relacionada à definição dos valores de referências e assim dá suporte para o monitoramento de áreas que possam ser contaminadas pelas ações antrópicas. Portanto, uma forma de se avaliar a influência antrópica em um dado local é realizar sua comparação com um solo nativo de mesmo contexto pedológico (FADIGAS et al., 2006).

A legislação brasileira estabelece três valores orientadores distintos: Valores Orientadores de Referência de Qualidade (VRQs), de Prevenção (VP) e

de Investigação (VI) (CONAMA, 2009). Estes valores são baseados na análise dos solos sob condição natural (sem nenhuma ou mínima interferência antrópica) e em análise de risco, sendo conceituados da seguinte forma:

Valor Orientador de Referência de Qualidade (VRQ) é também conhecido como *background* geoquímico, é baseado na avaliação dos teores naturais dos metais pesados nos solos, sem a influência de atividade humana. Para sua definição, a distribuição dos dados de uma população de amostras é normalizada, existindo inúmeros processos indicados para sua obtenção (MATSCHULLAT; OTTENSTEIN; REIMANN, 2000). Geralmente, baseia-se na exclusão de dados anômalos de uma população. A normalização dos dados pode basear-se na exclusão em percentil (geralmente 90% e 95% percentil) e quartil superior (75% percentil) dos valores observados (CAIRES, 2009; COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO - CETESB, 2005; MICÓ et al., 2007), sendo esta a sugestão do CONAMA (2009). Outras técnicas são discutidas em Matschullat, Ottenstein e Reimann (2000). Considera-se como solo não contaminado aquele cujo teor seja igual ou inferior aos VRQs para todos os metais.

Valor de Prevenção (VP) é um valor intermediário entre o VRQ e o Valor de Investigação (VI), é o valor limite de metal no solo, que não interfere em sua capacidade de comprometer suas funções: sustentador da diversidade biológica e dos ciclos biogeoquímicos, meio para a produção de alimentos e matéria prima, regulador da dispersão de substâncias contaminantes no solo mediante sua atuação como filtro e tampão ambiental, além de meio para a ocupação territorial e área para utilização recreacional, dentre outros. No caso deste valor ser alcançado, será requerido o monitoramento e avaliação da causa deste alto teor, tornando-se determinante para extinção de possíveis fontes de contaminação na área, ou verificação da existência de teores naturais atípicos. O VP é o objetivo deste trabalho.

Valor de Investigação(VI) é o valor acima do qual haverá risco à saúde humana e ao desenvolvimento dos demais organismos vivos. Sua determinação é baseada em análise de risco, considerando a dose máxima aceitável absorvida pelo organismo receptor, segundo pesquisas desenvolvidas por diversos órgãos, dentre os quais, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA), baseado na toxicologia do metal ou substância e nível de exposição dos indivíduos, mediante a aplicação de sistemas de modelagens. Uma vez observado um valor acima do VI, serão necessárias ações específicas para o gerenciamento da contaminação de forma a remediar a área e reduzir o risco de poluição.

O Brasil adotou os valores orientadores (VP e VI), com exceção do VRQ, estabelecidos para o Estado de São Paulo, através da resolução CONAMA 420 de 2009, até que os demais Estados brasileiros estabeleçam seus próprios valores de referência (CONAMA, 2009). Portanto, vê-se a necessidade de desenvolvimento de estudos voltados para a determinação de valores que possam ser tomados como referência para solos. Algumas pesquisas vêm sendo realizadas no Brasil, mesmo assim, elas ainda são insuficientes para avaliar de forma integrada os diversos fatores envolvidos na transferência desses elementos, principalmente os tóxicos, para o ser humano.

Com isso, desenvolver trabalhos buscando a quantificação dos teores de elementos-traço nos solos de referência para cada região permitirá demonstrar um manejo adequado, sustentável que pode contribuir tanto na produtividade quanto na melhoria da qualidade dos produtos agrícolas, assim como determinar a ocorrência de contaminação por esses elementos em áreas agricultáveis. Fadigas et al. (2002) encontraram valores médios para Co, Cr, Cu, Ni e Zn inferior aos encontrados na literatura internacional e inferior aos teores considerados tóxicos para plantas. Biondi et al. (2011), determinando os teores naturais de metais em solos de referência de Pernambuco, evidenciaram que a

maioria dos solos apresentou teores de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co menores que os de outras regiões do País e que Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co podem ser deduzidos como base para definição dos Valores de Referência de Qualidade dessa região.

No Estado do Espírito Santo, Paye et al. (2010) apresentaram valores de referência para metais pesados em solos. Para isso, realizaram análises em 56 pontos inseridos em três bacias hidrográficas na porção leste do estado. Eles observaram que os locais coletados, devido ao pH característico de solos ácidos, favorecem as perdas por lixiviação, devido ao aumento da solubilidade dos metais. Entretanto esta característica foi contrabalanceada pelos teores de argila e matéria orgânica responsável pela retenção dos mesmos. Os teores de metais encontrados pelos autores anteriormente citados foram, em geral, inferiores aos citados para solos dos EUA (CHEN; MA; HARRIS, 1999; LOGAN; MILLER, 1983) e os encontrados por Campos et al. (2003). Estas diferenças observadas, segundo os autores, podem ser parcialmente justificadas através do material de origem e dos processos pedogenéticos, pois foram observadas variações nos teores mesmo entre solos pertencentes à mesma classe.

## **2.5 Determinação dos valores de prevenção**

Os valores preventivos foram idealizados para evitar que o solo torne-se uma área contaminada, e referem-se a um limite de adição de metais no solo, independentemente do seu motivo de deposição, sendo o cenário agrícola alvo de estudos e de proteção máxima. Tais valores são derivados de estudos com fitotoxicidade para metais, uma vez que os contaminantes, quando presentes na solução do solo, podem ser absorvidos pelas plantas (CETESB, 2001).

No Estado de São Paulo, em anos anteriores a 2005, o Valor de Prevenção (VP) era denominado Valor de Alerta (VA), que era estabelecido de acordo com as médias aritméticas dos VRQ e VI, e indicava o valor a partir do

qual o monitoramento do solo era necessário, evitando que se transformasse em área contaminada, levando em conta a importância deste valor como caráter preventivo, na proteção da qualidade do solo, baseando-se no exemplo da Alemanha (CETESB, 2001).

Com o intuito de validar o Valor de Alerta para substâncias inorgânicas, definidos em 2001, em 2005 a CETESB realizou testes de fitotoxicidade para Cd e Pb, seguindo a metodologia da Holanda por meio da agência ambiental Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) (VERBRUGGEN et al., 2001), que consiste em calcular as concentrações de MAP (Adição Máxima Permitida). Para determinar o Valor de Prevenção, a CETESB adotou a seguinte metodologia: VP igual à MCP (Máxima Concentração Permitida), que é igual ao somatório do MAP com o VRQ. Para o Cd, o valor de alerta era de  $3 \text{ mgkg}^{-1}$  e o valor de prevenção foi de  $1,3 \text{ mgkg}^{-1}$  (valor de referência  $< 0,5 \text{ mgkg}^{-1}$ ), um decréscimo de 43%.

Para plantas, o protocolo 208 da Organisation for Economic Co-Operation and Development - OECD (2006) prevê a realização de testes de germinação, com espécies consideradas sensíveis à contaminação por elementos-traço, conforme a Tabela 1. O teste tem duração de 14 a 21 dias, após germinação de 50% do controle, com pelo menos duas espécies diferentes e no mínimo cinco concentrações do contaminante para que seja possível análise de regressão.

Tabela 1 Espécies sensíveis para testes de ecotoxicidade com elementos-traço

Espécie	Referência
Eudicotiledôneas	
<i>Beta vulgaris</i>	OECD (2006)
<i>Brassica napus</i>	ISO (2013)* e OECD (2006)
<i>Brassica oleracea var.</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)**
<i>Brassica rapa</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Brassica rapa pekinensis</i>	ISO (2013)
<i>Cucumis sativus</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Daucus carota</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Glycine max</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Helianthus annuus</i>	OECD (2006)
<i>Lactuca sativa</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Lepidium sativum</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Phaseolus aureus</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Pisum sativum</i>	OECD (2006)
<i>Raphanus sativus</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Sinapis alba</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Vicia sativa</i>	OECD (2006)
Monocotiledôneas	
<i>Allium cepa</i>	OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Avena sativa</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Hordeum vulgare</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Lolium perene</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)
<i>Oryza sativa</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Secale cereal</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Sorghum bicolor</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Triticum aestivum</i>	ISO (2013) e OECD (2006)
<i>Zea mays</i>	ISO (2013), OECD (2006) e USEPA (1996)

\* International Standard Organization

\*\* United States Environmental Protection Agency

São avaliados a emergência e o crescimento inicial, sintomas de fitotoxicidade e biomassa no final do teste. Os resultados de emergência são expressos em LC50 (dose que causa 50% de redução a uma variável resposta, em comparação ao controle) e o efeito no crescimento das plântulas expresso em EC50 (dose que causa 50% de morte em relação ao controle). Este protocolo abrange a ISO 11.269 e demais referências internacionais reconhecidas, em especial a U.S. EPA Test Guidelines e American Standard for Testing Material (ASTM).

Outra metodologia é a norma europeia ISO 22.030, de 2005, editada pela ISO 22.030, de 2011, que descreve um método para determinar a inibição do crescimento e da capacidade reprodutiva de plantas superiores por solos sob condições controladas. A duração do teste deve ser suficiente para induzir fitotoxicidade crônica que demonstra a capacidade reprodutiva das plantas avaliadas. O teste é aplicável para avaliar a qualidade do solo, especialmente a função do solo como um *habitat* para plantas e permite ensaios do ciclo de vida completo do vegetal.

Por fim, destaca-se que, na literatura nacional, existem diversos estudos ecotoxicológicos, porém sem padronização que sirva como modelo para determinação de valores de prevenção para os solos de Minas Gerais.

## REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY.  
**Toxicological profile for cadmium.** Atlanta: U.S. Public Health Service, 2011.  
487 p.
- BAIRD, C. **Química ambiental.** 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008. 622 p.
- BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. **Hand book of nutrition.** 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton:  
CRC, 2007. 662 p.
- BERMUDEZ, G. M. A. et al. Heavy metal pollution in topsoils near a cement  
plant: the role of organic matter and distance to the source to predict total and  
HCl-extracted heavy metal concentrations. **Chemosphere**, Oxford, v. 78, n. 4, p.  
375-381, Jan. 2010.
- BIONDI, C. M. et al. Teores de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co em solos de referência  
de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n.  
3, p. 1057-1066, maio/jun. 2011.
- CAIRES, S. M. D. E. **Determinação dos teores naturais de metais pesados  
em solos do Estado de Minas Gerais como subsídio ao estabelecimento de  
Valores de Referência de Qualidade.** 2009. 270 p. Tese (Doutorado em Solos  
e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2009.
- CAMPOS, M. L. et al. Baseline concentration of heavy metals in Brazilian  
latossols. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.  
34, p. 547-557, Jan. 2003.
- CAMPOS, M. L. et al. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo  
e zinco em fosfatos de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.  
40, p. 361-367, abr.2005.
- CHAOUI, A. et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and  
effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L). **Plant  
Science**, Washington, v. 127, p. 139-147, Sept.1997.
- CHEN, M.; MA, L.Q.; HARRIS, W.G. Baseline concentrations of 15 trace  
elements in Florida surface soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison,  
v. 28, p. 1173-1181, July/Aug.1999.

CHEN, T. et al. Identification of trace element sources and associated risk assessment in vegetable soils of the urban-rural transitional area of Hangzhou, China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 151, n. 1, p. 67-78, Jan. 2008.

CHOUDHURY, S.; PANDA, S. K. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Scwaeagr.) Broth under chromium and lead phytotoxicity. **Water Air & Soil Pollution**, Pequim, v. 167, p. 73-90, Dec.2004.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, Barking, v.92, p.1-5, June1996.

CLIJSTERS, H.; ASSCHE, F. van. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. **Photosynthesis Research**, Amsterdam, v. 7, p. 31-40, May 1985.

COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO. Decisão de Diretoria nº 195-2005-E, de 23 de novembro de 2005. Dispõe sobre a aprovação dos Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo, 2005, em substituição aos Valores Orientadores de 2001, e dá outras providências. **Diário Oficial [do] Estado de São Paulo**, Poder Executivo, São Paulo, v. 115, n. 227, p. 22-23, 13 dez. 2005. Seção 1.

COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2001. 4 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

DONG, J.; WU, F.B.; ZHANG, G.P. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 64, p. 1659-1666, Sept.2006.

DRAGOVIĆ, S.; MIHAILOVIĆ, N.; GAJIĆ, B. Heavy metals in soils: distribution, relationship with soil characteristics and radionuclides and multivariate assessment of contamination sources. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 3, p. 491-495, June2008.

FADIGAS, F. de S. et al. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. **Bragantia**, Campinas, v. 3, p. 151-159, maio 2002.

FADIGAS, F. de S. et al. Proposição de valores de referência para a concentração natural de metais pesados em solos brasileiros. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas Grande, v. 10, n. 3, p. 699-705, jul./set.2006.

FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: SBCS, 2006. 432p.

FIGUEIREDO, A.M.; SANTOS, M. L. dos; LIMA, J. F. de. Importância do agronegócio para o crescimento econômico de Brasil e Estados Unidos. **Gestão & Regionalidade**, São Caetano do Sul, v. 28, n. 82, p. 5-17, abr.2012.

FILIPIC, M.; HEI, T. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v.546, p. 81-91, Feb.2004.

GOUGH, L.P.; SEVERSON, R.C.; JACKSON, L.L. Baseline element concentrations in soils and plants, Bull Island, Cape Romain National Wildlife Refuge, South Carolina, USA. **Water Air Soil Pollution**, Amsterdam, v. 74, p. 1-17, Jan.1994.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos-traço em solos, sedimentos e nas águas. In: \_\_\_\_\_. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 345-390.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 2013. 28 p.

HERNANDEZ, L.E.; CARPENA-RUIZ, R.; GARATE, A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.19, p.1581-1598, Nov.1996.

JIANG, R.F. et al. Cadmium hyperaccumulation protects *Thlaspi caerulescens* from leaf feeding damage by thrips (*Frankliniella occidentalis*). **New Phytologist**, Cambridge, v.167, p.805-814, Sept.2005.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4<sup>th</sup>ed. Boca Raton: CRC, 2011. 534 p.

KABATA-PENDIAS, A.; MUKHERJEE, A.B. **Trace elements from soil to human**. New York: Springer, 2007. 450 p.

KLAUBERG FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005.p. 85-144.

KÜPPER, H. et al. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 175, p.1-20, Oct.2007.

KURDZIEL, B.M.; PRASAD, M.N.V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2<sup>nd</sup>ed. New Delhi: Springer, 2004. p.146-181.

LIAO, M.; XIE, X. M. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 66, n. 2, p. 217-223, Feb. 2007.

LIDON, F.C.; HENRIQUES, F. S. Changes in the contents of the photosynthetic electron carrier, RNase activity and membrane permeability triggered by excess copper in rice. **Photosynthetica**, Coverage, v. 28, p. 99-108, Feb.1993.

LINDBERG, S.; LANDBERG, T.; GREGER, M. A new method to detect cadmium uptake in protoplasts. **Planta**, Berlin, v. 219, p. 526-532, Apr. 2004.

LOGAN, T.J.; MILLER, R.H. Background levels of heavy metals in Ohio farm soils: soil contamination analysis. **Ohio Agricultural Research and Development Center**, Ohio, v. 275, p. 3-15, Jan./Feb.1983.

LUO, L. et al. An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. **Journal of Environmental Management**, London, v. 90, n. 8, p. 2524-2530, Feb. 2009.

MALAVOLTA, E.; MORAIS, M. F. Sobre a sugestão dos metais pesados tóxicos em fertilizantes e sobre a portaria 49 de 25/04/2005 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. **Informações Agrônomicas**, Piracicaba, n. 114, p. 10-14, 2006.

MATSCHULLAT, J.; OTTENSTEIN, R.; REIMANN, C. Geochemical background: can we calculate it? **Environmental Geology**, Berlin, v.39, p. 990-1000, Sept.2000.

MATTIAZZO, M. E.; ANDRADE, C. A. Aplicabilidade do biossólido em plantações florestais: lixiviação de N orgânico e toxicidade de metais pesados. In: Bettiol, W.; Camargo, O. A. (Ed.). **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2000. p. 203-213.

MCBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University, 1994. 406 p.

MICÓ, C. et al. Baseline values for heavy metals in agricultural soils in an European Mediterranean region. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 378, p. 13-17, Feb.2007.

MINAS GERAIS. **Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH nº 02**, de 08 de setembro de 2010. Institui o Programa Estadual de Gestão de Áreas Contaminadas, que estabelece as diretrizes e procedimentos para a proteção da qualidade do solo e gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por substâncias químicas. Belo Horizonte, 2010. Disponível em: <<http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=14670>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

MOHAN, B.S.; HOSETTI, B. B. Phytotoxicity of cadmium on the physiological dynamics of *Salvinia natans* L. grown in macrophyte ponds. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 27, p. 701-704, Oct.2006.

MOLINA, M. et al. Trace element composition of selected fertilizers used in Chile: phosphorus fertilizers as a source of long-term soil contamination. **Soil and Sediment Contamination**, Boca Raton, v. 18, n. 4, p. 497-511, July2009.

MONNET, F. et al. Relationship between PS II activity, CO<sub>2</sub> fixation and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. **Journal of Plant Physiology**, London, v. 158, p. 1137-1144, Apr.2001.

MONTEIRO, M.S. et al. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. **Ecotoxicology Environment**, New York, v. 72, p. 811-818, Mar.2009.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n°208: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test**. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

PAYE, H. de S. et al. Valores de referência de qualidade para metais pesados em solos no Estado do Espírito Santo. **Revista Brasileira de Ciências Solo**, Campinas, v. 1, n. 6, p. 2041-2051, nov./dez.2010.

PERFUS-BARBEOCH, L. et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Planta**, Berlin, v. 32, p. 539-548, Nov. 2002.

PIERZYNSKI, G. M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. **Soils and environmental quality**. Boca Raton: Lewis, 1994.313 p.

PIETRINI, F. et al. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, Lancaster, v.133, p.829-837, Oct.2003.

PIOTROWSKA, A. et al. Changes in growth, biochemical components, and antioxidant activity in aquatic plant *Wolffia arrhiza* (Lemnaceae) exposed to cadmium and lead. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 58, p. 594-604, Apr.2010.

REDJALA, T.; STERCKEMAN, T.; MOREL, J.L. Cadmium uptake by roots: contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, p. 235-242, Nov.2009.

RODRIGUES, A. S. de; NALINI JÚNIOR, H. A. Valores de background geoquímico e suas implicações em estudos ambientais. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 62, n. 2, p. 155-165, abr.2009.

ROMERO, I. et al. Evaluation of trace element contamination changes in soils using a new normalization factor application to the Guadiamar soils (SW Spain) affected by a mine spill in 1998. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 124, p. 29-39, Jan. 2013.

ROMERO-PUERTAS, M.C. et al. Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. **New Phytologist**, London, v.170, p.43-52, Jan.2006.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GRABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 41, p. 105-130, Apr.1999.

SCHUHMACHER, M.; NADAL, M.; DOMINGO, J. L. Environmental monitoring of PCDD/Fs and metals in the vicinity of a cement plant after using sewage sludge as a secondary fuel. **Chemosphere**, Oxford, v. 74, n. 11, p. 1502-1508, Mar.2009.

SHAW, B.P.; SAHU, S.K.; MISHRA, R.K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2<sup>nd</sup>ed. New Delhi: Springer, 2004. p.84-126.

SHEORAN, I. S.; AGGARWALA, N.; SINGH, R. Effects of cadmium and nickel on in vivo carbon dioxide exchange rate of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Plant and Soil**, Amsterdam, v. 129, p. 243-249, July1990.

SINGH, S.; EAPEN, S.; SOUZA, S.F. d'. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, p. 233-246, July2006.

SMEETS, K. et al. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. **Plant Physiol. Biochem**, Paris, v. 43, p. 437-444, Apr.2005.

SOARES, C.R.F.S. et al. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v.29, n.2, p.175-183, jan./fev.2005.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic, 1995. 267 p.

STERCKEMAN, T.; REDJALA, T.; MOREL, J.L. Influence of exposure solution composition and of plant cadmium content on root cadmium short-term uptake. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 74, p. 131-139, Dec.2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **The Report on the Environment (ROE) presents the best available indicators of information on national conditions and trends in air, water, land, human health, and ecological systems.** Washington, 2006. 11 p.

VÁSQUEZ-MURRIETA, M. S. et al. C and N mineralization and microbial biomass in heavy-metal contaminated soil. **European Journal of Soil Biology**, Montrouge, v. 42, n. 2, p. 89-98, Apr./June 2006.

VERBRUGGEN, E.M.J. et al. **Ecotoxicological serious risk concentrations for soil, sediment and (ground) water:** updated proposals for first series of compounds. Bilthoven: National Institute of Public Health and the Environment, 2001. 264 p.

VITÓRIA, A. P.; CUNHA, M.; AZEVESO, R. A. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 58, p. 47-52, Dec.2006.

WANG, C. X.; TAO, L.; REN, J. The response of maize seedlings to cadmium stress under hydroponic conditions. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 60, n. 2, p. 295-299, Mar.2013.

WEI, S.; ZHOU, Q. Trace elements in agro-ecosystems. In: \_\_\_\_\_. **Trace elements as contaminants and nutrients consequences in ecosystems and human health.** New Jersey: Wiley, 2008. p. 55-80.

YANG, H.Y. et al. Cadmium effects on mineral nutrition and stress related indices in *Potamogeton crispus*, Russ. **Journal of Plant Physiology**, New York, v. 58, p. 253-260, Apr.2011.

ZHANG, L.; LEE, Y. W.; JAHNG, D. Ammonia stripping for enhanced biomethanization of piggery wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 199/200, p. 36-42, Jan.2012.

## **CAPÍTULO 2 Avaliações fisiológicas de espécies sensíveis à toxidez cultivadas em Latossolo e Cambissolo com concentrações crescentes de Cd**

### **RESUMO**

O cádmio (Cd) está presente em diversas concentrações nos solos e devido a sua toxidez está na lista prioritária de substâncias tóxicas (Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR, 2011). As plantas possuem variados mecanismos de defesas contra a fitotoxidez e desta forma apresentam respostas fisiológicas diversificadas quando expostas aos elementos-traço. Por isso, torna-se necessário a melhor elucidação da interação solo-planta nestas condições. Neste trabalho, objetivou-se avaliar espécies sensíveis à contaminação por Cd, através de teste de germinação, desenvolvimento inicial, análises bioquímicas, sintomas visuais e índices ecotoxicológicos de plantas cultivadas em Latossolo e Cambissolo. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras segundo a ISO 11.269-2. Foram utilizadas quatro espécies sensíveis ao Cd (arroz, feijão, milho e rabanete) cultivadas em Latossolo e Cambissolo nas diferentes doses de Cd (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4 mg kg<sup>-1</sup>). Durante o período experimental, foi calculado o índice de velocidade de emergência e, ao final de 21 dias, foram avaliados germinabilidade, crescimento, enzimas do sistema antioxidante, teores de Cd nas folhas, sintomas visuais e concentração efetiva em que não houve efeitos observáveis (NOEC), bem como concentração efetiva mínima em que houve efeitos observáveis (LOEC). As espécies cultivadas no Latossolo, devido aos seus atributos, apresentaram maiores sintomas de toxidez, e por isso houve efeito negativo nos parâmetros analisados, principalmente germinação e altura da parte aérea. Diferentemente, no Cambissolo, embora tenham sido observadas variações nas enzimas do sistema antioxidante, as plantas apresentaram sintomas visuais de toxidez menos evidentes. Neste solo, um dos parâmetros mais responsivos foi o índice de velocidade de emergência. Assim, conclui-se que as concentrações crescentes de Cd alteraram o metabolismo bioquímico, germinação e o desenvolvimento do vegetal até atingir níveis visuais. Para os índices de ecotoxicidade, as espécies apresentaram sensibilidades variadas e diferiram quanto aos valores de NOEC e LOEC.

Palavras-chave: Parâmetros ecotoxicológicos. Elemento-traço. Fitotoxidez. Crescimento. Desenvolvimento.

### ABSTRACT

Cadmium (Cd) is present in many concentrations in the soil and, due to its toxicity, it is in a priority list of toxic substances. Plants present various defense mechanisms against phytotoxicity, with diverse physiological responses when exposed to trace elements, making it necessary to better elucidate soil-plant interaction under such circumstances. This work aimed at evaluating species sensitivity to Cd contamination assessing germination test, initial development, biochemical analyses, visual symptoms and ecotoxicological indexes in plants cultivated in an Oxisol and an Inceptisol. The experiment was conducted in a greenhouse at the Universidade Federal de Lavras, according to ISO 11269-2, using four species sensitive to Cd (rice, beans, corn and radish) cultivated in an Oxisol and an Cambisol, in different Cd doses (0.4; 0.72; 1.29; 2.3; 4.1; 13.6; 24.4 mg kg<sup>-1</sup>). During the experimental period we calculated the emergence velocity index and, at the end of 21 days, we evaluated germination quality, growth analyses, enzymes of the antioxidant system, Cd content on the leaves, visual symptoms, effective concentration in which there were no observable effects (NOEC) and minimum effective concentration in which there were observable effects (LOEC). The species cultivated in the Oxisol, due to its attributes, presented larger toxicity symptoms, with negative effects in the analyzed parameters, especially germination and shoot height. A different behavior occurred in the Inceptisol, in which plants showed variation in enzyme activity in the antioxidant system, but presented less evident visual toxicity symptoms. In this soil, one of the most responsive parameters was the emergence velocity index. Thus, we conclude that the increasing Cd concentrations have altered the plants' biochemical metabolism, germination and the development until reaching visual levels. For the ecotoxicity indexes, the species presented sensitivity variations and differed in regard to NOEC and LOEC values.

Keywords: Ecotoxicological parameters. Trace elements. Phytotoxicity. Growth. Development.

## 1 INTRODUÇÃO

As ações antrópicas vêm modificando as condições de equilíbrio ambiental (ZHANG et al., 2012). A poluição do solo com metais pesados, pela intensificação das atividades industriais, agrícolas e urbanização, é um problema crescente e responsável por sérios impactos ao ambiente (ROMERO et al., 2013).

Além disto, reconhecendo as dimensões continentais do Brasil e a diversidade de ambientes de formação, deve-se ter em mente a grande variabilidade natural dos teores de metais em solos, que mesmo elevados, muitas vezes não caracterizam contaminação ambiental (ERNST, 1996).

Assim, devido à grande variabilidade de solos encontrados em nosso país (BIONDI et al., 2011; FADIGAS et al., 2006), somado aos diferentes mecanismos de adaptação entre as espécies vegetais (FARGAŠOVÁ, 2012), torna-se necessário o estudo da interação solo-planta que servirá como sinalizador da qualidade de um dado ambiente.

O Cd está há alguns anos na sétima colocação na lista prioritária de substâncias tóxicas da Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doença - ATSDR (2011), pois pode ser prejudicial à grande parte dos organismos. Nas plantas, é considerado não essencial (VALLEE; ULMER, 1972). É absorvido pelas raízes e tende a se acumular em órgãos, sendo essa a principal forma de entrada na cadeia alimentar (STERCKEMAN; REDJALA; MOREL, 2011). Seu efeito fitotóxico é relatado em vários parâmetros fisiológicos como na germinação (CHUGH; SAWHNEY, 1996), crescimento (SHAW; SAHU; MISHRA, 2004), desenvolvimento (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991) e fotossíntese (LARSSON; BORNMAN; ASP, 1998), podendo levar à morte as plantas.

Uma maneira eficiente de obter dados concretos é através dos testes de ecotoxicidade, principalmente no que se refere à fitotoxicidade de plantas, em que vários parâmetros vegetais podem ser utilizados para avaliar a contaminação do solo (COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO - CETESB, 2001). Índices de ecotoxicidade como LC50 (dose letal a 50% dos indivíduos), NOEC (concentração efetiva que não houve efeitos observáveis) e LOEC (concentração efetiva mínima que teve efeitos observáveis), apesar de controversos, ainda têm sido bastante utilizados na literatura e por órgãos ambientais (DAM; HARFORD; WARNE, 2012).

Diante do exposto e visando um melhor entendimento do comportamento fisiológico de espécies expostas a Cd, o presente estudo teve como objetivo avaliar quatro espécies (milho, arroz, feijão e rabanete) sensíveis à contaminação por esse elemento (Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD, 2006), cultivadas em Latossolo e Cambissolo, através de teste de germinação, desenvolvimento inicial, análises bioquímicas, sintomas visuais e índices ecotoxicológicos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras/UFLA, em Lavras - MG (44° 55' W; 21° 05' S), segundo as recomendações da Resolução CONAMA 420 de 2009, ISO 11.269-2 e OECD-208. Foram selecionadas duas classes de solo do Estado de Minas Gerais consideradas representativas, classificadas como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico textura média a moderado e Cambissolo Háplico Tb distrófico típico a moderado, ambos na fase floresta tropical subperenifólia. Estes solos são considerados limpos quanto a Cd, ou seja,  $VRQ < 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso seco para Cd (Fundação Estadual do Meio Ambiente - FEAM, 2011), valor este determinado por digestão com ácido nítrico concentrado em forno micro-ondas (protocolo USEPA 3.051A, da Agência de Proteção Ambiental dos EUA).

Após a caracterização química e física dos solos, foram realizadas as adubação e correção (Tabela 1 e 2) segundo as recomendações da 5ª Aproximação (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999) para cada espécie utilizada neste experimento. Foram adicionadas diferentes doses de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$  (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4 mg de Cd  $\text{kg}^{-1}$  de solo seco), por meio de solução. As doses foram determinadas utilizando como parâmetros os valores orientadores já estabelecidos pela resolução 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2009), que tomou como referência os valores para os solos do Estado de São Paulo determinados pela CETESB. Os valores estabelecidos para este experimento são múltiplos de 1,8 conforme sugestão da normativa da OECD (2006).

Tabela 1 Fertilidade do Latossolo e Cambissolo

Solos	pH	K	P	Ca	Mg	Al	CTC ef	V	MO
Latossolo	4,8	32	1,13	0,3	0,1	0,6	1,08	9,64	1,64
Cambissolo	5,3	34	2,60	1,6	0,4	0,5	2,59	34,05	2,87

pH em água relação 1:25; P, K: Extrator Mehlich 1; S: Extrator fosfato monocálcico em ácido acético; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup>: Extrator KCl 1 mol<sup>-1</sup>; H + Al: Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,0; MO: Oxidação Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N; SB: Soma de Bases; CTCef.: Capacidade de troca catiônica efetiva; V: Índice de saturação de bases; MO: Matéria orgânica.

Tabela 2 Textura do Latossolo e Cambissolo

Solos	Argila	Textura	
		Silte	Areia
		----- % -----	
Latossolo	24	12	64
Cambissolo	31	22	47

O estudo foi constituído de dois experimentos distintos e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (7×4)+3, ou seja, para cada classe de solo, sete doses de Cd, quatro espécies de plantas com três repetições e três controles para cada espécie. Cada unidade experimental constou de um vaso contendo 500g de solo com 20 sementes para a realização do teste de germinação, sendo a umidade mantida entre 50 e 60% da capacidade de campo. Após o teste, o número de plantas por repetição foi reduzido para 10. O experimento teve duração de vinte e um dias, após a germinação de 50% do controle, de acordo com as recomendações da OECD-208. Nesse período, o experimento foi fotografado a cada sete dias para registro dos sintomas de toxidez.

## 2.1 Teste de germinação

Foram selecionadas quatro espécies, sendo:

- a) Duas monocotiledôneas, e;
- b) *Zea mays* (milho) - híbrido Cultivar BM207, sementes S-1, pureza mínima 98%, germinação 85%,
- c) *Oryza sativa*(arroz) - BRSMG CARAVERA, pureza 99%, germinação 65%.

Duas eudicotiledôneas:

- a) *Phaseolus vulgaris* (feijão comum) - BRSMG Madrepérola, pureza 95%, germinação 97%,
- b) *Raphanus sativus* (rabanete) – sementes S-2, pureza 99,9%, germinação 90%, tratadas com dissulfeto tetrametil-tiuram (Thiram) na dose de 1,5g do produto por kg de semente.

A determinação das espécies utilizadas foi feita de acordo com a lista de espécies sensíveis da ISO 11.269-2 (International Standard Organization - ISO, 2013) e OECD (2006). Com as sementes destas espécies, foi realizado o teste de germinação, obtendo a porcentagem de germinação total (%G), segundo Maguire (1962). Para os resultados da germinação, foi calculado o LC50 (concentração letal para a germinação de 50% das sementes) pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSSO; THURSTON, 1977).

Foi calculado, também, o Índice de Velocidade de Emergência (IVE), com contagens diárias de emergência das plântulas segundo Maguire (1962).

## 2.2 Análise de crescimento

Três plantas por repetição de cada tratamento, dos que obtiveram germinação, foram avaliadas segundo as seguintes características: altura da parte aérea; diâmetro do coleto, ambos obtidos com paquímetro digital; número de folhas e área foliar (AF).

Determinou-se a matéria fresca da parte aérea (MFPA), raiz (MFR) e total (MFT). Após o material ter sido seco a 70°C em estufa de circulação forçada até peso constante, foi determinada a matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST).

## 2.3 Enzimas antioxidantes

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 0,2g de folhas. A este material foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), 15 µL de EDTA 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), 6 µL de DTT 0,5 mol L<sup>-1</sup>, 12 µL de PMSF 0,1 mol L<sup>-1</sup>, ácido ascórbico 0,001 mol L<sup>-1</sup> e 22 mg de PVPP. O extrato foi centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C durante o período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados nas análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

### a) Dismutase do superóxido (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977)

em um meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,8, metionina 14 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 0,1 μmol L<sup>-1</sup>, NBT 75 μmol L<sup>-1</sup> e riboflavina 2 μmol L<sup>-1</sup>. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação:

$$Inibição(\%) = \frac{(A560_{ce} - A560_{se})}{(A560_{se})}$$

Em que:

A560 *ce* = amostra com extrato enzimático

A560 *se* = controle sem enzima

Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

#### **b) Catalase (CAT)**

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), em que uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático foi adicionada a 950 μL do meio de incubação contendo 500 μL de fosfato de potássio 200 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) e 50 μL de peróxido de hidrogênio 12,5 mmol L<sup>-1</sup>, incubado a 28°C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 36 mmol L<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

### **c) Peroxidase do ascorbato (APX)**

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada a 950  $\mu\text{L}$  de tampão de incubação composto por 500  $\mu\text{L}$  de fosfato de potássio 200  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,0), 50  $\mu\text{L}$  de ácido ascórbico 10  $\text{mmol L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 2  $\text{mmol L}^{-1}$  (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de 2,8  $\text{mmol L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### **2.4 Teor de Cd**

O teor de Cd foi determinado em extratos obtidos por digestão ácida em forno micro-ondas, conforme o método USEPA 3051A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (United States Environmental Protection Agency - USEPA, 1998) por espectrofotometria de absorção atômica (com atomização por forno de grafite).

### **2.5 Determinação de NOEC e LOEC**

Na posse de todos os parâmetros analisados, foram determinados o NOEC (concentração efetiva que não houve efeitos observáveis) e LOEC (concentração efetiva mínima que teve efeitos observáveis); ou seja, a menor dose de Cd aplicada ao solo que apresentou diferença significativa em relação ao controle é designada como LOEC e a dose anterior, que diferiu estatisticamente, é considerada o NOEC.

## **2.6 Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo nas médias quantitativas submetidas ao teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ) e analisadas por regressão polinomial. As regressões foram efetuadas em programa estatístico SISVAR versão 4.3 (FERREIRA, 1999).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de germinação e o IVE variaram conforme o solo e a espécie. As quatro espécies testadas em Latossolo tiveram respostas significativas na germinação quando submetidas a diferentes doses de Cd, como pode ser observado na Figura 1. Das espécies estudadas, o rabanete foi a mais sensível, não germinando no tratamento com dose de 24,4 mg kg<sup>-1</sup>. Já o feijão foi a espécie menos sensível ao Cd, germinando 44% no tratamento de maior dose, seguidos do milho e arroz.

Para o IVE no Latossolo (Figura 2), o controle apresentou dados médios de 3,40; 3,60; 5,50; 2,15 para milho, feijão, rabanete e arroz respectivamente, não diferindo estatisticamente do tratamento com a menor dose de Cd (0,4 mg kg<sup>-1</sup>). Para a maior dose (24,4 mg kg<sup>-1</sup>) os valores médios desse parâmetro foram significativamente afetados sendo inferiores a 1,4 em todas as culturas, excetuando-se o rabanete que não germinou.

No Cambissolo, para a germinação, os efeitos das doses de Cd foram distintos dos observados para o Latossolo. Neste solo, o Cd afetou em menor porcentagem e as espécies germinaram em todos os tratamentos, não havendo diferença estatística significativa entre eles (Figura 1). Já em relação ao IVE (Figura 2), os resultados foram significativos para todas as espécies e as maiores doses de Cd apresentaram o menor índice para todas as espécies, apesar de menos expressivos quando comparados ao Latossolo.

Na germinação, o tratamento com 0,4 mg kg<sup>-1</sup> em ambos os solos, considerado solo limpo pela resolução do CONAMA 420 (CONAMA, 2009), apresentou um comportamento de germinação semelhante ao controle, não havendo diferenças estatísticas significativas entre eles para todas as espécies. Estes resultados comprovam que este teor pode ser utilizado para classificar um solo como limpo.

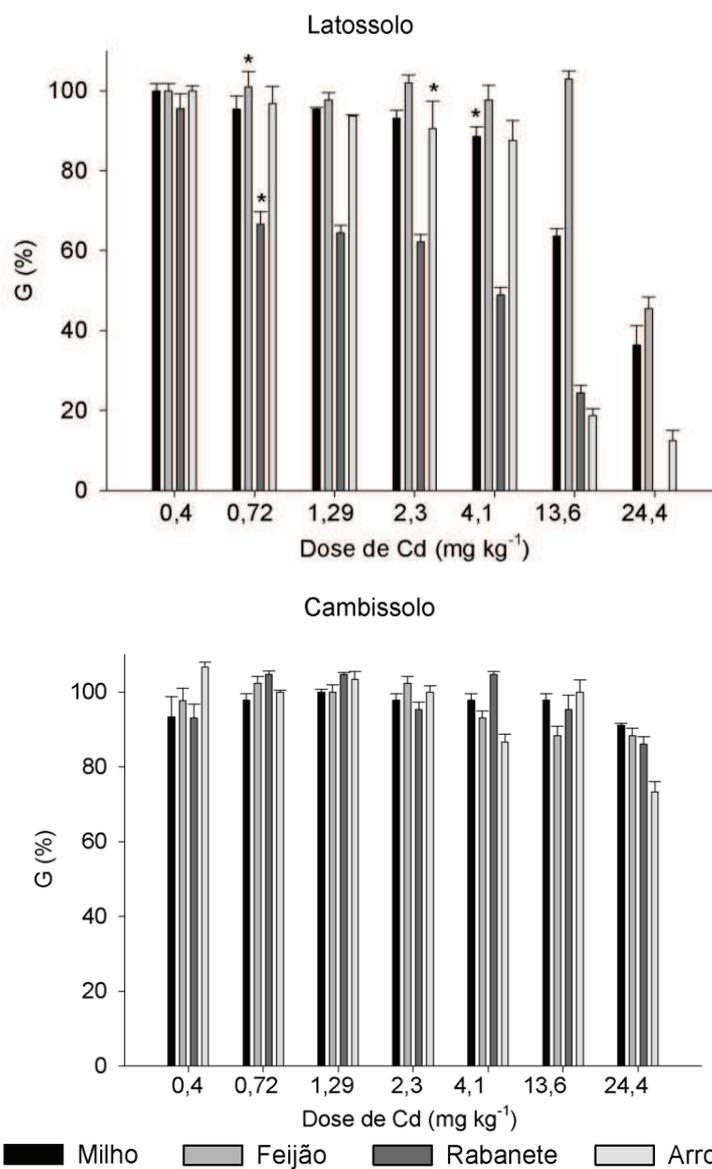


Figura 1 Germinabilidade (%) apresentadas como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

O Cd pode causar alterações na permeabilidade, gerar instabilidades das membranas (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005; SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991) e alterar a composição química das reservas (CARVALHO; NAKAGAWA, 1988). Estas alterações, associadas às diferentes adaptações das espécies de plantas ao estresse (FARGAŠOVÁ, 2012), podem justificar o efeito do Cd sobre a germinação como observado na Figura 1. Já os resultados de IVE podem ser explicados, pois além das alterações nas membranas, o Cd gera problemas na divisão e diferenciação celular (SINGH; EAPEN; SOUZA, 2006). Possivelmente estes efeitos devem ter alterado o desenvolvimento vegetal e retardado a emergência das plântulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Santos et al. (2013), que observaram redução da germinação e porcentagem de emergência de feijão cultivados em diferentes doses de Cd.

Gong et al. (2001) observaram também resultados diferentes entre espécies na resposta à toxicidade de Cd. Das espécies estudadas, o nabo (*Brassica rapa*) e o agrião (*Lepidium sativum*) foram as mais sensíveis quanto à germinação quando comparadas à aveia (*A. sativa*) e ao feijão (*P. vulgaris*). Apesar da alta sensibilidade das espécies testadas e dos resultados obtidos neste trabalho, testes de germinação realizados com milho, pepino, trigo e sorgo submetidos a diferentes doses de Cd, por An (2004), levaram à conclusão de que este parâmetro possui baixa sensibilidade para avaliações de fitotoxicidade.

Sabe-se que em pH menor que 6,5, como acontece nos dois solos deste estudo, a adsorção do Cd é fortemente influenciada pela CTC do solo (ZACHARA, 1992). Desta forma, os resultados encontrados podem ser justificados pelas diferenças nos atributos destes solos. O Latossolo, por apresentar o pH mais ácido (4,8), menores valores de CTC<sub>ef</sub> (1,08 cmol dm<sup>-3</sup>), argila (24%) e matéria orgânica (1,64%) quando comparado com o Cambissolo (pH = 5,3; CTC<sub>ef</sub> = 2,59 cmol dm<sup>-3</sup>; argila 31%; matéria orgânica 2,87%), possivelmente deve ter adsorvido menor quantidade de Cd e, conseqüentemente,

manteve uma maior proporção deste elemento em solução, ou seja, em uma forma disponível para a embebição das sementes.

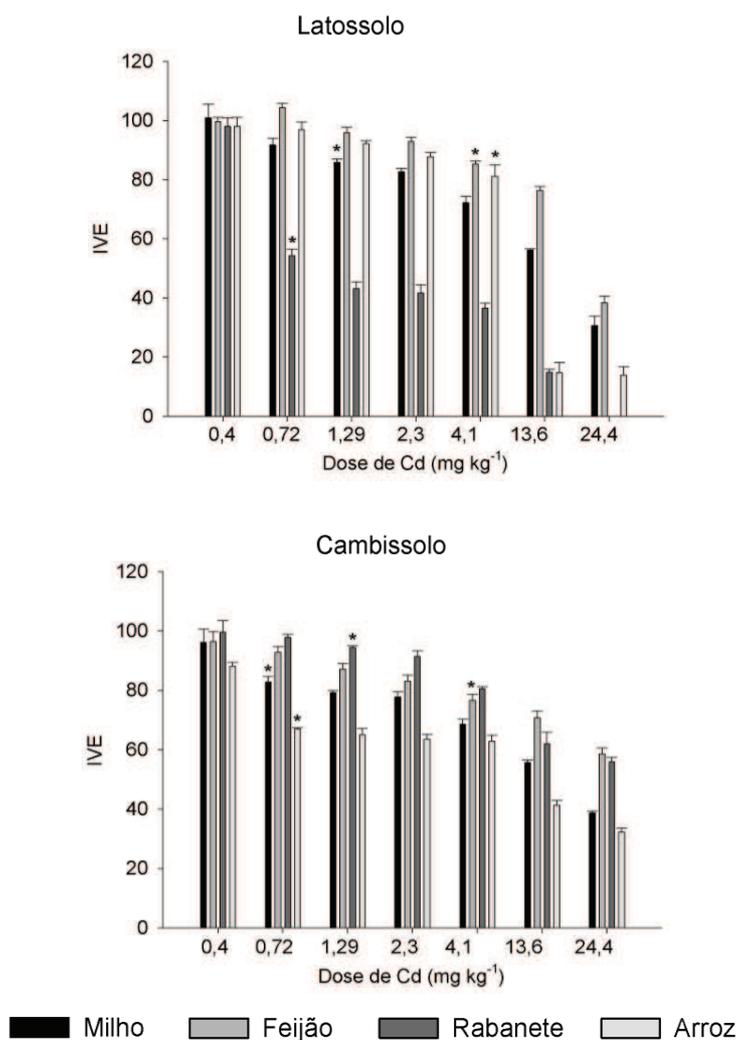


Figura 2 Índice de velocidade de emergência (IVE) apresentados como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

Essa maior disponibilidade de Cd no Latossolo, foi responsável pela diferença das variáveis analisadas, indicando que não somente o teor total deve ser analisado, mas, principalmente o teor fitodisponível, pois é este que efetivamente causará danos às sementes. Esta hipótese é reforçada ao aplicar a fórmula de solubilidade dos metais no solo -  $\text{Log}[\text{Cd}]_s = 3,62 - 0,50\text{pH} + 0,96 \log \text{Cd}_T - 0,45 \log \text{M.O.}$  - proposta por McBride et al. (1997). O valor encontrado para Cambissolo é de  $\sim 2,09 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto para o Latossolo é de  $\sim 2,46 \mu\text{g L}^{-1}$ , mostrando que, neste caso, o Cd estava mais solúvel no Latossolo, ou seja, mais disponível. Estudos realizados por Pierangeli et al. (2003) também mostraram que a adsorção de Cd em solos brasileiros é correlacionada de forma positiva à matéria orgânica e argila.

Houve diferenças para LC50 calculado entre as espécies e solos (Figura 3). O rabanete foi a espécie mais sensível em relação às doses de Cd, seguidas do arroz. O feijão foi a terceira espécie mais sensível em Cambissolo, porém a mais resistente das espécies testadas em Latossolo.

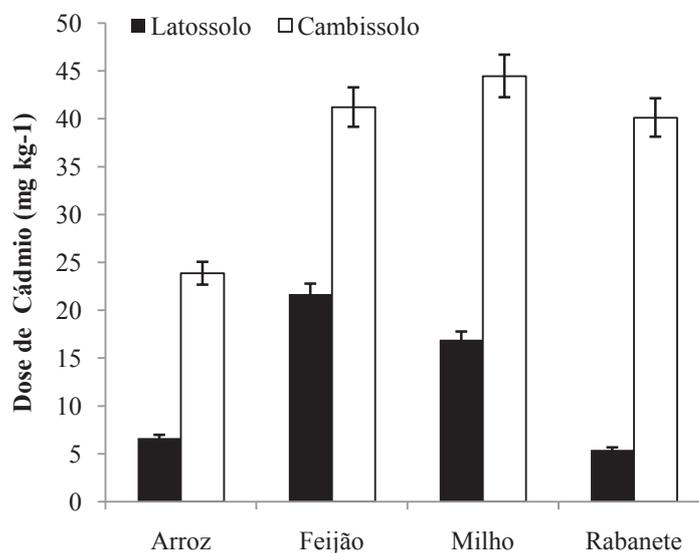


Figura 3 Concentração de Cd no solo letal a 50% (EC50) das sementes de arroz, feijão, milho e rabanete em Latossolo e Cambissolo

Legenda: Determinado pelo método Trimmed Spearman-Kärber, valores representam a média (n = 3) ± erro-padrão.

Como nos resultados apresentados, vários outros estudos também demonstram comportamento diferenciado entre as espécies após exposição a doses de Cd. Segundo Gong et al. (2001), o nabo (*Brassica rapa*) e o agrião (*Nasturtium officinale*) são mais sensíveis que o feijão (*P. vulgaris*) e a aveia (*A. sativa*). Lima et al. (2010) também observaram maior tolerância do nabo (*Brassica rapa*) em relação à aveia-preta (*Avena stringosa*). Além da variabilidade entre as espécies, foram observadas também diferenças entre as variedades de uma mesma cultura, como em arroz (LAI et al., 2009).

De forma geral, a análise de crescimento demonstrou ser um parâmetro sensível ao aumento da dose de Cd no solo. No Latossolo, as plantas de arroz não sobreviveram nas doses com 13,6 e 24,4 mg kg<sup>-1</sup> de Cd. Já no Cambissolo, todas as espécies sobreviveram durante o período experimental. A altura da parte aérea

foi afetada negativamente com o incremento do elemento-traço em todas as espécies no Latossolo (Figura 4). O feijão foi a espécie que apresentou maior redução da altura da parte aérea (89,45%) no último tratamento ( $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) quando comparado com o controle. No Cambissolo, os resultados não foram responsivos às doses de Cd, não havendo diferenças estatísticas entre eles em todas as espécies (Figura 4).

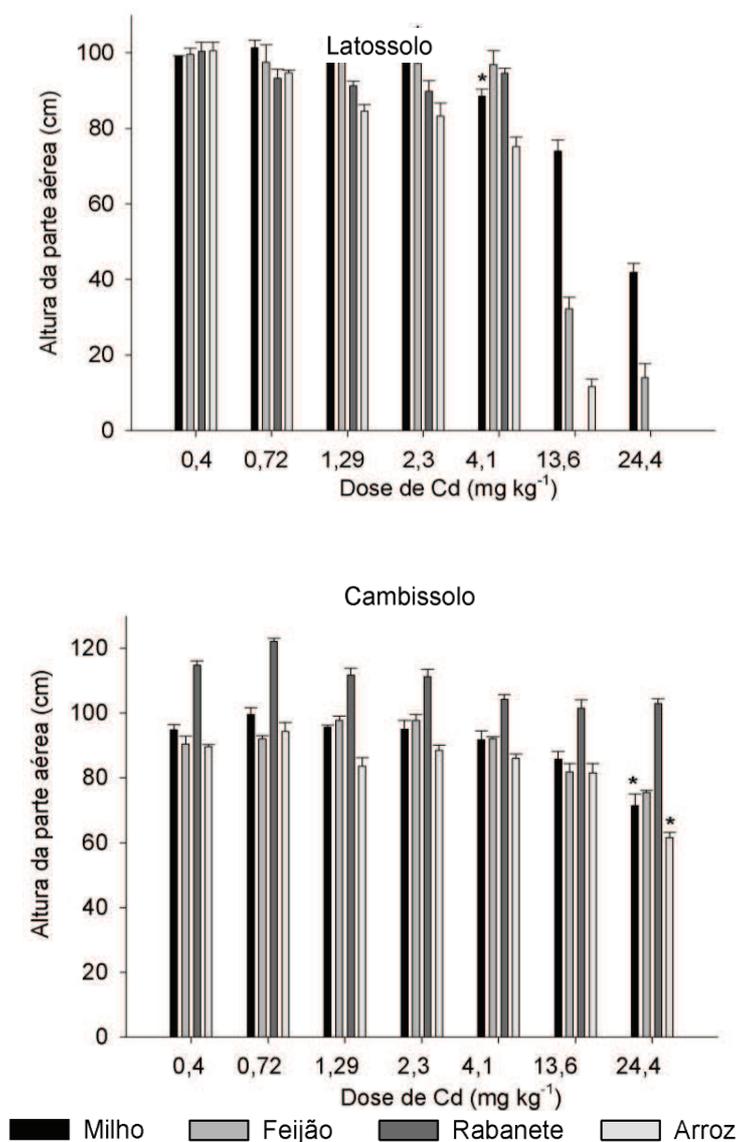


Figura 4 Altura da parte aérea apresentadas como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

Estudos apontam que o Cd pode induzir a liberação de cálcio do retículo endoplasmático ou do vacúolo, aumentando assim a sua concentração no citossol, o que seria uma das justificativas de uma menor abertura estomática (GUIMARÃES et al., 2008). Este decréscimo da abertura estomática reduz a quantidade de CO<sub>2</sub> assimilado durante a fotossíntese, o que explica a redução do crescimento das plantas (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002). Estudos realizados por An (2004), que avaliou a exposição de Cd em diversas espécies de plantas, considerou o crescimento da parte aérea como um parâmetro sensível às respostas deste elemento-traço.

Os mecanismos de defesa histológicos têm sido bastante estudados em plantas com potencial de fitorremediação de ambientes contaminados por elemento-traço, como o acúmulo de Cd em tricomas, cristalização deste elemento com Ca na forma de cristais no interior do vacúolo (MAZEN; EL MAGHRABY, 1997; SALT et al., 1995; VECCHIA et al., 2005; ZENK, 1997). Este mecanismo de defesa pode evitar a toxidez das plantas pelo elemento-traço e possibilitar que a planta complete seu biociclo. Acredita-se que as plantas cultivadas no Cambissolo podem ter usado destes artifícios para evitar grandes danos de fitotoxidez causados pelo Cd.

A contagem do número de folhas nas plantas cultivadas no Latossolo indicou que as doses de Cd afetaram de maneira significativa o feijão e o arroz (Tabela 3). Foi observada redução no número de folhas a partir da dose 13,6 mg kg<sup>-1</sup>. As espécies que tiveram influência das doses de Cd em relação ao diâmetro do coleto no Latossolo foram o rabanete e o arroz, com redução de 0,9 e 1,8 mm, respectivamente, quando comparado ao controle. Pinto (2011) cultivou plantas de espinafre em solução nutritiva com doses de Cd em concentrações de 25 e 50 µmol L<sup>-1</sup> e também observou redução do número de folhas ao final do período de avaliação.

Já para o Cambissolo, o número de folhas e o diâmetro do coleto não apresentaram diferenças expressivas e não houve diferença significativa para todas as espécies (Tabela 3).

Tabela 3 Número de folhas e diâmetro do coleto (DC) de arroz, feijão, milho e rabanete cultivadas em doses crescentes de Cd em Latossolo e Cambissolo

Espécie	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	Latossolo		Cambissolo	
		Nº Folhas	DC(mm)	Nº Folhas	DC(mm)
Milho	0,00	4,6	3,7	4,11	2,92
	0,40	4,4	2,8	4,11	3,02
	0,72	4,7	2,8	4,33	3,03
	1,23	4,4	2,8	4,33	3,02
	2,23	4,7	2,8	4,33	3,16
	4,10	4,4	2,7	4,22	2,74
	13,60	4,9	2,7	4,33	2,48
	24,40	4,6	2,5	4,00	2,64
Feijão	0,00	5,1	2,7	2,22	2,53
	0,40	5,0	2,6	2,00	2,32
	0,72	5,0	2,6	2,67	2,44
	1,23	5,0	2,7	2,33	2,33
	2,23	5,0	2,5	2,33	2,33
	4,10	5,0	2,3	2,33	2,49
	13,60	3,9*	2,2	2,33	2,87
	24,40	1,7	2,2	2,33	2,78
Rabanete	0,00	4,7	1,9a	4,44	1,29
	0,40	5,0	1,5a	4,56	1,50
	0,72	5,0	1,7a	4,33	1,32
	1,23	4,9	1,6a	4,22	1,11
	2,23	4,8	1,5a	4,56	1,29
	4,10	4,8	1,0ab	4,56	1,74
	13,60	-	0,4b	4,56	1,69
	24,40	-	-	4,78	1,78

“Tabela 3, conclusão”

Espécie	Concentração (mg kg <sup>-1</sup> )	Latossolo		Cambissolo	
		Nº Folhas	DC(mm)	Nº Folhas	DC(mm)
Arroz	0,00	3,0	2,1a	3,00	1,24
	0,40	3,0	1,8a	3,00	1,02
	0,72	3,0	1,6a	3,00	1,06
	1,23	3,0	1,2a	2,89	1,07
	2,23	3,0	0,9b	3,00	1,26
	4,10	3,0	0,8b	3,00	1,06
	13,60	1,0*	0,3b	3,00	1,13
	24,40	-	-	2,89	0,92

\* Indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

As espécies que obtiveram influência significativa na área foliar, quando submetidas a doses crescentes de Cd no Latossolo, foram feijão e milho, com perdas percentuais de 95,29% e 75,69%, respectivamente (Figura 5). Já as espécies cultivadas em Cambissolo não apresentaram comportamentos significativos à indução do estresse (Figura 5).

A análise da área foliar é um importante parâmetro para avaliação de plantas sob estresse, pois a redução afeta diretamente a quantidade de fótons que podem ser absorvidos, o que altera de forma negativa o incremento da matéria fresca (WANG et al., 2001). Estudos realizados com o feijoeiro por Rossi, Silva Júnior e Santos (1998) revelaram que a absorção de Cd pelas plantas causa a diminuição da área foliar e redução das raízes.

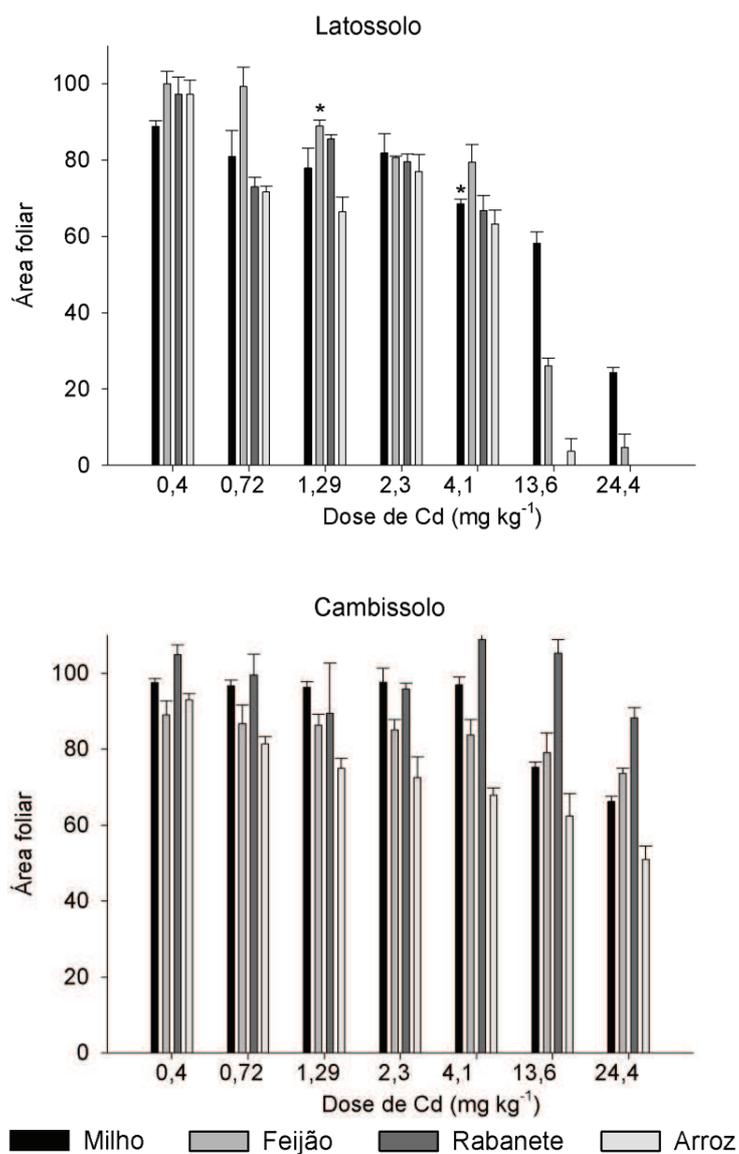


Figura 5 Área foliar apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

Da mesma forma como observado por Wang et al. (2001), os resultados obtidos para matéria fresca das plantas no Latossolo também apresentaram decréscimo. O feijão foi a espécie que apresentou a maior redução da parte aérea (Figura 6) com o aumento das doses, 88,17% no solo com  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , seguido do milho e do rabanete (39,6 e 32,2%). Não foi evidenciada diferença significativa para esta variável no arroz. Em relação à matéria fresca da raiz (Figura 7), as espécies que apresentaram redução com diferenças estatísticas foram o feijão (93,2%) e o milho (64,7 %). A redução da matéria fresca total do feijão e do milho foi de 96,5 e 54,5 %, respectivamente (Figura 8).

No Cambissolo, apesar de ter ocorrido redução na matéria fresca, os resultados não foram tão expressivos. Somente o feijão apresentou diferenças significativas à exposição ao Cd, com redução da parte aérea de 0,33g por planta (Figura 6), 0,37 g de raiz por planta (Figura 7) e uma redução da matéria seca total média de 11,39 % (Figura 8).

Redução semelhante foi observada por Fernández et al. (2005). Estes autores observaram redução de 47% da matéria fresca de trevo vermelho (*Trifolium pratense*) quando submetido a crescimento em solo contaminado com Cd na dose de  $44 \text{ mg kg}^{-1}$ , se comparado ao controle ( $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ ). O mesmo ocorreu com as duas espécies de eucalipto (*Eucalyptus maculada* e *E. urophylla*), em que o aumento das concentrações de Cd na solução nutritiva exerceu efeito negativo acentuado no peso da matéria fresca (SOARES et al., 2005). Em outras espécies, como o feijão (VASQUES; POSCHENRIEDER; BARCELÓ, 1989) e o trigo (JALIL; SELLES; CLARKE, 1994), também foram observados resultados semelhantes.

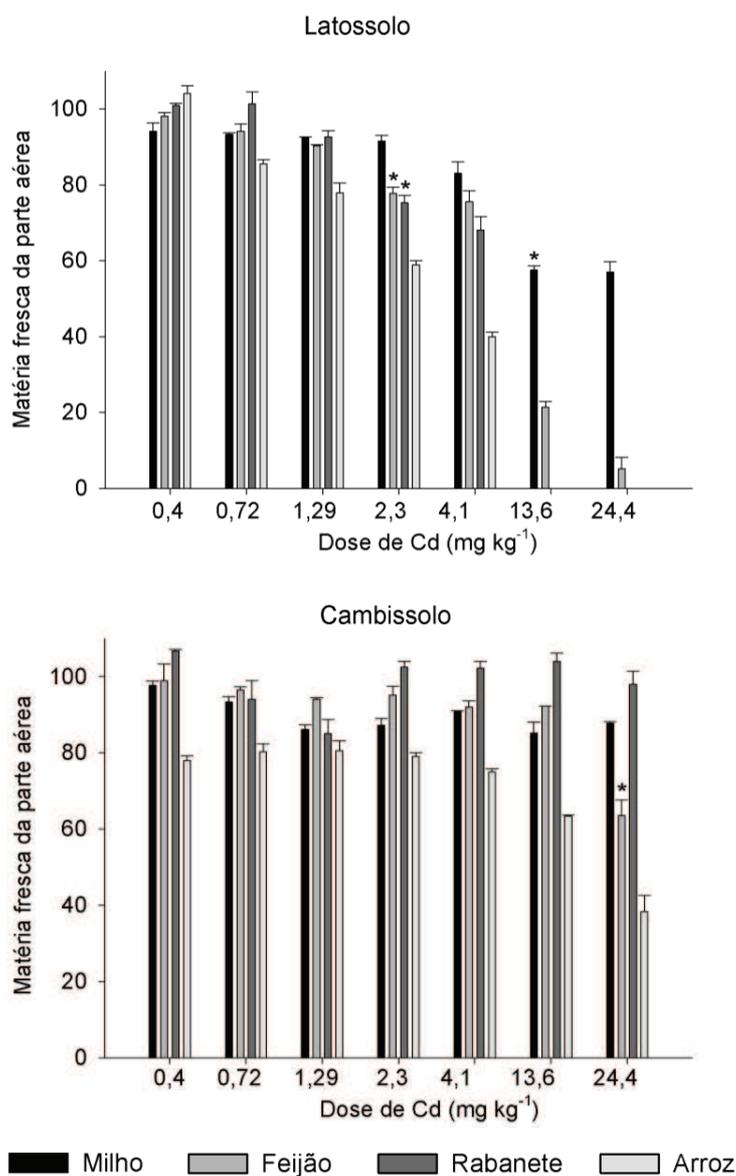


Figura 6 Matéria fresca da parte aérea apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

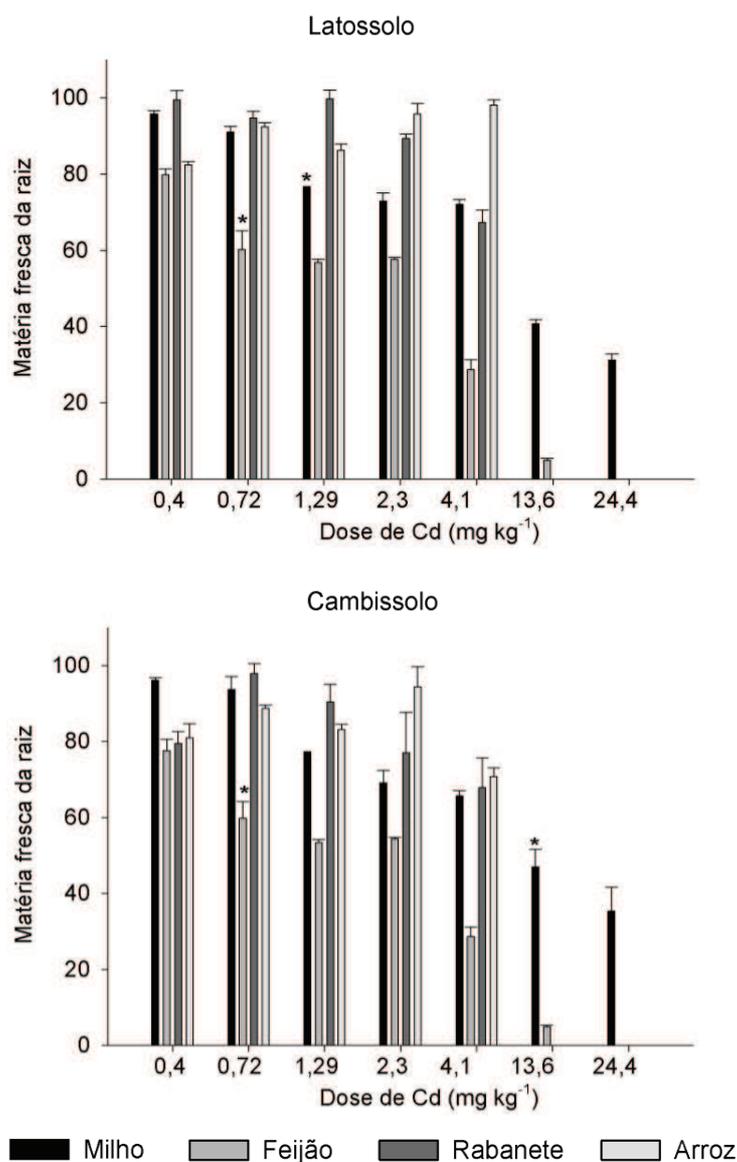


Figura 7 Matéria fresca da raiz apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

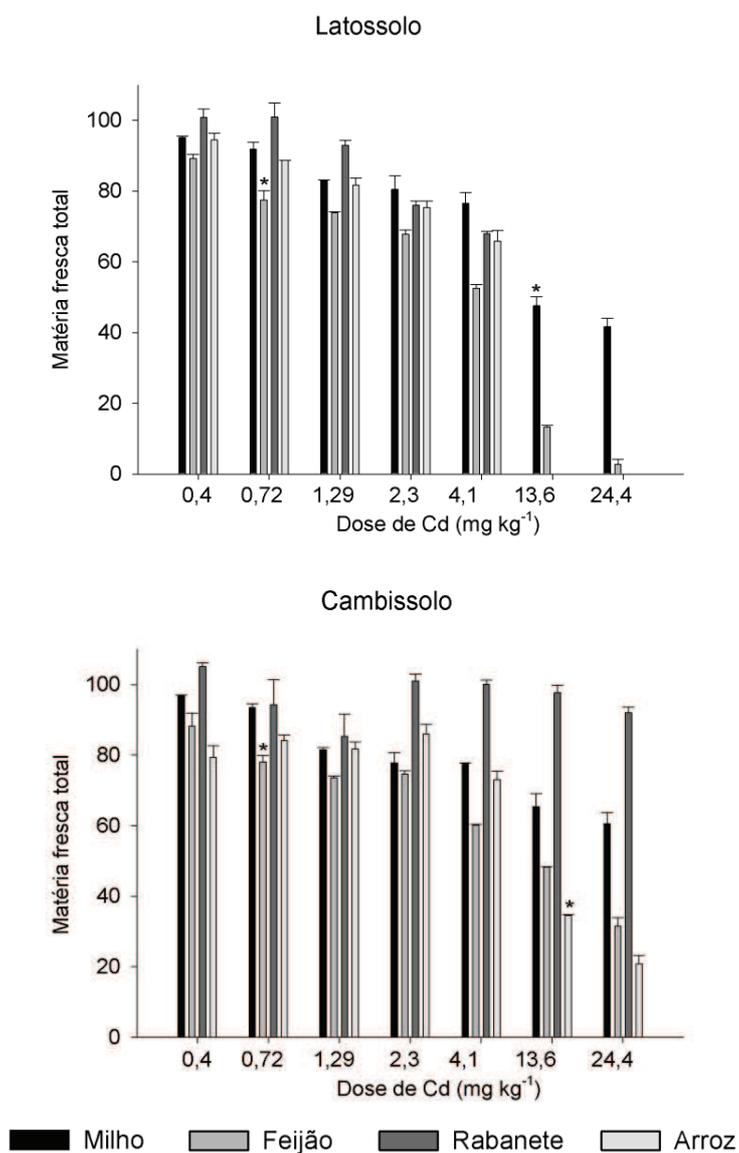


Figura 8 Matéria fresca total apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

Já em relação à matéria seca, para as espécies cultivadas em Latossolo, o feijão foi a mais afetada com as doses de Cd, sofrendo redução de 94,4 % da matéria seca total (Figura 11). Para esta espécie, as alterações foram observadas a partir do primeiro tratamento com Cd ( $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ). No Cambissolo, só foi observada diferença significativa na matéria fresca da parte aérea do milho, com redução de 55,4% no tratamento que continha a maior concentração de Cd quando comparados ao controle (Figura 9). As variáveis, matéria fresca da raiz e total não foram responsivas à exposição ao Cd (Figuras 10 e 11). Muito provavelmente este resultado foi obtido devido à adsorção do Cd no solo e da vacualização (VECCHIA et al., 2005).

A exposição de plantas a níveis de Cd que causam toxidez durante períodos de tempo superior a cinco dias, quase sempre, acarreta forte influência sobre o crescimento das plantas. Um dos danos que o Cd causa às plantas é o decréscimo da fotossíntese. Além disso, a similaridade do Cd com nutrientes essenciais faz com que este elemento-traço tenha afinidade pelos mesmos sítios de absorção e reduza a absorção e o transporte de nutrientes, o que justifica a redução no acúmulo de matéria do vegetal (LARSSON; BORNMAN; ASP, 1998).

Os efeitos do Cd na redução do peso fresco e seco total já foram relatados por vários autores (AN, 2004; DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997). Estes resultados concordam com os dos Zeitouni, Berton e Abreu (2007), que também observaram que o incremento das doses de Cd em solo diminuiu a matéria seca em girassol, mamona e pimenta. Nos resultados encontrados por Melo (2002), que avaliou a matéria seca de milho cultivado em solos tratados durante três anos com lodo de esgoto, também houve redução dessa variável.

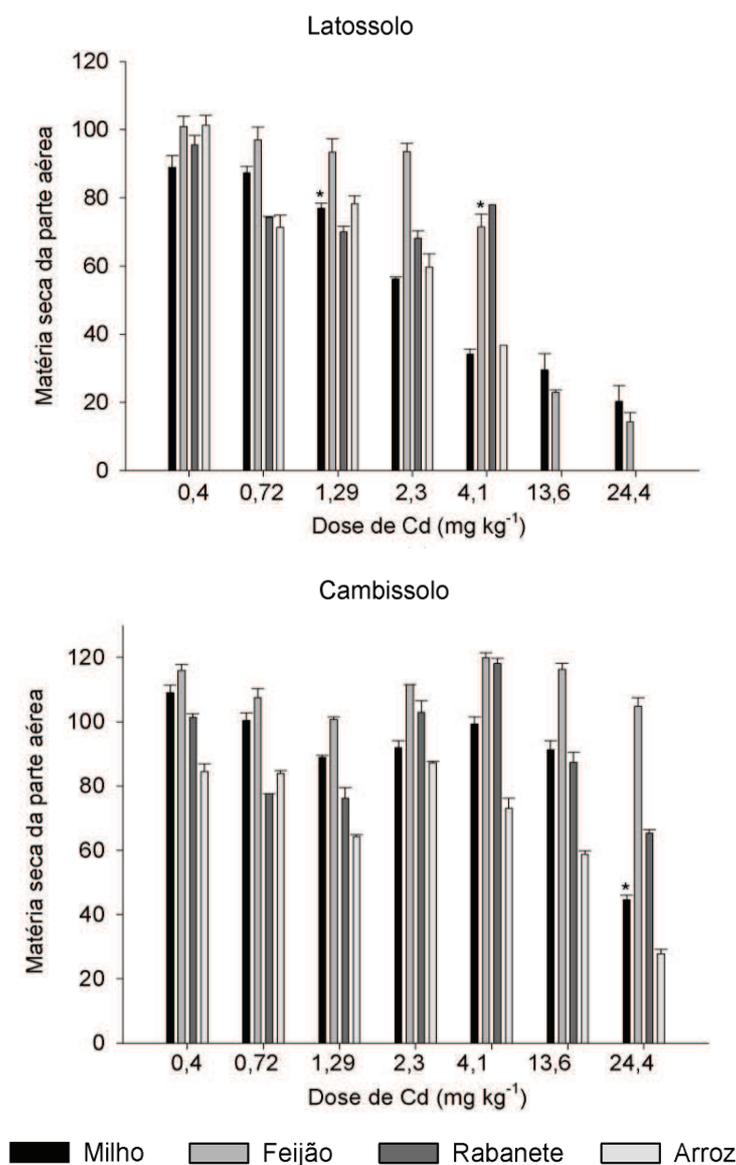


Figura 9 Matéria seca da parte aérea apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

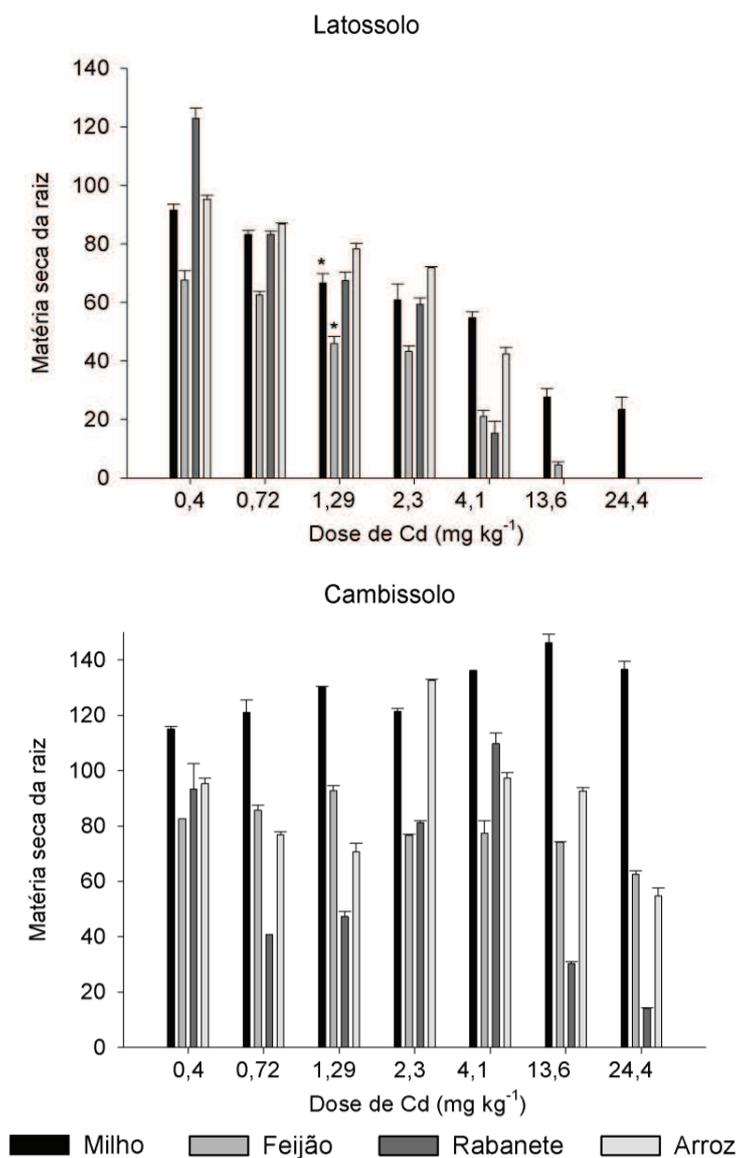


Figura 10 Matéria seca da raiz apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média ( $n=3$ ). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p<0,05$ ).

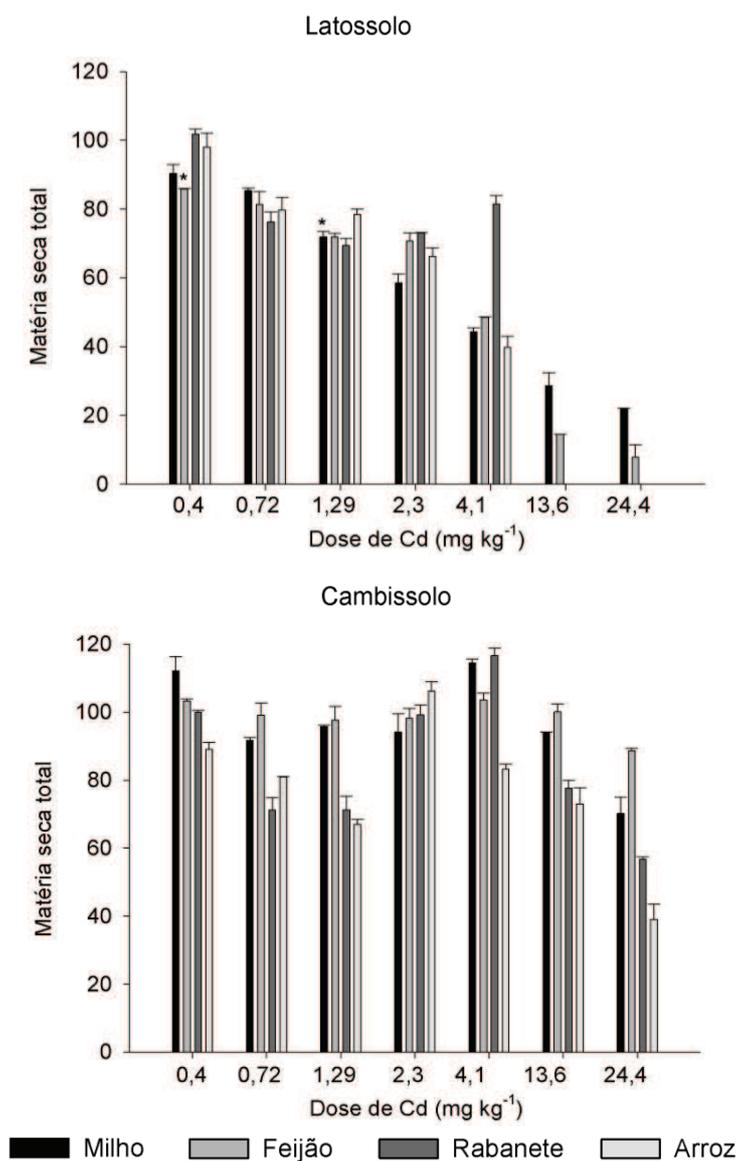


Figura 11 Matéria seca total apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

As espécies utilizadas nesse experimento são consideradas sensíveis e não são fitorremediadoras. Por isso, foi observada redução nos parâmetros de análises de crescimento. Porém, existem espécies com comportamento diferente e adaptações fisiológicas. Carvalho et al. (2013) realizaram experimentos distintos durante 30 dias e objetivaram estudar a tolerância a Zn e Cd, avaliando características fisiológicas em *Gomphrena claussenii* Moq. A espécie foi cultivada em solos com elevados teores naturais de elemento-traço (concentrações até 5318  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Zn e 287  $\mu\text{g g}^{-1}$  de Cd) e em hidroponia (100, 1.000, e 3.000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{ZnSO}_4$  ou 10, 50, e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{CdSO}_4$  com 2  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{ZnSO}_4$ ). Os autores concluíram que a espécie provou ser tolerante a Zn e Cd, pois não houve diminuição significativa na biomassa e nenhum efeito sobre o crescimento das raízes.

Em relação ao metabolismo antioxidante, no Latossolo, a quantificação da atividade das enzimas não foi possível nas últimas doses (13,6 e 24,4  $\text{mg kg}^{-1}$ ) de arroz e rabanete, por não ter havido material suficiente. A resposta da SOD ao estresse por elemento-traço pode ser influenciada por vários fatores, como espécies da planta em questão, seu período vegetativo e tempo de exposição ao metal (SCHÜTZENDÜBEL et al., 2001). A alteração desta atividade ocorreu em maiores proporções nas plantas cultivadas no Latossolo e teve seu maior aumento no feijão (38%) quando o último tratamento (24,4  $\text{mg kg}^{-1}$ ) foi comparado com o controle. No milho, esta enzima teve um pico de atividade entre os tratamentos 0,4 e 0,72  $\text{mg kg}^{-1}$  (Figura 12).

Em Cambissolo, a SOD no feijão também apresentou maior acréscimo na atividade, 10%, em relação às outras espécies. Para o arroz, milho e rabanete foram os incrementos de 9,52%, 9,43% e 1,92%, respectivamente (Figura 12). Como esta é a primeira via de defesa enzimática de metabolismo das plantas, fica evidente que as plantas estão sob influência de estresse.

Como pode ser observada na Figura 13, a atividade da CAT aumentou e teve diferença significativa nas quatro espécies testadas no Latossolo. Quando comparado ao controle, o arroz apresentou o maior aumento na atividade, que foi de ~146%, seguido de ~128%, ~143% e 100% do milho, rabanete e feijão, respectivamente. Já para Cambissolo, somente o milho apresentou aumento e diferença significativa quando exposto às concentrações de Cd e teve aumento da atividade de 67,25% (Figura 13). Mas, mesmo não havendo diferenças significativas, o aumento da atividade da CAT foi mais expressivo nas monocotiledôneas quando comparadas com as eudicotiledôneas.

Apesar de não ter sido observadas diferenças estatísticas na concentração de  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd com o controle, em ambos os solos houve incremento da atividade da enzima, mostrando que mesmo sendo considerado um solo limpo (COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO - CETESB, 2009), o metabolismo da planta já apresenta níveis de alterações metabólicas.

Apesar de terem afinidade pelo mesmo substrato, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e as enzimas CAT e APX atuam em concentrações diferentes, a CAT atua na ordem milimolar enquanto a APX em unidades de micromolar, o que caracteriza funções diferentes na célula (MITTLER, 2002).

Em Latossolo, somente as monocotiledôneas apresentaram resultados significativos à exposição ao Cd (Figura 14). O milho foi a espécie que teve maior acréscimo na atividade da APX. O tratamento com maior dose de Cd ( $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) apresentou acréscimo de  $0,045 \text{ } \mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de MF quando comparado ao controle que foi de  $0,1104 \text{ } \mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$  MF. Em Cambissolo, todas as espécies apresentaram diferença significativa aos tratamentos. Como pode ser observado na Figura 14, as monocotiledôneas foram as espécies que apresentaram maior aumento da atividade da APX no tratamento com  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$  quando comparado com a atividade do controle. O

arroz apresentou aumento de 0,047  $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de MF e para milho foi de 0,038  $\mu\text{mol ascorbato min}^{-1} \text{ mL}^{-1} \text{ g}^{-1}$  de MF.

A presença de elemento-traço pode alterar a atividade das enzimas antioxidantes, estimulando-as ou inibindo-as (SANITÀ Di TOPPI; GABBRIELLI, 1999). Esta inibição foi observada em Latossolo para o arroz e rabanete e nas dicotiledôneas no Cambissolo. Em ambos os solos, houve um pico da atividade APX nos primeiros tratamentos com Cd e depois uma redução, esta inibição pode ocorrer devido à degradação das enzimas pelo excesso da presença do elemento-traço.

As enzimas do sistema antioxidante são as principais indicadoras do estresse vegetal, como o gerado pelo Cd. Elas são responsáveis pela remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs) que normalmente são geradas no citossol, cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomas (MITTLER, 2002). A ação das EROs podem ser danosas às plantas ou agirem como sinalizadoras para desencadear mecanismos de proteção. Este mecanismo depende do minucioso equilíbrio entre a produção das EROs e sua remoção, que se dá através da ação do sistema de defesa antioxidante. A toxicidade do oxigênio singleto, uma das espécies reativas de oxigênio, pode resultar em dano tecidual e até a apoptose celular (EDREVA, 2005).

Como foi observado, todas as enzimas avaliadas tiveram maior acréscimo de suas atividades em Latossolo quando comparados ao Cambissolo (Figuras 12, 13 e 14). Isto pode indicar que o primeiro solo impõe um estresse oxidativo maior, pois no Cambissolo pode ter ocorrido maior adsorção do Cd, devido ao maior teor de argila e matéria orgânica, além de um possível acúmulo de cristais de Cd no interior do vacúolo (MAZEN; EL MAGHRABY, 1997; VECCHIA et al., 2005).

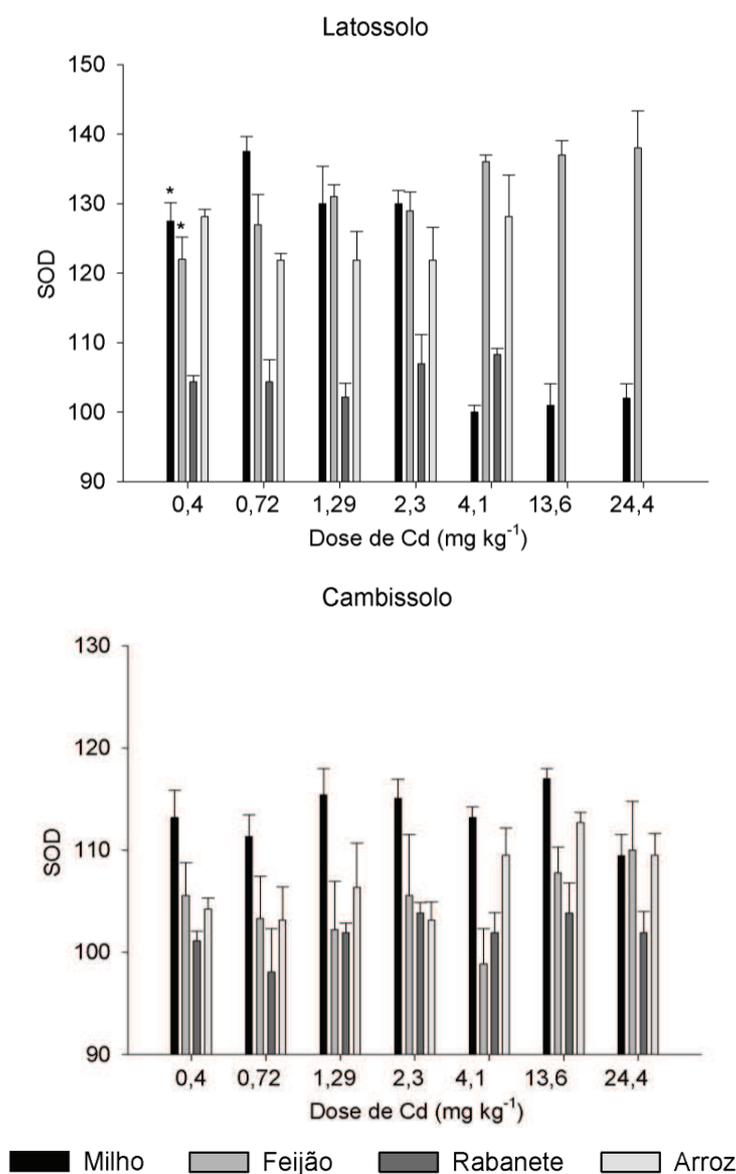


Figura 12 Desmutase do superóxido (SOD) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

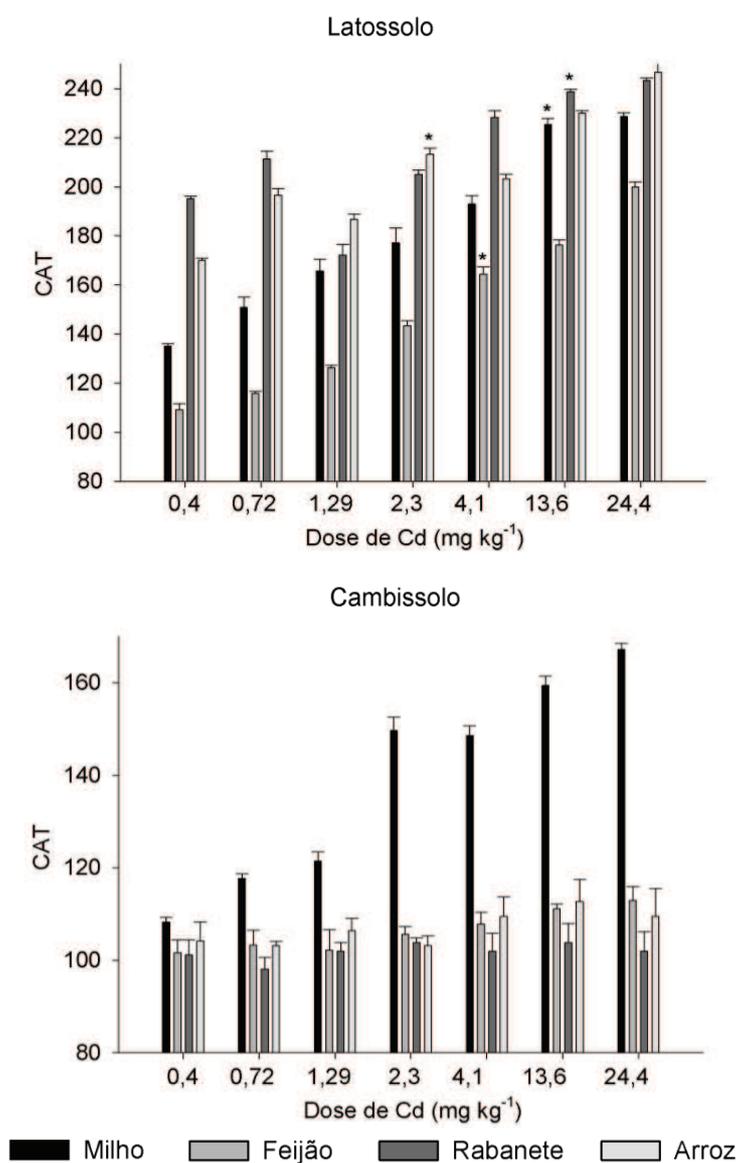


Figura 13 Catalase (CAT) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

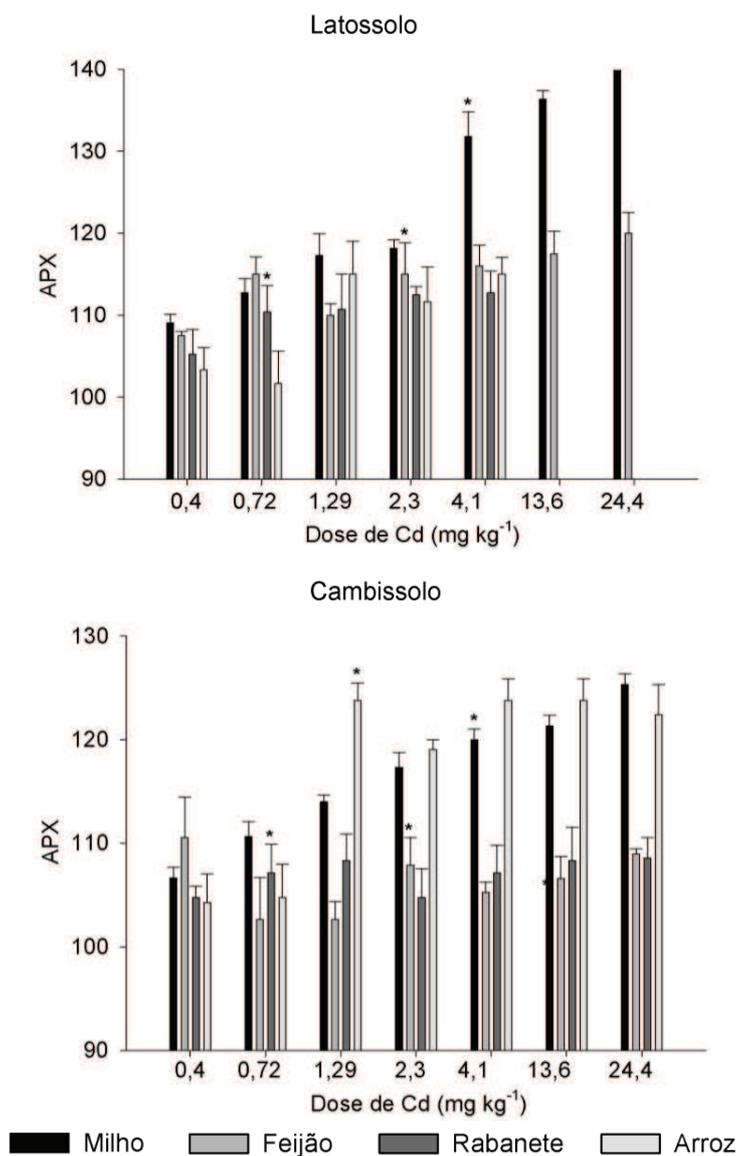


Figura 14 Peroxidase do ascorbato (APX) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

O efeito do Cd no aumento da atividade do CAT foi reportado em várias espécies vegetais, como soja (MELO et al., 2011), feijão (BHARDWAJ; CHATUVERDI; PRASADI, 2009; MESSIAS, 2008), ervilha (DALURZO et al., 1997) e milho (CUI; WANG, 2006; ZHAO, 2011). Resultados contrapostos também são encontrados, como os observados por Ferreira et al. (2002), que não verificaram mudanças na atividade desta enzima em soja, indicando a possibilidade de resultados contraditórios para esta espécie.

Nos dois solos estudados, todas as espécies cultivadas apresentaram acúmulo de Cd na parte aérea e as espécies mais responsivas para ambos os solos testados foram o rabanete e o milho. Em Latossolo (Figura 15), o rabanete teve um acúmulo de  $81,93 \text{ mg kg}^{-1}$  no solo na dose  $4,1 \text{ mg kg}^{-1}$  e não foi possível analisar nos solos com maiores doses, pois não havia disponibilidade suficiente de matéria seca. O milho apresentou teor de  $63,91 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Assim como no Latossolo, todas as espécies cultivadas em Cambissolo também apresentaram acúmulo de Cd na parte aérea (Figura 15). A espécie que obteve resultados mais expressivos, foi o rabanete, com  $124,08 \text{ mg kg}^{-1}$  no tratamento com maior dose do elemento-traço, quando comparados com o controle, que foi de  $0,257 \text{ mg kg}^{-1}$ . Considerando os dados para o teor total de Cd encontrado na maior dose de rabanete, o valor foi onze vezes maior do que o encontrado em feijão, que obteve o menor teor na mesma dose.

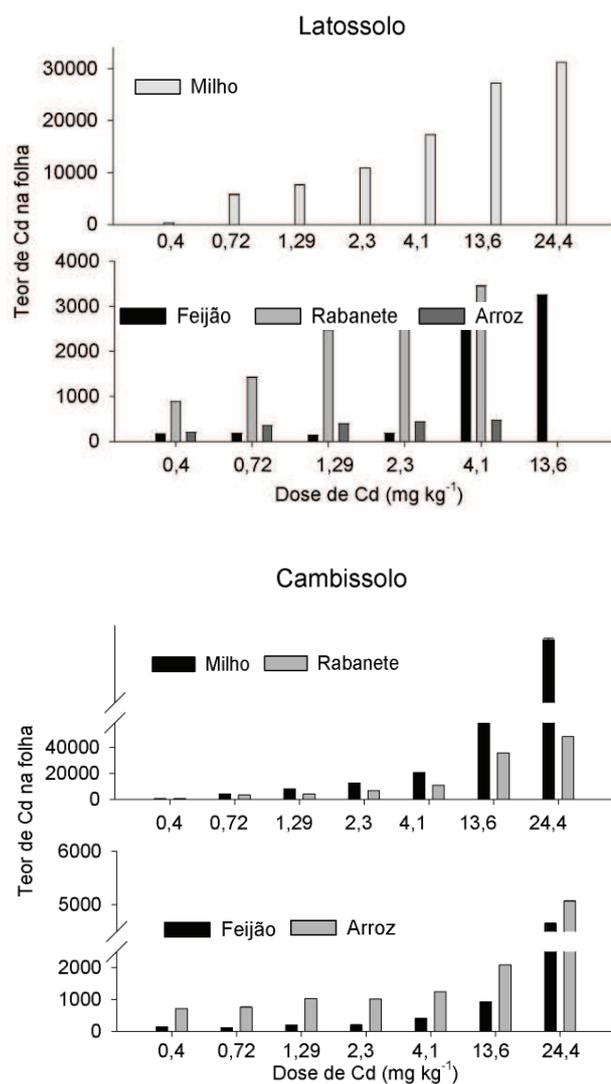


Figura 15 Teor de Cd nas folhas apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

O Cd é altamente solúvel no solo, e a forma  $Cd^{2+}$  pode facilmente ser absorvida pelas plantas (WANG et al., 2011). A literatura indica que maiores teores de Cd são acumulados na raiz, porém, este elemento é conhecido por ser facilmente translocado para a parte aérea (ALLOWAY, 1995). As concentrações utilizadas neste estudo foram suficientes para o translocação e acúmulo na parte aérea.

O Cd, quando absorvido pelas raízes, pode se ligar às cargas negativas das paredes celulares e ser translocado de forma rápida para a parte aérea dos vegetais (GRANT et al., 1998). Parte do Cd que é absorvido pelas plantas pode ser complexada na forma de fitoquelatinas e translocadas para a parte aérea através do xilema e se compartimentalizando no vacúolo. Porém as fitoquelatinas não representam a única forma de transporte para a parte aérea (SALT et al., 1995; SANITÀ Di TOPPI; GABBRIELLI, 1999).

Em vários trabalhos, também foram observados acúmulos de Cd em espécies cultivadas em concentrações crescentes de Cd como no milho (AN, 2004; WANG et al., 2007) feijão (BHARDWAJ; CHATUVERDI; PRASADI, 2009; VASQUES; POSCHENRIEDER; BARCELÓ, 1989), rabanete (CANNATA, 2011) e arroz (LIU et al., 2007). O rabanete, por exemplo, que no presente estudo foi a espécie que apresentou os maiores teores, foi também estudado por Cannata (2011), que encontrou elevados teores de Cd em rabanete cultivado em solução nutritiva acrescida das seguintes doses desse elemento: 0; 0,025; 0,1; 0,5; 1  $mg L^{-1}$  de Cd. Nesse estudo, observou-se que quanto maior as concentrações do elemento-traço, maiores foram os teores nas raízes, tubérculos e folhas, sendo mais expressivos na raiz.

Para Kabata-Pendias e Pendias (2000), valores de Cd superiores à faixa de 5 a 30  $mg kg^{-1}$  podem ser considerados potencialmente tóxicos para as plantas. Observou-se que para todas as espécies do presente estudo, em ambos os solos (Figura 15), os valores encontrados foram superiores, o que justifica os

danos por estresse de Cd supracitados. Mesmo não sendo consideradas espécies com potencial de fitorremediação, um melhor entendimento nesta área é necessário, pois as plantas são as principais vias de entrada de elementos-traço na cadeia alimentar humana (VECCHIA et al., 2005).

Como previsto e observado na Tabela 4, as espécies se comportaram de forma diferente, havendo divergência nos valores de NOEC e LOEC entre os solos e os parâmetros observados (%G, IVE, altura da parte aérea, número de folhas, matéria fresca total, matéria seca total, SOD, CAT e APX). Embora o sistema radicular seja reportado na literatura como o mais afetado pelo elemento-traço, as análises da parte aérea apresentaram resultados expressivos para parâmetros ecotoxicológicos.

Em Latossolo, as eudicotiledôneas foram mais sensíveis à germinação quando comparadas às monocotiledôneas e apresentaram valores de LOEC menores ( $0,72 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Devido ao comportamento do Cd no Cambissolo, não foi observado efeito do elemento-traço quanto à germinação. O IVE foi um parâmetro importante para obtenção de índices de ecotoxicidade, pois foi responsivo para todas as espécies nos dois solos. Em Latossolo, o rabanete foi a espécie mais sensível e apresentou diferença no tratamento com  $0,72 \text{ mg kg}^{-1}$  e, em Cambissolo, as monocotiledôneas tiveram comportamento semelhante e a última dose a não apresentar diferença significativa foi  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Em relação à análise de crescimento, os valores de NOEC e LOEC também foram superiores no Latossolo quando comparados ao Cambissolo. O rabanete foi a espécie mais sensível no Latossolo em relação à altura da parte aérea, apresentando redução a partir da dose  $0,72 \text{ mg kg}^{-1}$ . Já, no Cambissolo e somente nas últimas doses, as únicas espécies que apresentaram sintomas foram o arroz e o milho. A única espécie que não obteve redução do número de folhas no Latossolo foi o milho, as demais apresentaram diferenças significativas a

partir da dose  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$ . Em Cambissolo, todos os resultados foram não significativos para o número de folhas.

Milho e feijão foram as espécies utilizadas para calcular o LOEC no Latossolo ( $4,1$  e  $2,3 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd) para área foliar. O feijão foi a espécie mais sensível às doses de Cd para o parâmetro de matéria fresca total com LOEC de  $0,72 \text{ mg kg}^{-1}$ , seguido do milho que apresentou diferença significativa a partir da dose  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$ . Para Cambissolo, a única espécie que apresentou diferenças significativas também foi o feijão e nas mesmas doses. Também o feijão foi a única espécie que apresentou diferenças significativas quanto à matéria seca total no Latossolo, apresentando valor de LOEC de  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ . No Cambissolo, nenhuma espécie teve observações significativas.

Tabela 4 Índices LOEC (mg kg<sup>-1</sup>) e NOEC (mg kg<sup>-1</sup>) de arroz, feijão, milho e rabanete, cultivadas em Latossolo e Cambissolo

Solo	Espécie	Índice	G(%)	IVE	Alt Parte Aérea	Nº de folhas	Área Foliar	MFT	MST	SOD	CAT	APX	
Latossolo	Arroz	NOEC	1,29	13,6	0,72	4,1	*	24,4	24,4	24,4	1,29	4,1	
		LOEC	2,3	4,1	1,29	13,6	*	*	*	*	2,3	13,6	
	Feijão	NOEC	0,4	2,3	4,1	4,1	0,72	0,4	0	0	2,3	1,29	
		LOEC	0,72	4,1	13,6	13,6	1,29	0,72	0,4	0,4	4,1	2,3	
	Milho	NOEC	2,3	0,72	2,3	24,4	2,3	4,1	0,72	0	4,1	2,3	
		LOEC	4,1	1,29	4,1	*	4,1	13,6	1,29	0,4	13,6	4,1	
	Rabanete	NOEC	0,4	0,4	0,4	4,1	*	4,1	24,4	24,4	4,1	0,4	
		LOEC	0,72	0,72	0,72	*	*	13,6	*	*	13,6	0,72	
	Cambissolo	Arroz	NOEC	24,4	0,4	13,6	24,4	*	24,4	24,4	24,4	24,4	0,72
			LOEC	*	0,72	24,4	*	*	*	*	*	*	1,29
Feijão		NOEC	24,4	2,3	24,4	24,4	*	0,4	24,4	24,4	24,4	1,29	
		LOEC	*	4,1	*	*	*	0,72	*	*	*	2,3	
Milho		NOEC	24,4	0,4	13,6	24,4	*	24,4	24,4	24,4	24,4	2,3	
		LOEC	*	0,72	24,4	*	*	*	*	*	*	4,1	
Rabanete		NOEC	24,4	0,72	24,4	24,4	*	24,4	24,4	24,4	24,4	0,4	
		LOEC	*	1,29	*	*	*	*	*	*	*	0,72	

NOEC- concentração efetiva que não houve efeitos observáveis, LOEC- concentração efetiva mínima que teve efeitos observáveis. \* Não houve diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade

Em ambos os solos, a APX foi a enzima do sistema antioxidante mais responsiva à exposição de concentrações de Cd. Todas as espécies apresentaram valor de LOEC e o rabanete foi a espécie mais sensível, apresentando o teor de  $0,72 \text{ mg kg}^{-1}$  para ambos os solos. As quatro espécies não apresentaram resultados significativos. Portanto não foi possível calcular o LOEC para o Cambissolo.

As espécies que mais apresentaram sintomas de toxidez visuais foram o milho e o feijão em ambos os solos. Os sintomas mais comumente observados durante a condução do experimento foram a clorose foliar nas folhas mais jovens (Figuras 10D e 10F), encarquilhamento (Figura 10E), um possível acúmulo de antocianinas devido à coloração escura no caule (Figuras 10A, 10B e 10C) e danos no desenvolvimento das raízes jovens, nos dois últimos tratamentos ( $13,6$  e  $24,4 \text{ kg mg}^{-1}$ ) em ambos os solos, porém com maior intensidade no Latossolo.

A clorose pode ser justificada devido à competição interespecífica que o Cd tem com o sítio de absorção do Fe (DONG et al., 2006). Outra justificativa é a maneira como o Cd afeta a clorofila, pois pode causar decréscimo na replicação dos cloroplastos, alterar as enzimas que sintetizam a clorofila e competir pelo mesmo sítio que o Mg, podendo alterar, desta forma, a estabilidade das clorofilas (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 1992; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000; KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004).

O Cd pode reduzir a absorção e transporte de nitrato, por inibição da atividade da redutase do nitrato, a fixação de nitrogênio e assimilação de amônia. Além destes sintomas, o teor elevado de Cd em tecidos vegetais pode causar retardo no crescimento, danos às raízes, coloração avermelhada em margens e nervuras foliares (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005).

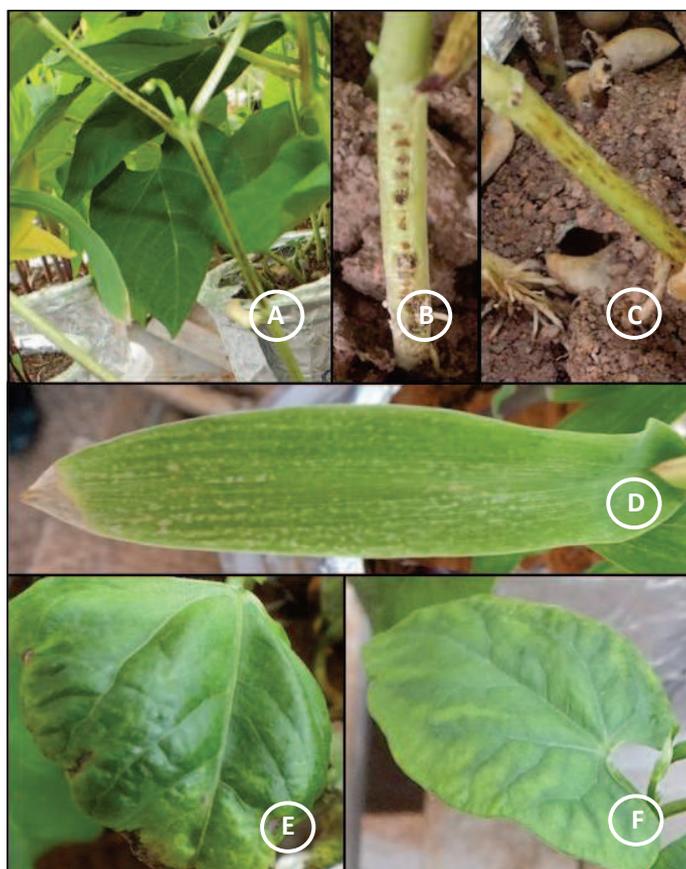


Figura 16 Efeito tóxico das doses crescentes de Cd em Latossolo e Cambissolo após 21 dias de experimento as letras A, B, C, E e F são de *Phaseolus vulgaris* e D de *Zea mays*

Resultados similares foram encontrados por Soares et al. (2005), que realizaram observações visuais em *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* cultivadas com 0, 45, 90, 135 e 180  $\mu\text{M}$  de Cd ( $\text{CdSO}_4$ ) durante cinco semanas, reportando clorose e redução do número de folhas, além de pontuações avermelhadas que não foram encontradas nas espécies desse experimento. Oliveira et al. (2001) também observaram nas plantas de aguapé, redução das

raízes e escurecimento do pecíolo. As plantas submetidas a concentrações elevadas de Cd sofreram danos nas raízes, inibindo o crescimento e tornando as raízes escuras (BRECKLE, 1991).

#### 4 CONCLUSÕES

Diante do exposto, os dados obtidos evidenciaram comportamento específico para cada solo. O Latossolo disponibilizou em maior quantidade o Cd aplicado às plantas, resultando em maior fitotoxicidade. Já o Cambissolo, devido a seus atributos, principalmente aos maiores teores de argila e matéria orgânica em relação ao Latossolo, adsorveu o Cd em maiores proporções, o que proporcionou o melhor desenvolvimento das plantas cultivadas.

Cada espécie se comportou de uma forma específica e, de modo geral, as concentrações crescentes de Cd alteraram o metabolismo bioquímico, germinação e o desenvolvimento do vegetal até atingir níveis que resultaram em sintomas visuais de toxicidade. Os resultados foram mais evidentes no Latossolo, quando comparado ao Cambissolo.

Para os índices de ecotoxicidade, as espécies apresentaram sensibilidades variadas e diferiram quanto aos valores de NOEC e LOEC, o que evidencia que para estes estudos o maior número de espécies aumenta a confiabilidade e sensibilidade dos resultados.

## REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY.  
**Toxicological profile for cadmium**. Atlanta: U.S. Public Health Service, 2011.  
487 p.
- ALLOWAY, B.J. Soil processes and the behavior of heavy metals. In: \_\_\_\_\_.  
**Heavy metals in soils**. New York: Blackie Academic and Professional, 1995. p.  
38-57.
- AN, Y. J. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants.  
**Environmental Pollution**, Barking, v.127, p. 21-26, Jan.2004.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Respuestas de las plantas a la  
contaminación por metales pesados. **Suelo y Planta**, Madrid, v.2, n.2, p.345-  
361, abr.1992.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity  
in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 17,  
n. 1, p. 21-34, Feb.2005.
- BHARDWAJ, P.; CHATUVERDI, A.K.; PRASADI, P. Effect of enhanced lead  
and cadmium in soil on physiological and biochemical attributes of *Phaseolus  
vulgaris* L. **Nature and Science**, New York, v. 7, n. 8, p. 63-75, June2009.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia  
or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of  
wheat seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 116, p. 651-658, Feb.1998.
- BIONDI, C. M. et al. Teores de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co em solos de referência  
de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 35, p.  
1057-1066, maio/jun.2011.
- BRECKLE, S.W. Growth under stress: heavy metals. In: WAISEL, Y.; ESHEL,  
A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **The plant roots, the hidden half**. New York: M.  
Dekker, 1991. p.351-373.
- CANNATA, M. G. **Efeitos de cádmio e chumbo no desenvolvimento de  
rúcula (*Eruca sativa* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e feijoeiro  
(*Phaseolus vulgaris* L.) em solução nutritiva**. 2011. 212 p. Dissertação  
(Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

CARVALHO, M. T. V. et al. *Gomphrena claussenii*, the first South-American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Plant Science**, Limerick, v. 4, p. 180-190, June 2013.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3.ed. Campinas: Fundação Cargill, 1988. 424 p.

CHUGH, L. K.; SAWHNEY, S. K. Effect of cadmium on germination, amylases and rate of respiration of germinating pea seeds. **Environmental Pollution**, Barking, v. 92, p. 1-5, June 1996.

COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO. **Dispõe sobre a aprovação dos valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo, 2005, em substituição aos valores orientadores de 2001**. São Paulo, 2009. 5 p.

COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2001. 1 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

CUI, Y.; WANG, Q. Physiological responses of maize to elemental sulphur and cadmium stress. **Plant, Soil and Environment**, Beijing, v. 52, n. 11, p. 523-529, 2006.

DALURZO, H.C. et al. Cadmium infiltration of detached pea leaves: effect on its activated oxygen metabolism. **Phyton**, Hom, v. 37, n. 3, p. 59-64, Jan.1997.

DAM, R. A. van; HARFORD, A. J.; WARNE, M. S. J. Time to get off the fence: the need for definitive international guidance on statistical analysis of ecotoxicity data. **Integrated Environmental Assessment and Management**, Pensacola, v. 8, n. 2, p. 242-245, Apr. 2012.

- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 98, n. 1, p. 29-36, Jan.1997.
- DONG, X. et al. Irs1 and Irs2 signaling is essential for hepatic glucose homeostasis and systemic growth. **Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 116, p. 101-114, Jan.2006.
- EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystem and Environmental**, New Haven, v. 106, p. 119-133, Apr. 2005.
- ERNST, W. H. O. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 11, p. 163-167, Jan./Mar.1996.
- FADIGAS, F. de S. et al. Proposição de valores de referência para a concentração natural de metais pesados em solos brasileiros. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campinas Grande, v. 10, n. 3, p. 699-705, jul./set. 2006.
- FARGAŠOVÁ, A. Plants as models for chromium and nickel risk assessment. **Ecotoxicology**, London, v. 21, n. 5, p. 1476-1483, May 2012.
- FERNÁNDEZ, M. D. et al. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 62, p. 174-184, Oct. 2005.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999.228 p.
- FERREIRA, R. R. et al. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 25, p. 327-342, July2002.
- Fundação Estadual do Meio Ambiente. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2011. 4 p.
- GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rochville, v. 59, n. 2, p. 309-314, Aug.1977.

GONG, P. et al. Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. **Chemosphere**, Oxford, v. 44, p. 491-500, July 2001.

GRANT, C.A. et al. Cadmium accumulation in crops. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 78, p. 1-17, Mar.1998.

GUIMARÃES, M.A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica -Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v.3, n.1, p.58-60, maio 2008.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 2013. 28 p.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 11, n. 7, p. 714-719, July 1977.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

JALIL, A.; SELLES, F.; CLARKE, J.M. Effect of cadmium on growth and the uptake of cadmium and other elements by durum wheat. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.17, n.11, p.1839-1858, Oct. 1994.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3<sup>rd</sup>ed. London: CRC, 2000. 167 p.

KURDZIEL, B. M.; PRASAD, M. N. V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2<sup>nd</sup> ed. New Delhi: Springer, 2004. p. 146-181.

LAI, H.Y. et al. Phytoremediation and the uptake characteristics of different rice varieties growing in Cd- or As-contaminated soils in Taiwan. **Food & Fertilizer Technology Center**, Taipei, v. 6, p.1-13, Sept. 2009.

LARSSON, E.L.; BORNMAN, J.F.; ASP, H. Influence of UV-B radiation and Cd<sup>2+</sup> on chlorophyll fluorescence, growth and nutrient content in Brassica napus. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 1031-1039, Jan.1998.

LIMA, C.V.S. et al. Potencial de fitoextração do nabo forrageiro e da aveia preta em argissolo contaminado por cádmio. **Revista de Estudos Ambientais**, Blumenau, v.12, n. 1, p. 39-49, jan./jun.2010.

LIU, J. et al. Uptake and translocation of Cd in different rice cultivars and the relation with Cd accumulation in rice grain. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 143, n. 1/2, p. 443-447, Sept. 2007.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.1, p.176-177, Mar.1962.

MAZEN, A.M.A.; EL MAGHRABY, O.M.O. Accumulation of cadmium, lead and strontium, and a role of calcium oxalate in water hyacinth tolerance. **Biologia Plantarum**, Praga, v. 40, p. 411-117, Aug. 1997.

MCBRIDE, M. B. et al. Mobility and solubility of toxic metals and nutrients in soil fifteen years after sludge application. **Soil Science**, Madison, v. 162, n. 7, p. 487-500, July 1997.

MELO, L. C. A. et al. Cadmium- and barium-toxicity effects on growth and antioxidant capacity of soybean (*Glycine max* L.) plants, grown in two soil types with different physicochemical properties. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tokyo, v.174, p. 1-13, Aug. 2011.

MELO, V.P. **Propriedades químicas e disponibilidade de metais pesados para a cultura de milho em dois Latossolos que receberam adição de lodo de esgoto**. 2002. 134 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2002.

MESSIAS, U. **Atividade de superóxido dismutase, catalase, peroxidases e acúmulo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> associados a infecção de Carlavirus em soja e um Potyvirus no feijoeiro**.2008. 81 f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants, and stress tolerance. **Trends Plant Science**, Limerick, v. 7, p. 405-410, Sept. 2002.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n.5, p. 867-880, June 1981.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n° 208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

OLIVEIRA, J.A. et al. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 13, p. 329-341, dez. 2001.

PERFUS-BARBEOCH, L. et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Planta**, Berlin, v. 32, p. 539-548, Nov. 2002.

PIERANGELI, M.A.P. et al. Efeito da força iônica da solução de equilíbrio na adsorção de cádmio em Latossolos brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 737-745, jun. 2003.

PINTO, F. L. **Avaliação da resposta ao stresse oxidativo induzido por cádmio em plantas de espinafre**. 2011. 77 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359p.

ROMERO, I. et al. Evaluation of trace element contamination changes in soils using a new normalization factor application to the Guadiamar soils (SW Spain) affected by a mine spill in 1998. **Journal of Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 124, p. 29-39, Jan. 2013.

ROSSI, C.V.; SILVA JÚNIOR, M.C.; SANTOS, C.E.N. Fitossociologia do estrato arbóreo do cerrado sensu stricto no Parque ecológico Norte. **Boletim do Herbário Ezechias Paulo Heringer**, Brasília, n. 2, p.49-56, out. 1998.

SALT, B. M. et al. Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. **Biotechnology**, New York, v. 13, p. 468-474, May 1995.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GRABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 41, p. 105-130, May 1999.

SCHÜTZENDÜBEL, A. et al. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 27, p. 887-898, Nov. 2001.

SHAW, B. P.; SAHU, S. K.; MISHRA, R. K. Heavy metal induced oxidative damage in terrestrial plants. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2<sup>nd</sup> ed. New Delhi: Springer, 2004. p. 84-126.

SINGH, S.; EAPEN, S.; SOUZA, S. F. d'. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, p. 233-246, July 2006.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D. G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, Bronx, v. 45, p. 379-396, July/Sept. 1991.

SOARES, C.R.F.S. et al. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. urophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 175-183, mar./abr. 2005.

STERCKEMAN, T.; REDJALA, T.; MOREL, J. L. Influence of exposure solution composition and of plant cadmium content on root cadmium short-term uptake. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 74, p. 131-139, Dec. 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **The Report on the Environment (ROE) presents the best available indicators of information on national conditions and trends in air, water, land, human health, and ecological systems**. Washington, 2008. 12 p.

VALLEE, B. L.; ULMER, D. D. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. **Annual Reviews**, Oxford, v. 41, p. 91-128, 1972.

- VÁSQUEZ, M.D.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Pulvinus structure and leaf abscission in cadmium-treated bean plants (*Phaseolus vulgaris*). **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.67, n.9, p. 2756-2764, Sept. 1989.
- VECCHIA, F.D. et al. Morphogenetic ultrastructural and physiological damages suffered by submerged leaves of *Elodea canadensis* exposed to cadmium. **Plant Science**, Limerick, v.168, p. 329-338, feb.2005.
- WANG, M. et al. Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Z. mays*). **Bioresource Technology**, Essex, v.98, p.82-88, Jan.2007.
- WANG, M.Y. et al. Cadmium accumulation in and tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) varieties with different rates of radial oxygen loss. **Environmental Pollution**, Barking, v. 159, p. 1730-1736, Mar.2011.
- WANG, X.Q. et al. Structure of C-phycocyanin from *Spirulina platensis* at 2.2 Å resolution: a novel monoclinic crystal form for phycobiliproteins in phycobilisomes. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, Copenhagen, v. 57, p. 784-792, June 2001.
- ZACHARA, J.M. et al. Cadmium sorption to soil separates containing layer silicates and iron and aluminum oxides. **Soil Science Society of America**, Madison, v. 56, p. 1974-1084, July1992.
- ZEITTOUNI, C.F.; BERTON, R.S.; ABREU, C.A. Phytoextraction of cadmium and zinc from an Oxisol contaminated with heavy metals. **Bragantia**, Campinas, v. 66, p. 649-657, Aug.2007.
- ZENK, M. H. Heavy metal detoxification in higher plants: a review. **Gene**, Amsterdam, v. 179, p. 21-30, July1997.
- ZHANG, W. et al. Ecotoxicological effects of decabromodiphenyl ether and cadmium contamination on soil microbes and enzymes. **Ecotoxicology and environmental safety**, New York, v. 82, p. 1-9, June 2012.
- ZHAO, Y. Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 15, p. 2936-2943, Feb.2011.

### **CAPÍTULO 3 Desempenho ecofisiológico de espécies cultivadas em Latossolo e Cambissolo com concentrações crescentes de Cd**

#### **RESUMO**

O Cd pode apresentar comportamento distinto nos solos, associado às suas características e interações com outros elementos. Se absorvido e acumulado, pode causar vários efeitos tóxicos nas plantas, sendo o aparato fotossintético um dos locais mais afetados por esse elemento-traço. A fim de compreender melhor as respostas fisiológicas das espécies submetidas ao estresse causado por este elemento-traço, objetivou-se neste trabalho avaliar clorofilas, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* de espécies sensíveis ao Cd. O experimento foi conduzido em casa de vegetação do departamento de Ciência do Solo na Universidade Federal de Lavras. Os testes foram realizados com espécies consideradas sensíveis a elementos-traço em Latossolo e Cambissolo, com as seguintes doses de Cd (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4 mg kg<sup>-1</sup>). Durante o período experimental, em folhas completamente expandidas e aparentemente saudáveis, foram feitas medições de trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* e, ao final de 21 dias, também foram quantificados o índice de clorofila (IC) e os índices ecotoxicológicos. Os resultados quantitativos foram submetidos à análise de regressão e as curvas tiveram ajustes lineares ou exponencial e os qualitativos, pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Em Latossolo, devido aos seus atributos, as plantas apresentaram sintomas de fitotoxidez mais evidentes quando comparadas ao Cambissolo. As plantas estudadas, mesmo quando não apresentaram sintomas visuais, em ambos os solos, tiveram seu metabolismo alterado, pois houve redução de todos os parâmetros relacionados à fotossíntese. Essas reduções representam perdas efetivas às plantas, pois afetam diretamente o desenvolvimento e produção de biomassa. Diante do exposto, conclui-se que as plantas apresentaram comportamentos diferentes nos solos em que foram cultivadas, e obtiveram respostas metabólicas específicas para cada espécie. Mesmo nas concentrações baixas de Cd, as plantas apresentam alterações devido à fitotoxidez causada pelo Cd. O aparato fotossintético das espécies foi alterado, sendo observadas reduções do índice de clorofila. Para os índices de ecotoxicidade, as espécies apresentaram sensibilidades variadas e diferiram quanto aos valores de NOEC e LOEC.

Palavras-chave: Elemento-traço. Trocas gasosas. Clorofila. Fitotoxidez.

### ABSTRACT

Cadmium may present a distinct behavior in soils, which is associated to its characteristics and interactions with other elements. If absorbed and accumulated, it may cause many toxic effects on plants, with the photosynthetic apparatus being the most affected by this trace element. In order to better understand the physiological responses of the species submitted to stress caused by this trace element, this work aimed at evaluating chlorophylls, gas exchanges and  $\alpha$  chlorophyll fluorescence of species sensitive to Cd. The experiment was conducted in a greenhouse at the Soil Science Department of the Universidade Federal de Lavras. The tests were performed with species considered sensitive to trace elements in an Oxisol and an Inceptisol, with the following Cd doses: 0.4; 0.72; 1.29; 2.3; 4.1; 13.6; 24.4 mg kg<sup>-1</sup>. During the experimental period, in completely expanded and apparently healthy leaves, we performed gas exchange and  $\alpha$  chlorophyll fluorescence measurements and, at the end of 21 days, we also quantified the Chlorophyll Index (CI) and ecotoxicological indexes. The quantitative results were submitted to regression analysis and the curves were linearly or exponentially adjusted, and the qualitative results were submitted to the Scott-Knott test ( $p < 0.05$ ). In the Oxisol, due to its attributes, the plants presented more evident phytotoxicity symptoms than those in the Inceptisol. The studied plants, even when not presenting visual symptoms, in both soils, had their metabolism altered, for all the photosynthesis parameters were altered. These indirect reductions represent effective loss to the plants, directly affecting development and biomass production. With this, we conclude that the plants presented different behavior in the soils in which they were cultivated, yielding metabolic responses specific to each species. Even in low Cd concentrations, the plants presented alterations due to phytotoxicity caused by Cd. The species' photosynthetic apparatus were altered, leading to negative effects to the chlorophyll index. For the ecotoxicity indexes, the species presented sensitivity variations and differed in regard to NOEC and LOEC values.

Keywords: Trace element. Gas exchanges. Chlorophyll. Phytotoxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

Os elementos-traço, dentre eles o Cd, podem estar presentes nos solos em concentrações variadas, como consequência de processos pedogenéticos que ocorrem ao longo do tempo (ALLOWAY, 1995). Associado a isso, as ações antrópicas vêm alterando as concentrações deste elemento-traço no solo. Esta é, atualmente, uma questão mundialmente reconhecida, devido aos problemas que tem causado diretamente ao bem estar e à qualidade de vida dos seres.

O Cd pode apresentar comportamento distinto nos solos, associado às suas propriedades químicas e interações com outros elementos e organismos vivos (ERNST, 1996). Se absorvido e acumulado, pode causar vários efeitos tóxicos nas plantas e aos seres humanos.

Nas plantas, este elemento pode ser facilmente absorvido e causar variações em todo o metabolismo. O aparato fotossintético é um dos locais mais afetados por esse elemento-traço, pois pode causar danos à fase fotoquímica e à fase bioquímica (MYSLIWAKURDIZEL; PRASAD; STRZALKA, 2004). Na fase fotoquímica, os danos são mais severos no fotossistema II em comparação com o fotossistema I (CLIJSTERS; ASSCHE, 1985). Os elementos-traço interferem na síntese e degradação de pigmentos ligados à fotossíntese, como clorofilas e carotenoides (MYSLIWA-KURDIZEL; PRASAD; STRZALKA, 2004).

A fim de compreender melhor as respostas fisiológicas das espécies submetidas ao estresse por elemento-traço, objetivou-se neste trabalho avaliar o comportamento das clorofilas, trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* de espécies sensíveis ao Cd (Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD, 2006) em Latossolo e Cambissolo nos quais foram adicionadas doses crescentes de Cd.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras - UFLA. Foram selecionadas duas classes de solo consideradas representativas do Estado de Minas Gerais, classificados como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico textura média a moderado e Cambissolo Háplico Tb distrófico típico a moderado, ambos da fase floresta tropical subperenifólia. Os solos utilizados neste experimento foram considerados limpos quanto à contaminação de Cd, segundo a legislação vigente (Fundação Estadual do Meio Ambiente - FEAM, 2011), ou seja, apresentaram  $VRQ < 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso seco para Cd, determinado por digestão com ácido nítrico concentrado em forno micro-ondas (USEPA 3051A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA).

Realizou-se a caracterização química e física destes solos (Tabelas 1 e 2) e posteriormente foi realizada a adubação e correção de acordo com as recomendações da 5ª aproximação (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999), levando em consideração as especificidades de cada espécie utilizada no experimento. Foram adicionadas diferentes doses de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$  (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4  $\text{mg kg}^{-1}$  de solo seco) por meio de solução. Para a determinação das concentrações, usou-se como parâmetro os Valores Orientadores estabelecidos pela resolução 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2009) que são derivados dos valores estabelecidos para os solos do Estado de São Paulo. Como sugestão da normativa da OECD (2006), os valores utilizados nesse experimento são múltiplos de 1,8.

Foram selecionadas duas espécies de monocotiledôneas (*Zea mays*, *Oryza sativa*) e duas eudicotiledôneas (*Phaseolus vulgaris*, *Raphanus sativus*) consideradas sensíveis de acordo com a lista da ISO 11.269-2 (International Standard Organization - ISO, 2013).

O estudo constituiu-se de dois experimentos distintos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (7×4), ou seja, para cada classe de solo, 7 doses de Cd, 4 espécies de plantas com três repetições e três controles para cada espécie. Cada unidade experimental constituiu-se de um vaso contendo 500 g de solo onde foram semeadas 20 sementes. A umidade foi mantida entre 50 e 60% da capacidade de campo. Após a germinação, o número de plantas por repetição foi reduzido para 10, o experimento teve duração de 21 dias, após a germinação de 50% do controle de acordo com as recomendações da OECD-208.

Tabela 1 Fertilidade do Latossolo e Cambissolo

Solos	pH	K	P	Ca	Mg	Al	CTC ef	V	MO
Latossolo	4,8	32,	1,13	0,3	0,1	0,6	1,08	9,64	1,64
Cambissolo	5,3	34,	2,60	1,6	0,4	0,5	2,59	34,05	2,87

pH em água relação 1:25; P, K: Extrator Mehlich 1; S: Extrator fosfato monocálcico em ácido acético; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup>: Extrator KCl 1 mol<sup>-1</sup>; H + Al: Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,0; MO: Oxidação Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N; SB: Soma de Bases; CTCef.: Capacidade de troca catiônica efetiva; V: Índice de saturação de bases; MO: Matéria orgânica.

Tabela 2 Textura do Latossolo e Cambissolo

Solos	Textura		
	Argila	Silte	Areia
	----- % -----		
Latossolo	24	12	64
Cambissolo	31	22	47

## 2.1 Índice de Clorofila

Após os 21 dias de duração do experimento, foi determinado o Índice de Clorofila (IC) das quatro espécies pelo clorofilômetro (Chlorophyll Meter,

SPAD-502, da Minolta Co., Japão, 1989). Foram realizadas 30 leituras por repetição para cada tratamento no período da manhã. As leituras foram realizadas na face adaxial da primeira folha completamente expandida, aparentemente sadia e em três alturas do limbo foliar (MINOLTA CAMERA LTDA, 1989).

## 2.2 Trocas gasosas

As medições de trocas gasosas foram realizadas somente em milho e feijão, pois as demais espécies não possuíam área foliar suficiente para completar a câmara de *led* do equipamento. As medições foram realizadas sempre no período entre 9 e 11 horas, com o auxílio de um analisador de gás infravermelho (IRGA – Li-Cor LI – 6400XT). Sua câmara de *led* foi programada para uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de  $600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Foram determinados os valores de fotossíntese líquida ( $A - \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), transpiração ( $E - \text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) e condutância estomática ( $g_s - \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

## 2.3 Fluorescência da clorofila *a*

Nas mesmas folhas em que foram feitas as análises de trocas gasosas, com o auxílio de um fluorômetro portátil MINI-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha), foram realizadas as análises de fluorescência da clorofila *a* no período da manhã entre 9 e 11 horas. As avaliações foram realizadas segundo Bilger et al. (1995) e Heinz Walz GmbH (1993) pela superfície adaxial das folhas. Os parâmetros foram analisados em função da irradiância (P.A.R.), que obteve a maior taxa de transporte de elétrons do controle.

Através da curva de resposta ao fluxo de fótons fotossintéticos (FFF), com aplicação de oito pulsos crescentes de intensidade de radiação, foram obtidos os valores de fluorescência inicial ( $F_0$ ), fluorescência máxima ( $F_M$ ), fluorescência variável ( $F_V$ ), determinados pela diferença entre  $F_0$  e  $F_M$  e eficiência fotoquímica aparente do fotossistema II ( $F'_m/F_m$ ). O valor da eficiência fotoquímica potencial do PSII ( $F_v/F_m$ ) foi determinado no período entre 4h e 30min e 5h e 30 minutos. Foram consideradas as médias de três leituras para cada parâmetro mensurado e calculada a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) a partir da equação:

$$ETR = \left( \frac{F_v}{F_m} \right) \times FFF \times 0,5 \times 0,84$$

#### **2.4 Determinação de NOEC e LOEC**

Na posse de todos os parâmetros analisados, foram determinados o NOEC (concentração efetiva que não houve efeitos observáveis) e LOEC (concentração efetiva mínima que teve efeitos observáveis). Ou seja, a menor dose de Cd aplicada ao solo a apresentar diferença do tratamento controle é designada LOEC, e a dose anterior, sem diferença estatística significativa, é considerado o NOEC.

#### **2.5 Análises estatísticas**

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, sendo as médias quantitativas submetidas ao teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ) e analisadas por regressão polinomial. As regressões foram efetuadas em programa estatístico SISVAR versão 4.3 (FERREIRA, 1999).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas espécies que germinaram (milho, feijão e arroz) no Latossolo com a dose mais alta de Cd ( $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ), não foi possível realizar a análise com o aparelho de medição do índice SPAD devido ao tamanho da área foliar. Houve perda de 7,36; 6,8; 5,46 e 4,6 no teor de clorofila para feijão, arroz, milho e rabanete, respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 1). As espécies cultivadas no Cambissolo também apresentaram redução do índice de clorofila. As perdas médias foram de 10,66; 6,83; 5,8 e 4,9 para rabanete, arroz, milho e feijão respectivamente, em relação ao controle. De forma semelhante ao ocorrido no Latossolo, não houve diferença estatística (Figura 1).

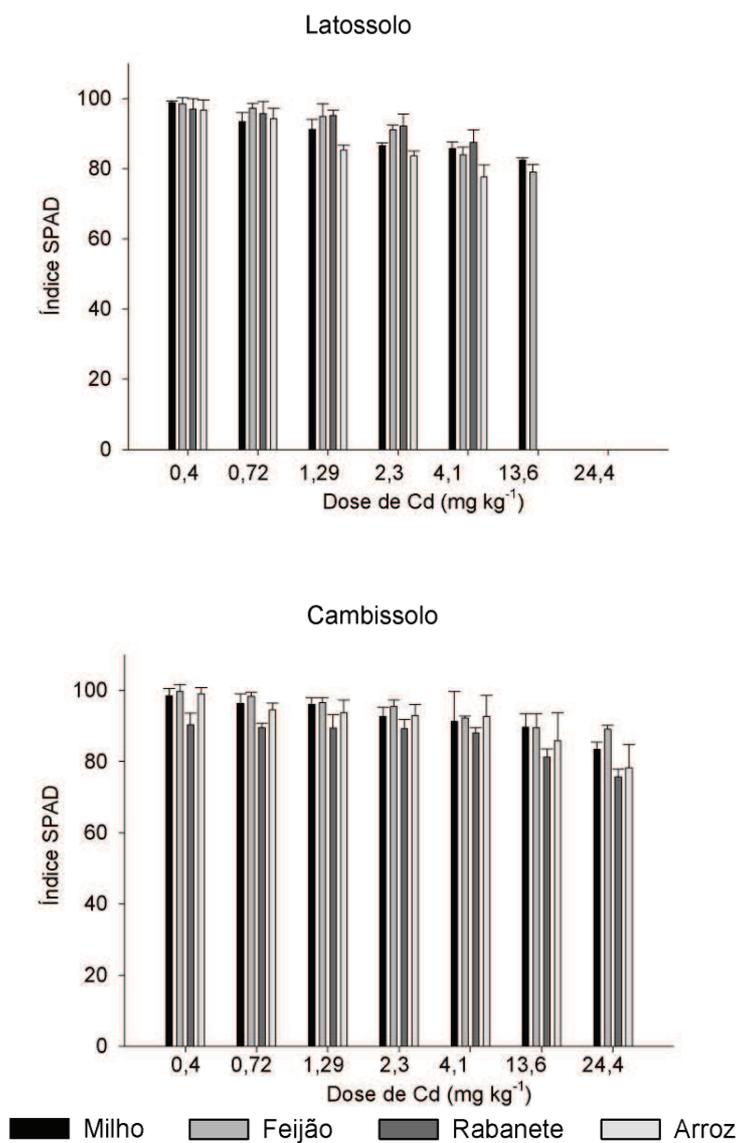


Figura 1 Índice SPAD apresentadas como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz, feijão, milho e rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

Essa variável se mostrou eficiente para avaliar o efeito do Cd nas plantas, pois houve redução do teor de clorofila com o aumento das concentrações do elemento-traço. Os resultados obtidos pelo SPAD têm sido bastante utilizados na mensuração do teor de clorofila foliar das plantas e serve para efeito de comparação de possíveis efeitos fitotóxicos de elementos-traço (SANTOS, 2006).

Essa redução do teor de clorofila pode estar relacionada à redução no número de cloroplastos, devido aos danos diretos na replicação destes, causados pelas ligações diretas com o  $Cd^{2+}$ , a forma mais tóxica deste elemento-traço às plantas (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005; KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004). Também, devido à competição do Cd com o Fe e Mg pelos sítios de absorção, que pode gerar instabilidade das clorofilas, podendo levar à degradação (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000; KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho estão em concordância com as conclusões de Silva et al. (2010), que buscou encontrar espécies fitoextratoras de Cd e observou a redução da clorofila nas espécies maria-pretinha (*Solanum americanum*) e tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom). Corroboram também com os estudos de Monteiro et al. (2010), que analisou a fitotoxicidade de Cd em híbridos de tomate, e observou redução da clorofila e danos ao fotosistema II quando exposto à dose máxima de  $0,5\text{mmol L}^{-1}$  de Cd.

Em relação às variáveis relacionadas ao aparato fotossintético, foram realizadas três coletas durante o experimento (7, 14 e 21 dias) para observar o comportamento do vegetal no decorrer do período de indução do estresse causado pelo elemento-traço. As taxas de fotossíntese líquida também decresceram com o aumento da concentração de Cd nas três coletas. Em Latossolo (Figura 2), o tratamento que continha milho com dose de  $24,4\text{ mg kg}^{-1}$ , apresentou taxas médias de fotossíntese líquida na 1ª coleta de  $2,36\text{ }\mu\text{mol CO}_2$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  seguido de 1,58 e 1,37  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na 2ª e 3ª coleta, enquanto a taxa média do controle foi de 18,67  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Com relação ao feijão, no maior tratamento com Cd (24,4  $\text{mg kg}^{-1}$ ), as plantas não sobreviveram. No solo que continha 13,6  $\text{mg kg}^{-1}$ , o feijão apresentou taxas de fotossíntese líquida média de 13,5; 3,59; 2,35  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  nas 1ª, 2ª e 3ª coletas respectivamente, sendo as taxas médias do controle de 21,56  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

O Cambissolo obteve resultados semelhantes e apresentou redução na taxa média de assimilação de  $\text{CO}_2$  ao longo do tempo em todos os tratamentos (Figura 3). Em plantas de milho no tratamento com maior teor de elemento-traço (24,4  $\text{mg kg}^{-1}$ ), para a 1ª, 2ª e 3ª coleta, foram obtidos os seguintes valores: 18,16; 10,86 e 8,78  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  enquanto o valor médio do tratamento controle foi de 22,63  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . No feijão houve redução de 20,08, 67,6% e 75,19% respectivamente, quando comparados ao controle que obteve valor médio de 17,03  $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Sabe-se que as taxas de fotossíntese líquida são superiores em plantas de metabolismo C4 quando comparadas às plantas C3, pois apesar do maior consumo energético, a fotorrespiração é praticamente inexistente em plantas que possuem esse metabolismo e não existe inibição da fotossíntese por  $\text{O}_2$ . Isso está de acordo com os dados obtidos neste trabalho, pois o milho (C4) apresentou taxas médias de fotossíntese superiores às do feijão (C3), mesmo nos tratamentos que possuíam doses mais elevadas de Cd. Nos tratamentos com elevado teor de elemento-traço, a redução da taxa de  $\text{CO}_2$  fixado justificaria a menor produção de biomassa seca quando comparado ao solo limpo.

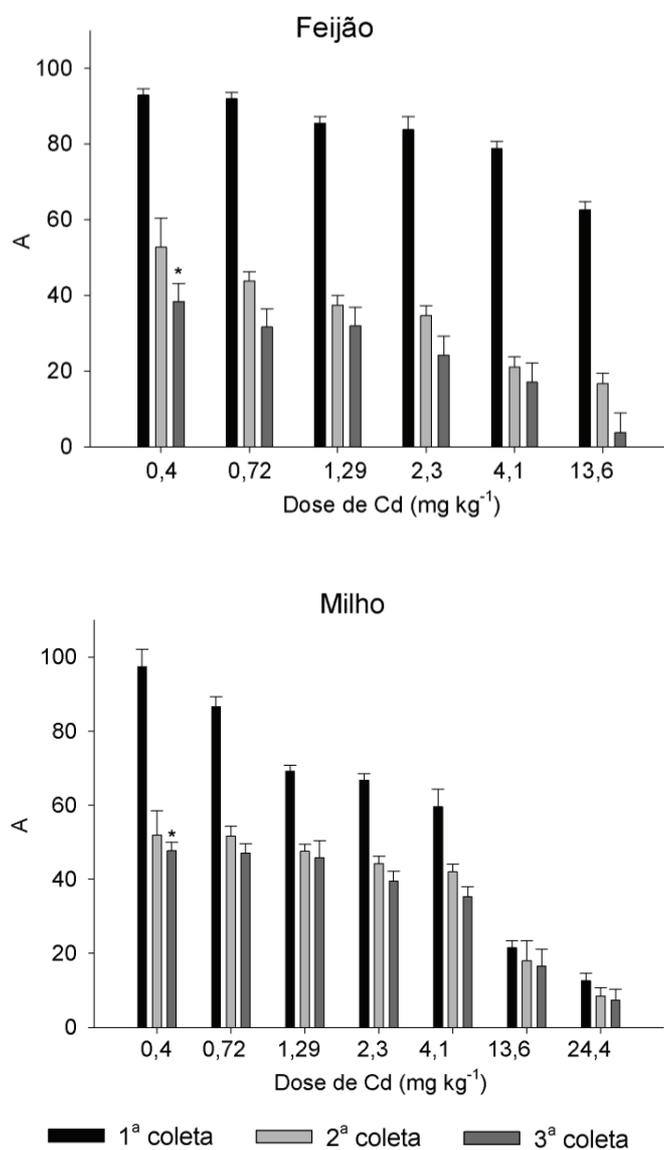


Figura 2 Fotossíntese líquida (A) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd em Latossolo

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

De acordo com Mendelssohn, McKee e Kong (2001), a fotossíntese líquida reduz-se com a aumento das doses de Cd, podendo ser considerado uma sensível variedade para quantificar o estresse e a fitotoxicidade causada por esse elemento-traço. Trabalhos realizados por Chugh e Sawhney (1999) com *Pisum sativum L.* levaram à conclusão de que as doses crescentes de Cd exerceram efeito negativo nas enzimas fotossintéticas e causaram redução progressiva da fotossíntese líquida. Os resultados se assemelham aos de Moya, Ros e Picazo (1993) que avaliaram as taxas de fotossíntese líquida em arroz cultivados em solução com cloreto de cádmio, 11 e 16 dias após a semeadura, e também, observaram a mesma redução com o aumento da exposição aos teores do elemento-traço.

Sheoran, Singal e Singh (1990), em seus estudos, quantificaram a fotossíntese líquida, enzimas do ciclo fotossintético e teor de clorofila em feijão guandu (*Cajanus cajan*) durante duas aplicações de Cd (30 e 70 dias após a semeadura). Estes autores observaram uma redução de 50 e 86% na taxa de fotossíntese, e concluíram que a redução da fotossíntese está mais relacionada com a perda de clorofila e redução da condutância estomática do que com as enzimas do ciclo da fotossíntese. Esses efeitos já haviam sido citados por Bazzaz, Rolfe e Windle (1974). Daniel (2010) realizou estudos em Cambissolo Flúvico aluminico tratado com Cd nas seguintes doses de 0 a 200 mg kg<sup>-1</sup> e cultivados com plantas de *Salix viminalis*. Estes autores concluíram que as taxas absolutas fotossintéticas também decresceram à medida que as doses de Cd aumentaram.

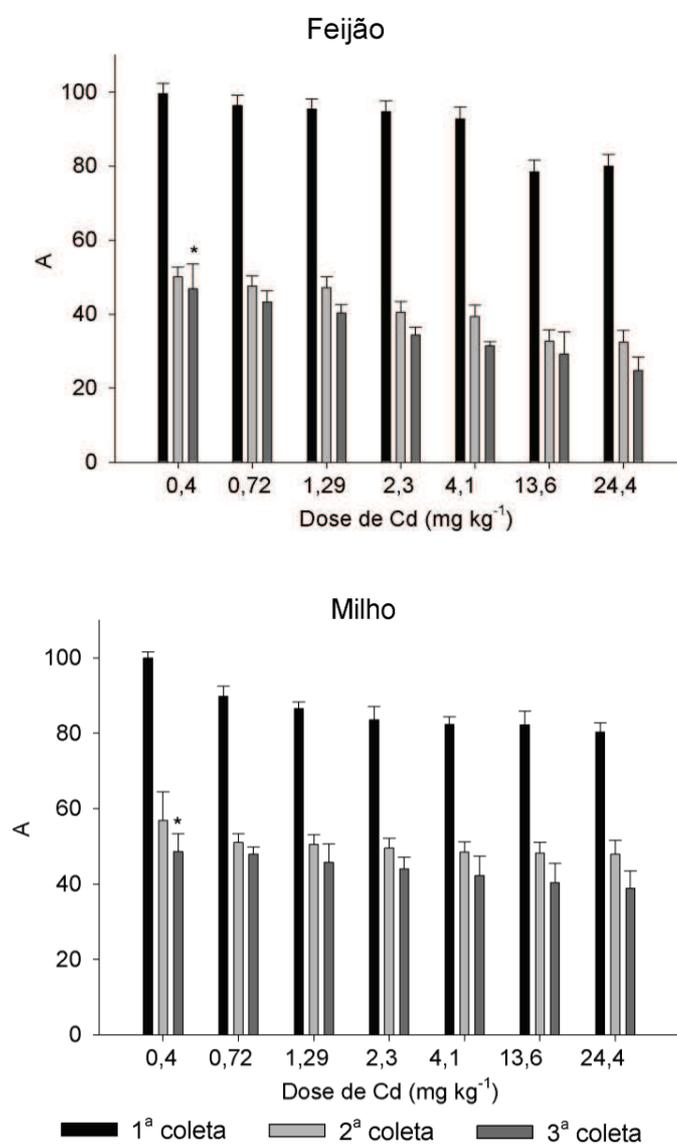


Figura 3 Fotossíntese líquida (A) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Cambissolo

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

A condutância estomática foi realizada somente nas plantas de milho e feijão, devido ao tamanho da área foliar das demais espécies. As espécies analisadas foram afetadas ao longo do experimento pelas crescentes concentrações de Cd. Para as plantas de milho (Figura 4) em Latossolo, no tratamento com  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , durante o período de avaliação, houve redução de 39,37%, e, na 3ª coleta, houve redução de  $0,18 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  quando comparado ao controle que foi de  $0,20 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Para o feijão (Figura 4), não foi possível realizar medições no solo com  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , devido ao tamanho da área foliar. Houve também redução de 96,6% na condutância estomática durante o período experimental no tratamento com  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$ . Na 3ª coleta, houve decréscimo de  $1,21 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  quando comparada ao controle que foi de  $1,23 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

No Cambissolo, houve redução ao comparar as coletas, mas ao final do experimento (21 dias) o Cd não influenciou a condutância estomática, não havendo diferenças estatísticas (Figura 5). Para o feijão, na 3ª coleta observou-se redução de  $0,73 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  quando comparados com o controle que foi de  $0,76 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ; e ao longo do período de avaliação do tratamento com  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$  houve redução de ~94%. Para o milho, na dose com  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , entre a 1ª e a 3ª coleta, houve redução de ~63%, e na 3ª coleta houve redução média de  $0,20 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  se comparado com o controle, que foi de  $0,25 \text{ mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

As plantas C4 possuem mecanismos de concentração de  $\text{CO}_2$ , que as permite ter um ponto de compensação menor de dióxido de carbono que as plantas C3. Estes mecanismos tornam possível que as plantas de milho apresentem taxas de fotossíntese líquida superiores, quando comparadas ao feijão (C3), mesmo com a redução da condutância estomática observada em milho e que não foi tão evidente em feijão, como pode ser observado nas Figuras 3 e 4. Estes mecanismos de concentração também conferem às plantas de

metabolismo C4 o uso mais eficiente da água. Acredita-se que a redução da condutância estomática pode estar associada com os efeitos do Cd na inibição de incorporação de nitrato e do potássio em plantas jovens, que estão associados à abertura e fechamento dos estômatos (GOMES et al., 1998).

Guimarães et al. (2008) reportam que reduções significativas na condutância estomática podem ser observadas em concentrações de Cd que não afetam as taxas fotossintéticas. No entanto, não foi possível realizar essas observações no presente estudo pois na análise em três coletas, a menor dose de Cd utilizada ( $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) já apresentou diferença significativa nas taxas médias de fotossíntese líquida. Barceló e Poschenrieder (1990), com estudos relacionados, também observaram que uma das implicações do Cd nas plantas é a redução da condutância estomática, mesmo em doses muito pequenas.

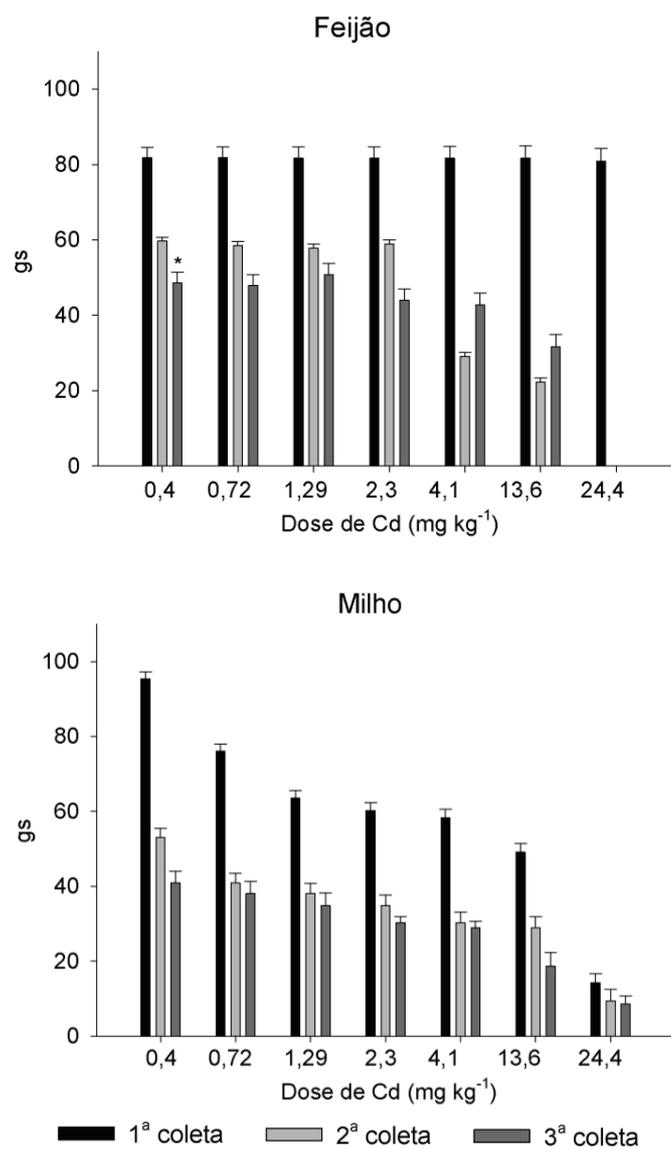


Figura 4 Condutância estomática (gs) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Latossolo

Legenda: As barras representam o erro padrão da média ( $n=3$ ). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p<0,05$ ).

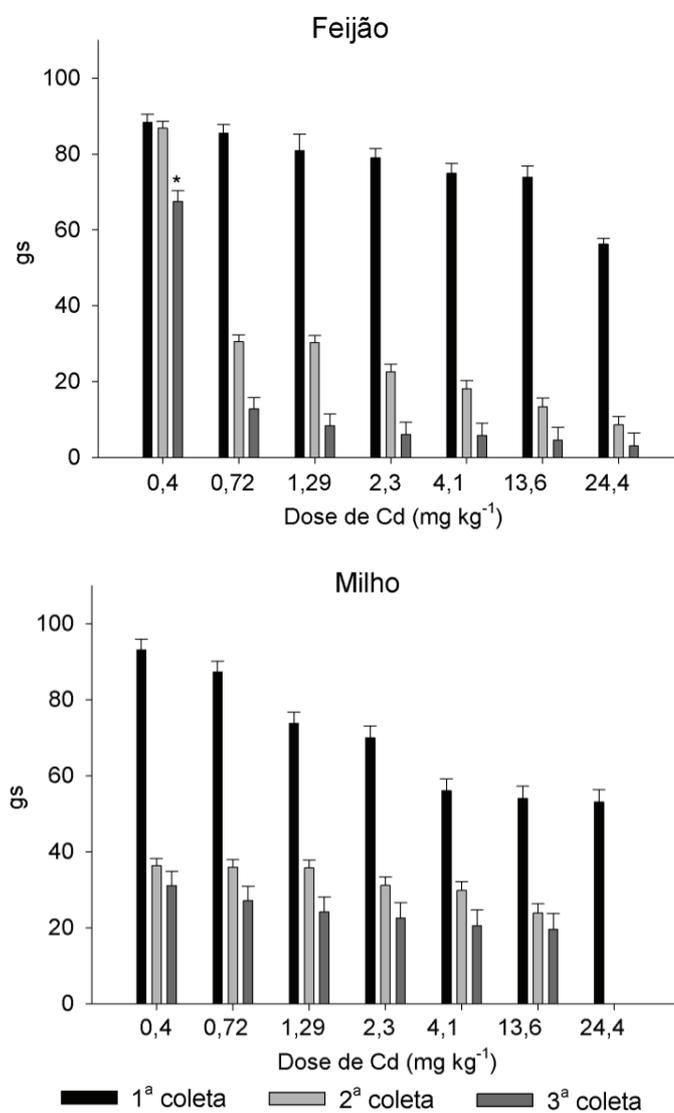


Figura 5 Condutância estomática (gs) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Cambissolo

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

A redução da condutância estomática pela toxidez do Cd pode causar diminuição no processo de transpiração (GOMES et al., 1998), o que está em concordância com alguns resultados encontrados neste estudo para feijão e milho, apesar de haver diferenças entre os solos cultivados. No Latossolo, foi observado decréscimo da transpiração para feijão e milho. Porém no feijão, a diferença significativa só foi na 3ª coleta e em milho na 2ª e 3ª coletas (Figura 6). Ou seja, no início do experimento, o Cd não afetou a transpiração, mas ao final dos 21 dias as plantas tiveram redução da transpiração. Em Cambissolo, as duas espécies não apresentaram diferenças significativas da transpiração na 1ª coleta. Já na 3ª coleta, o feijão quando comparado o tratamento com a dose mais alta ( $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) com o controle ( $7,25 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), houve redução de 86,8%. Para milho, na 3ª coleta, a redução foi de 74,4% no tratamento que tem  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$ , quando comparados ao controle que foi de  $4,19 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Figura 7).

Trabalhos realizados por Macedo et al. (2011) em *Coffea arabica* L. cv. Obatã IAC 1669-20 com sete anos de idade, exposta a 0; 15; 45; 90  $\text{mg planta}^{-1}$  de  $\text{CdSO}_4$  durante 128 dias, levaram às conclusões de que mesmo não ocorrendo acúmulo na parte aérea, a fotossíntese líquida, a transpiração e a condutância estomática diminuíram nas doses 45 e 90  $\text{mg de Cd planta}^{-1}$ .

A literatura recente é escassa em dados de avaliação de trocas gasosas no desenvolvimento inicial de plantas submetidas ao estresse induzido pelo Cd. Estes parâmetros devem ser mais bem entendidos a fim de esclarecer os mecanismos de defesas fisiológicas, desenvolver técnicas para tornar espécies resistentes ou indicar plantas com potencial fitoextrator.

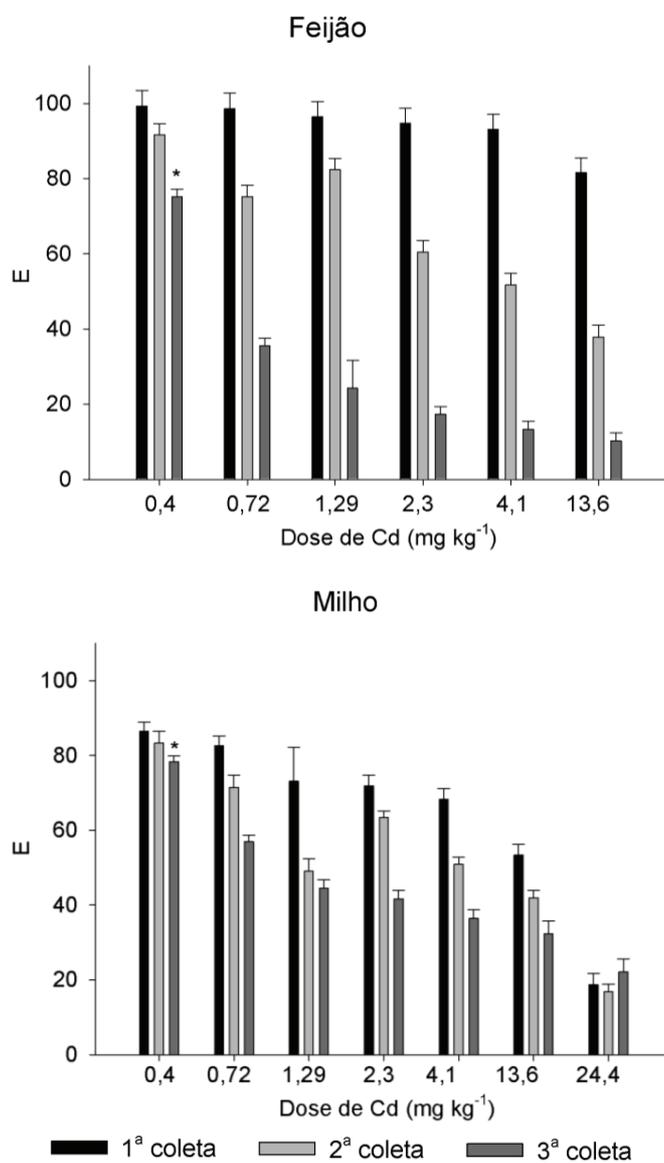


Figura 6 Transpiração (E) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Latossolo

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

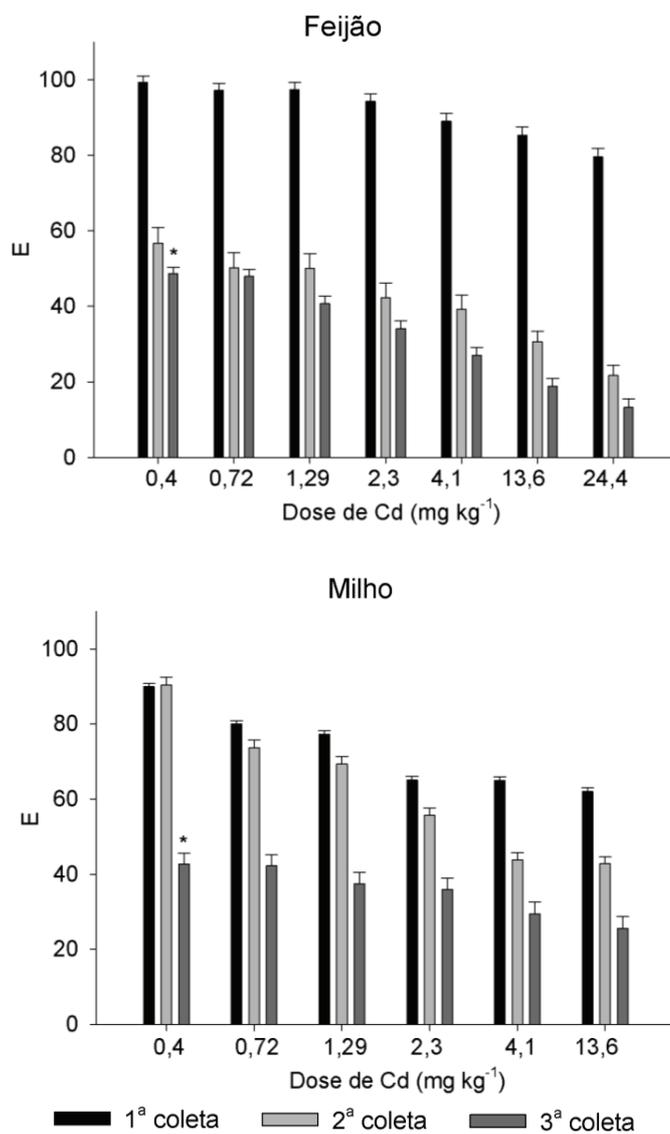


Figura 7 Transpiração (E) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão (a) e milho (b) em função de doses crescentes de Cd aplicadas em Cambissolo

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

Foi avaliada a eficiência máxima do fotossistema II, entre os diferentes tratamentos e ao longo do tempo. Com o incremento dos teores de Cd e com o tempo de exposição, as plantas tiveram redução da eficiência máxima do fotossistema II. Em Latossolo, todas as espécies cultivadas tiveram diferenças significativas com o aumento das concentrações, mas as eudicotiledôneas foram as mais afetadas (Figuras 9 e 11). Na 3ª coleta, o feijão (Figura 9) teve redução de 47,33% na eficiência de fotossistema II, quando foram comparados o tratamento com  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$  e o controle. Observou-se no rabanete redução de 36,79% (Figura 11) seguidos do milho com 33,08% (Figura 10) e arroz com 29,40% (Figura 8).

A queda de rendimento do fotossistema II implica no desencadeamento de perdas severas para as plantas, pois o não funcionamento correto da fase fotoquímica deixa de gerar poder redutor para a fase bioquímica, que não sintetiza na quantidade necessária o carbono orgânico, e por consequência, inibe a produção de todos os precursores do metabolismo da planta. Os danos dependem do nível da redução da eficiência do fotossistema II, podendo ser mais brandos e temporários como perda de reservas e se agravar, gerando instabilidade das membranas, perda severa de água, podendo levar à morte.

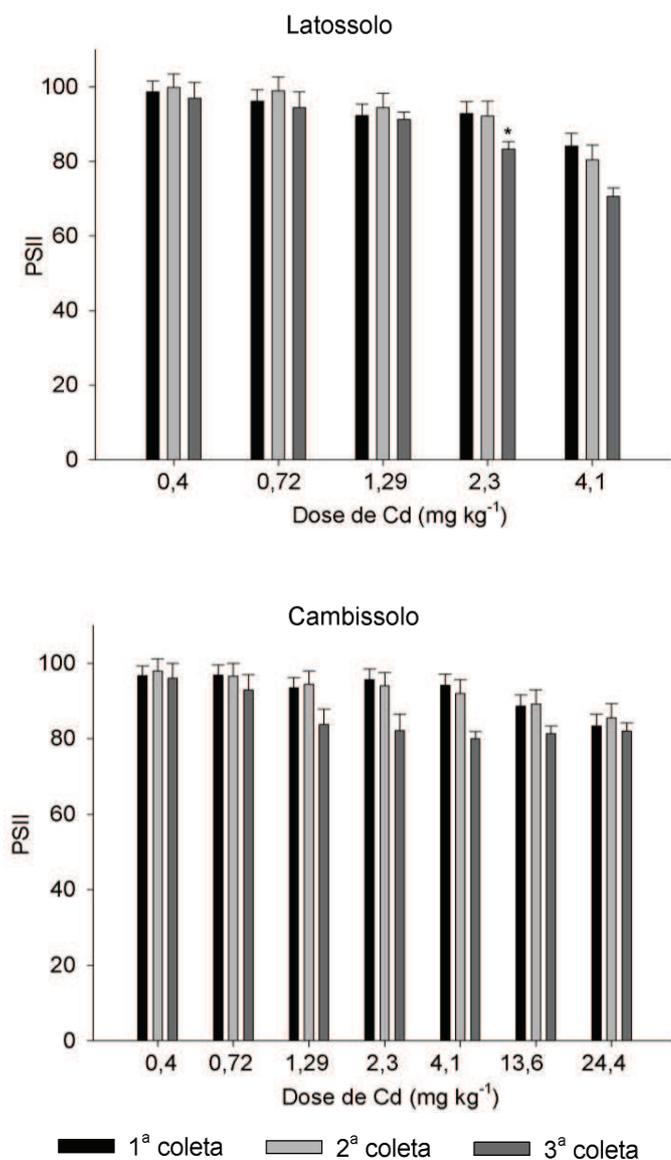


Figura 8 Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

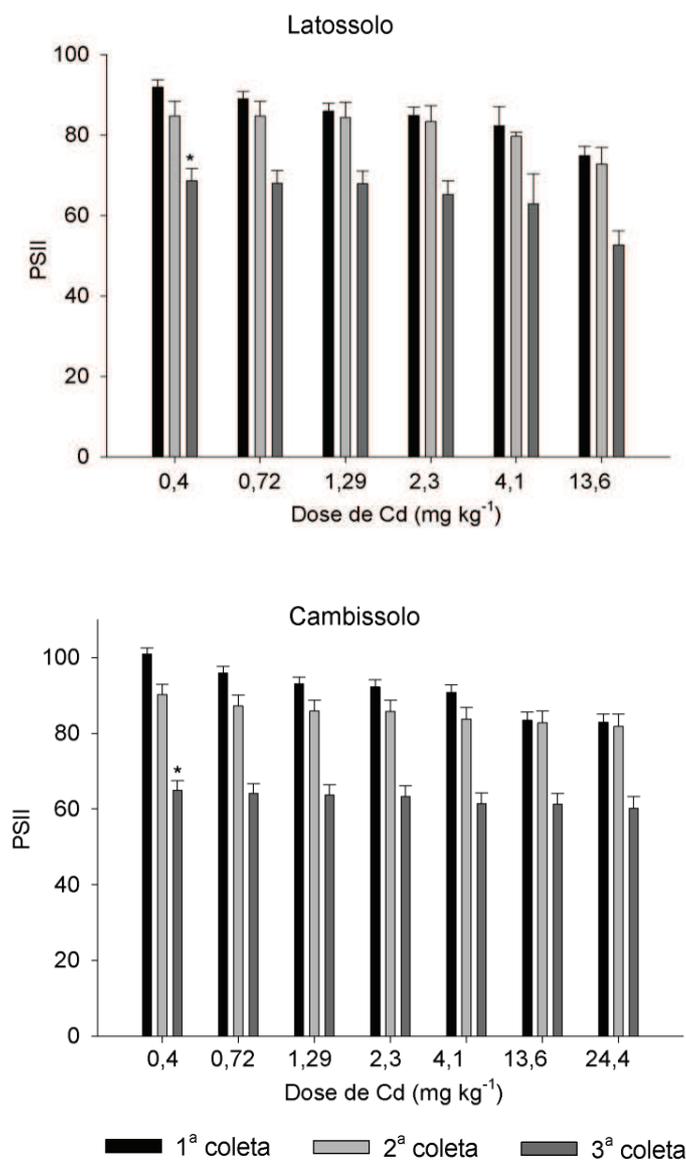


Figura 9 Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

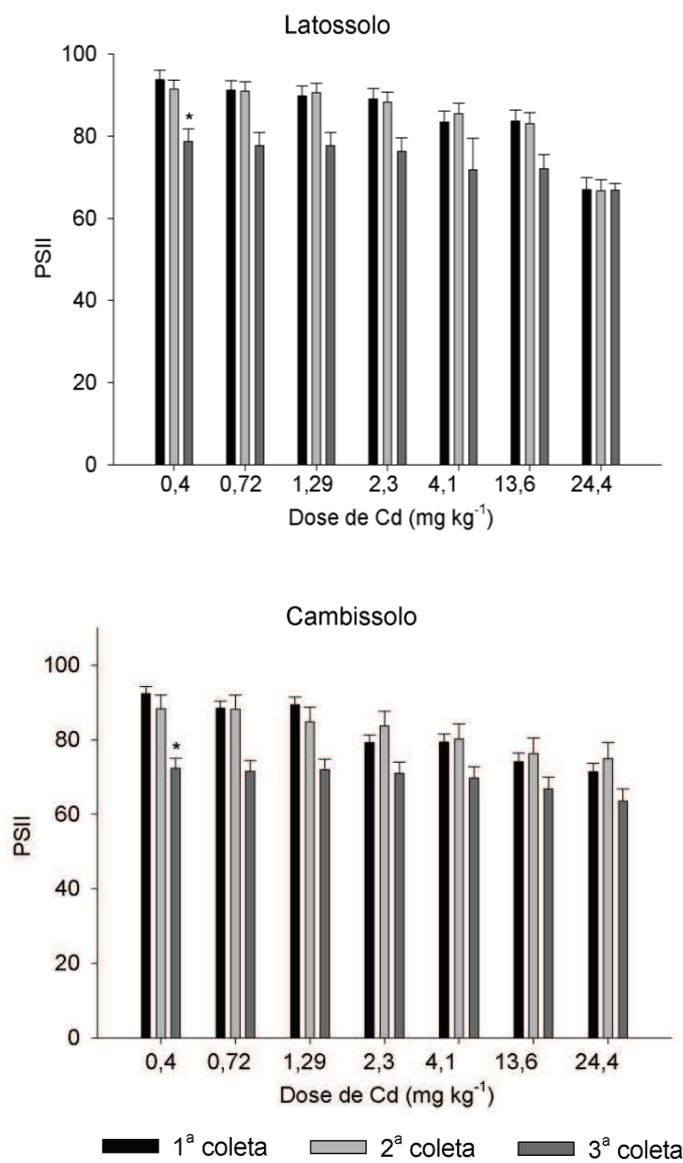


Figura 10 Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de milho em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

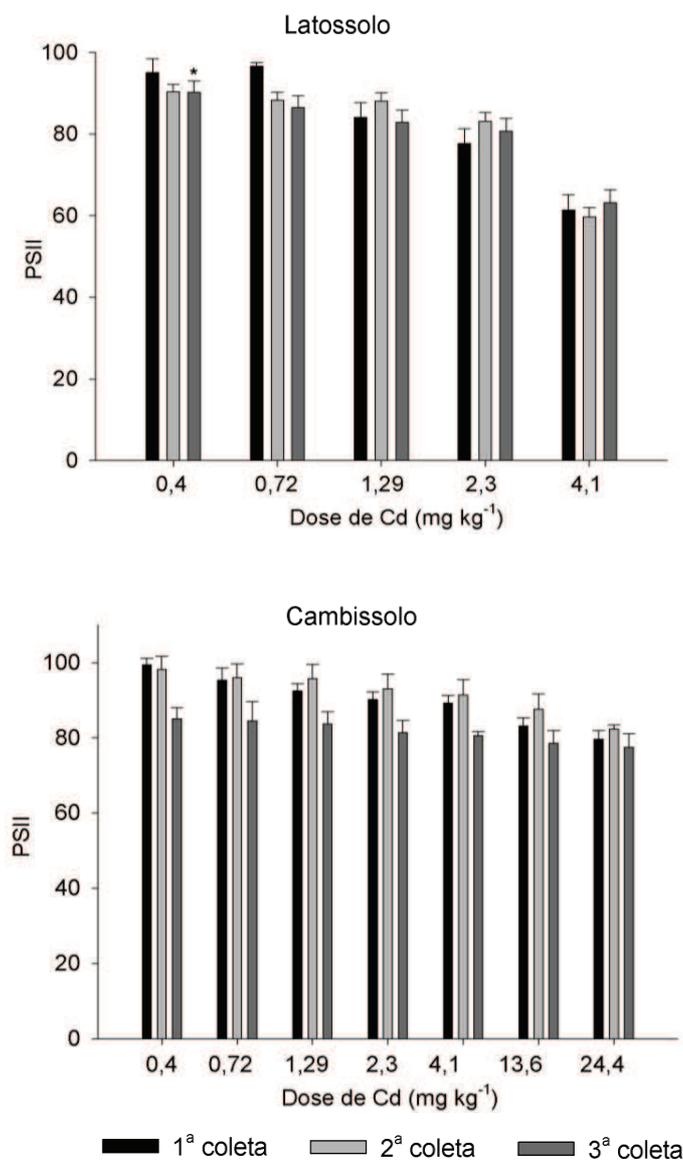


Figura 11 Eficiências do fotossistema II (PSII) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

De uma forma geral, como pode ser observado nas Figuras 8, 9, 10 e 11, as plantas cultivadas em Cambissolo tiveram a eficiência do fotossistema II menos afetada se comparadas com as cultivadas no Latossolo. O arroz (Figura 8) foi a única espécie que apresentou diferença significativa para o incremento de doses de Cd nas duas primeiras coletas, enquanto para as demais espécies, esta diferença foi apenas na 1ª coleta. Apesar de apresentar redução da eficiência do fotossistema em duas coletas, a perda foi menor no arroz (~14%) e, mais expressiva no milho (~28%), seguido do rabanete (~20%) e feijão (~17%), Figuras 8, 10, 11 e 9, respectivamente.

Esta diferença entre as mesmas espécies cultivadas em solos diferentes pode ser devido ao comportamento do Cd relacionado aos atributos de cada solo. O Cambissolo possui maiores teores de matéria orgânica e argila do que o Latossolo (Tabelas 1 e 2). Por isso, parte da concentração total de Cd presente pode ter sido adsorvido por componentes do solo e, conseqüentemente, ter reduzido a fração disponível em Cambissolo.

Gavina et al. (2013) realizaram trabalhos com diferentes classes de solos em uma antiga área de mineração de arsênio e avaliaram várias variáveis fisiológicas como teores de pigmentos fotossintéticos, fluorescência da clorofila entre outros. Os resultados desses parâmetros foram muito significativos e levaram à conclusão que os acréscimos dessas variáveis fisiológicas permitem a identificação de solos mais fitotóxicos e que podem melhorar a sensibilidade dos testes padrões já existentes.

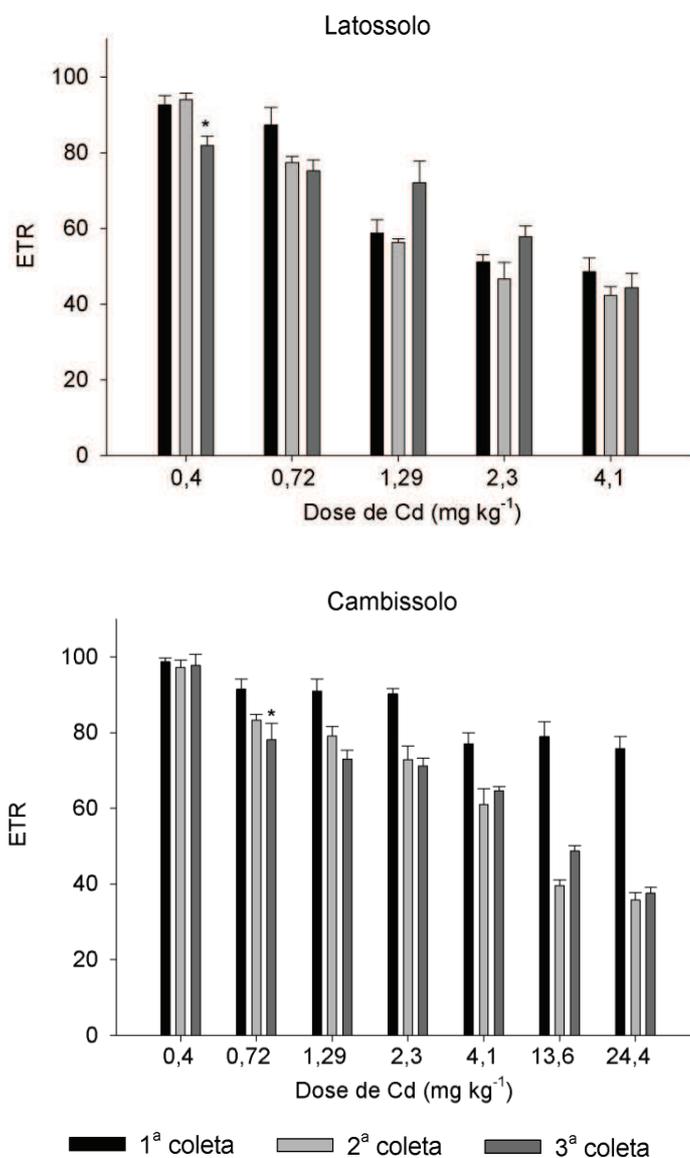


Figura 12 Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de arroz em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

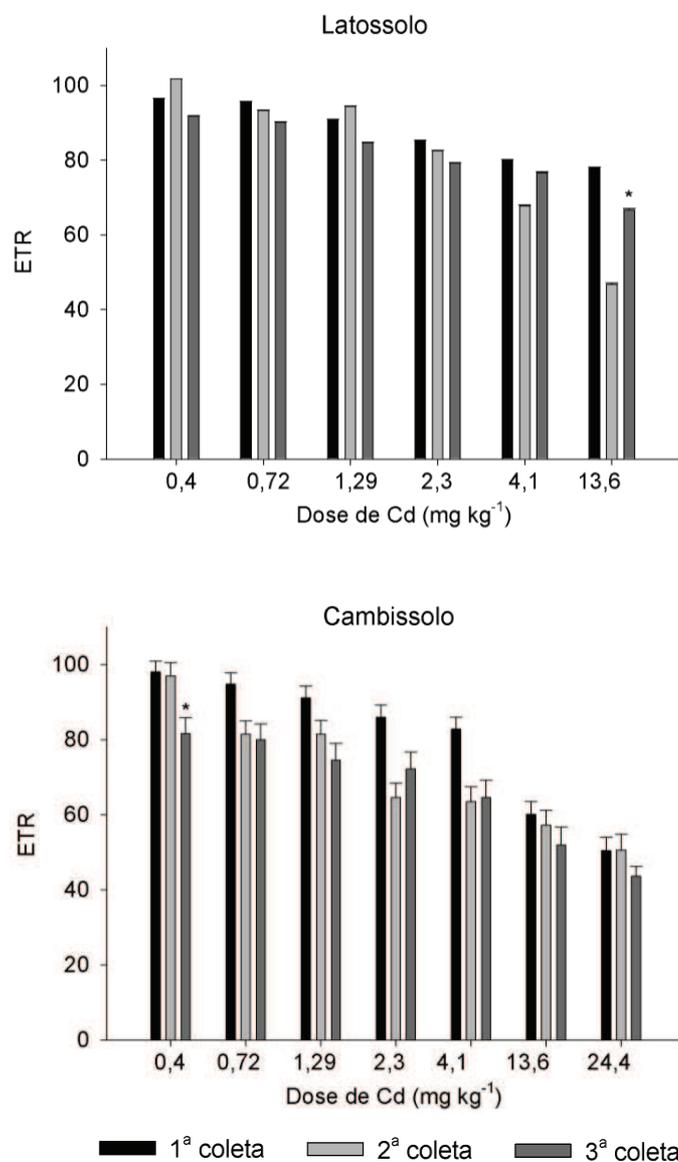


Figura 13 Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de feijão em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet ( $p < 0,05$ ).

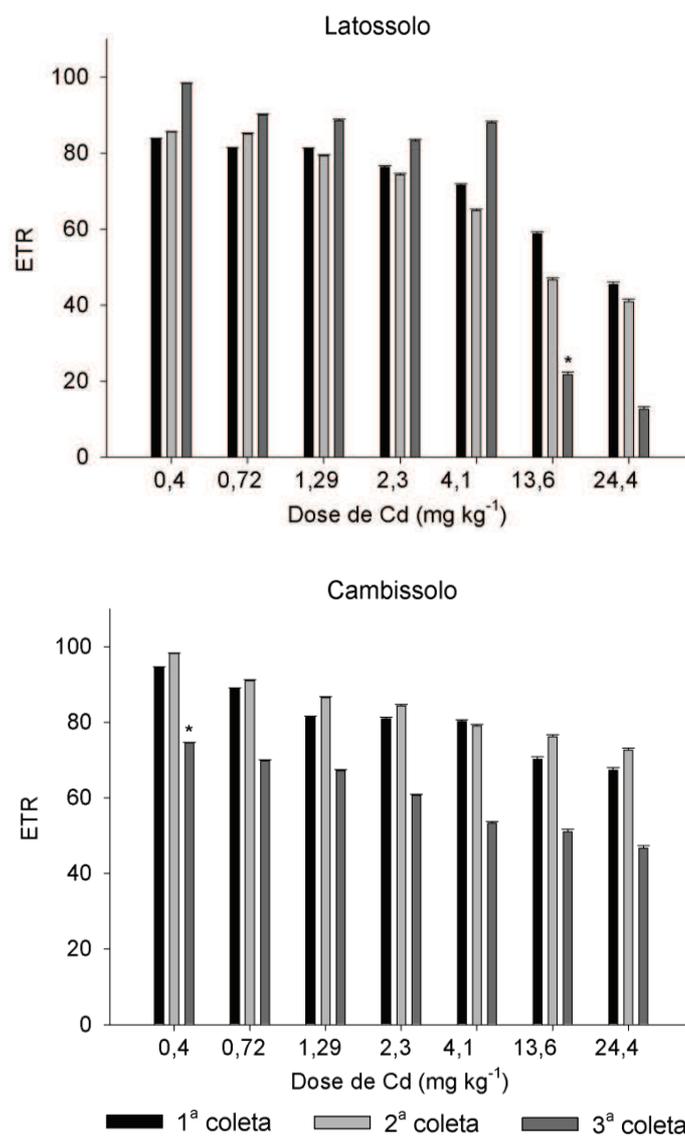


Figura 14 Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de milho em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

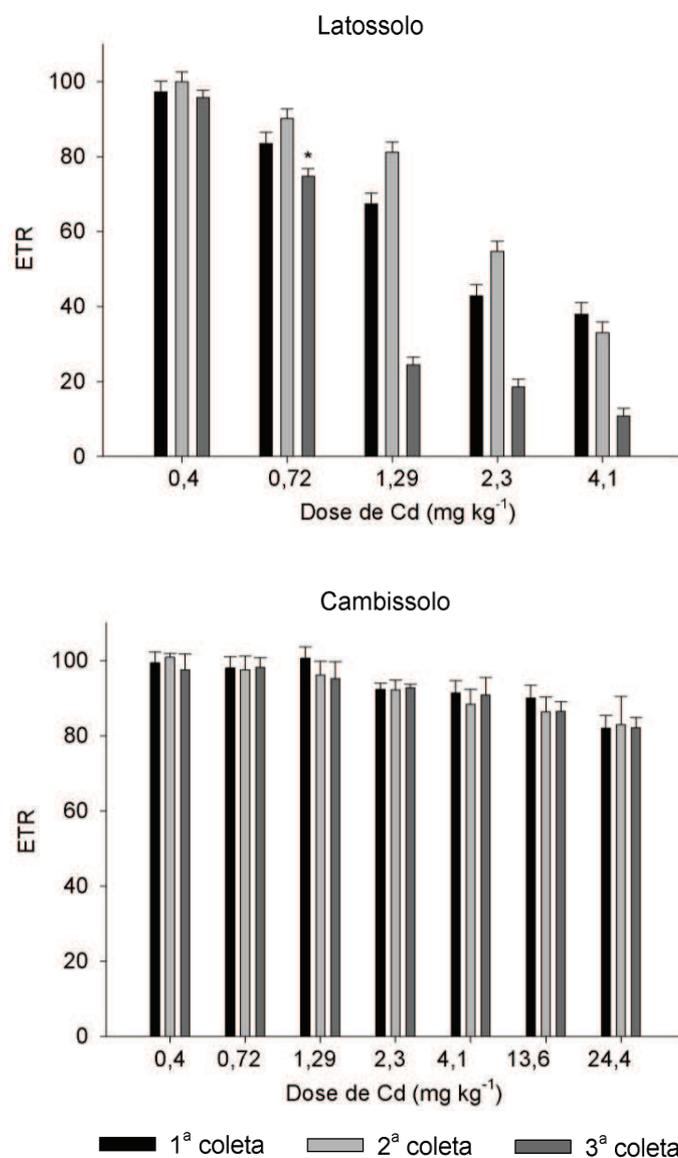


Figura 15 Taxa relativa do transporte de elétrons (ETR) apresentada como porcentagem em relação ao controle (sem Cd) de plantas de rabanete em função de doses crescentes de Cd

Legenda: As barras representam o erro padrão da média (n=3). \* indica a primeira dose a diferir do controle (LOEC), pelo teste de Dunnet (p<0,05).

Ao avaliar a taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) em Latossolo, só foi possível realizar medições na dose máxima do experimento ( $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) em milho (Figura 14). No arroz (Figura 12) e no rabanete (Figura 15), as avaliações foram realizadas até o tratamento com  $4,1 \text{ mg kg}^{-1}$  e no feijão (Figura 13) até  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$ , devido à situação necrosada das folhas. As quatro espécies expostas ao Cd foram responsivas e tiveram diferenças significativas, reduzindo a ETR nas três coletas. Comparado com a dose superior que foi possível realizar análise, o rabanete foi a espécie que teve menor redução (89,2%), seguido do milho (87,3%), arroz (55,7%) e a espécie que teve menor influência foi o feijão (33,28%).

Como pode ser observado nas Figuras 12, 13, 14 e 15, no Cambissolo, foi possível realizar em todas as espécies medições até a concentração mais alta de Cd ( $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ). Nelas houve diferença significativa nas três coletas. O arroz (Figura 12), milho (Figura 14) e o feijão (Figura 13) tiveram reduções da ETR semelhantes quando comparados à última dose com o controle, com perdas de 54,94%, 53,31% e 56,39%, respectivamente. O rabanete (Figura 15), assim como no Latossolo, obteve diferenças significativas entre os tratamentos, mas foi a espécie que teve menor interferência do elemento-traço na taxa de transferência de elétrons, com redução de 17,8% no último tratamento, quando comparado ao controle que foi de 149,4%.

Estudos realizados em tomate (*Lycopersicon esculentum*) por Souza (2003), que cultivaram as plantas por 14 dias em solução nutritiva com 10, 30 e 50 mol de  $\text{Cd}^{+2}$ , concluíram que a exposição a esse elemento-traço causou uma série de danos significativos ao ETR e uma redução máxima de 86% nos teores de clorofila. Resultados semelhantes foram encontrados por Xia et al. (2004), que também encontraram redução na quantidade de ETR e ficobiliproteínas (pigmentos acessórios encontrados em cianobactérias e em cloroplasto de algas que auxiliam a capturar energia solar e repassar para o PSII, excitando a

clorofila *a* (TALARICO, 1996) ao expor *Gracilaria lemaneiformis* a concentrações de Cd. Estes autores observaram correlação entre o decréscimo de ficobiliproteínas e ETR, pois quando há diminuição na quantidade de ficobiliproteínas, menos energia luminosa é captada e repassada ao fotossistema II, diminuindo então a ETR.

Plantas sob efeito do estresse causado pelo Cd, possuem a homeostase redox das células interrompida (FOYER; Mullineaux, 1994), porque os danos causados afetam o transporte de elétrons realizado pela cadeia transportadora de elétrons (BREUSEGEM et al., 2001). Com o rompimento da homeostase celular ocorre a aceleração da produção de espécies reativas de oxigênio (LAMB; DIXON, 1997), o que pode causar estresse oxidativo da planta (ASADA, 1994).

Tabela 3 Índices LOEC ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) e NOEC ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de arroz, feijão, milho e rabanete, cultivadas em Latossolo e Cambissolo

Solo	Espécie	Índice	SPAD	A	gs	E	PSII	ETR
Latossolo	Arroz	NOEC	4,1	-	-	-	1,29	0
		LOEC	13,6	-	-	-	2,3	0,4
	Feijão	NOEC	13,6	0	0	0	0	13,6
		LOEC	24,4	0,4	0,4	0,4	0,4	24,4
	Milho	NOEC	13,6	0	24,4	0	0	4,1
		LOEC	24,4	0,4	*	0,4	0,4	13,6
	Rabanete	NOEC	4,1	-	-	-	0	0,72
		LOEC	13,6	-	-	-	0,4	1,29
Cambissolo	Arroz	NOEC	24,4	-	-	-	24,4	0,4
		LOEC	*	-	-	-	*	0,72
	Feijão	NOEC	24,4	0	0	0,4	0	0
		LOEC	*	0,4	0,4	0,72	0,4	0,4
	Milho	NOEC	24,4	0	0	0	0	0
		LOEC	*	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Rabanete	NOEC	24,4	-	-	-	24,4	24,4
		LOEC	*	-	-	-	*	*

NOEC (concentração efetiva que não houve efeitos observáveis); LOEC (concentração efetiva mínima que teve efeitos observáveis); SPAD (índice de clorofila); A (fotossíntese líquida); gs (condutância estomática); E (transpiração); PSII (eficiência do fotossistema II); ETR (taxa relativa de transporte de elétrons). \* Não houve diferenças estatísticas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade; - variável não calculada.

Para o cálculo dos parâmetros de ecotoxicidade NOEC e LOEC, foram utilizados os dados obtidos ao final dos 21 dias do experimento. Os valores variaram de acordo com a espécie e o solo em que foram cultivados (Tabela 3). No Latossolo, as quatro espécies apresentaram resultados significativos nos valores de NOEC, ou seja, foram sensíveis à exposição ao Cd em alguma dose. As variáveis relacionadas ao aparato fotossintético, em sua maioria, apresentaram valores de LOEC de  $0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , ou seja, mesmo na dose em que o solo é considerado limpo pela FEAM (2011), já foi possível observar alterações

metabólicas geradas pela toxidez do Cd. Isso também está em acordo com as alterações da eficiência do fotossistema II em baixas doses de Cd.

O rabanete foi a espécie com menor sensibilidade no Cambissolo e não foi possível obter valores de LOEC para nenhuma das variáveis. Já o feijão e o milho apresentaram resultados semelhantes, apresentando valores de LOEC baixos, demonstrando que mesmo em baixas concentrações o Cd altera o metabolismo dos vegetais, só diferindo em relação à transpiração. As características dos solos influenciam muito na obtenção de parâmetros ecotoxicológicos. Como pode ser observado na Tabela 3, as mesmas espécies obtêm valores diferenciados em solos diferentes.

#### **4 CONCLUSÃO**

O solo em que as espécies foram cultivadas, devido aos seus atributos, interferiu substancialmente na disponibilidade de Cd para as plantas, que tiveram respostas e comportamentos do metabolismo diferentes para cada espécie. Mesmo nas concentrações baixas de Cd, as plantas já apresentam alterações metabólicas devido à fitotoxidez causada pelo Cd. O aparato fotossintético das quatro espécies foi alterado sendo observadas reduções do índice de clorofila.

## REFERÊNCIAS

- ALLOWAY, B. J. Soil processes and the behavior of heavy metals. In: \_\_\_\_\_. **Heavy metals in soils**. London: Blackie Academic and Professional, 1995. p. 38-57.
- ASADA, K. Production and action of reactive oxygen species in photosynthetic tissue. In: FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M. (Ed.). **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC, 1994. p. 77-104.
- BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, London, v.13, p.1-37, Nov.1990.
- BAZZAZ, F. A.; ROLFE, G. L.; WINDLE, P. Differing sensitivity of corn and soybean photosynthesis and transpiration to lead contamination. **Journal of Environment Quality**, Madison, v. 3, p. 156-158, Apr.1974.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 17, n. 1, p. 21-34, Jan./Mar. 2005.
- BILGER, W. et al. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, n. 4, p. 1479-1486, Aug. 1995.
- BREUSEGEM, F. van et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Limerick, v. 161, p. 405-414, Oct. 2001.
- CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 37, p. 297-303, Aug. 1999.
- CLIJSTERS, H.; ASSCHE, F. van. Inhibition of photosynthesis by heavy metals. **Photosynthesis Research**, Amsterdam, v. 7, p. 31-40, May 1985.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

DANIEL, E. de S. **Taxa fotossintética de plantas de vime cultivadas em solo contaminado por cádmio**. Pouso Alegre: Instituto Federal do Sul de Minas Gerais, 2010. 5 p.

ERNST, W. H. O. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 11, p. 163-167, Jan. 1996.

FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análises estatísticas. Lavras: UFLA, 1999. Software.

FOYER, C. H.; Mullineaux, P. M. **Causes of Photooxidative stress and amelioration of defense system in plants**. Boca Raton: CRC, 1994. 315 p.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2011. 4 p.

GAVINA, A. et al. Physiological endpoints improve the sensitivity of assays with plants in the risk assessment of contaminated soils? **Plo S One**, New York, v. 8, n. 4, p. 597-608, Apr. 2013.

GOMES, P. C. et al. Extração fracionada de metais pesados em Latossolo Vermelho-Amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 21, p. 543-551, maio 1998.

GUIMARÃES, M. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica -Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 3, n. 1, p. 58-60, maio 2008.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 2013. 28 p.

HEINZ WALZ GMBH. **Mini-pam**: photosynthesis yield analyser. Effeltrich, 1993. Disponível em: <[http://www.walz.com/products/chl\\_p700/mini-pam/introduction.html](http://www.walz.com/products/chl_p700/mini-pam/introduction.html)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3<sup>rd</sup> ed. London: CRC, 2000. 167 p.

KURDZIEL, B. M.; PRASAD, M. N. V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2<sup>nd</sup> ed. New Delhi: Springer, 2004. p. 146-181.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, June 1997.

MACEDO, A.F. et al. The effect of light quality on leaf production and development of in vitro-cultured plants of *Alternanthera brasiliana* Kuntze. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v.70, p.43-50, Jan.2011.

MENDELSSOHN, I.A.; MCKEE, K.L.; KONG, T. A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wetlandplants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 46, p. 263-275, Dec.2001.

MINOLTA CAMERA LTDA. **Manual for chlorophyll meter SPAD 502**. Osaka: Radiometric Instruments Divisions, 1989. 22 p.

MONTEIRO, M. S. et al. Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. **Ecotoxicology and Environmental**, New York, v. 72, n. 3, p. 811-818, Mar. 2010.

MOYA, J. L.; ROS, R.; PICAZO, I. Influence of cadmium and nickel on growth, net photosynthesis and carbohydrate distribution in rice plants. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 75-80, May 1993.

MYSLIWA-KURDIZEL, B.; PRASAD, M. N. V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2<sup>nd</sup> ed. Berlin: Springer-Verlang, 2004. p. 147-181.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n° 208:** terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação.** Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359 p.

SANTOS, D. M. A. **Adubação nitrogenada e recomendação com medidor portátil de clorofila em algodão.** 2006. 54 p. Dissertação (Mestrado em Sistema de Produção) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2006.

SHEORAN, I.S.; SINGAL, H. R.; SINGH, R. Effect of cadmium and nickel on photosynthesis and enzymes of the photosynthetic carbon reduction cycle in pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 23, p. 345-351, Mar. 1990.

SILVA, E. N. et al. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **Journal of Arid Environments**, London, v. 74, n. 10, p. 1130-1137, Oct. 2010.

SOUZA, C. L. L. V. **Metodologias não-invasivas e bioquímicas usadas na detecção dos efeitos fisiológicos causados por salinidade, cádmio e flúor em tomateiro.** 2003. 93 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2003.

TALARICO, L. Phycobiliproteins and phycobilissomes in red algae: adaptive responses to light. **Science Marine**, Oxford, v. 60, n. 1, p. 205-222, 1996.

XIA, J. R. et al. Effects of copper and cadmium on growth, photosynthesis, and pigment content in *Gracilaria lemaneiformis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 73, n. 8, p. 979-986, Aug. 2004.

## **CAPÍTULO 4 Alterações ultraestruturais de feijão e milho cultivados em diferentes doses de Cd no Latossolo e Cambissolo**

### **RESUMO**

Os elementos-traço estão presentes naturalmente nos solos. Suas concentrações naturais podem variar de acordo com a gênese dos solos, mas, devido às atividades humanas estes teores estão sofrendo incremento. O Cd é considerado um elemento-traço não essencial às plantas, e quando absorvido, pode provocar várias alterações e danos na morfologia e no metabolismo das plantas. Visando entender melhor o comportamento deste elemento nos compartimentos celulares, o presente trabalho teve como objetivo analisar as alterações ultraestruturais nas plantas de milho e feijão cultivadas em diferentes concentrações de Cd. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras e os testes foram realizados com duas espécies consideradas sensíveis (feijão, milho) a elementos-traço em Latossolo e Cambissolo. As plantas foram submetidas a diferentes doses de Cd (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4 mg kg<sup>-1</sup>) durante 21 dias. Após este período, procedeu-se a coleta de folhas, de ambas as espécies, nos tratamentos em que os sintomas visíveis de toxidez foram mais evidentes nos dois solos (13,6 mg kg<sup>-1</sup> no Latossolo e 24,4 mg kg<sup>-1</sup> no Cambissolo) e no controle para comparação. As amostras foram fixadas em Karnovsky e tetróxido de ósmio e emblocadas em resina Spurr. Procedeu-se o corte de seções ultrafinas as quais foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão. As alterações das organelas das células das duas espécies foram mais evidentes nas cultivadas no Latossolo, com redução no número e no tamanho dos cloroplastos, espessamento da parede celular com acúmulo de material eletro-denso, provavelmente de Cd, devido à competição pelo mesmo sítio de absorção do cálcio. No entanto, no Cambissolo, além das alterações encontradas em Latossolo, mesmo em menores proporções, nas células do feijão foi observado que o Cd pode ter complexado com fitoquelatinas e estava em processo de compartimentalização e cristalização. As células de milho apresentaram maior acúmulo de material eletro-denso nas paredes celulares. Essas alterações nas plantas em Cambissolo podem ser consideradas mecanismos de proteção, uma vez que apresentaram melhor desenvolvimento quando comparadas com as plantas do Latossolo. Conclui-se que, ao serem submetidas ao estresse causado pelo Cd, as plantas de milho e feijão cultivadas em Latossolo e Cambissolo sofreram alterações em nível celular e apresentaram alterações e degradações nas organelas das células do mesófilo e que, possivelmente, houve acúmulo deste elemento-traço.

Palavras-chave: Microscopia eletrônica. Morfologia. Elementos-traço. Fitotoxidez.

### ABSTRACT

Trace elements are naturally present in the soils. Their native concentrations may vary according to the soils' genesis, however, due to human activities, these contents are increasing. Cadmium is considered a non-essential trace element to plants and, when absorbed, may cause many alterations and damages to plant morphology and metabolism. Aiming to better understand the behavior of this element in the cellular compartments, the present work aimed at analyzing ultra-structural alterations on corn and bean plants cultivated under different Cd concentrations. The experiment was conducted in a greenhouse at the Universidade Federal de Lavras and the tests were performed with two species considered sensitive (bean and corn) to trace elements in an Oxisol and an Inceptisol. The plants were submitted to different doses of Cd (0.4; 0.72; 1.29; 2.3; 4.1; 13.6; 24.4 mg kg<sup>-1</sup>) during 21 days. After this period, we proceeded to collecting leaves from both species, in treatments in which the visible toxicity symptoms were more evident (13.6 mg kg<sup>-1</sup> in the Oxisol and 24.4 mg kg<sup>-1</sup> in the Cambisol) and in the witness for comparison. The samples fixed in Karnovsky and osmium tetroxide and blocked in Spurr resin. We proceeded to cutting ultra-fine sections, which were analyzed in transmission electronic microscope. The alterations on cellular organelles of both species were more evident in those cultivated in the Oxisol, with reduction in the number and size of the chloroplasts, thickness of the cellular wall with accumulation of electro-dense matter, probably Cd, due to the competition for the same absorption site of calcium. However, in the Inceptisol, in addition to the alterations found in the Oxisol, even if in smaller proportions, we observed in bean cells that the Cd may have complexed with phytochelatin and was in the process of compartmentalization and crystallization. The corn cells presented a larger accumulation of electro-dense matter on the cellular walls. These alterations in the Inceptisol may be considered protection mechanisms, since they presented better development when compared to the Oxisol. We conclude that, while submitted to stress caused by Cd, the bean and corn plants cultivated in an Oxisol and an Inceptisol suffered alterations at cellular levels and presented alterations and degradations on cellular organelles of the mesophyll and there was possible Cd accumulation.

Keywords: Electronic microscopy. Morphology. Trace elements. Phytotoxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

Os elementos-traço, como o Cd, estão presentes naturalmente nos solos, em concentrações variáveis de acordo com a sua gênese. A capacidade das plantas em absorver esse elemento-traço pode sofrer interferência de fatores como concentração e biodisponibilidade, os quais são determinados pelo teor de matéria orgânica presente no solo, pH, temperatura, bem como a presença de outros elementos (SANITÁ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999), dentre outros fatores.

Quando absorvido, o Cd pode interferir no desenvolvimento normal das plantas, inibindo uma variedade de processos fisiológicos e bioquímicos. A toxidez deste elemento interfere principalmente na síntese e degradação de pigmentos ligados à fotossíntese, como clorofilas e carotenoides causando mudanças na estrutura dos cloroplastos e no arranjo dos tilacoides (CHOUDHURY; PANDA, 2004; KLAUBERG-FILHO et al., 2005; VITÓRIA; CUNHA; AZEVESO, 2006).

Algumas plantas possuem mecanismos de proteção contra fitotoxidez dos elementos-traço. Entre eles, cita-se a complexação e a quelação, para que possa ocorrer o transporte e a compartimentalização desses elementos em organelas e células específicas (e.g. tricomas, vacúolos), visando à desintoxicação e evitando injúrias em todo o metabolismo das plantas (TIAN et al., 2010).

Nos últimos anos, progressos significativos têm sido alcançados no que diz respeito ao entendimento do acúmulo de elementos-traço nos vegetais, particularmente no tocante à absorção pelas raízes e à translocação para a parte aérea. Uma ferramenta importante e avançada tem sido a microscopia eletrônica, que tem possibilitado verificar essas alterações morfológicas dos vegetais e tem-

se mostrado promissora no estudo da compartimentalização dos elementos-traço nas plantas.

Uma das técnicas de microscopia utilizada é a microscopia eletrônica de transmissão (MET), que foi introduzida na pesquisa por volta de 1950 e trouxe contribuições marcantes ao mostrar detalhes jamais visualizados na área biológica. A biológica celular sofreu marcante revolução quando a ultraestrutura celular foi revelada em toda a sua exuberância, não só mostrando os detalhes das poucas organelas conhecidas (membrana plasmática, núcleo, cloroplasto, mitocôndria, p.ex.), mas também permitindo a descoberta de uma série de outros componentes (ribossomos, microtúbulos, peroxissoma, glicocalix, etc) (ALVES; PERINA, 2012).

Visando analisar na MET as alterações morfológicas causadas nas células vegetais pelo Cd, no presente estudo, objetivou-se observar alterações ultraestruturais nas plantas de milho e feijão cultivadas em diferentes concentrações de Cd em um Latossolo e um Cambissolo.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Lavras - UFLA, na cidade de Lavras – MG (44° 55' W; 21° 05' S). Foram selecionadas duas classes de solo consideradas representativas do Estado de Minas Gerais, Latossolo e Cambissolo. Os solos utilizados foram classificados como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico textura média a moderado e Cambissolo Háptico Tb distrófico típico a moderado, ambos da fase floresta tropical subperenifólia. Esses solos foram considerados limpos quando a contaminação de cádmio, segundo a legislação vigente (Fundação Estadual do Meio Ambiente - FEAM, 2011), ou seja, que apresentassem VRQ < 0,4 mg kg<sup>-1</sup> de peso seco para cádmio, determinado por digestão com ácido nítrico concentrado em forno micro-ondas (USEPA 3051A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA).

Realizou-se a caracterização química e física destes solos (Tabelas 1 e 2) e posteriormente foi realizada a adubação e correção de acordo com as recomendações da 5ª aproximação (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999), levando em consideração as especificidades de cada espécie utilizada no experimento. Foram adicionadas diferentes doses de nitrato de cádmio - Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.4(H<sub>2</sub>O). (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4 mg kg<sup>-1</sup> de solo seco), por meio de solução. Para a determinação das concentrações, foram usados como parâmetro os Valores Orientadores estabelecidos pela resolução 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2009). Como sugestão da normativa da OECD-208, os valores utilizados nesse experimento são múltiplos de 1,8.

Tabela 1 Fertilidade do Latossolo e Cambissolo

Solos	pH	K	P	Ca	Mg	Al	CTC ef	V	MO
Latossolo	4,8	32	1,13	0,3	0,1	0,6	1,08	9,64	1,64
Cambissolo	5,3	34	2,60	1,6	0,4	0,5	2,59	34,05	2,87

pH em água relação 1:25; P, K: Extrator Mehlich 1; S: Extrator fosfato monocálcico em ácido acético; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup>: Extrator KCl 1 mol<sup>-1</sup>; H + Al: Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,0; MO: Oxidação Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N; SB: Soma de Bases; CTCef.: Capacidade de troca catiônica efetiva; V: Índice de saturação de bases; MO: Matéria orgânica.

Tabela 2 Textura do Latossolo e Cambissolo

Solos	Argila	Textura	
		Silte	Areia
		----- % -----	
Latossolo	24	12	64
Cambissolo	31	22	47

Foram selecionadas uma espécie de monocotiledônea (*Zea mays*) e uma eudicotiledônea (*Phaseolus vulgaris*), consideradas sensíveis de acordo com a lista da ISO 11.269-2 (International Standard Organization - ISO, 2013).

O estudo constituiu-se de dois experimentos distintos. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial (7×4)+3, ou seja, para cada classe de solo, 7 doses de Cd, 4 espécies de plantas com três repetições e três controles para cada espécie. Cada unidade experimental constituiu-se de um vaso contendo 500g de solo onde foram semeadas 20 sementes. A umidade foi mantida entre 50 e 60% da capacidade de campo. O experimento teve duração de 21 dias após a germinação de 50% do controle de acordo com as recomendações da Organisation for Economic Co-Operation and Development - OECD (2006). Após esse período, através de comparações de aspectos visuais, foi observada, para ambos os solos, a concentração que mais

afetou as espécies. Dessas concentrações mais o controle, para fim de comparação, foram realizadas análises ultraestruturais.

## 2.1 Microscopia eletrônica de transmissão

As análises de microscopia eletrônica de transmissão (ultraestruturais), foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do Departamento de Fitopatologia da UFLA. Foram coletados fragmentos de 0,5 cm<sup>2</sup>, imersos em solução fixadora [2,5% glutaraldeído e 2,5% paraformaldeído em tampão cacodilato 0,05M (pH 7,0) + CaCl<sub>2</sub> 0,001M]. Após a pré-fixação as amostras foram cortadas em fragmentos de 1mm<sup>2</sup>, lavadas em solução tampão fosfato por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em solução tampão cacodilato 0,05M por 1-2 horas. Em seguida, foram lavados por três vezes em água destilada e colocados em solução a 0,5% de acetato de uranila durante 12 horas a 4°C. Após esse período foram novamente lavadas em água destilada por três vezes e desidratados em gradiente de acetona (25, 30, 40, 50, 70, 80, 85, 90 e 95% por 10 minutos e três vezes de 10 minutos em 100%). Logo após, o material foi incluído em gradiente crescente de acetona e resina *Spurr* 30% por 8 horas, 70% por 12 horas e 100%, duas vezes por 24 horas cada e polimerizado em estufa a 70°C por 8 horas. Após esse período, os blocos de resina, contendo as amostras, passaram pelo processo de desbaste para retirar o excesso de resina e em seguida foram obtidas seções ultrafinas (<100nm) usando-se um ultra micrótomo modelo Leica MT-Ultracut, com o auxílio de navalha de diamante. Os cortes foram coletados em tela de cobre e contrastados em acetato de uranila 2%, seguido por citrato de chumbo 0,2% por três minutos cada, e, após a secagem, examinados em microscópio eletrônico de transmissão (MET) Zeiss EM 109 a 80kv.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando observadas no microscópio eletrônico de transmissão (MET), as células do parênquima esponjoso, das amostras do controle de feijão cultivadas no Latossolo apresentaram grande quantidade de cloroplastos e grãos de amido (Figuras 1A e 1D). Os cloroplastos moldam a morfologia celular e possuem estrutura mais alongada. Estas células são envolvidas por uma fina parede celular (Figura 1B) constituída por microfibrilas concêntricas de celulose, núcleo central (Figura 1C) com a mesma eletro-densidade aparente, embebidas em uma matriz amorfa eletro-transparente (Figura 1A).

Ao analisar as células das plantas de feijão cultivadas por 21 dias em solo com concentração de  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd, as mesmas apresentaram alterações na organização dos seus constituintes quando comparadas ao controle. Foi observado o aumento da espessura da parede celular e de pontuações com maior eletro-densidade (Figuras 2A e 2D) e o aparecimento de inúmeras vesículas de degradação (Figura 2E). Os núcleos estavam reduzidos e as mitocôndrias estavam com aspecto desuniforme e eletro-densas (Figura 1F). Algumas células apresentaram apoptose, enquanto em outras, foi possível observar a ruptura da parede celular (Figura 2C). Em relação aos cloroplastos destas células, ocorreu redução na quantidade e no tamanho e os tilacoides sofreram alterações estruturais significativas e variações no empilhamento.

As pontuações escuras encontradas na parede celular, provavelmente, são devidas a uma das formas de absorção do Cd pelas células, que é através de canais de cálcio e potássio (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002). O Cd possui afinidade pelo mesmo sítio de absorção do Ca, e por consequência, é possível que tenha ocorrido a imobilização deste elemento nas paredes celulares (GREGER; LÖFSTEDT, 2004; WAISBERG et al., 2003).

A redução do número de cloroplastos observada pode ser justificada pela influência direta do Cd em enzimas relacionadas à biossíntese de clorofilas, o que implica na alteração do tamanho e redução no número de cloroplastos por célula das plantas expostas a este metal (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; GODBOLD; HUTTERMAN, 1985). Já Kurdziel, Prasad e Strzalka (2004) afirmam que a interferência do Cd está mais relacionada ao decréscimo na replicação e divisão celular do cloroplasto do que com a interação direta entre o Cd e a biossíntese de clorofila.

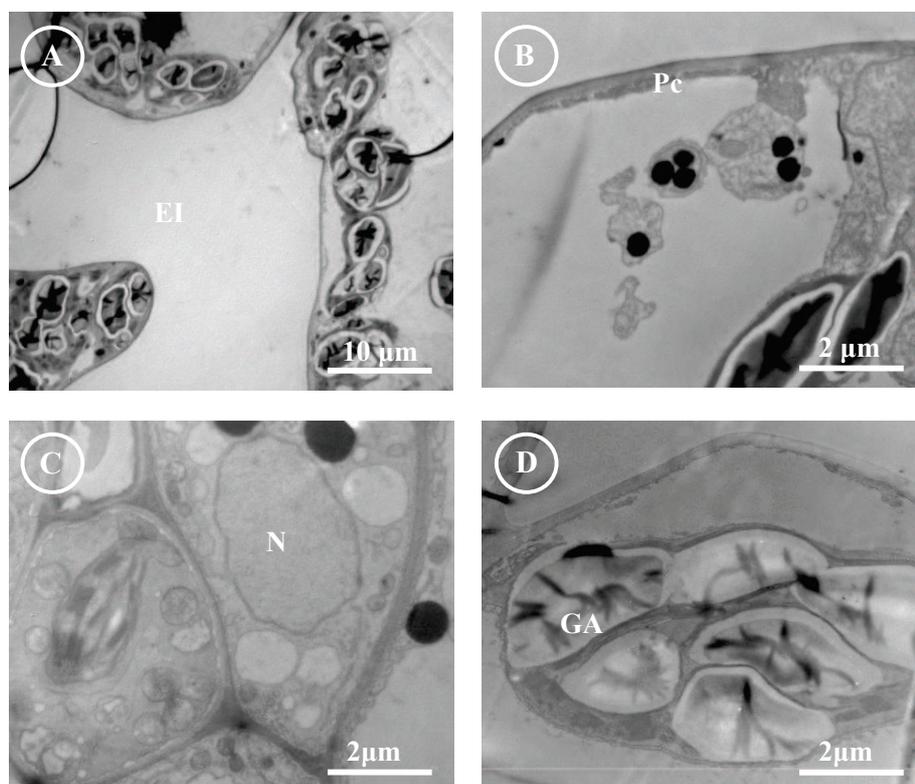


Figura 1 Eletromicrografia de transmissão de *Phaseolus vulgaris* mostrando as células do mesofilo cultivadas sem condições de estresse no Latossolo (controle)

Legenda: EI = espaço intracelular. GA = grão de amido, Pc = parede celular, N = núcleo.

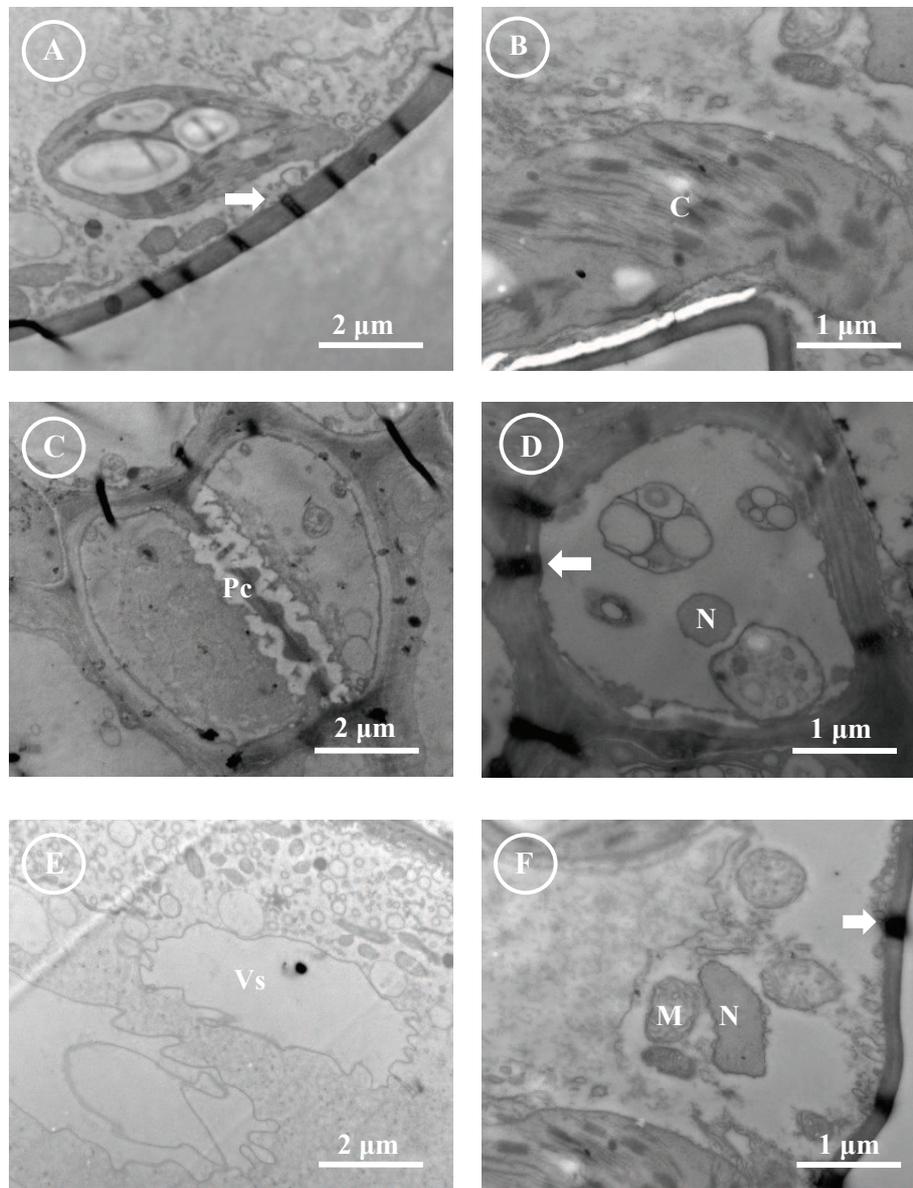


Figura 2 Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesofilo de *Phaseolus vulgaris* cultivados na concentração de 13,6 mg kg<sup>-1</sup> de Cd no Latossolo

Legenda: Vs = vesículas, C = cloroplastos, M = mitocôndrias, Pc = parede celular, Setas = material eletro-denso.

Outros autores também já observaram que as folhas de plantas expostas a Cd sofrem distorções nos tilacoides, desorganizações do grana, diminuição dos espaços intercelulares e das células do mesofilo. (ARAVIND; PRASAD, 2005; DJEBALI et al., 2005; GRATÃO et al., 2005; SANDALIO et al., 2001).

A diminuição do acúmulo de grão de amido em cloroplastos de células cultivadas sob estresse de elementos-traço, assim como observada neste experimento para o feijão cultivado em Latossolo, também já foi observada por outros autores. Azzarello et al. (2012) avaliaram o efeito de doses de Zn (100 a 5000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em solução nutritiva na fisiologia e análises ultraestrutural de *Paulownia tomentosa* (kiri japonês) e observaram a redução de grãos de amido no cloroplasto e em volta do núcleo.

As diferentes espécies de plantas podem apresentar comportamento diferenciado quanto às modificações ultraestruturais das células, sendo as alterações específicas para cada elemento-traço e independente das concentrações com que as plantas são tratadas (SHI; CAIA, 2009). Observações diferenciadas foram encontradas nas células do tratamento controle de plantas de milho cultivadas em Latossolo, observadas em MET, onde nota-se grandes quantidades de cloroplastos, alguns com presença de grãos de amido e empilhamento das tilacoides característico. A parede celular em sua maioria era constituída por uma fina espessura e uma eletro-densidade uniforme. Os espaços intracelulares apresentaram aspectos amorfos e elétron-transparentes.

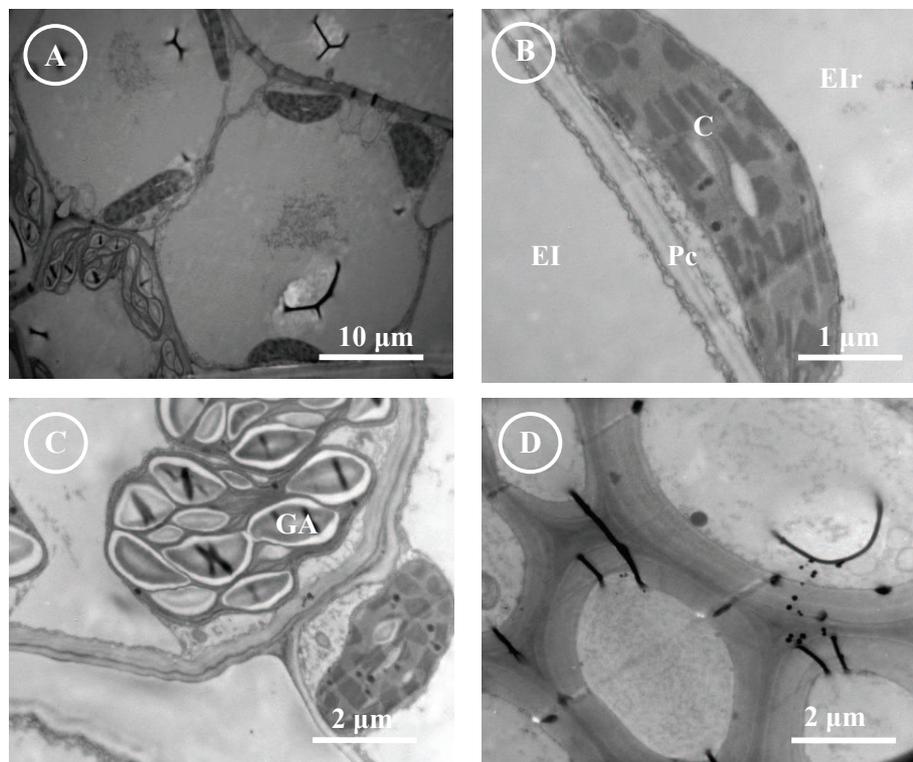


Figura 3 Eletromicrografia de transmissão de *Zea mays* mostrando as células do mesofilo cultivadas sem condições de estresse no Latossolo (controle)

Legenda: EIr = espaço intercelular, EI = espaço intracelular. GA = grão de amido, Pc = parede celular, C = cloroplasto.

Ao comparar a mesma espécie, mas que foi cultivada durante 21 dias na concentração de  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd no solo, foi observado aumento dos vacúolos, grande quantidade de vesículas de degradação (Figura 4A), maior número de plastídeos e redução do número e alterações das membranas das mitocôndrias. Mas em algumas células ainda foram observados alguns cloroplastos com grãos de amido, porém em menor quantidade e em tamanho reduzido quando comparados ao controle (Figura 4D). Ainda nas células deste tratamento, foram observadas pontuações escurecidas na parede celular (Figura

4.B) e, principalmente, aumento de materiais eletro-densos no espaço intercelular acumulados próximos à lamela média (Figura 4C).

Um dos efeitos conhecidos do Cd é a alteração na permeabilidade das membranas das mitocôndrias (LÖSCH, 2004), como foi observado no presente trabalho. Este estresse oxidativo pode causar variações no metabolismo da planta, pois essas alterações nas membranas mitocondriais reduzem o gradiente protônico e a geração de ATP. Um dos mecanismos de tolerância existente é a mudança no metabolismo do carbono para suprimento da demanda energética, com o aumento da rota glicolítica (NOCITO et al., 2008; SARRY; KUHN, 2006).

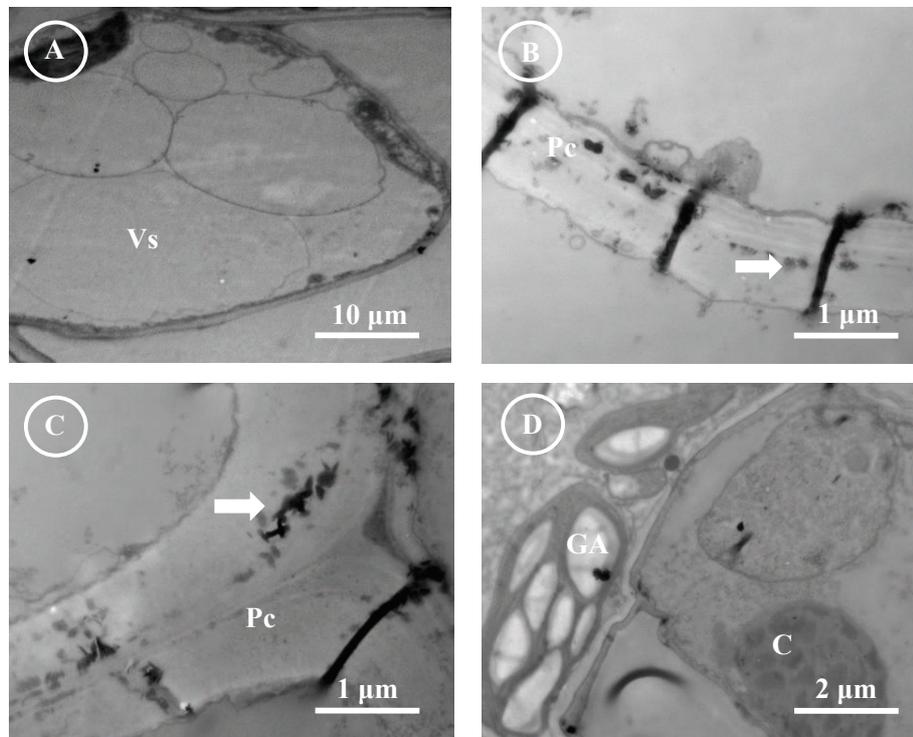


Figura 4 Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesófilo de *Zea mays* cultivados na concentração de  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd no Latossolo

Legenda: Vs = vesículas, C = cloroplastos, GA = grão de amido, Pc = parede celular, Setas = material eletro-denso.

A concentração de material eletro-denso, muito provavelmente, pode ser acúmulo do elemento-traço, pois a lamela média é constituída quimicamente por pectatos de Ca e Mg e como se sabe, o Cd compete pelo mesmo sítio de absorção que o Ca, (DONG; WU; ZHANG, 2006), podendo ser a explicação para esse material ter sido encontrado na amostra do tratamento, o que não foi observado na amostra do controle.

Pelas análises ultraestruturais obtidas através do MET, notou-se que as plantas de feijão sofreram maiores danos celulares, tanto nos componentes

protoplasmáticos e não protoplasmáticos, do que as plantas de milho cultivadas na concentração de  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd. Como esses componentes são responsáveis pelas funções vitais das células, a ausência do correto funcionamento destas organelas gerou danos às plantas e, portanto, podemos concluir que nessas condições o feijão tolerou melhor o estresse do Cd quando comparado ao milho.

Ao analisar as células das plantas de feijão do tratamento controle cultivadas no Cambissolo, assim como no Latossolo, as células e suas estruturas apresentaram aspectos aparentemente normais (Figura 5), com grande número de cloroplastos por célula (Figura 5A), muitos deles com grãos de amido e membranas com espessura fina (Figura 5B). Tanto o espaço intercelular e intracelular apresentaram características eletro-densas translúcidas e uniformes.

Ao comparar as células do controle, com as cultivadas por 21 dias em concentração de  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd no solo, foi observado o aumento do espessamento da parede celular (Figura 6A e 6F) e inúmeras vesículas de degradação (Figura 6D). Essas vesículas demonstram que as células estavam em processo de apoptose, que normalmente ocorre quando as células não sofrem autólise e estão sob alguma condição severa de estresse. Mas, em algumas células foi observada a lise.

Como pode ser observado na Figura 6, foi encontrado um acúmulo de material eletro-denso em forma de pontuações, semelhante aos das células de feijão e milho cultivadas na dose de  $13,6 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd no Latossolo (Figuras 2 e 4). Essas pontuações na parede celular, muito provavelmente, são de acúmulo de Cd, que foi aderido pelo sítio de absorção do Ca. Houve também redução do número de cloroplastos, alterações no empilhamento dos tilacoides e interferência nas membranas das mitocôndrias.

No entanto, foi observada uma alteração diferente que não foi vista nas plantas de feijão cultivadas em Latossolo. Nos feixes vasculares, foram

encontrados corpos mais eletro-densos e com morfologia que muito provavelmente indica que não pertencem às células (Figuras 6B e 6C). Possivelmente, trata-se de uma complexação intercelular (quelação), que é um dos mecanismos mais importantes, na detoxificação para a tolerância do estresse ao Cd (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

A síntese das fitoquelatinas (PC) é rapidamente induzida após a exposição a elementos-traço, sendo que o Cd é o indutor mais forte desta acumulação. As PC são sintetizadas enzimaticamente a partir da GSH e catalizadas pelas enzimas PCS (sintetase de fitoquelatinas) (GRILL; WINNACKER; ZENK, 1987; MAITANI et al., 1996). Essas PC associadas ao Cd no citossol poderiam estar transportando o Cd para o vacúolo para formação de cristais e anulação do efeito tóxico (CLEMENS, 1999).

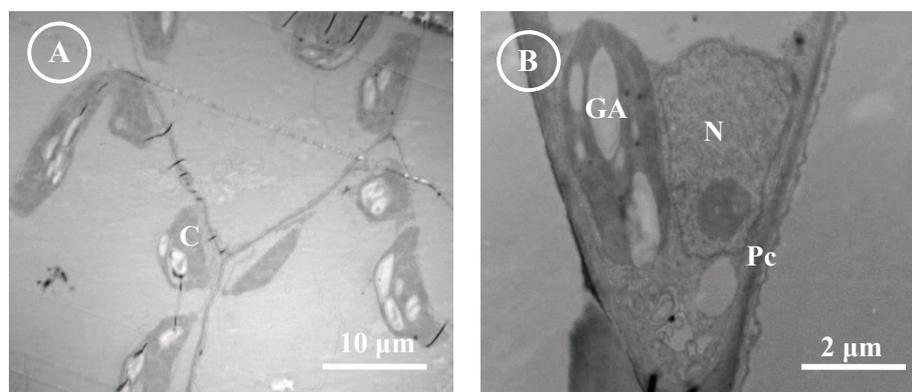


Figura 5 Eletromicrografia de transmissão de *Phaseolus vulgaris* mostrando as células do mesofilo cultivadas sem condições de estresse no Cambissolo (controle)

Legenda: C = cloroplasto, GA = grão de amido, Pc = parede celular, N = núcleo

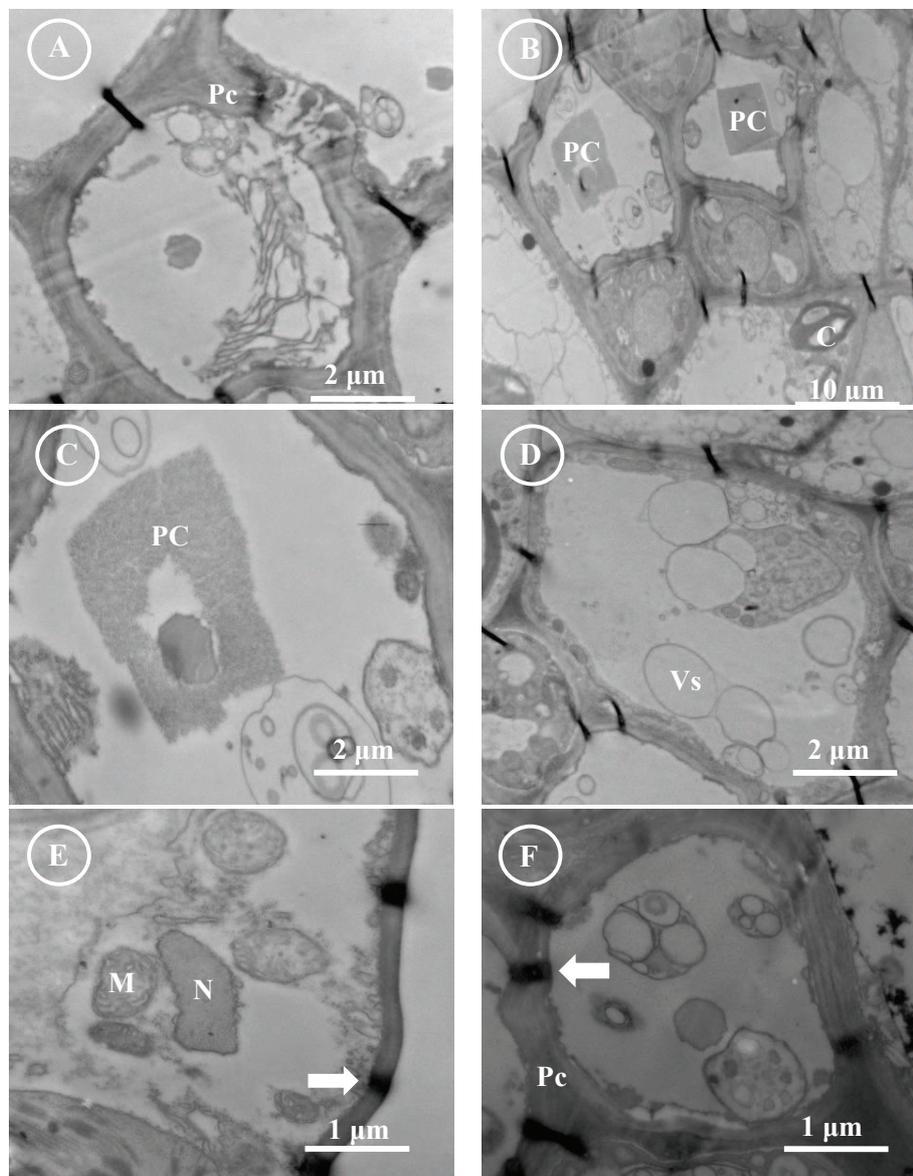


Figura 6 Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesofilo de *Phaseolus vulgaris* cultivados na concentração de  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de Cd no Latossolo

Legenda: Vs = vesículas, C = cloroplastos, GA = grão de amido, Pc = parede celular, N = núcleo, M = mitocôndria, PC = fitoquelatinas, Setas = material eletrodense.

O uso deste mecanismo de defesa, formação das PC, pode ser a explicação plausível para as plantas de feijão cultivadas em Cambissolo terem apresentado melhor crescimento e desenvolvimento quando comparadas às plantas de feijão cultivadas em Latossolo com a mesma concentração de Cd.

Ao avaliar as plantas de milho cultivadas no tratamento controle do Cambissolo (Figura 7), foi observada grande semelhança com o controle do milho no Latossolo (Figura 3). As células apresentaram espessamento fino da parede celular (Figuras 7A e 7B), grande número de cloroplasto por células e empilhamento dos tilacoides aparentemente normal (Figura 7A). Nas células do sistema vascular foram observadas poucas vesículas e de tamanho reduzido.

Na concentração de  $24,4 \text{ mg kg}^{-1}$ , as plantas de milho apresentaram comportamento semelhante a essa mesma espécie cultivada sob condições de estresse de Cd no Latossolo. Houve redução do número e no tamanho dos cloroplastos das células (Figura 8A), pontuações mais eletro-densas na parede celular (Figuras 8B E 8D) e inúmeras vesículas de degradação (Figuras 8C E 8D), demonstrando que as células estão sob condições de estresse.

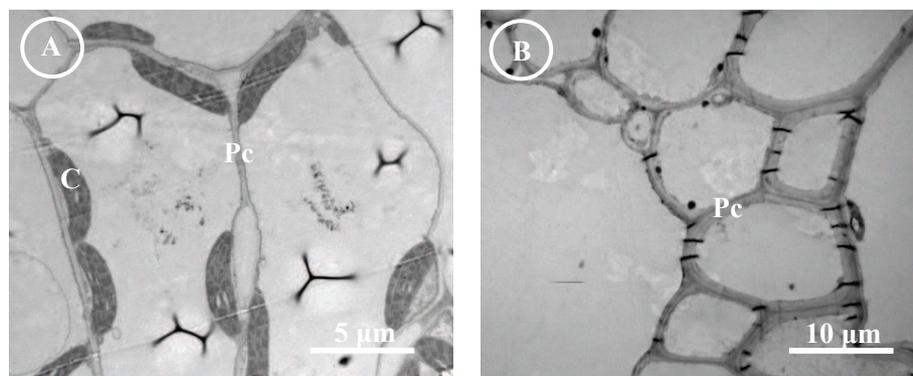


Figura 7 Eletromicrografia de transmissão de *Zea mays* mostrando as células do mesófilo cultivadas sem condições de estresse no Cambissolo (controle)

Legenda: C = cloroplasto, Pc = parede celular.

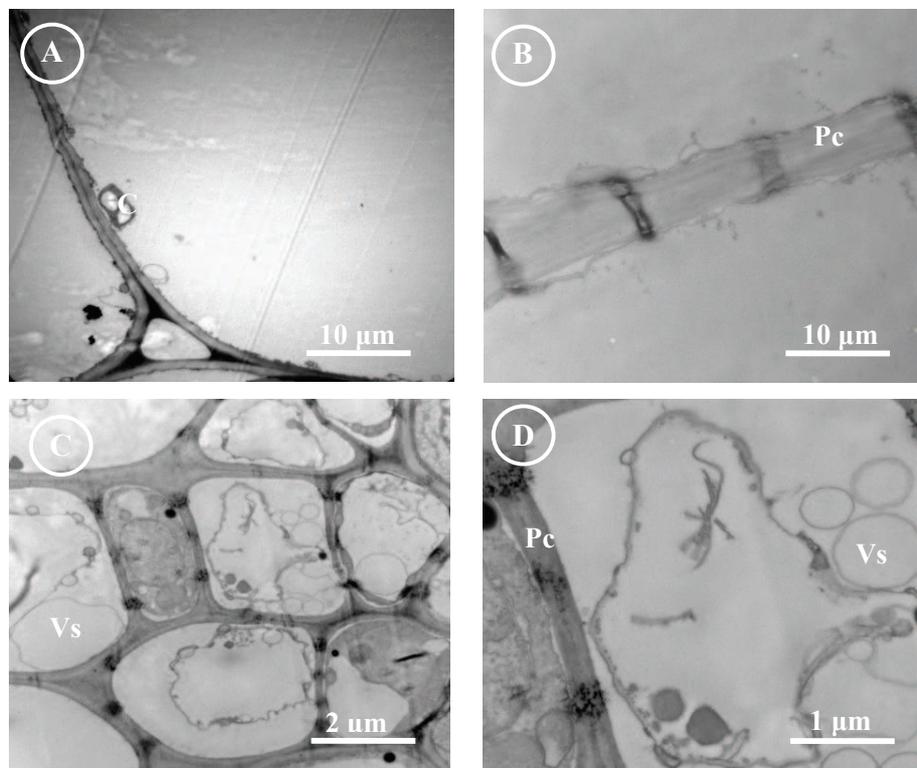


Figura 8 Eletromicrografia de transmissão mostrando células do mesofilo de *Zea mays* cultivados na concentração de 24,4 mg kg<sup>-1</sup> de Cd no Latossolo

Legenda: Vs = vesículas, C = cloroplastos, Pc = parede celular, Vs = vesícula, Setas = material eletro-denso.

#### **4 CONCLUSÃO**

Ao serem submetidas ao estresse causado pelo Cd, as plantas de milho e feijão cultivadas em Latossolo e Cambissolo apresentaram alterações e degradações nas organelas das células do mesofilo. Possivelmente, há acúmulo deste elemento-traço na parede celular.

Nas plantas de feijão cultivadas no Cambissolo, observa-se que o Cd pode ter complexado com as fitoquelatinas e estar em processo de formação de cristais, como um mecanismo de tolerância.

## REFERÊNCIAS

ALVES, E.; PERINA, F. J. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de transmissão**. Lavras: UFLA, 2012. 52p. Apostila.

ARAVIND, P.; PRASAD, M.N.V. Cadmium-zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Londrina, v.17, p.3-5, Jan./Mar.2005.

AZZARELLO, E. et al. Ultramorphological and physiological modifications induced by high zinc levels in *Paulownia tomentosa*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 81, p. 11-17, Sept. 2012.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 17, n. 1, p. 21-34, Jan./Mar. 2005.

CHOUHDURY, S.; PANDA, S. K. Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Scwaegr.) Broth under chromium and lead phytotoxicity. **Water Air & Soil Pollution**, Pequim, v. 167, p. 73-90, Jan.2004.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, Berlin, v.212, p.475-486, Mar.1999.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual Reviews Plant Physiology**, Palo Alto, v.53, p.159-182, June 2002.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

DJEBALI, W. et al. Ultra-structure and lipid alterations induced by cadmium in tomato (*Lycopersicon sculentum*) chloroplast membranes. **Plant Biology**, Stuttgart, v.7, p.358-368, May2005.

DONG, J.; WU, F. B.; ZHANG, G. P. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 64, p. 1659-1666, Feb. 2006.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2011. 4 p.

GODBOLD, D.L.; HUTTERMANN, A. Effect of zinc, cadmium and mercury on root elongation of *Picea abies* (Karst.) seedlings and the significance of these metals to forest dieback. **Environmental Pollution**, Barking, v. 38, p. 509-516, June 1985.

GRATÃO, P.L. et al. Making the life of heavy metal stressed plants a little easier. **Functional plant Biology**, Victoria, v.32, p.481-494, June 2005.

GREGER, M.; LÖFSTEDT, M. Comparison of uptake and distribution of cadmium in different cultivars of bread and durum wheat. **Crop Science**, Madison, v. 44, n. 2, p. 501-507, Mar. 2004.

GRILL, E.; WINNACKER, E. L.; ZENK, M.H. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants are functionally analogous to metallothioneins. **The Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v.84, p.439-443, Jan.1987.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 2013. 28 p.

KLAUBERG FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 85-144.

KURDZIEL, B. M.; PRASAD, M. N. V.; STRZALKA, K. Photosynthesis in heavy metal stressed plants. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants**: from biomolecules to ecosystems. 2<sup>nd</sup> ed. New Delhi: Springer, 2004. p. 146-181.

LOSCH, R. Plant mitochondrial respiration under the influence of heavy metals. In: PRASAD, M.N.V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2<sup>nd</sup>ed. New Delphi: Springer, 2004. p. 182-200.

MAITANI, T. et al. The composition of metals bound to class III thiolthionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. **Plant Physiology**, Bethesda, v.110, n. 32, p.1145-1150, Apr. 1996.

NOCITO, F.F. et al. Cadmium induces acidosis in maize root cells. **Phytologist**, London, v. 179, n. 3, p. 700-711, June2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n° 208: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test**. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

PERFUS-BARBEOCH, L. et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Planta**, Berlin, v. 32, p. 539-548, Nov. 2002.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359 p.

SANDALIO, L.M. et al. Cadmium-induce changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, July2011.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GRABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 41, p. 105-130, July 1999.

SARRY, J. E. et al. The early responses of *Arabidopsis thaliana* cells to cadmium exposure explored by protein and metabolite profiling analysis. **Proteomics**, Weinheim, v.6, p.2180-2198, Apr.2006.

SHI, G.; CAIA, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 67, n. 1, p. 112-117, Mar. 2009.

TIAN, S. K. et al. Cellular sequestration of cadmium in the hyperaccumulator plant species *Sedum alfredii*. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 157, p. 1914-1925, Dec. 2010.

VITÓRIA, A. P.; CUNHA, M.; AZEVEDO, R. A. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 58, p. 47-52, Dec. 2006.

WAISBERG, M. et al. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. **Toxicology**, Limerick, v.192, p.95-117, Nov.2003.

## **CAPÍTULO 5 Derivação do valor de prevenção de Cd para os solos de Minas Gerais**

### **RESUMO**

Os Valores de Prevenção (VP) para o solo são estipulados com base na adição limite de elementos-traço, que não comprometa a qualidade de suas funções. Esses valores são instrumentos para o gerenciamento ambiental, visando a proteção do solo. A resolução 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (2009) deliberou sobre a adoção dos valores de prevenção do Estado de São Paulo para todos os Estados do Brasil por cinco anos, prazo para que todos os Estados estabelecessem os próprios valores. Minas Gerais ainda não possui o valor de prevenção para Cd estabelecido. Diante disso, objetivou-se neste trabalho realizar testes de ecotoxicidade com plantas e gerar subsídios para a determinação do valor de prevenção para Cd para solos do Estado de Minas Gerais. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Universidade Federal de Lavras. Os testes foram realizados com quatro espécies consideradas sensíveis (arroz, feijão, milho e rabanete) a elementos-traço. As plantas foram submetidas a diferentes doses de Cd (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4 mg kg<sup>-1</sup>) por 21 dias. Foram avaliados os parâmetros de germinação, análise de crescimento, trocas gasosas e florescência. De posse desses resultados, foi calculada a concentração efetiva que causa danos a 50% dos organismos (EC50) e a partir deles foram derivados os valores de concentração perigosa para 5% dos organismos testados (HC5). Ao HC5 foi adicionado o valor de referência de qualidade (VRQ) de Cd para Minas Gerais e obtido o valor de prevenção. Foram encontrados os valores para Latossolo, Cambissolo e ambos os solos, de 2,55; 10,75 e 3,05 mg kg<sup>-1</sup> em solo seco, respectivamente. Acredita-se que as variações desses valores são relacionadas principalmente aos atributos do solo, pois são eles que determinam a fração disponível do elemento-traço no solo. Os resultados encontrados podem servir como subsídio para o órgão ambiental de Minas Gerais determinar o valor de prevenção de Cd para o Estado. Mas acredita-se que seja importante estudos ecotoxicológicos e derivação de VP's para cada classe de solo, assim como foi realizado neste estudo para Latossolo e Cambissolo (2,55 mg kg<sup>-1</sup> e 10,75 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Esta divisão por classe de solo possibilitaria que a fiscalização e as medidas de precaução pudessem ser realizadas com valores específicos das características de cada solo. Para que os valores possam ser representativos é necessário que os protocolos sejam mais bem elaborados e que se utilize uma maior quantidade de parâmetros para o cálculo, a fim de se aumentar a sensibilidade dos resultados.

Palavras-chave: Elementos-traço. Ecotoxicidade. Valores orientadores. Fitotoxicidez.

### ABSTRACT

Soil prevention values (PV) are stipulated based on limited additions of trace elements to the soil in order not to compromise soil quality and function. These values are instruments for risk management, aiming at soil protection. The Brazilian National Environmental Council, in its CONAMA 420-2009 directive, deliberated the adoption of the prevention values initially set for the State of São Paulo for all Brazilian states for five years, until all states could establish their own. Minas Gerais does not yet present an established prevention value for Cd. Therefore, this work performed ecotoxicity tests with plants aiming to generate subsidies that could contribute for the determination of prevention value for Cd in soils from the state of Minas Gerais. The experiment was conducted in a greenhouse at the Universidade Federal de Lavras, and the tests performed with four species considered sensitive (rice, bean, corn and radish) to trace elements. The plants were submitted to different Cd doses (0.4; 0.72; 1.29; 2.3; 4.1; 13.6; 24.4 mg kg<sup>-1</sup> for 21 days. We evaluated germination, growth analysis, gas exchanges and fluorescence parameters. With these results, we calculated the effective concentration which causes damage to 50% of the organisms (EC50) and, from these, were derived hazardous concentration values for 5% of the tested organisms (HC5). After that we added the Cd quality reference value (QRV) for Minas Gerais to the HC5 in order to obtain the prevention value. We found the values of 2.55; 10.75 and 3.05 mg kg<sup>-1</sup> of dry soil for the Oxisol, the Inceptisol and both soils, respectively. We believe that the variations of these values are mainly related to the soil's attributes affecting the available fraction of Cd in the soil. The results found may serve as a subsidy for helping the environmental agency of Minas Gerais to determine the state prevention value for Cd in the soil. It is important to perform ecotoxicological studies and PV derivation for each soil class, as was performed in this study for an Oxisol and an Inceptisol (2.55 mg kg<sup>-1</sup> and 10.75 mg kg<sup>-1</sup>, respectively). This division by soil class could allow monitoring and mitigation measures to be set specifically by soil type. In addition, for setting more robust prevention values, we suggest the use of a larger amount of calculation parameters in order to increase the sensitivity of the results.

Keywords: Trace elements. Ecotoxicity. Soil Screening values. Phytotoxicity.

## 1 INTRODUÇÃO

Reconhecendo-se as dimensões continentais do Brasil e a diversidade de ambientes de formação de solos, deve-se ter em mente a grande variabilidade natural dos teores de elementos-traço em diferentes ecossistemas. Esses teores, mesmo elevados, muitas vezes não caracterizam contaminação ambiental, mas sim refletem as características intrínsecas do ambiente. Verifica-se, portanto, a necessidade de proposição de valores de referência de qualidade para elementos-traço que sejam representativos e específicos para cada região (HUGEN, 2010).

Até recentemente existia uma atitude generalizada de subestimar os riscos de poluição do solo, observada pela falta de políticas e de ações voltadas para sua proteção (COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO - CETESB, 2001). As legislações atualmente em elaboração são de caráter preventivo e visam estabelecer critérios para ocupação do solo que evitem as perdas de suas funções.

Os valores preventivos foram caracterizados para evitar que o solo se torne uma área contaminada e referem-se a um limite de adição de metais no solo, independentemente do seu motivo de deposição. Tais valores são derivados de estudos de ecotoxicidade para elementos-traço, uma vez que, os contaminantes, quando presentes na solução do solo, podem ser absorvidos pelas plantas (CETESB, 2001).

O Brasil adotou os valores de referência, inclusive o de prevenção, estabelecidos para o Estado de São Paulo, através da resolução CONAMA 420 de 2009, por um período de cinco anos, tempo para que os estados brasileiros estabeleçam seus próprios valores de referência (CONAMA, 2009). O fato de os teores naturais de elementos-traço estarem ligados diretamente ao material de origem e aos processos pedogenéticos faz com que a extrapolação de valores de

referência para áreas diferentes daquelas utilizadas para a obtenção dos dados se torne um procedimento inadequado (BIONDI et al., 2011).

Portanto, vê-se a necessidade de desenvolver trabalhos buscando a determinação de valores de prevenção específicos para cada região. Isto permitirá demonstrar um manejo adequado, sustentável e que possa contribuir tanto na produtividade, quanto na melhoria da qualidade dos produtos agrícolas, assim como determinar a ocorrência de contaminação por esses elementos em áreas agricultáveis.

Alguns elementos-traço são considerados essenciais por exercerem função biológica, enquanto outros não o são. O Cd é considerado um elemento-traço não essencial. Os seus efeitos tóxicos interferem no funcionamento das plantas, da biota do solo, afetando a produtividade e a sustentabilidade dos ecossistemas e, inclusive, ameaçam a saúde humana (KLAUBERG-FILHO et al., 2005; RODRIGUES, NALINI JÚNIOR, 2009). Apesar da alta toxicidade do Cd, ainda não são encontrados estudos de valores de prevenção para esse elemento para os solos do Estado de Minas Gerais.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho realizar testes de ecotoxicidade com plantas e, através de parâmetros fisiológicos, obter embasamento e gerar subsídios para a determinação do valor de prevenção para o Estado de Minas Gerais.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciências do Solo da Universidade Federal de Lavras/UFLA em Lavras-MG (44° 55' W; 21° 05' S), segundo as recomendações da Resolução CONAMA 420 de 2009, ISO 11.269-2 e OECD-208. Foram selecionadas duas classes de solo do Estado de Minas Gerais consideradas representativas, classificadas como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico textura média a moderado e Cambissolo Háplico Tb distrófico típico a moderado, ambos da fase floresta tropical subperenifólia. Estes solos são considerados limpos quanto ao Cd, ou seja,  $VRQ < 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$  de peso seco (Fundação Estadual do Meio Ambiente - FEAM, 2011), determinada por digestão com ácido nítrico concentrado em forno micro-ondas (USEPA 3051A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA).

Após a caracterização química e física dos solos, foi realizada a adubação e correção (Tabela 1 e 2) segundo as recomendações da 5ª aproximação (RIBEIRO; GUIMARÃES; ALVAREZ, 1999) segundo as especificidades de cada espécie utilizada neste experimento. Foram adicionadas diferentes doses de nitrato de cádmio -  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$  - (0,4; 0,72; 1,29; 2,3; 4,1; 13,6; 24,4  $\text{mg kg}^{-1}$ ) por meio de solução. As doses foram determinadas utilizando como parâmetros os valores orientadores já estabelecidos pela resolução 420 do CONAMA (2009), que tomou como referência os valores para os solos de Estado de São Paulo determinados pela CETESB. Os valores estabelecidos para este experimento são múltiplos de 1,8 conforme sugestão da normativa da Organisation for Economic Co-Operation and Development - OECD (2006).

Tabela 1 Fertilidade do Latossolo e Cambissolo

Solos	pH	K	P	Ca	Mg	Al	CTC <sub>ef</sub>	V	MO
Latossolo	4,8	32	1,13	0,3	0,1	0,6	1,08	9,64	1,64
Cambissolo	5,3	34	2,60	1,6	0,4	0,5	2,59	34,05	2,87

pH em água relação 1:25; P, K: Extrator Mehlich 1; S: Extrator fosfato monocálcico em ácido acético; Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Al<sup>3+</sup>: Extrator KCl 1 mol<sup>-1</sup>; H + Al: Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L<sup>-1</sup>, pH = 7,0; MO: Oxidação Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N; SB: Soma de Bases; CTC<sub>ef</sub>: Capacidade de troca catiônica efetiva; V: Índice de saturação de bases; MO: Matéria orgânica.

Tabela 2 Textura do Latossolo e Cambissolo

Solos	Argila	Textura	
		Silte	Areia
		----- % -----	
Latossolo	24	12	64
Cambissolo	31	22	47

Foram selecionadas duas espécies de monocotiledôneas (*Zea mays*, *Oryza sativa*) e duas eudicotiledôneas (*Phaseolus vulgaris*, *Raphanus sativus*) consideradas sensíveis de acordo com a lista da ISO 11.269-2 (International Standard Organization - ISO, 2013).

O estudo constituiu-se de dois experimentos distintos. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (7×4)+3, ou seja, para cada classe de solo, 7 doses de Cd, 4 espécies de plantas com três repetições e três controles para cada espécie. Cada unidade experimental constou de um vaso contendo 500g de solo com 20 sementes. A umidade foi mantida entre 50 e 60% da capacidade de campo. Após a germinação, o número de plantas por repetição foi reduzido para 10. O experimento teve duração de 21 dias, após a germinação de 50% do controle de acordo com as recomendações da OECD (2006).

Para obtenção dos parâmetros para a derivação do valor de prevenção, para cada espécie, foram determinadas algumas variáveis fisiológicas. Foi avaliada germinabilidade (%G) e o Índice de Velocidade de Emergência (IVE) segundo cálculos sugeridos por Maguire (1962). Para a análise de crescimento, determinou-se a altura da parte aérea, diâmetro do coleto, número de folhas e área foliar (AF), matéria fresca da parte aérea (MFPA), raiz (MFR) e total (MFT). Após a secagem do material em estufa de circulação forçada a 70°C até atingir peso constante, foi determinada a matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST).

Foi determinado o Índice de Clorofila (IC) das quatro espécies através do clorofilômetro (Chlorophyll Meter, SPAD-502) da Minolta Co., Japão, 1989. As medições de trocas gasosas foram realizadas somente em milho e feijão, pois as demais espécies não possuíam área foliar suficiente para completar a câmara de *led* do equipamento e as leituras foram realizadas com o auxílio de um analisador de gás infravermelho (IRGA – Li-Cor LI – 6400XT). Sua câmara de *led* foi programada para uma densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) de  $600\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Foram determinados os valores de fotossíntese líquida ( $A-\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ), transpiração ( $E-\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) e condutância estomática ( $g_s - \text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Nas mesmas folhas em que foram feitas as análises de trocas gasosas, com o auxílio de um fluorômetro portátil MINI-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha), foram realizadas as análises de fluorescência da clorofila *a*. As avaliações foram realizadas segundo Bilger et al. (1995) e Heinz Walz GmbH (1993) pela superfície adaxial das folhas. Os parâmetros foram analisados em função da irradiância (P.A.R.) que obteve a maior taxa de transporte de elétrons do controle. Através da curva de resposta ao fluxo de fótons fotossintéticos (FFF), com aplicação de oito pulsos crescentes de intensidade de radiação, foi obtida a eficiência fotoquímica potencial do PSII

( $F_v/F_m$ ). A taxa relativa de transporte de elétrons (ETR) foi calculada a partir da equação:

$$ETR = \left( \frac{F_v}{F_m} \right) \times FFF \times 0,5 \times 0,84$$

## 2.1 Análises estatísticas

A partir de cada parâmetro obtido nos ensaios com plantas, foram calculados os EC's 50 através de modelos de regressão não lineares que melhor se ajustaram pelo programa STATISTICA, versão 7. Os valores de HC5 foram calculados pelo programa ETX 2.0 (VLAARDINGEN et al., 2004).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de concentração efetiva que causam danos em 50% dos organismos testados (EC50) são parâmetros ecotoxicológicos e podem ser usados para a derivação de valores orientadores, como no presente estudo foi utilizado para a obtenção de valores de prevenção. Eles variam conforme a sensibilidade e as condições em que cada organismo está sendo avaliado. Ao avaliar os valores de EC50 derivados para os dois solos, verificou-se diferença entre os valores obtidos para eles (Tabela 3). Em ambos os solos, das variáveis analisadas, os parâmetros mais sensíveis foram os relacionados ao aparato fotossintético, seguidos dos parâmetros de crescimento e germinação.

O uso dos parâmetros mais sensíveis (e.g. fotossíntese líquida, transpiração, condutância estomática) para o cálculo do valor de prevenção (VP), foi importante, pois, aumentou a restrição e aproximou o VP da realidade, uma vez que alterações no metabolismo e na fotossíntese desencadeiam alterações de forma direta e indireta no crescimento e desenvolvimento do vegetal. Conforme pode ser observado na Tabela 3, os valores de EC50 relacionados à fotossíntese foram menores dos que o de crescimento e germinação.

Como a intenção é a derivação de valores preventivos, torna-se necessário a utilização de parâmetros sensíveis, que antecedam os sintomas visuais e que tenham correlação como desenvolvimento vegetal. Isso é importante, pois se trata de um valor de alerta, indicando que alterações importantes já estão ocorrendo no metabolismo vegetal, entretanto, ainda não são tão severas e irreversíveis. Então, se o monitoramento do solo acontecer de maneira correta, ainda é viável e possível que os indivíduos completem seu biociclo.

Tabela 3 Valores de EC50 calculados de diversos parâmetros para Latossolo e Cambissolo

Parâmetros	Espécies	Latossolo		Cambissolo	
		EC50 (mg kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	EC50 (mg kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Germinabilidade	Arroz	12,17	0,88	*	*
	Feijão	*	*	*	*
	Milho	19,17	0,97	*	*
	Rabanete	11,17	0,9	*	*
Índice de Velocidade de Emergência	Arroz	12,08	0,89	18,31	0,83
	Feijão	20,93	0,94	31,27	0,94
	Milho	17,49	0,92	14,24	0,96
	Rabanete	1,48	0,91	25,4	0,95
Altura da parte aérea	Arroz	10,57	0,82	39,01	0,83
	Feijão	11,48	0,94	54,36	0,85
	Milho	21,44	0,98	46,67	0,94
	Rabanete	*	*	*	*
Número de folhas	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	*	*	*	*
	Milho	*	*	*	*
	Rabanete	*	*	*	*
Diâmetro do coleto	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	*	*	*	*
	Milho	*	*	*	*
	Rabanete	*	*	*	*
Área foliar	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	*	*	*	*
	Milho	*	*	*	*
	Rabanete	*	*	*	*

“Tabela 3, continua”

Parâmetros	Espécies	Latossolo		Cambissolo	
		EC50 (mg kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	EC50 (mg kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Matéria fresca da parte aérea	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	7,66	0,98	40,06	0,82
	Milho	29,02	0,8	*	*
	Rabanete	6,54	0,83	*	*
Matéria fresca da raiz	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	11,48	0,79	*	*
	Milho	18,03	0,8	*	*
	Rabanete	*	*	*	*
Matéria fresca total	Arroz	*	*	14,54	0,88
	Feijão	11,01	0,92	8,49	0,94
	Milho	21,5	0,82	31,91	0,79
	Rabanete	*	*	*	*
Matéria seca da parte aérea	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	4,61	0,98	*	*
	Milho	3,45	0,73	25,51	0,78
	Rabanete	*	*	*	*
Matéria seca da raiz	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	12,67	0,7	*	*
	Milho	13,71	0,84	*	*
	Rabanete	*	*	*	*
Matéria seca total	Arroz	*	*	23,6	0,75
	Feijão	11,29	0,92	*	*
	Milho	13,77	0,81	44,72	0,73
	Rabanete	*	*	*	*

“Tabela 3, conclusão”

Parâmetros	Espécies	Latossolo		Cambissolo	
		EC50 (mg kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	EC50 (mg kg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
SPAD	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	*	*	*	*
	Milho	14,45	0,9	*	*
	Rabanete	10,34	0,93	64	0,71
Fotossíntese líquida	Feijão	5,38	0,94	*	*
	Milho	3,45	0,72	*	*
Condutância estomática	Feijão	2,14	0,73	*	*
	Milho	3,2	0,97	*	*
Transpiração	Feijão	2,8	0,98	*	*
	Milho	1,12	0,98	13,9	0,76
Eficiência do fotossistema II	Arroz	*	*	*	*
	Feijão	*	*	*	*
	Milho	*	*	*	*
	Rabanete	*	*	*	*
Taxa relativa de transporte de elétrons	Arroz	6,53	0,9	*	*
	Feijão	*	*	*	*
	Milho	*	*	*	*
	Rabanete	4,94	0,97	*	*

\* Não foram significativos a 5% de probabilidade para regressões não lineares

Em uma avaliação de risco ecotoxicológico, um ecossistema é considerado protegido quando as espécies em questão possuem 95% dos valores de EC50 protegidos. Para tanto, de posse dos valores de EC50, foram plotados gráficos de distribuição das espécies de acordo com a sensibilidade (SSD), conforme pode ser observado nas Figuras 1, 2 e 3. A partir de então, foram obtidos os valores da concentração perigosa para 5% dos parâmetros testados

(HC5), que é a restrição necessária para a proteção do ecossistema em um solo que está em monitoramento e sob alerta. Foram derivados valores específicos para Latossolo, Cambissolo e para os dois solos conjuntos (Tabela 4).

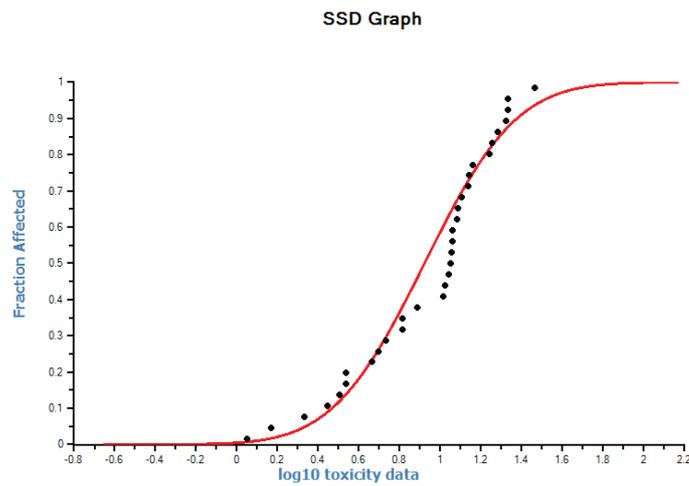


Figura 1 Gráfico da distribuição da sensibilidade das espécies para EC50 (concentração efetiva que causa danos a 50% das espécies) para Latossolo

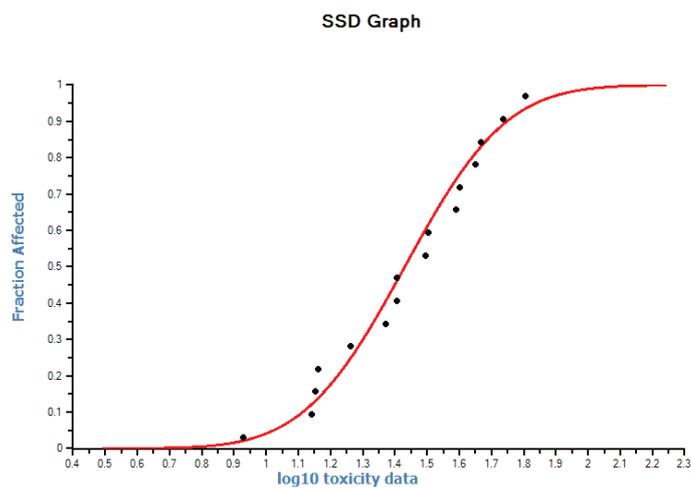


Figura 2 Gráfico da distribuição da sensibilidade das espécies para EC50 (concentração efetiva que causa danos a 50% das espécies) para Cambissolo

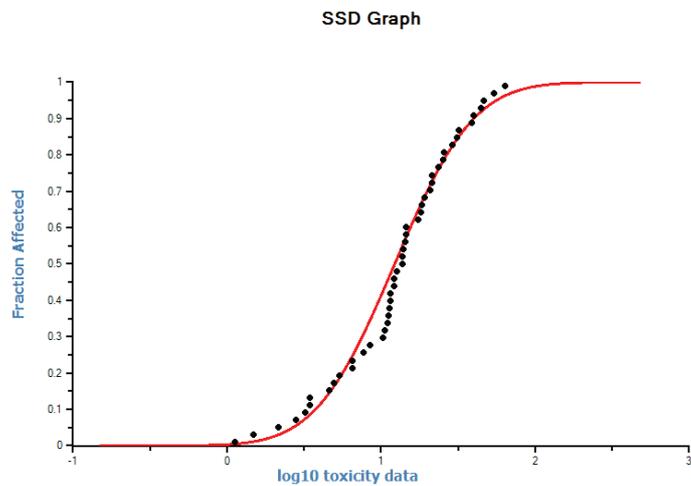


Figura 3 Gráfico da distribuição da sensibilidade das espécies para EC50 (concentração efetiva que causa danos a 50% das espécies) para Latossolo e Cambissolo

Foram utilizados os valores médios de HC5 e conforme observado na Tabela 4, os valores foram distintos entre si, sendo a diferença dos valores de Latossolo com o Cambissolo, de mais de 8,2 mg de Cd kg<sup>-1</sup> de solo seco. Isso evidencia que os atributos do solo são determinantes para o estabelecimento desses valores, pois são esses atributos que determinam a fração disponível do elemento-traço no solo. Os resultados de HC5 expressam de maneira indireta esta disponibilidade. O Latossolo, por apresentar condições que favoreceram uma maior disponibilidade de Cd (pH mais ácido, menores valores de CTC<sub>ef</sub> e matéria orgânica), apresentou um menor valor de HC5, indicando que as alterações vegetais são mais sensíveis a essa condição.

Diferentemente do Cambissolo (Tabela 4), que apresentou valores 4,8 vezes maiores quando comparados ao Latossolo. Este resultado reforça ainda mais que não somente o teor total (dose aplicada), mas o teor fitodisponível deve ser analisado nestes estudos, pois esse foi o principal parâmetro que alterou o desenvolvimento das plantas.

Tabela 4 Valores de HC5 para Latossolo, Cambissolo e ambos os solos

	Latossolo <sup>a</sup>	Cambissolo <sup>b</sup>	Ambos os solos <sup>b</sup>
LL HC5	1,4	6,39	1,81
HC5	2,15	10,35	2,65
UL HC5	2,97	14,16	3,59

<sup>a</sup>- Valores aceitos pelos testes de normalidade de Anderson-Darling e Cramer von Mises ( $p < 0,01$ ); <sup>b</sup>- Valores aceitos pelos testes de normalidade de Anderson-Darling, Kolmogorov-Smirnov e Cramer von Mises ( $p < 0,01$ ); LL HC5-menor estimativa para HC5; HC5- concentração perigosa média para 5% dos indivíduos testados; UL HC5-maior estimativa para HC5

Aos valores de HC5 para os dois solos e o que foi derivado de forma simultânea para os dois solos, foi acrescido o valor de referência de qualidade (VRQ) para os solos de Minas Gerais que é de 0,4 mg de Cd kg<sup>-1</sup> de solo

seco (FEAM, 2011) para a obtenção do valor de prevenção, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 Valor de prevenção de Cd para Latossolo, Cambissolo e ambos os solos

	Latossolo	Cambissolo	Ambos os solos
	mg kg <sup>-1</sup> de peso seco		
VP	2,55	10,75	3,05

O valor de prevenção de Cd para o Estado de Minas Gerais na atualidade foi determinado pela Resolução CONAMA (2009) que adotou os valores até então estabelecidos pelo órgão ambiental de São Paulo, que é de 1,3 mg de Cd kg<sup>-1</sup> de peso seco. Como podem ser observados na Tabela 5, os estudos realizados nas duas classes de solos, que são encontradas em maiores proporções no Estado de Minas Gerais (FEAM, 2011), diferiram do valor que está em vigência. No entanto, o que se torna evidente, devido às características de cada solo, é que uma única classe de solo não pode ser considerada representativa para todos os Estados, sendo necessário o estudo de mais de uma classe para a obtenção de resultados mais representativos.

O ideal é a determinação de VPs para cada classe de solo, como foi realizado neste estudo para Latossolo e Cambissolo, encontrando os valores de 2,55 mg kg<sup>-1</sup> e 10,75 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Ao utilizar um valor específico para cada solo, e não uma aproximação, está se protegendo o número de espécies desejados, levando em conta a restrição que se deseja adotar e considerando as características de cada solo, viabilizando o funcionamento do solo. Porém, para os órgãos ambientais, a fiscalização por classes de solos pode se tornar inviável. Então, poderia ser indicado também para obter uma maior representatividade, que seja derivado o VP com mais de uma classe de solo,

como apresentado na Tabela 5, realizado para Latossolo e Cambissolo simultaneamente, com valor de 3,05mg de Cd kg<sup>-1</sup> de peso seco de solo.

Os estudos de ecotoxicidade ainda estão em fases iniciais no Brasil e para a obtenção de resultados mais fidedignos e responsivos as variáveis analisadas, talvez os protocolos precisem ser mais bem elucidados e estabelecidos. Pois, como observado no presente estudo, valores diferenciados de pH, textura dos solos e matéria orgânica dentre outras variáveis, podem influenciar os resultados, interferindo não somente nos valores de prevenção mas em todos os valores orientadores gerando números que não condizem com a realidade da variabilidade dos solos de uma região.

Essas observações estão de acordo com o reportado pelos autores Sanitá di Toppi e Gabrielli (1999), que afirmaram que a capacidade com que as plantas podem absorver o Cd do solo pode sofrer interferência de fatores como concentração e biodisponibilidade, os quais são determinados pelo teor de matéria orgânica presente no solo, pH, temperatura, bem como a presença de outros elementos.

#### 4 CONCLUSÃO

O presente estudo traz embasamento e pode servir como subsídio para o órgão ambiental de Minas Gerais determinar o valor de prevenção de Cd para o Estado. E sugere-se que a adição de novos parâmetros fisiológicos como variáveis adicionais para avaliar os riscos ecológicos de solos contaminados pode ser relevante para a melhoria da sensibilidade dos ensaios com plantas.

Mas, acredita-se que seja importante o estudo ecotoxicológico e derivação de VP's para cada classe de solo, assim como foi realizado neste estudo para Latossolo e Cambissolo ( $2,55 \text{ mg kg}^{-1}$  e  $10,75 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectivamente). Esta divisão por classe de solo possibilitaria que a fiscalização e as medidas de precaução possam ser realizadas com valores específicos das características de cada solo. Para que os valores possam ser representativos é necessário que os protocolos sejam melhores elaborados e que se utilize uma maior quantidade de parâmetros para o cálculo, aumentando a sensibilidade dos resultados.

## REFERÊNCIAS

BILGER, W. et al. Determination of the quantum efficiency of photosystem II and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence in the field. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 108, n. 4, p. 1479-1486, Aug. 1995.

BIONDI, C. M. et al. Teores de Fe, Mn, Zn, Cu, Ni e Co em solos de referência de Pernambuco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 35, n. 3, p. 1057-1066, maio/jun. 2011.

COMPANHIA AMBIENTAL DE SÃO PAULO. **Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, 2001. 4 p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res09/res42009.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de Minas Gerais**. Belo Horizonte, 2011. 4 p.

HEINZ WALZ GMBH. **Mini-pam**: photosynthesis yield analyser. Effeltrich, 1993. Disponível em: <[http://www.walz.com/products/chl\\_p700/mini-pam/introduction.html](http://www.walz.com/products/chl_p700/mini-pam/introduction.html)>. Acesso em: 10 dez. 2013.

HUGEN, C. **Valores de referência para teores de Cr, Cu, Ni, Pb, e Zn em solos do Estado de Santa Catarina**. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Manejo de Solo) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION. **ISO 11.269-2**: determination of the effects of pollutants on soil flora, part 2: effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneve, 2013. 28 p.

KLAUBERG FILHO, O. et al. Ecologia, função e potencial de aplicação de fungos micorrízicos arbusculares em condições de excesso de metais pesados. In: VIDAL-TORRADO, P. et al. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: UFV; Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2005. p. 85-144.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 1, p. 176-177, Jan. 1962.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n° 208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2013.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ, V. H. (Ed.). **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais, 1999. 359 p.

RODRIGUES, A. S. de; NALINI JÚNIOR, H. A. Valores de background geoquímico e suas implicações em estudos ambientais. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 62, n. 2, p. 155-165, abr./jun. 2009.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GRABRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 41, p. 105-130, July 1999.

VLAARDINGEN, P. VAN et al. **ETX 2.0**: a program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data: RIVM Report n° 601501028/2004. Bilthoven: RIVM, 2004. 68 p.