



FERNANDA HELENA DE SOUZA SANTOS

**CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO “IN
VITRO” DE *Gomphrena claussenii* EXPOSTA A
ZINCO E CÁDMIO**

LAVRAS – MG

2012

FERNANDA HELENA DE SOUZA SANTOS

**CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO “IN VITRO” DE
Gomphrena claussenii EXPOSTA A ZINCO E CÁDMIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Recursos Ambientais e Uso da Terra, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Janice Guedes de Carvalho

Coorientador

PhD. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

**LAVRAS – MG
2012**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Santos, Fernanda Helena de Souza.

Crescimento, nutrição e produção *in vitro* de *Gomphrena
claussenii* exposta a zinco e cádmio / Fernanda Helena de Souza
Santos. – Lavras : UFLA, 2012.

78 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Janice Guedes de Carvalho.

Bibliografia.

1. Metais pesados. 2. Contaminação. 3. Absorção mineral. 4.
Translocação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 628.5

FERNANDA HELENA DE SOUZA SANTOS

**CRESCIMENTO, NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO “IN VITRO” DE
Gomphrena claussenii EXPOSTA A ZINCO E CÁDMIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, área de concentração em Recursos Ambientais e Uso da Terra, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de fevereiro de 2012.

Dr. Mozart Martins Ferreira	UFLA
Dra. Ana Rosa Ribeiro Bastos	UFLA
Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares	UFSC

Orientadora
Dra. Janice Guedes de Carvalho

Coorientador
PhD. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

**LAVRAS – MG
2012**

Ao Senhor Deus,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus caminhos, escolhas e por estar sempre presente em minha vida.

Ao meu esposo, Luís Antônio, pelo amor, carinho, paciência e incentivo para a concretização deste trabalho. Suas palavras sempre me deram forças para suportar a distância e a saudade.

Aos meus pais, Hilda e Fernando, que deram o melhor de si para a realização de meus estudos.

A minha irmã, Daniele, grande amiga, pelo companheirismo.

A todos os meus familiares, pelo carinho e torcida.

À Dra. Elka, por suas palavras de incentivo e por ter me apresentado à pesquisa.

A Daniella e Leandro, por terem me acolhido em Lavras.

Ao Departamento de Ciência do Solo e seus professores, pela oportunidade de cursar o mestrado e pelo grande aprendizado repassado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

À Mina, pela sua valorosa contribuição e por ter permitido continuar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciência do Solo, em especial a Dirce, sempre solícita e atenciosa.

A Ana Rosa e aos professores Janice e Beбето, pela orientação, apoio, grandes ensinamentos e por serem exemplo de profissionalismo.

Aos componentes da banca, Cláudio Soares e Mozart Ferreira, pela valorosa contribuição no trabalho.

Aos colegas Ênio, Geila, Sílvio, Wesley, Alisson, Giuvano e Bruno, pela colaboração na condução dos trabalhos.

Às amigas Marla, Dani, Giovana, Vanessa, Nilma, Ana Paula, Lauana, Viviane, Inêz e Maíza, pelos bons momentos que passamos juntas.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

A crescente atividade antrópica tem levado à contaminação do ambiente por meio da deposição, no solo, de resíduos contaminados com diversos metais pesados, os quais, quando presentes em níveis tóxicos, tornam-se danosos às plantas. Os efeitos tóxicos de Zn e Cd podem ser resultado da interação destes com outros elementos, causando distúrbios nutricionais nas plantas. Objetivou-se avaliar o efeito da aplicação de Zn e Cd em solução nutritiva e da época de colheita sobre o teor, o acúmulo e a translocação de elementos em *Gomphrena claussenii*, bem como o crescimento *in vitro* desta espécie submetida a concentrações crescentes de Zn. Um primeiro experimento foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade Federal de Lavras, em Lavras, MG. O esquema estatístico utilizado foi o delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos constituídos de quatro concentrações crescentes de Zn+Cd (16,25; 162; 325 e 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e três épocas de colheita (15, 30 e 45 dias), com três repetições. Avaliaram-se o teor, o acúmulo e o fator de translocação de Ca, P, K, S, Fe, Cu, Mn, Cd e Zn. Um segundo experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, com 8 repetições. Como tratamentos, adicionaram-se as concentrações 0, 16, 160, 320 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), em meio de cultura MS; aos 30 dias de condução do experimento, avaliaram-se as plantas quanto aos parâmetros biométricos de crescimento. No primeiro experimento, a aplicação das concentrações crescentes de Zn+Cd exerceu efeitos nos parâmetros avaliados, diferindo quanto ao elemento e à época de colheita, com destaque para a expressiva redução na translocação de Fe e Cd nas plantas. Presume-se que o Zn teve importante papel na absorção de Cd, caracterizando um mecanismo de defesa na planta. Os teores médios encontrados na parte aérea das plantas submetidas às diferentes concentrações de Zn e Cd estudadas foram: 18,8 g kg^{-1} , para Ca; 26,3 g kg^{-1} , para P; 4,7 g kg^{-1} , para K; 848 g kg^{-1} , para S; 132 mg kg^{-1} , para Fe; 12 mg kg^{-1} , para Cu e 29,6 mg kg^{-1} , para Mn. No segundo experimento, as plântulas de *G. claussenii* mostraram clorose pronunciada em folhas novas, nas concentrações de 0 e 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. Quando submetidas a elevadas concentrações de Zn (160, 320 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$), as plântulas apresentaram sintoma de toxidez, caracterizado como coloração pardo-avermelhada. Apesar de a aplicação de zinco ter proporcionado o decréscimo nos parâmetros avaliados, a espécie foi capaz de se desenvolver até a maior concentração de Zn (960 $\mu\text{mol L}^{-1}$) aplicada. Sugere-se que a concentração de Zn mais adequada para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas dessa espécie esteja na faixa de 16 a 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Palavras-Chave: Metais pesados. Contaminação. Absorção mineral. Translocação.

ABSTRACT

Growing human activity has led to contamination of the environment due to soil deposition of wastes contaminated with various heavy metals, which may become harmful to plants when present at toxic levels. The toxic effects of Zn and Cd may result from their interaction with other elements, causing nutritional disturbances in plants. This study evaluated the effect of Zn and Cd in nutrient solution and of harvest time on the content, accumulation and translocation of elements in *Gomphrena claussenii* plants as well as the *in vitro* growth of these plants when exposed to increasing concentrations of Zn. The first experiment was conducted in a greenhouse at the Federal University of Lavras, MG, Brazil. A completely randomized experimental design was used, with treatments consisting of four increasing concentrations of Zn + Cd (16,25; 162; 325 and 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and three harvest times (15, 30 and 45 days) with three replications. The content, accumulation factor and translocation of Ca, P, K, S, Fe, Cu, Mn, Cd and Zn were evaluated. The second experiment was conducted in a completely randomized design with eight replications. The treatments consisted in the application of increasing concentrations of Zn (0, 16, 160, 320 and 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$) added as $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on MS medium. After 30 days of growth plants were evaluated with respect to their biometric parameters. In the first experiment, the application of increasing concentrations of Zn + Cd affected all parameters evaluated, differing as to the element and the harvest season, with a noteworthy reduction in the translocation of Fe and Cd in plants. It is assumed that Zn played an important role in the absorption of Cd, featuring a defense mechanism in plants. The average contents found in the shoots of plants submitted to the different concentrations of Cd and Zn studied were: 18.8 g kg^{-1} for Ca; 26.3 g kg^{-1} for P; 4.7 g kg^{-1} for K; 848 g kg^{-1} for S; 132 mg kg^{-1} for Fe, 12 mg kg^{-1} to Cu and 29.6 mg kg^{-1} for Mn. In the second experiment, the *G. claussenii* seedlings showed pronounced chlorosis in young leaves at concentrations of 0 and 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn. When exposed to high concentrations of Zn (160, 320 and 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$), the seedlings showed symptoms of toxicity characterized by a reddish brown color. Although the application of zinc has decrease the evaluated parameters, the seedlings of *G. claussenii* were able to grow even when exposed to the highest concentration of Zn (960 $\mu\text{mol L}^{-1}$) applied. It is suggested that the Zn concentration most suitable for the *in vitro* development of the studied species is within the range 16-160 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Keywords: Heavy metals. Contamination. Mineral absorption. Translocation.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Contaminação por metais pesados	12
2.2	Cádmio	13
2.3	Zinco	14
2.4	Absorção de metais pesados pelas plantas.....	15
2.4.1	Absorção de Cd pelas plantas	17
2.4.2	Absorção de Zn pelas plantas	19
2.5	Transportadores de membrana.....	20
2.6	Influência de metais pesados na absorção e translocação de nutrientes	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Experimento I	26
3.2	Experimento II	31
3.3	Análise estatística	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Produção de matéria seca	34
4.2	Teor e acúmulo de nutrientes sob influência das concentrações de Zn+Cd aplicadas e épocas de colheitas.....	36
4.2.1	Teor e acúmulo de Ca	36
4.2.2	Teor e acúmulo de P	38
4.2.3	Teor e acúmulo de K	40
4.2.4	Teor e acúmulo de S	42
4.2.5	Teor e acúmulo de Fe	44
4.2.6	Teor e acúmulo de Cu	47
4.2.7	Teor e acúmulo de Mn	49
4.3	Fator de translocação de Ca, P, K e S sob influência das concentrações de Zn+Cd aplicadas e épocas de colheita	52
4.4	Fator de translocação de Fe, Cu, Mn, Zn e Cd sob influência das concentrações de Zn+Cd aplicadas e épocas de colheita ...	56
4.5	Influência do aumento da concentração de Zn aplicada <i>in vitro</i> no desenvolvimento de <i>Gomphrena clausenii</i>	62
5	CONCLUSÕES	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Desde a Revolução Industrial, a ação antropogênica tem resultado em uma expressiva contaminação por meio da adição metais ao ambiente (WU et al., 2010). Dentre as principais fontes dessa poluição, estão a mineração e a fundição de minerais metálicos, a atividade de indústrias metalúrgicas e eletrônicas, as ações militares, a queima de carvão, os resíduos urbanos, os esgotos e os fertilizantes agrícolas (JABEEN; AHMAD; IQBAL, 2009).

Indiscutivelmente, as atividades de mineração são de fundamental importância para a obtenção de materiais necessários para a fabricação de bens indispensáveis para o homem e também por proporcionarem inúmeros benefícios à sociedade e ao desenvolvimento do país. Entretanto, no processo de extração e beneficiamento de metais, o minério é moído e os resíduos contendo metais pesados, como cádmio (Cd), zinco (Zn) e chumbo (Pb), são expostos ao meio, provocando impactos que levam a danos no ambiente, comprometendo os ecossistemas e a saúde da população. Nas últimas décadas, estima-se que as atividades antrópicas tenham provocado, mundialmente, o lançamento no ambiente de 22.000 t de Cd, 939.000 t de cobre (Cu), 783.000 t de Pb e 1,35 milhões t de Zn (SINGH et al., 2011).

Minas Gerais se destaca por ser o estado brasileiro no qual a metalurgia de zinco é mais expressiva. Este estado detém 92% das reservas deste mineral, sendo responsável por praticamente 100% da produção nacional (BIGARELLI; ALVES, 1998). Uma das maiores empresas produtoras é a Votorantim Metais (VM), com atividade de mineração localizada na cidade de Vazante, MG, contendo a maior jazida brasileira de Zn, sendo o processamento do minério realizado na cidade de Três Marias, MG.

Os teores de metais disponíveis encontrados nas camadas superficiais na região de depósito do rejeito são, em média, de 13.695 mg dm⁻³, para Zn; 565

mg dm⁻³, para Cd; 343 mg dm⁻³, para Cu e 32,5 mg dm⁻³, para Pb (SANTOS, 2010). Estes valores são considerados muito acima dos comumente encontrados nos solos, o que caracteriza essas áreas como contaminadas (KABATA-PENDIAS, 2011). Esta contaminação é ainda mais agravada com a predominância de formas disponíveis e trocáveis de Cd e Zn na área. Já para o Pb, mais de 90% do total estaria na forma residual, enquanto o Cu presente apresentaria baixa solubilidade (RIBEIRO-FILHO et al., 1999).

Os teores elevados e formas potencialmente disponíveis de Cd e Zn presentes seriam, provavelmente, a principal causa do estágio de degradação da área, caracterizado pela escassez de vegetação na região de deposição do rejeito. Certos metais, em elevadas concentrações no solo, afetam processos fisiológicos e bioquímicos, causando redução no crescimento, inibição da fotossíntese e respiração das plantas. A destruição da cobertura vegetal em áreas de mineração potencializa a degradação do solo, promovendo erosão hídrica e eólica, além de lixiviação de contaminantes para o lençol freático, desencadeando um progressivo grau de contaminação de outras áreas (KABATA-PENDIAS, 2011). A maioria dos estudos realizados para a avaliação dos efeitos fisiológicos da toxicidade de metais pesados às plantas não envolve contaminações múltiplas (OLIVEIRA, 2001; SAGARDOY et al., 2009; SKREBSKY et al., 2008), que estão frequentemente presentes em lodos de esgoto, resíduos de mineradoras, refinarias e águas residuais.

As plantas hiperacumuladoras de metais têm recebido considerável atenção no desenvolvimento de tecnologias para a remediação de solos contaminados por metais pesados pelas atividades de mineração. Essas espécies são excelentes fitoextratoras, uma vez que podem acumular em seu interior, principalmente na parte aérea, teores de metais de 100 a 1.000 vezes maiores

que aqueles comparados aos de plantas não hiperacumuladoras (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2010).

A diferença de comportamento entre as espécies mostra a dificuldade na indicação de plantas para a recomposição de áreas contaminadas. Um número restrito de plantas da flora local tem sido uma fonte potencial para programas de fitorremediação, uma vez que são capazes de sobreviver, crescer e reproduzir em solos com elevadas concentrações de metais, dadas as suas adaptações fisiológicas ao ambiente (YOON et al., 2006).

No Brasil, o estudo de *Gomphrena claussenii* (anteriormente classificada como *Gomphrena elegans* e *Alternanthera* sp.), encontrada em uma área de mineração de zinco, revelou a classificação desta espécie como hiperacumuladora de Cd e Zn e promissora para ser utilizada em programas de descontaminação de áreas afetadas por estes elementos. Isso porque apresentou elevada concentração de Cd ($>100 \text{ mg kg}^{-1}$) e Zn ($>10.000 \text{ mg kg}^{-1}$) na parte aérea, valores estes superiores às concentrações normalmente encontradas nas plantas (BORIN, 2010; CARVALHO, 2010).

A produção *in vitro* de espécies hiperacumuladoras tende a ser difundida devido à possibilidade de produzir, em larga escala, um grande número de plantas homogêneas e com elevada qualidade sanitária. Conhecer o desenvolvimento *in vitro* de espécies coletados em áreas contaminadas é uma das primeiras etapas para o seu manejo, além de permitir a obtenção de material vegetal para a avaliação da tolerância, do potencial fitoextrator e posterior utilização em programas de fitorremediação de áreas impactadas negativamente por metais pesados.

Embora a identificação da espécie *Gomphrena claussenii* para o aprimoramento de programas de fitorremediação seja de suma importância, tornam-se necessários, ainda, estudos que forneçam subsídios para explicar os

mecanismos de tolerância desta planta ao ser submetida a elevadas concentrações de Zn e Cd. Quando estes metais pesados se acumulam em elevadas concentrações nas plantas, eles podem comprometer o funcionamento de diversos processos fisiológicos, tais como alterações na taxa fotossintética, transpiração, síntese de clorofila e integridade da membrana celular (SARWAR et al., 2010). Sabe-se, ainda, que os efeitos tóxicos de Zn e Cd podem resultar da interação destes com outros elementos essenciais (SKREBSKY et al., 2008), causando distúrbios nutricionais que refletem na absorção e no acúmulo dos nutrientes.

Diante do exposto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de concentrações crescentes e combinadas de Zn e Cd em solução nutritiva e da época de colheita, no teor, no acúmulo e na translocação de elementos em *Gomphrena claussenii*, bem como o crescimento desta espécie cultivada *in vitro*, sob concentrações crescentes de Zn.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Contaminação por metais pesados

A intensificação das atividades industriais tem resultado em uma expressiva contaminação do ambiente com a adição de resíduos orgânicos e inorgânicos (JABEEN; AHMAD; IQBAL, 2009).

A mineração e a industrialização de metais representam potenciais fontes poluidoras do ambiente devido à adição de metais pesados ao solo. Os resíduos ricos em metais pesados gerados por estas atividades são acumulados em depósitos de rejeito que, ao serem expostos aos processos de drenagem natural, lixiviação e erosão, promovem a solubilização de metais e desencadeiam progressivo grau de contaminação de áreas adjacentes (SILVA et al., 2004).

O termo “metal pesado” refere-se a qualquer elemento metálico com densidade relativamente alta e tóxico aos organismos, sendo muito deles até em baixas concentrações. Por isso, frequentemente designa elementos classificados como poluentes do ar, água, solo, plantas e alimentos, uma vez que não são degradados ou modificados, como ocorre com os contaminantes orgânicos. Assim, mantendo-se a fonte contaminante, pode ocorrer a acumulação progressiva e persistente do metal no solo. Os metais pesados são definidos como um grupo de metais, semimetais e não metais que possuem densidade específica acima de 5 g cm^{-3} e massa atômica maior que 40 (SEREGIN; IVANOV, 2001). Também são conhecidos como elementos-traço, por serem encontrados na crosta terrestre, em quantidades inferiores a 0,1% (1.000 mg kg^{-1}) (KABATA-PENDIAS, 2011).

A maioria dos metais pesados não tem função nutricional conhecida, como é o caso do Cd, Hg e Pb, porém, outros são micronutrientes, como, por exemplo Fe, Cu e Zn. Esta essencialidade é justificada por suas propriedades químicas, tornando-os íons indispensáveis ao metabolismo dos vegetais. No entanto, todos são tóxicos, quando disponíveis em concentrações elevadas na solução do solo (MARIA et al., 2011).

Dentre os metais pesados considerados perigosos ao ambiente, o Cd e o Zn ocupam, respectivamente, a sétima e a septuagésima quinta posição na lista da Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR (2011), na qual constam as 250 substâncias mais tóxicas aos seres humanos.

2.2 Cádmio

O cádmio (Cd) é um elemento químico de número atômico 48 e massa atômica de 112,4 u, situado no grupo 12 (2B) da classificação periódica dos elementos. Tem sido considerado um dos mais perigosos metais pesados aos

organismos, dada sua elevada toxicidade e solubilidade, ampla distribuição na crosta terrestre e uso intenso para a fabricação de itens como fungicidas, plásticos coloridos, pigmentos de tintas, lubrificantes, baterias de automóveis, fertilizantes fosfatados e pilhas, dentre outros (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997). Após sua utilização para a fabricação dos diversos materiais, o Cd é adicionado ao solo por meio da deposição de lixo orgânico, resíduos de pneus, óleos, lodo de esgoto e resíduos de mineração (BERGMANN, 1992).

Quando o Cd é encontrado na sua forma disponível, trocável, é facilmente absorvido pelas plantas, sendo pH e matéria orgânica os fatores mais importantes que controlam a disponibilidade deste elemento no solo (BARANČÍKOVÁ; MADARAS; RYBÁR, 2004).

Na natureza, Cd e o Zn são, normalmente, encontrados juntos em minérios e têm propriedades físicas e químicas similares, sendo ambos pertencentes à mesma coluna da tabela periódica (2B). Isso implica em uma série de propriedades químicas e físicas semelhantes entre estes metais, como estrutura iônica, eletronegatividade e forte afinidade pelo enxofre (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Assim, acredita-se que o comportamento destes dois elementos nos sistemas biológicos seja similar (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997).

2.3 Zinco

O zinco (Zn) é um metal de número atômico 30 e o 2º metal de transição mais abundante nos organismos, ficando atrás apenas do ferro (BROADLEY et al., 2007).

Na fração mineral dos solos, este elemento é encontrado, principalmente, em minerais ferromagnesianos, como biotita, magnetita, hornblenda e sulfeto de Zn que, ao sofrerem intemperização, liberam Zn, que

pode ser adsorvido aos coloides do solo, como um cátion divalente ou formar complexos com a matéria orgânica do solo, principalmente em solos tropicais (DECHEN; NACHTIGALL, 2006). Sua disponibilidade pode ser afetada pelo pH do solo, sendo maior naqueles ácidos (MARSCHNER, 1995).

Devido à sua propriedade anticorrosiva, o Zn tem grande aplicação na construção civil e na indústria automobilística e de eletrodomésticos, sobretudo na galvanização, servindo como revestimento do aço. Além disso, é um importante componente de diversas ligas e amplamente utilizado como catalisador de produtos químicos, como borracha, pigmentos, plásticos, lubrificantes e pesticidas (JESUS et al., 2001; KABATA-PENDIAS, 2011).

A ação antropogênica contribui para a maior entrada de Zn nos solos, como resultado das atividades de mineração e fundição (NRIAGU, 1996). Além destas, outras entradas de Zn incluem queima de combustíveis fósseis, resíduos de mineração, adubos fosfatados, partículas de superfícies galvanizadas e resíduos derivados de práticas agrícolas, dentre outros (ALLOWAY, 1995).

2.4 Absorção de metais pesados pelas plantas

A absorção de metais pelas plantas envolve, primeiramente, a interceptação e a entrada dos mesmos pelas raízes, como ocorre com os demais nutrientes, juntamente com a água (KVESITADZE et al., 2006). Uma vez que os íons metálicos penetram o sistema radicular, estes podem ser armazenados neste local ou ser encaminhados para a parte aérea, principalmente através do xilema (HARDIMAN; JACOBY; BANIN, 1984).

Assim como todos os organismos vivos, as plantas são, geralmente, sensíveis, tanto à deficiência quanto ao excesso de metais disponíveis. De forma geral, a relação entre a concentração de metais disponível na solução do solo e a

concentração absorvida pelas plantas nem sempre é direta (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). A capacidade de absorção de metais pesados pelas plantas, seja ela em níveis tóxicos ou não, pode ser influenciada pela espécie vegetal, pH do solo, tempo de exposição ao contaminante, regime de água, teor de argila, de matéria orgânica, presença de ânions, textura do solo, temperatura, luminosidade, umidade, presença de corretivos e fertilizantes, aeração, potencial redutor do solo, presença de micorrizas, equilíbrio entre os nutrientes e concentração de outros metais pesados (KABATA-PENDIAS, 2011).

Quanto à absorção, as plantas podem ser classificadas de diversas maneiras. As exclusoras são aquelas nas quais a concentração de metais pesados é mantida em níveis constantes até que uma concentração crítica no solo seja alcançada. Estas plantas têm a capacidade de evitar a translocação dos metais pesados das raízes para a parte aérea. No entanto, elas podem conter grande quantidade de metais em suas raízes. Em oposição às exclusoras, têm-se as acumuladoras, nas quais os metais podem ser encontrados em elevadas concentrações em determinadas partes da planta, sendo estes encontrados em alto ou baixo teor no solo. Por último, têm-se as indicadoras, nas quais a absorção e o transporte de metais para a parte aérea são regulados e a concentração interna reflete os níveis externos de contaminação (BAKER, 1981).

Algumas plantas denominadas hiperacumuladoras têm a habilidade de estocar elevados teores de metais, incluindo aqueles que são dispensáveis ao seu metabolismo, sem, contudo, prejudicar seu crescimento (CONN; GILLIHAM, 2010). Esses vegetais são definidos como espécies capazes de acumular, na parte aérea, metais em níveis cem vezes maiores do que normalmente se observa em plantas não acumuladoras (mais de 10 mg kg^{-1} de Hg, 100 mg kg^{-1} de Cd, 1.000 mg kg^{-1} de Co, Cr, Cu, Pb e mais de $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ de Zn e Ni). Cerca de 450

espécies de angiospermas têm sido identificadas como hiperacumuladoras de metais (As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Sb, Se, Ti, Zn), representando menos que 0,2% das espécies de plantas conhecidas (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2010).

As espécies hiperacumuladoras de metais são comumente requeridas e introduzidas em programas de fitorremediação. A fitorremediação é uma técnica emergente de descontaminação ambiental, realizada *in situ* e definida pelo uso de plantas e sua microbiota associada para remover, destruir ou sequestrar contaminantes da água, ar ou solo (MEMON; SCHRODER, 2009; PRASAD, 2003).

Embora a extração de elementos tóxicos por plantas hiperacumuladoras seja vista como uma técnica promissora para a descontaminação de áreas afetadas por metais pesados, ainda são necessários estudos acerca dos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na absorção de metais nestes vegetais (COSIO; MARTINOIA; KELLER, 2004).

2.4.1 Absorção de Cd pelas plantas

Mesmo não sendo considerado um elemento essencial ao desenvolvimento dos vegetais, o Cd, uma vez presente no solo, pode ser absorvido na forma de Cd^{2+} de forma passiva, na qual a captura envolve difusão dos íons da solução do solo para dentro da endoderme ou, de forma ativa, por gradiente de concentração, requerendo energia metabólica (SALT et al., 1995).

Normalmente, o Cd é retido nas raízes e somente pequenas quantidades são transportadas para a parte aérea. Após ser absorvido pelas raízes através dos tecidos do córtex, o Cd alcança o xilema via apoplasto e ou simplasto, podendo estar complexado a vários ligantes, como os ácidos orgânicos ou fitoquelatinas. Por meio da atuação destes complexos metalo-orgânicos, o Cd não seria

facilmente movimentado por toda a planta, impedindo uma série de fitotoxicidades e alterações no metabolismo vegetal (ALLOWAY, 1995; KABATA-PENDIAS, 2011). O efeito do Cd na atividade enzimática está associado ao fato de que grande número de enzimas contém metais e a substituição destes por outro metal de mesma carga e tamanho similar pode resultar na inibição da atividade da enzima. O zinco é um constituinte de muitas metaloenzimas, além de vários fatores transcricionais importantes na regulação da expressão gênica. O Cd, por sua semelhança com o Zn, pode substituí-lo nestas enzimas, resultando em alteração da atividade enzimática (SHAW; SAHU; MISHRA, 2004).

A presença de excessivas concentrações de Cd na solução do solo e sua posterior absorção em níveis tóxicos pode promover mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e estruturais nos vegetais. Sabe-se que concentrações entre 5 e 30 mg kg⁻¹ na matéria seca da parte aérea das plantas são consideradas tóxicas para quase todas as espécies (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Esta toxidez ocorre devido a alterações que o Cd provoca nos estômatos, impedindo seu fechamento e desencadeando um desbalanço hídrico, além de alterações no transporte de elétrons, no ciclo de Calvin, na estrutura do grana, na síntese de clorofila e na fosforilação oxidativa (BARCELÓ; VASQUES; POSCHENRIEDER, 1988). Já com relação aos efeitos visíveis da exposição das plantas a elevadas concentrações de Cd, têm-se, ainda, clorose nas folhas e inibição do crescimento, com conseqüente redução na produção de biomassa (CLEMENS, 2006).

2.4.2 Absorção de Zn pelas plantas

O Zn é considerado um micronutriente para as plantas e o único metal presente em todas as seis classes de enzimas (oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases). Desempenha papel importante em diversos processos metabólicos como componente e ativador enzimático, além da síntese de proteínas, carboidratos e metabolismo lipídico nos vegetais (BROADLEY et al., 2007). O Zn é necessário, ainda, para manter a integridade dos ribossomos, tem papel estrutural no processo de transcrição e é um cofator da RNA polimerase. Além disso, participa da formação de hidratos de carbono e catalisa processos de oxidação nas plantas (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

O zinco é adquirido a partir da solução do solo pelas raízes principalmente na forma de Zn^{2+} , que pode estar complexado em ligantes orgânicos ou na argila (MARSCHNER, 1995). Nas plantas, este elemento é transportado das raízes para a parte aérea através do xilema, embora se saiba que o Zn é pouco móvel nas plantas (MENGEL; KIRKBY, 1982) e que, na maioria das espécies, o teor deste elemento nas raízes é bem maior que na parte aérea.

A concentração de Zn para o ideal crescimento da maioria das plantas é de 15-20 mg kg⁻¹ de matéria seca, enquanto teores maiores que 300 mg de Zn por kg de matéria seca podem provocar sintomas visíveis de toxidez (MARSCHNER, 1995). Os sintomas mais típicos da carência de Zn consistem no encurtamento dos internódios e na produção de folhas novas pequenas, cloróticas e lanceoladas (FAGERIA; BALIGAR; CLARK, 2002). A toxicidade de Zn pode ser comum em solos ácidos, em solos cujo material de origem é composto por rochas ricas neste nutriente e em locais onde há aplicações de resíduos orgânicos ou fontes industriais. A toxidez de Zn nas plantas é

visivelmente caracterizada pelo surgimento de clorose e pigmentações vermelhas no pecíolo e nas nervuras das plantas. Este último sintoma estaria associado a interações de Zn e P que podem alterar os padrões de absorção e translocação de P, causando deficiência deste elemento na planta (DECHEN; NACHTIGALL, 2006).

Embora não se saiba exatamente a causa da toxicidade de Zn nas plantas, acredita-se que este metal possa se associar inapropriadamente a ligantes intracelulares ou competir com outros íons metálicos por sítios ativos de enzimas ou proteínas transportadoras, influenciando a permeabilidade das membranas (ISHIMARU; BASHIR; NISHIZAWA, 2011).

2.5 Transportadores de membrana

Com a finalidade de manter a concentração de metais dentro dos limites fisiológicos e para minimizar os efeitos deletérios de metais não essenciais, as plantas desenvolveram uma complexa rede de mecanismos homeostáticos utilizados para controlar a absorção, a acumulação, o transporte e a desintoxicação aos metais (CLEMENS, 2001; SANTOS et al., 2006). Essas estratégias para lidar com flutuações no ambiente podem incluir uma alteração significativa na expressão de genes, particularmente dos transportadores de membrana que são responsáveis pela captação, translocação e sequestro de elementos minerais essenciais e não essenciais (MEMON; SCHODER, 2009). Dessa forma, os transportadores de membrana estariam ligados diretamente aos processos que levam à tolerância e ao armazenamento de metais pesados nas plantas.

O Cd, por ser um íon metálico não essencial ao desenvolvimento vegetal, provavelmente não seria absorvido pelas plantas por meio de um

mecanismo específico. Dessa forma, o Cd assim como outros cátions tóxicos, provavelmente, penetra as células vegetais através de uma variedade de proteínas com maior especificidade para íons, como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} , resultando em alterações nas concentrações de determinados elementos na parte aérea das plantas (BROADLEY et al., 2001). Algumas famílias de proteínas que são capazes de transportar outros metais de transição, como Fe, Zn e Mn, têm sido apontadas como transportadoras de Cd. Entre elas estão *Zn-regulator transporter*, ou ZRT e *Fe-regulator transporter*, ou IRT, denominadas, em conjunto, como ZIP, *resistance-associated macrophage proteins* ou NRAMP e *cation diffusion facilitator*, ou CDF (GUERRINOT, 2000; HALL; WILLIAMS, 2003). O Cd pode ainda ser absorvido pelas plantas via canais de Ca^{2+} (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002).

O papel da proteína IRT em transportar não somente o Fe, mas também outros elementos, está de acordo com as observações de estudos fisiológicos realizados em espécies de plantas. Em um trabalho realizado por Cohen et al. (1998), verificou-se que a regulação de sistemas de captação de Fe^{2+} permitiu a entrada de Cd^{2+} e Zn^{2+} nas células de raízes de *Pisum sativum* L. cv Sparkle. Segundo os autores, a deficiência de Fe induziu a expressão do transportador IRT1 e isso, provavelmente, facilitou o transporte dos cátions divalentes. A função de transporte do Cd por IRT e NRAMP também foi observado em outros trabalhos realizados nas espécies *Arabidopsis* (KORSHUNOVA et al., 1999; THOMINE et al., 2000) e *T. caerulea* (ZHAO et al., 2002).

Para o Zn, diversos estudos também identificam a família de proteínas ZIP como principal mediadora da absorção deste elemento nas plantas (FILATOV et al., 2006; ISHIMARU et al., 2005; MOREAU et al., 2002; PENCE et al., 2000). As proteínas ZIP apresentam oito domínios transmembrana e radicais amino e carboxil situados na superfície externa da

membrana plasmática. ZIP 1 e ZIP 3 são expressas nas raízes em resposta à deficiência de Zn, sugerindo que elas transportam Zn do solo para a planta, enquanto ZIP 4 é expressa tanto na parte aérea quanto nas raízes, sugerindo que ela transporte Zn intracelularmente e entre os tecidos das plantas (GUERRINOT, 2000; ISHIMARU; BASHIR; NISHIZAWA, 2011).

2.6 Influência de metais pesados na absorção e na translocação de nutrientes

O equilíbrio químico nas plantas é essencial para promover seu pleno crescimento e desenvolvimento. Como visto anteriormente, após a planta ser submetida a concentrações estressantes de metais pesados e permitir a entrada destes nas células, espera-se encontrar efeitos nos processos de absorção, acumulação, transporte e uso de vários nutrientes.

Um dos mecanismos que explicam mudanças na concentração e na composição dos nutrientes no interior das plantas afetados por Cd e Zn seria físico-químico e é regido pelo tamanho - raio iônico - destes em relação aos demais elementos, causando competição. Outro mecanismo seria a alteração no metabolismo celular por interferir na estrutura e na atividade das membranas, além de provocar inibição no crescimento radicular. Esses efeitos desencadeariam outros novos, como alterações no balanço hormonal, deficiência de nutrientes, inibição da fotossíntese, variações na translocação de fotoassimilados e alterações nas relações de água, entre outros (BARCELÓ; POSCHENREIDER, 1990).

Diversos estudos apontaram que a toxicidade de Cd e Zn, aplicados isoladamente ou em combinação, pode influenciar no metabolismo de elementos essenciais às plantas, resultando em desordens fisiológicas e desbalanço de elementos nas plantas.

A aplicação de concentrações combinadas de Cd (2 e 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Zn (10 e 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em feijão levou ao incremento no acúmulo de Cu e Mn nas raízes, enquanto na parte aérea o acúmulo destes dois elementos foi reduzido. Já as concentrações de Fe, Ca e K nas duas partes da planta permaneceram inalteradas (CHAOUÏ; GHORBAL; FERJANI, 1997).

A presença de Zn em doses crescentes (0,1; 1; 2 mmol L^{-1}) em solução nutritiva promoveu redução na concentração de Fe, Cu e P em folhas de cana-de-açúcar (JAIN et al., 2010). Já em duas espécies de eucalipto (*E. maculata* e *E. urophylla*), altas doses de Zn (1.200 e 1.600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) reduziram as concentrações de Fe e Ca na parte aérea das plantas, sendo observado, também, efeito negativo acentuado das doses aplicadas sobre o crescimento das plantas. Essas mesmas espécies, submetidas a doses de Cd (180 $\mu\text{mol L}^{-1}$), tiveram os teores de Ca e Mg na parte aérea reduzidos (SOARES et al., 2001). Já em *Lycopersicon esculentum*, observou-se que a aplicação de 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd provocou efeito antagônico na absorção de Mn (DONG; WU; ZHANG, 2002).

A resposta mostrada por algumas espécies, quando submetidas a ambientes contaminados por metais pesados, pode ser muito variável. Na matéria seca de raiz de *Cedrela fissilis*, a aplicação de doses entre 0 e 132 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd promoveu aumento linear nos teores de P, Fe e Cu, redução no teor de Zn, além de resposta quadrática positiva sobre o teor de Mg e Mn e negativa sobre o teor de S. Já para as folhas, foram observados aumentos lineares nos teores de Fe, resposta quadrática positiva sobre o teor de Cu e Zn e negativa sobre o teor de P, Ca e Mn (PAIVA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2001).

A translocação dos elementos nas plantas também pode ser afetada pela presença de elevadas concentrações de metais pesados na solução, como Cd e Zn. Esse evento pode provocar uma série de desarranjos fisiológicos nas plantas, uma vez que passa a ocorrer deficiência ou excesso de determinado nutriente na

parte aérea, prejudicando o desenvolvimento e o crescimento normal dos vegetais (PAIVA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2002).

A translocação refere-se ao movimento ou à transferência do íon do local de absorção na raiz para outro qualquer, dentro ou fora da raiz (MARSCHNER, 1995). Já o índice de translocação é representado em porcentagem e tem como base a quantidade total de determinado elemento acumulada na raiz que foi transferida para a parte aérea (ABICHEQUER; BOHNEN, 1998).

Paiva, Carvalho e Siqueira (2002), trabalhando com mudas de cedro (*Cedrela fissilis*) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*), verificaram que a translocação de P, K, Ca, Mg, S e Zn em ipê aumentou com o incremento de doses de Cd, em solução nutritiva, que variaram entre 0 e 132 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Já para cedro, a aplicação das doses de Cd não interferiu na translocação de P, K e Ca, enquanto aumentou a translocação de Mg, Mn e Zn e diminuiu a de S, Cu e Fe. Por outro lado, a aplicação de doses crescentes de Cd em plantas de milho, azevém, trevo-branco e repolho, cultivadas em solução nutritiva, provocou redução na translocação de Zn, Fe, Cu, Mn, Ca e Mg e aumento na translocação de P (YANG et al., 1996).

Estudos revelam que a translocação de Fe das raízes para a parte aérea de soja é influenciada pela presença de Zn na solução (AMBLER; BROWN; GAUCH, 1970). Em determinadas situações, o excesso de metais pesados não afeta a absorção e translocação de Fe e, ainda sim, algumas plantas exibem sintomas de deficiência induzidos, possivelmente, devido a desbalanços nutricionais ou ao fato do metabolismo de o Fe estar sendo afetado (MALAVOLTA, 2006).

Em *Cucumber sativus*, o aumento de concentrações de Zn (0,014; 0,06 e 0,1 mg kg^{-1}) em solução nutritiva reduz a translocação de P e Mn, fazendo com

que estes elementos permaneçam nas raízes em níveis tóxicos às plantas (ABOU-HADID et al., 1994).

Algumas das contradições de interações de Cd e Zn com outros metais observadas nos diferentes trabalhos citados podem ser devido aos resultados serem amplamente dependentes das condições experimentais testadas, como concentração do metal pesado, tipo de solução nutritiva, parte da planta e espécie estudada, sendo necessário testar o comportamento de cada espécie em face do ambiente no qual se deseja simular.

Embora o índice de translocação seja o parâmetro mais utilizado em trabalhos nos quais se deseja avaliar a translocação de elementos nas plantas, ele é indicado apenas quando se tem pouca interferência dos tratamentos sobre a matéria seca ou sobre a proporção do teor entre parte aérea e raízes. Em avaliações da toxicidade de metais nas plantas, o estudo da razão dos teores dos elementos na parte aérea e raiz da plantas é o mais indicado, em detrimento do índice de translocação, por não depender do comportamento da produção de matéria seca.

Estudos acerca da influência múltipla de metais pesados sobre a absorção e translocação de nutrientes em plantas utilizadas para a descontaminação dos solos praticamente inexitem na literatura, culminando em esforços para conhecer o efeito destes não só na sobrevivência das plantas, mas também no comportamento de elementos essenciais ao desenvolvimento dos vegetais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento I

Este trabalho consiste em uma etapa subsequente ao realizado por Carvalho (2010). Resultados satisfatórios alcançados pela autora, os quais foram baseados na produção de matéria seca, capacidade de bioacumulação, teores de Zn e Cd e atividade de enzimas antioxidantes em *Gomphrena clausenii* (anteriormente classificada por *Gomphrena elegans*), possibilitaram classificar tal espécie como hiperacumuladora de Zn e Cd. Contudo, ao longo do período experimental, observaram-se, dependendo da concentração de Zn+Cd utilizada, indícios de que a planta sofreu desbalanços nutricionais possivelmente devido ao ambiente estressante ao qual foi submetida. Dessa forma, tal indagação originou a necessidade de execução deste primeiro experimento, que teve início a partir da análise dos elementos (Ca, P, K, S, Fe, Cu e Mn) na planta. De qualquer modo, toda condução experimental realizada por Carvalho (2010), desde a coleta do material será descrita a seguir.

A amostragem das plantas foi realizada em dezembro de 2007, em uma área nas serras do Poço Verde e do Sucuri, entorno de uma região de mineração de zinco na cidade de Vazante, no noroeste de Minas Gerais. Oito plantas foram coletadas e identificadas como 5B, conforme a posição do local de coleta (Figuras 1 e 2) e, posteriormente, acondicionadas em sacos plásticos.

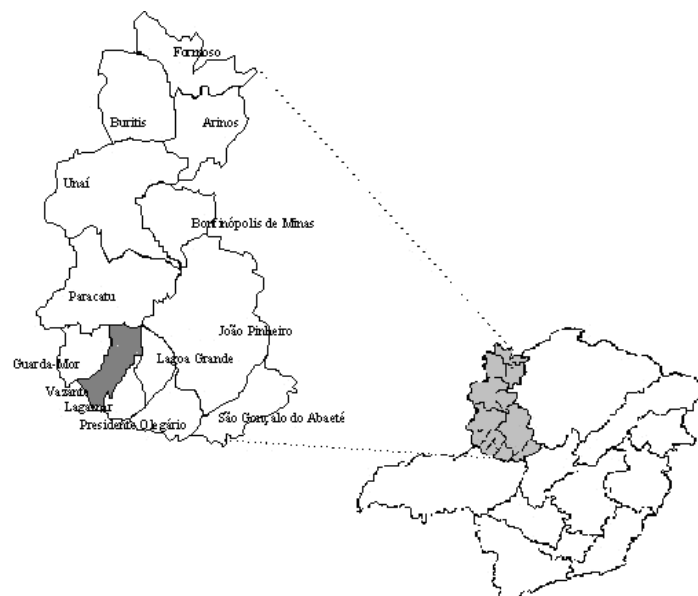


Figura 1 Mapa de Minas Gerais, com destaque para a região noroeste do estado, onde se encontra o município de Vazante



Figura 2 Localização da área de estudo em unidade de mineração de zinco em Vazante, MG

A multiplicação do material foi realizada por meio da técnica de micropropagação, no Laboratório de Cultura de Tecidos, Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras. Após a coleta, as plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação. Para a propagação, foram utilizadas como explantes gemas vegetativas novas apicais e laterais. O processo de assepsia foi de 10 minutos, em água corrente, seguido por imersão sob agitação em hipoclorito de sódio (40%) e Tween-20, durante 15 minutos. Ao final, foram realizados 5 enxágues com água destilada autoclavada, dentro de um fluxo laminar. Os explantes foram inoculados em frascos de 25 x 150 mm contendo 12 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, autoclavado durante 20 minutos (1 atm, 120 °C). Os frascos foram mantidos durante 40 dias em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 ± 1 °C. A aclimatização das plântulas foi realizada em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax, por um período de duas semanas.

O estudo foi realizado em casa de vegetação no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com solução nutritiva em sistema hidropônico, sob aeração constante. As plântulas permaneceram em solução de Clark, para adaptação, por três semanas, com concentrações crescentes correspondentes a 25%, 50% e 100% da força iônica. A solução nutritiva de Clark (1975) contém: $7,26 \text{ mmol L}^{-1} \text{ N} - \text{NO}_3^-$; $0,90 \text{ mmol L}^{-1} \text{ N} - \text{NH}_4^+$; $0,07 \text{ mmol L}^{-1} \text{ P}$; $1,80 \text{ mmol L}^{-1} \text{ K}$; $2,60 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}$; $0,60 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Mg}$; $0,50 \text{ mmol L}^{-1} \text{ S}$; $7,0 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Mn}$; $2 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Zn}$; $0,5 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Cu}$; $19 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ B}$; $0,60 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Mo}$ e $38 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Fe}$ complexado com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$. As soluções foram trocadas semanalmente, renovando-se a contaminação com

Zn+Cd e o pH da solução mantido em 5,5, com adição de NaOH ou HCl 0,1 mol L⁻¹, quando necessário.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 3, sendo 4 concentrações crescentes de Zn+Cd e 3 épocas de coleta das plantas (aos 15, 30 e 45 dias). Como na área estudada existe a presença de uma contaminação múltipla, as concentrações estabelecidas seguiram uma razão Zn+Cd, em molaridade, de 64. Essa razão foi determinada de acordo com os resultados de experimentos realizados por Carvalho (2010), estabelecendo como maior dose aquela na qual as plantas não apresentaram sintomas de toxidez com a aplicação de concentrações de Zn+Cd. As concentrações combinadas utilizadas neste experimento foram 16,25 µmol (16,0 Zn e 0,25 Cd); 162,5 µmol (160 Zn e 2,5 Cd); 325 µmol (320 Zn e 5 Cd) e 975 µmol (960 Zn e 15 Cd). As fontes dos sais utilizadas foram ZnSO₄ e CdSO₄. Os tratamentos resultaram da combinação das quatro concentrações de Zn+Cd e três épocas de coleta das plantas, caracterizando 12 tratamentos com três repetições, totalizando 36 parcelas. Os vasos utilizados apresentavam capacidade de 1,7 L e continham uma única planta.

Durante a condução do experimento, foram observadas possíveis ocorrências de sintomas de toxidez e os efeitos no crescimento das plantas.

Aos 15, 30 e 45 dias de exposição às concentrações de Zn+Cd, as plantas foram colhidas, sendo separadas em parte aérea (folha e caule) e raízes. A parte aérea foi lavada em água deionizada e as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico 10% (v/v), por um minuto e, em seguida, enxaguadas em água deionizada. A seguir, ambas as partes foram secas em estufa, à temperatura entre 65 e 75° C, até atingir massa constante. O peso da matéria seca foi determinado em balança de precisão (0,01 g) e, em seguida, a matéria

seca foi moída em moinho tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm, para ser analisada quimicamente.

O material moído foi digerido segundo o método 3051 da United States Environmental Protection Agency - USEPA (1995), utilizando-se de 0,5 g de material em 10 mL de HNO₃ concentrado, em forno de micro-ondas, com tubos de Teflon® PTFE, à pressão 0,76 MPa, por dez minutos. A temperatura alcançada à pressão de 0,76 MPa foi de, aproximadamente, 175 °C. Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado até 20 mL com água destilada. Após a obtenção dos extratos, foram determinados os teores de Cd e Zn, dados obtidos por Carvalho (2010), por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando-se o equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800®, com atomizador tipo forno de grafite e, para os teores mais elevados (>1,0 mg L⁻¹), por meio da espectrofotometria de absorção atômica com atomizador tipo chama.

A partir dos extratos, também se quantificaram os teores dos elementos Ca, P, K, S, Fe, Mn e Cu, por espectrometria de fluorescência de raios X, por reflexão total (S2 PICOFOX – Bruker), adicionando-se 10 µL do extrato em porta amostras de quartzo. Utilizou-se o gálio como padrão interno e o tempo de leitura foi de 400 segundos.

O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises foram assegurados pelo uso de material de referência BCR-482 Lichen, proveniente do Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM) inserido nas baterias de análise.

O acúmulo dos elementos por planta foi calculado por meio da multiplicação da matéria seca produzida na parte aérea ou raiz pela concentração do elemento no tecido vegetal.

De posse dos teores de Ca, P, K, S, Fe, Mn, Cu, Cd e Zn nas plantas, também se calculou o fator de translocação (FT= teor elemento parte aérea/teor elemento nas raízes). Por meio deste fator, é possível avaliar a habilidade da espécie em translocar determinado elemento da raiz para a parte aérea.

3.2 Experimento II

O segundo experimento foi realizado no período de 27 de outubro a 26 de novembro de 2010, no Laboratório de Cultura de Tecidos, no Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras.

Plantas matrizes de *Gomphrena claussenii*, previamente coletadas na área de mineração descrita anteriormente, cujo solo apresentava elevadas concentrações de Zn, foram mantidas em casa de vegetação. Posteriormente, foram coletados segmentos nodais (contendo um par de gemas) destas plantas matrizes e os mesmos foram introduzidos assepticamente em condições de cultivo *in vitro*. Os segmentos nodais foram submetidos à lavagem por dez minutos em água corrente, seguida de imersão em solução de hipoclorito de sódio (40%) mais Tween-20, por 15 minutos, sob agitação constante. Passaram também por cinco lavagens em água destilada e esterilizada em câmara de fluxo laminar. Após a assepsia, os mesmos foram individualizados e inoculados em frascos de 25 x 150 mm contendo 12 mL meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), adicionando-se 3% de sacarose e 0,6% de ágar. O pH foi ajustado para $5,7 \pm 0,1$, antes da inclusão do ágar e da autoclavagem (1 atm, 120 °C, 20 minutos). Todos os frascos foram mantidos em sala climatizada, com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro, fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de 26 ± 1 °C.

Após o estabelecimento e o crescimento das plântulas, estas foram utilizadas para a obtenção dos segmentos nodais que foram submetidos às concentrações de Zn. O padrão estabelecido foi o de duas folhas por segmento nodal, pertencentes ao terço médio da plântula, com comprimento médio de 1cm.

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com oito repetições, totalizando 40 plantas para o experimento. Os tratamentos consistiram de cinco concentrações de Zn (0, 16, 160, 320 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$), aplicadas por meio de sulfato de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). As plântulas permaneceram em meio de cultura por 30 dias e, ao final do experimento, foram avaliadas em relação aos parâmetros biométricos, que consistiram no número de folhas (NF), comprimento da plântula (ALT) - medida entre a base do caule e a extremidade superior da maior folha -, comprimento do sistema radicular (COM), massa de matéria fresca (MF), massa de matéria seca (MS), número de internódios (NIN), número de brotos (NB), número de pares de gemas emitidos (PGE), bem como diagnose visual.

3.3 Análise estatística

Os dados obtidos nos dois experimentos foram submetidos à análise de variância, sendo as equações de regressão ajustadas às variáveis dependentes, em função das concentrações de Zn e Cd aplicadas. Os critérios para a escolha dos modelos de regressão foram maior coeficiente de determinação, significância dos coeficientes de regressão até 5% de probabilidade e significado biológico do modelo. As análises estatísticas foram realizadas com o programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores certificados para Zn, Cd e Cu nas amostras padrão de referência, bem como os percentuais de recuperação desses metais nas mesmas, são mostrados na Tabela 1. Os valores encontrados são teores médios dos elementos, sendo resultado da leitura de três amostras padrão. Em virtude da recuperação dos elementos obtida nas amostras certificadas, os teores revelam a boa qualidade dos dados analíticos obtidos por espectrometria de fluorescência de raios X ou por espectrometria de absorção atômica.

Tabela 1 Valores certificados, teores encontrados e recuperação de Zn, Cd e Cu nas amostras de referência analisadas por diferentes métodos de leitura

BCR [®] - 482*	Valor certificado	Valor encontrado	Recuperação
	----- mg kg ⁻¹ -----		%
<u>Zn</u> **	100,6(±2,2)	96,4	95,8
<u>Cu</u> **	7,03(±0,19)	7,00	99,6
<u>Cd</u> ***	0,56(±0,02)	0,47	84,0
<u>Zn</u> ***	100,6(±2,2)	71,9	71,5

* padrão de referência produzido a partir de líquen e proveniente do Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM)

** espectrometria de fluorescência de raios X

***espectrometria de absorção atômica

A seguir, são descritos os resultados referentes à produção de matéria seca, teor e acúmulo dos elementos nas plantas sob concentrações de Zn e Cd aplicadas. Cabe ressaltar que, embora os dados referentes às três épocas de colheita das plantas (15, 30 e 45 dias) estejam representados ao longo do trabalho por meio de gráficos e tabelas, foi dada maior ênfase à discussão dos

resultados obtidos aos 45 dias de coleta das plantas (DCP), o que também não impediu que dados de outras épocas de colheita fossem mencionados quando julgado necessário. Tal feito foi realizado por considerar este o período no qual, provavelmente, as plantas estariam mais adaptadas às soluções nutritivas, representando ou extrapolando o máximo possível as condições externas, em campo, na qual as plantas tendem a sobreviver por períodos muito mais longos. Também, aos 45 DCP, foi a ocasião em que, na maior parte dos casos, foram observados efeitos com significância estatística dos tratamentos aplicados.

4.1 Produção de matéria seca

Os valores de matéria seca da parte aérea e raiz foram influenciados pelas concentrações estudadas apenas aos 45 DCP (Figura 3). Neste período, a produção de matéria seca na parte aérea mostrou resposta quadrática negativa com a aplicação dos tratamentos (Figura 3A), com produção máxima estimada (7,68 g) na dose 237,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Zn+Cd). Quanto à matéria seca da raiz, as plantas também mostraram resposta quadrática negativa, sendo a máxima produção atingida estimada (2,36 g) na concentração 537,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn+Cd (Figura 3B). A redução na biomassa de plantas submetidas a níveis tóxicos de metais pesados como Cd e Zn pode ser uma consequência direta destes, influenciando o metabolismo de elementos essenciais como Zn, Mn, Fe e Cu, resultando em um desbalanço nutricional e desordens fisiológicas (DONG; WU; ZHANG, 2002).

Estudos foram realizados submetendo a espécie *Gomphrena claussenii* (anteriormente classificada como *Alternanthera* sp.) a concentrações isoladas de Cd (0 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Zn (2 a 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e também combinadas destes elementos. Os resultados permitiram concluir que as concentrações de Cd e Zn

isoladamente não influenciaram a matéria seca das plantas, porém, foi favorecida pela mais alta concentração de Zn aplicada ($300 \mu\text{mol L}^{-1}$), associada a uma pequena concentração de Cd, na proporção de Zn: Cd de 60:1 (BORIN, 2010).

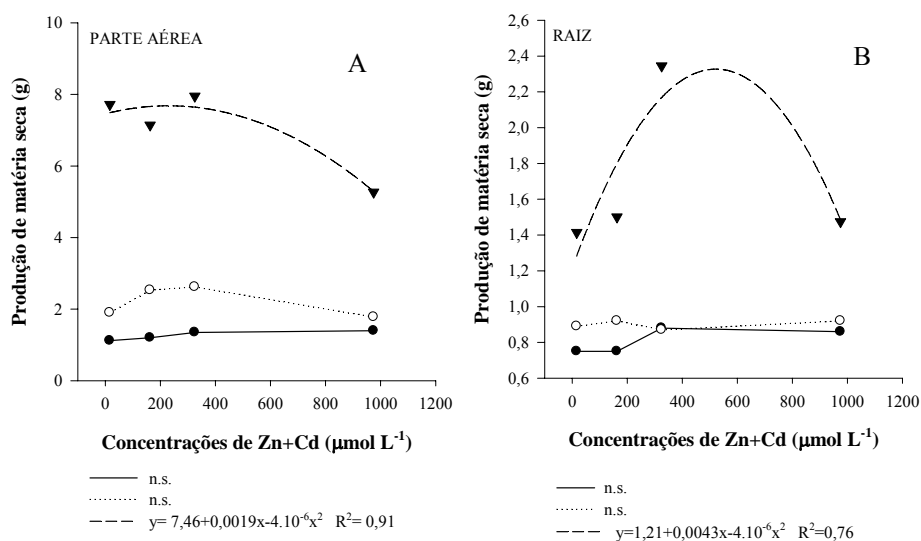


Figura 3 Produção de matéria seca na parte aérea (A) e raiz (B) de *Gomphrena clausenii*, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25; 162,5; 325 e $975 \mu\text{mol L}^{-1}$) aplicadas e épocas de colheita (—●— 15,○..... 30 e ---▼--- 45 dias). ns: não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

Embora, no presente trabalho, tenha sido observada redução nos valores de matéria seca das plantas, com a aplicação das concentrações aos 45 DCP, estes foram elevados quando comparados aos resultados obtidos por Cosio, Martinoia e Keller (2004). Neste estudo, em que foram utilizadas duas espécies hiperacumuladoras de Cd e Zn (*Thlaspi caerulescens* e *Arabidopsis halleri*), os valores de matéria seca da parte aérea encontrados, quando as plantas foram submetidas às maiores concentrações de Cd ($10 \mu\text{mol L}^{-1}$) e Zn ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$),

não ultrapassaram 2,87 g, durante o período de 12 semanas. Isso evidencia uma vantagem comparativa da espécie *Gomphrena claussenii* com a maioria das espécies estudadas e indicadas como hiperacumuladoras de Cd e Zn que, em sua maioria, são de clima temperado.

4.2 Teor e acúmulo de nutrientes em *Gomphrena claussenii* sob influência das concentrações de Zn+Cd aplicadas e épocas de colheita

4.2.1 Teor e acúmulo de Ca

O teor e o acúmulo de Ca na parte aérea e raiz da planta são apresentados na Figura 4. Observa-se que, aos 45 DCP, ocorreu resposta linear negativa para teor de Ca na raiz (Figura 4B), com teor mínimo de 1,47 g kg⁻¹ com a aplicação da última concentração (975 µmol L⁻¹ Zn+Cd).

Estudos realizados em *Thlaspi caerulescens* apontaram redução na concentração de Ca nas raízes quando aplicada a dose de 3.160 mmol de Zn (BROWN et al., 1995). Já em *Betula pendula*, a aplicação de doses de Cd entre 0 e 2 µmol de Cd resultou em uma diminuição na concentração de Ca (GUSSARSON, 1994). Reduções de Ca na parte aérea e raiz das plantas podem possivelmente ser explicadas pela interação antagônica entre este elemento e cátions divalentes como o Cd⁺², potencialmente presente durante o processo de absorção (KABATA-PENDIAS, 2011).

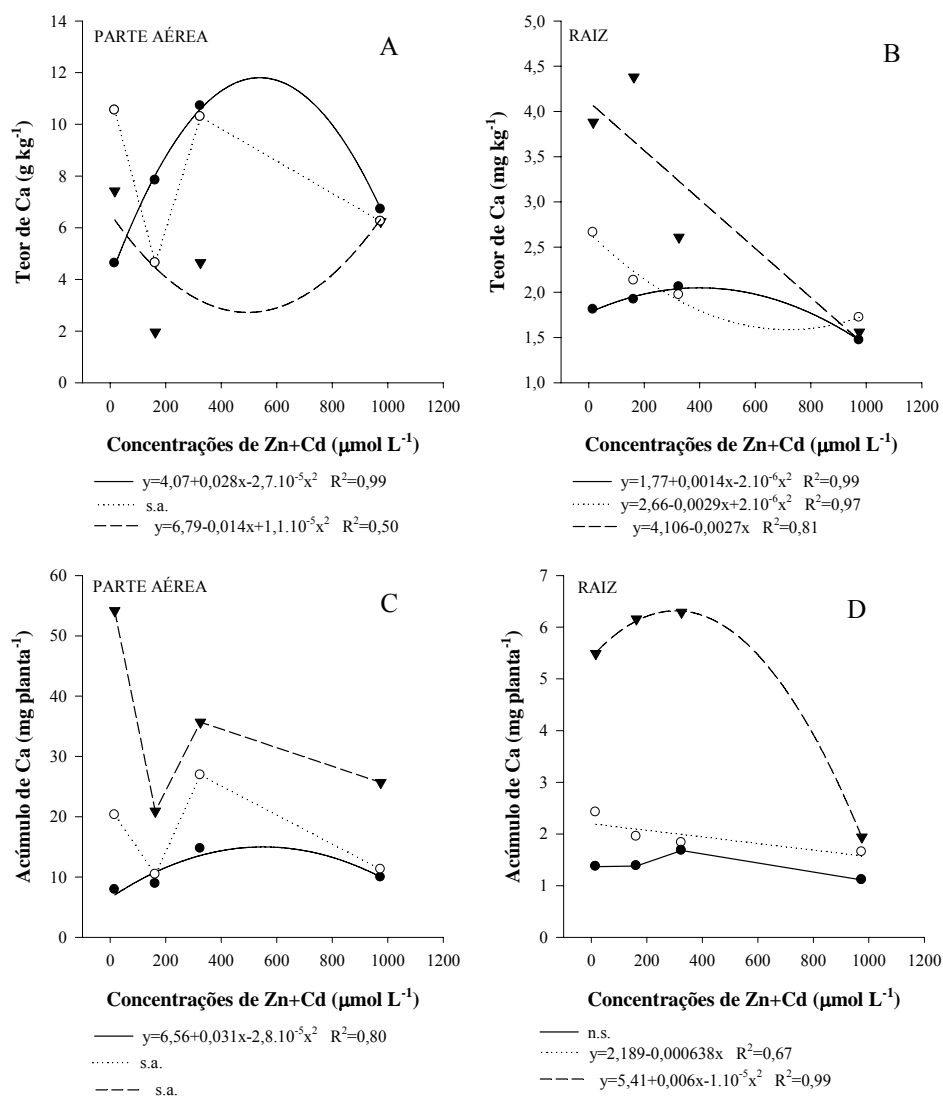


Figura 4 Teor e acúmulo de Ca, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25; 162,5; 325 e 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$) aplicadas e épocas de colheita (—●— 15,○..... 30 e ----▼---- 45 dias). ns: não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. sa: sem ajuste para os modelos testados

4.2.2 Teor e acúmulo de P

O acúmulo de P na matéria seca da raiz apresentou resposta quadrática negativa, com valor máximo ($6,28 \text{ mg planta}^{-1}$) na dose $611,1 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Zn+Cd}$ (Figura 5D). Segundo Malavolta (2006), o excesso de Zn exerce efeito antagônico na absorção de P, tendo este efeito sido observado na espécie *Saccharum* ssp. (JAIN et al., 2010). O Cd pode exercer também efeito antagônico na absorção de P, com reduções em seu teor de até 40%, prejudicando o crescimento das plantas (KABATTA-PENDIAS, 2011). Reduções no teor foliar de P foram observadas na espécie *Betula pendula*, na presença de Cd (GUSSARSSON et al., 1996).

De maneira geral, aos 15 e 30 DCP (Figuras 5A e 5B), a espécie *Gomphrena claussenii* não teve os teores de fósforo reduzidos com o aumento das concentrações de Zn+Cd.

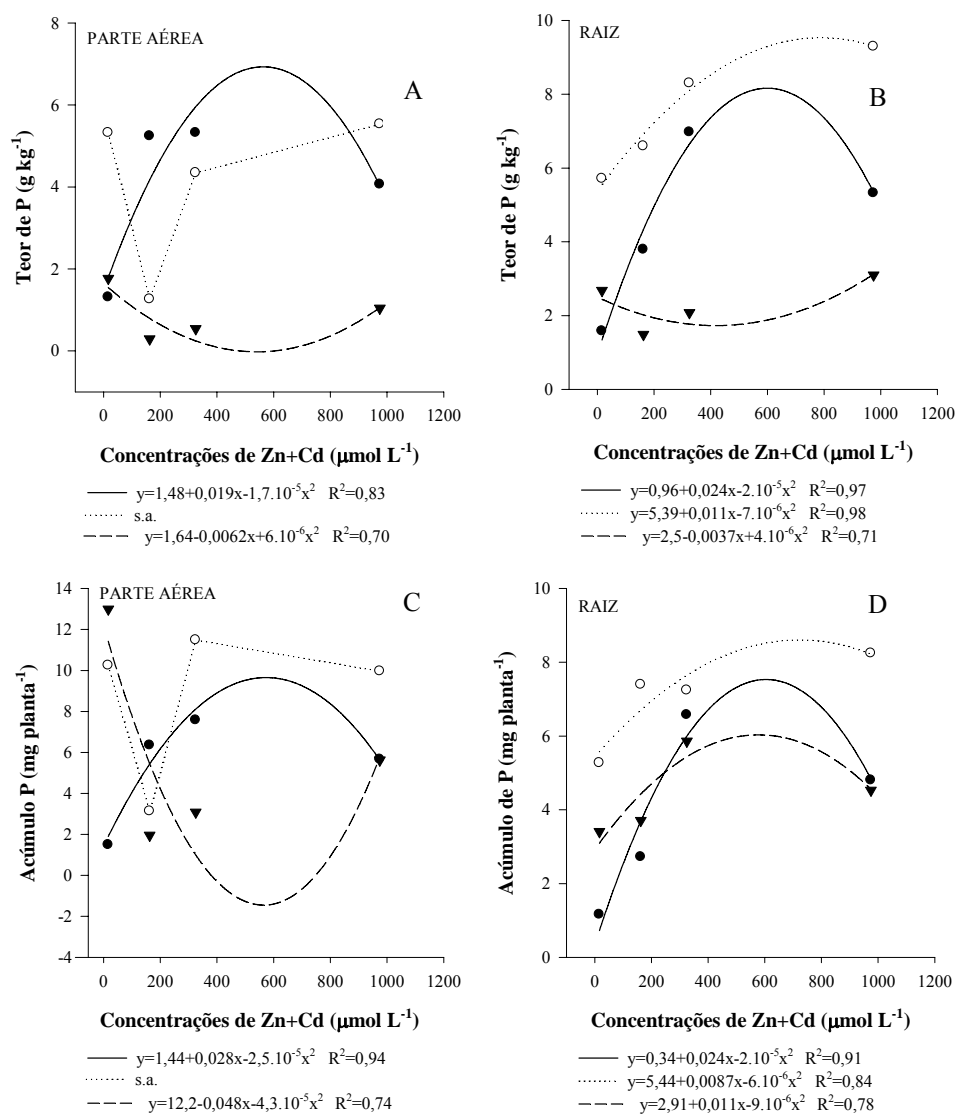


Figura 5 Teor e acúmulo de P, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25; 162,5; 325 e 975 μmol L⁻¹) aplicadas e épocas de colheita (—●— 15,○..... 30 e - - - ▼ - - - 45 dias). ns: não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. sa: sem ajuste para os modelos testados

4.2.3 Teor e acúmulo de K

Na Figura 6 são mostrados o teor e acúmulo de K encontrados nas plantas analisadas. Observou-se resposta quadrática negativa para acúmulo de K na raiz aos 45 DCP, atingindo valor máximo ($34,9 \text{ mg planta}^{-1}$) na concentração $450,6 \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Zn+Cd}$, reduzindo a partir daí (Figura 6D). Em *E. maculata* e *E. urophylla*, a presença de concentrações crescentes de Zn na solução provocou inibição de K no processo de absorção (SOARES et al., 2001). O mesmo comportamento de redução radicular de K foi observado por Paiva, Carvalho e Siqueira (2001), em mudas de ipê-roxo submetidas a doses crescentes de Cd. Segundo Kabata-Pendias (2011), interações antagônicas entre Cd e elementos essenciais, como o K, podem ocorrer devido a um efeito prejudicial do Cd às membranas celulares, o que afetaria a absorção e o transporte de K na planta. A redução nos teores radiculares de K é, possivelmente, explicada por um efeito de competição entre este elemento e cátions divalentes, como o Cd^{2+} , presente na solução (MARSCHNER, 1995).

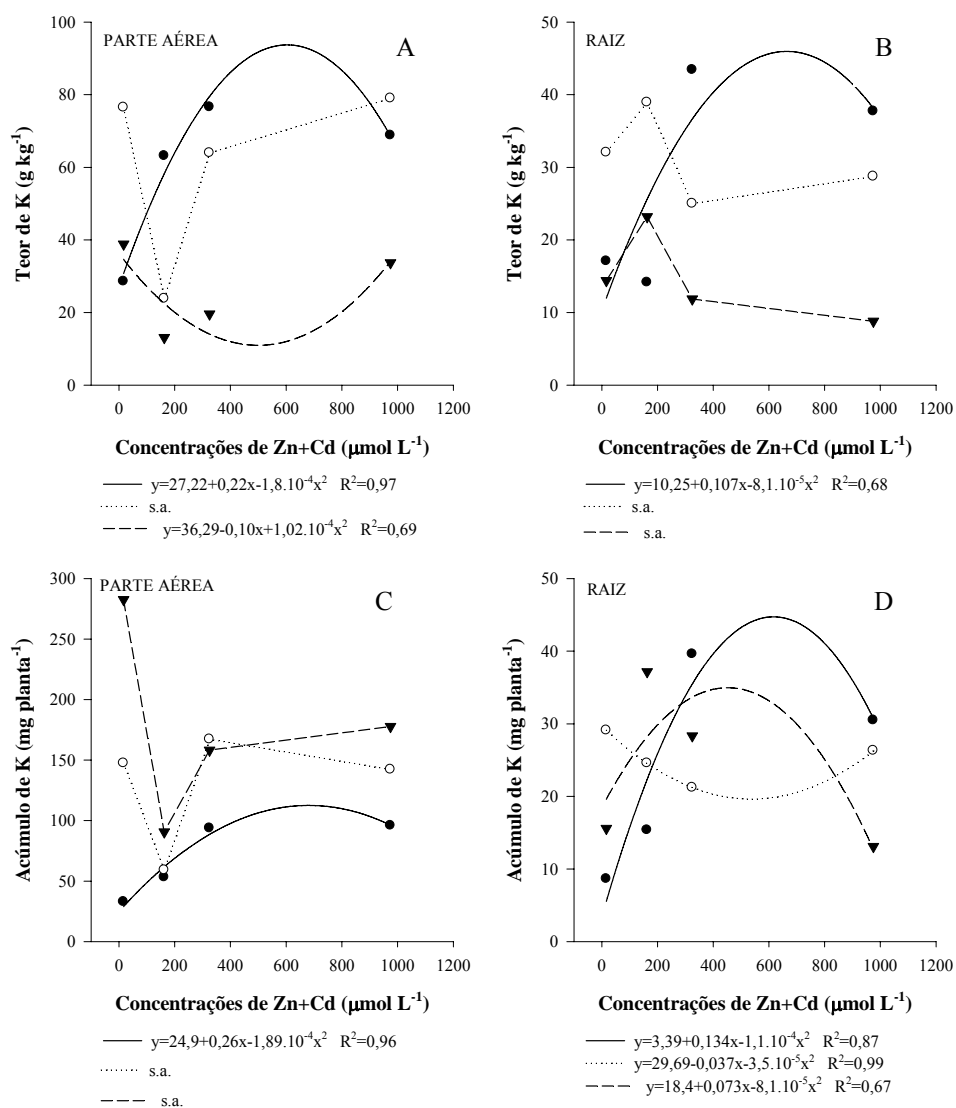


Figura 6 Teor e acúmulo de K, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25; 162,5; 325 e 975 μmol L⁻¹) aplicadas e épocas de colheita (—●— 15,○..... 30 e ---▼--- 45 dias). ns: não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. sa: sem ajuste para os modelos testados

4.2.4 Teor e acúmulo de S

Na Figura 7 são mostrados o teor e o acúmulo de S na parte aérea e na raiz das plantas estudadas. Observa-se que, aos 45 DCP, o acúmulo de S na raiz mostrou resposta quadrática negativa, alcançando valor máximo de 5.626 mg planta⁻¹, na concentração estimada de 624,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd. De maneira geral, a diminuição no acúmulo de S na raiz, possivelmente, está associada à redução na produção de matéria seca da raiz observada aos 45 DCP.

De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001), a presença de metais pesados não exerce nenhum efeito sobre a absorção de S. O que ocorre é que as plantas, quando em condição de exposição a níveis tóxicos de determinados metais, como Cd e Zn, durante longos períodos, tendem a sintetizar compostos ricos em grupos tiólicos, presentes nas fitoquelatinas, sendo, possivelmente, o responsável pelo aumento de S, principalmente na raiz. Essas moléculas complexam e impedem a ação dos metais nas células, caracterizando um possível mecanismo de tolerância ao ambiente estressante (DING et al., 1994). A síntese de fitoquelatinas é fortemente influenciada pela presença de Cd, enquanto para o Zn são necessárias elevadas concentrações para induzir sua síntese (STEFFENS, 1990).

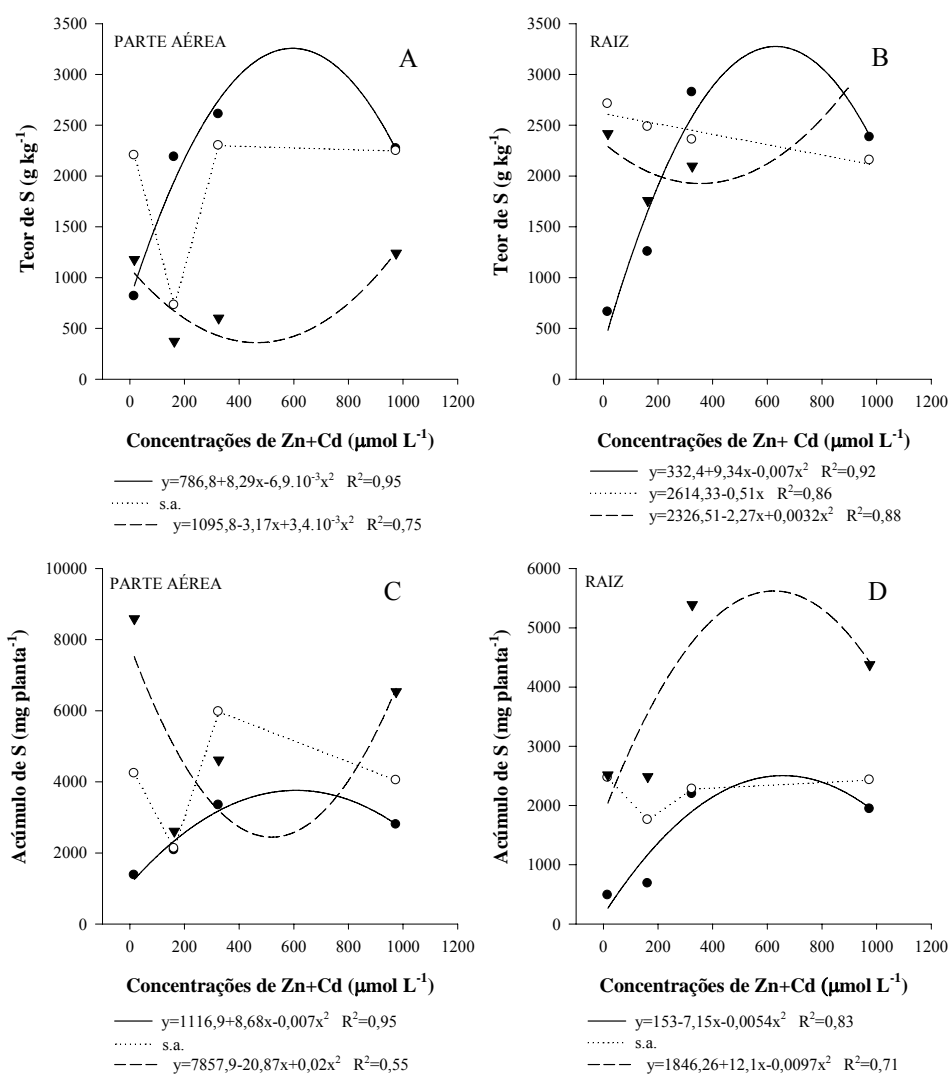


Figura 7 Teor e acúmulo de S, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25; 162,5; 325 e 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$) aplicadas e épocas de colheita (—●— 15,○..... 30 e ----▼---- 45 dias). ns: não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F. sa: sem ajuste para os modelos testados

4.2.5 Teor e acúmulo de Fe

Após 45 dias de exposição das plantas às concentrações de Zn+Cd, observa-se que o teor de Fe na parte aérea mostrou resposta quadrática positiva (Figura 8A), implicando que, até a concentração de 477, 27 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd, a presença de Zn e Cd exerceu efeito antagônico sobre a absorção de Fe. Segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), a presença de metais pesados pode induzir à deficiência de Fe na planta, presumivelmente, por inibição competitiva.

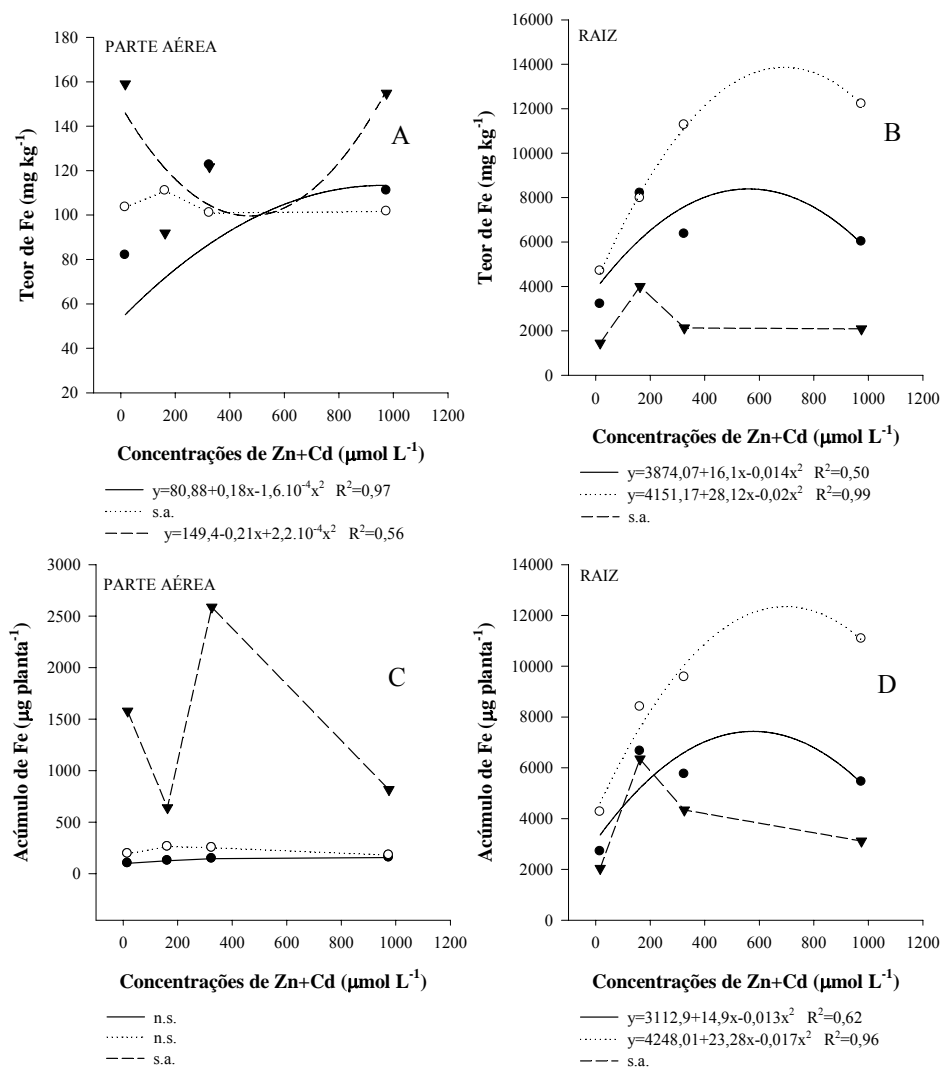


Figura 8 Teor e acúmulo de Fe, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25; 162,5; 325 e 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$) aplicadas e épocas de (—●—15, ○ 30 e ▼ 45 dias). ns: não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. sa: sem ajuste para os modelos testados

Carvalho (2010) verificou, visualmente, a ocorrência de sintoma de toxidez caracterizada por uma clorose generalizada, pouco acentuada em *Gomphrena claussenii*, quando submetida à maior concentração de Zn+Cd ($975 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Figura 9).



Figura 9 Detalhe do sintoma de clorose em *Gomphrena claussenii*, 30 e 45 dias após exposição à última concentração ($975 \mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd). Foto de Carvalho (2010)

O sintoma de clorose pode surgir a partir da deficiência de Fe na parte aérea da planta, causada pelo fato de Zn^{2+} e Fe^{2+} possuírem o mesmo raio iônico ou, possivelmente, pela absorção de Cd ser realizada através de transportadores de Fe, o que causaria a deficiência deste nutriente na planta (CLEMENS, 2006; MARSCHNER, 1995). O sintoma de clorose em órgãos mais novos, quando comparados aos mais velhos, é atribuído ao fato de o Fe ser classificado como um nutriente pouco móvel nos vasos do floema. Há evidências de que parte do Fe também seja transportado na forma orgânica de quelatos, mesmo quando

aplicados na forma mineral. Assim, a formação de quelatos com carga negativa dificultaria a fixação do cátion na parede celular dos vasos do floema (MALAVOLTA, 2006). A clorose observada nas plantas pode, ainda, ser atribuída a uma competição do Cd com o Mg (KURDZIEL; PRASAD; STRZALKA, 2004), afetando potencialmente a estabilidade das clorofilas.

4.2.6 Teor e acúmulo de Cu

O teor de Cu na parte aérea aos 45 DCP seguiu resposta quadrática positiva, tendo o teor mínimo estimado ($8,6 \text{ mg kg}^{-1}$) sido atingido na concentração $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn+Cd (Figura 10A). Segundo Kabata-Pendias (2011), interações entre o Zn e Cu são comuns, uma vez que são absorvidos pelo mesmo mecanismo e que, dessa forma, um pode inibir a absorção do outro. Já a interação entre Cd e Cu pode ser antagônica ou sinérgica.

A exposição das plantas a elevadas concentrações de metais pesados como Cd e Zn pode estimular a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio resultantes de um estresse oxidativo (DIETZ; BAIER; KRÄMER, 1999). Para reduzir os danos causados por essas espécies reativas de oxigênio, as plantas se utilizam de enzimas, como a superóxido dismutase (SOD), que são catalisadoras da dismutação do O_2^- e HO_2^+ a H_2O_2 . Essas enzimas podem estar ligadas a um metal (Cu/Zn, Mn e Fe) que atuam como cofatores e, nas plantas, normalmente, estão presentes no citosol, como Cu/Zn-SOD, nos cloroplastos, como Cu/Zn e ou Fe-SOD e nas mitocôndrias, como Mn-SOD. Dessa forma, as SODs são consideradas importantes agentes antioxidantes, sendo os elementos ligados a elas fundamentais para superar o estresse causado pela toxidez de metais pesados (BAKER; ORLANDI, 1995).

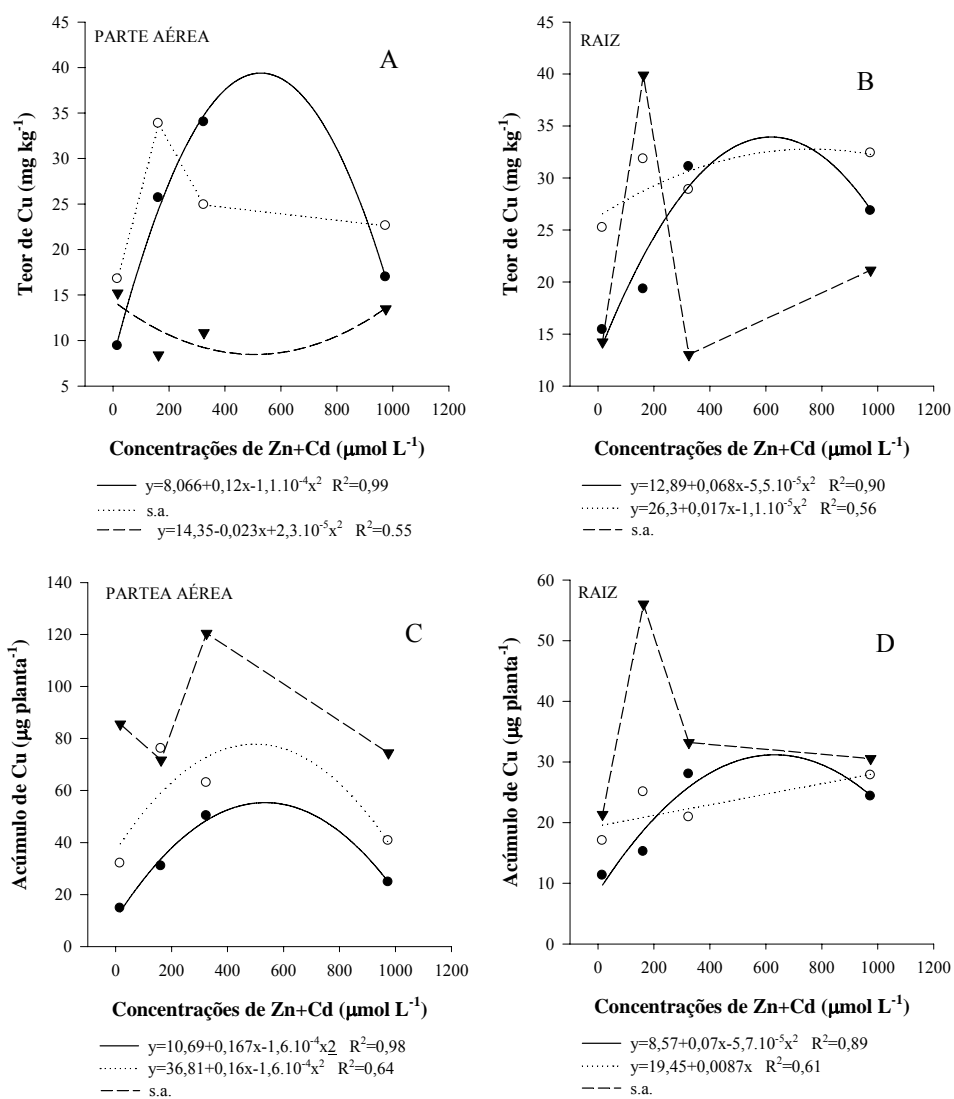


Figura 10 Teor e acúmulo de Cu, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25;162,5; 325 e 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$) aplicadas e épocas de (—●— 15,○..... 30 e ----▼---- 45 dias). ns: não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. sa: sem ajuste para os modelos testados

Adicionalmente, vale ressaltar que a espécie *Gomphrena claussenii* utilizou o sistema de enzimas antioxidantes, destacando-se a atividade da SOD e da glutatona redutase (GR), na redução do estresse causado pela exposição das plantas a elevadas concentrações Zn+Cd, conforme relatado por Carvalho (2010).

4.2.7 Teor e acúmulo de Mn

Observou-se resposta linear negativa para acúmulo de Mn na parte aérea das plantas aos 45 DCP, tendo o menor acúmulo ($112,2 \mu\text{g planta}^{-1}$) sido atingido com a maior concentração Zn+Cd aplicada (Figura 11C). Quanto ao teor de Mn aos 45 DCP na parte aérea e raiz da plantas, foi observada redução entre 25% e 50% com a aplicação da última concentração de Zn+Cd ($975 \mu\text{mol L}^{-1}$) em relação à primeira ($16,25 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 2). Contudo, o teor médio total estimado de Mn aos 45 DCP ($38,1 \text{ mg kg}^{-1}$) e com a aplicação da última relação de Zn+Cd está acima do nível crítico de deficiência observado para a maioria dos vegetais ($15 \text{ a } 25 \text{ mg kg}^{-1}$), possivelmente não implicando em riscos no desenvolvimento da espécie (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

Tabela 2 Efeito das concentrações de Zn+Cd no teor de elementos na parte aérea e raiz de *Gomphrena claussenii*, aos 45 dias de coleta das plantas

	Elemento						
	Ca	P	K	S	Fe	Cu	Mn
Parte aérea	(- -)*	(- -)	(-)	(+)	(-)	(-)	(- -)
Raiz	(- - -)	(+)	(- -)	(++)	(++)	(++)	(- -)

*comparando-se teores obtidos com a maior e a menor concentração de Zn+Cd aplicada. (-/+) redução/ incremento de até 25%; (-/++) redução/ incremento entre 25 e 50%; (- - /+++) redução/ incremento maior que 50%; 0 sem efeito

Segundo os mesmos autores, os efeitos do Mn na absorção de Cd nas plantas podem ser antagônicos ou sinérgicos. Já o excesso de Zn levaria a deficiências de Mn na parte aérea das plantas (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Soares et al. (2001) observaram que a aplicação de concentrações referentes a 400 μmol de Zn na solução foi capaz de reduzir em 57% o teor de Mn na parte aérea em espécies de eucalipto, evidenciando uma inibição competitiva entre estes dois elementos.

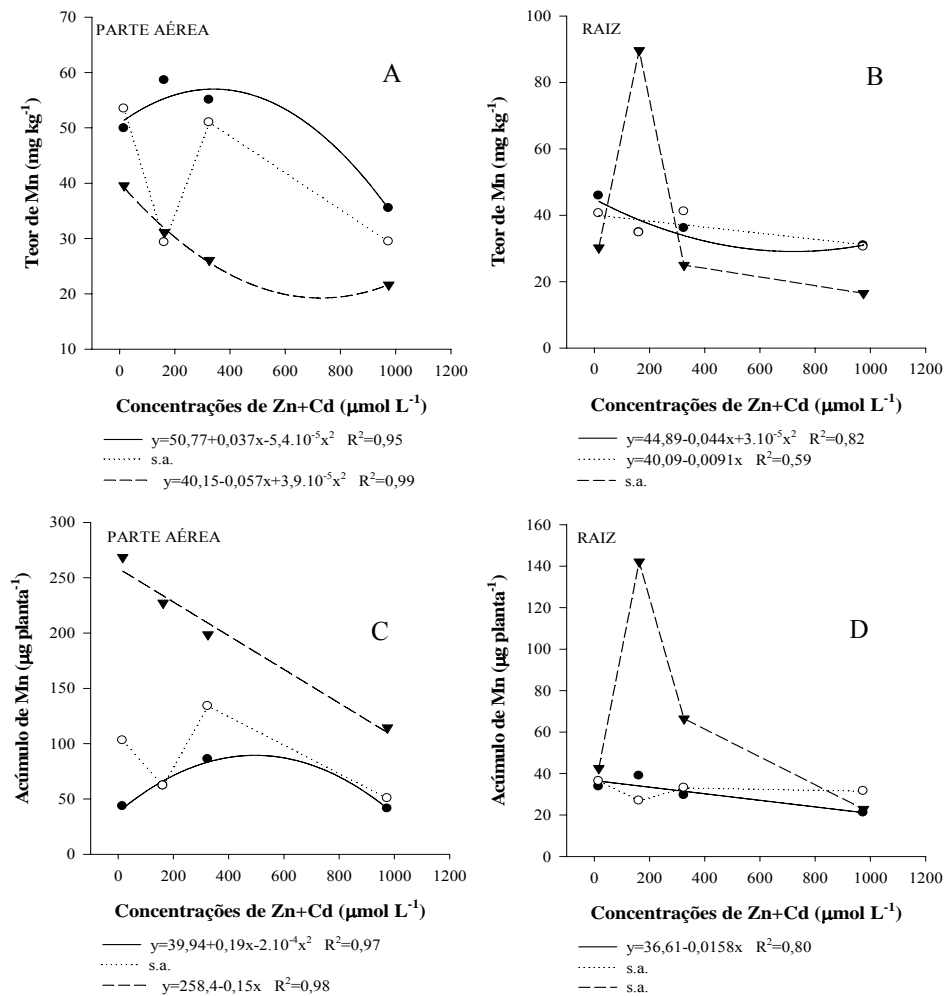


Figura 11 Teor e acúmulo de Mn, em função das concentrações de Zn+Cd (16,25; 162,5; 325 e 975 μmol L⁻¹) aplicadas e épocas de colheita (—●— 15,○..... 30 e ----▼---- 45 dias). ns: não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F. sa: sem ajuste para os modelos testados

Devido à recente descoberta de que a espécie *Gomphrena claussenii* é hiperacumuladora de Cd e Zn, inexitem, na literatura, teores adequados de nutrientes para esta espécie. Dessa forma, sugere-se que, quando a mesma é submetida a uma condição de estresse, tal como realizado neste trabalho, o teor médio de nutrientes na parte aérea das plantas na faixa de contaminação entre 16,25 e 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd seja o apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Teores médios encontrados na parte aérea de *Gomphrena calussenii*, quando submetida à faixa de contaminação de 16,25 a 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd

Elemento	Teores médios encontrados
Ca	18,8 g kg ⁻¹
P	26,3 g kg ⁻¹
K	4,7 g kg ⁻¹
S	848,3 g kg ⁻¹
Fe	132,0 mg kg ⁻¹
Cu	12,0 mg kg ⁻¹
Mn	29,6 mg kg ⁻¹

4.3 Fator de translocação de Ca, P, K e S sob influência das concentrações de Zn+Cd aplicadas e épocas de colheita

Os fatores médios de translocação de Ca, P, K e S determinados para *Gomphrena claussenii* são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4 Fator médio de translocação de Ca, P, K e S em *Gomphrena claussenii* exposta a concentrações crescentes de Zn+Cd em solução nutritiva e três épocas de colheita

		Concentração de Zn+Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
		16,25 (16+0,25)	162,5 (160+2,5)	325 (320+5)	975 (960+15)
Épocas		Fator de translocação			
Ca	15	2,55	4,14	5,19	4,56
	30	3,99	2,18	5,22	3,66
	45	1,91	0,68	1,78	2,44
P	15	0,83	1,40	0,77	0,77
	30	0,93	0,19	0,52	0,59
	45	0,67	0,20	0,26	0,34
K	15	1,82	4,78	1,77	1,86
	30	2,39	0,62	2,56	2,75
	45	2,72	0,57	1,65	3,92
S	15	1,30	1,81	0,93	0,95
	30	0,82	0,29	0,97	1,05
	45	0,49	0,21	0,29	0,40

A aplicação das concentrações crescentes de Zn+Cd exerceu efeito significativo sobre os fatores de translocação (FTs) de Ca, K e S, apresentado efeitos diferenciados quanto ao nutriente e à época de colheita (Tabela 5).

Tabela 5 Equações de regressão do fator de translocação (FT em %) de Ca, P, K e S de *Gomphrena claussenii*, em resposta a concentrações de Zn+Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e épocas de colheita

Nutriente	Época de colheita (dias)	Equação de regressão	R ²
Ca	15	$y=2,4+0,012x-1.10^{-5}x^2$	0,99
	30	s.a.	-
	45	$y=1,61-0,0016x+3.10^{-6}x^2$	0,50
P	15	s.a.	-
	30	s.a.	-
	45	$y=0,63-0,0019x+2.10^{-6}x^2$	0,72
K	15	s.a.	-
	30	s.a.	-
	45	$y=2,4-0,0068x+9.10^{-6}x^2$	0,78
S	15	s.a.	-
	30	s.a.	-
	45	n.s.	-

n.s. não significativo, a 5% de probabilidade, pelo teste F

s.a. sem ajuste para os modelos testados

Os FTs de Ca mostraram resposta quadrática negativa aos 15 DCP, atingindo translocação máxima estimada na concentração $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn+Cd (Tabela 5). Resposta quadrática positiva foi observada nas plantas aos 45 DCP, obtendo-se translocação mínima estimada (1,39) de Ca na concentração $266,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn+Cd. De forma geral, observaram-se incrementos entre 25% e 50% no fator de translocação de Ca aos 45 DCP, comparando-se os fatores obtidos com a aplicação da primeira e da última concentração de Zn+Cd (Tabela 6). O aumento da translocação de Ca em determinada concentração pode ser atribuído ao efeito fitotóxico do Zn na perda de seletividade da membrana, causando influxo passivo deste nutriente para a parte aérea (KABATA-PENDIAS, 2011).

Tabela 6 Efeito das concentrações de Zn+Cd no fator de translocação de Ca, P, K e S em *Gomphrena claussenii*, aos 45 dias de coleta das plantas

Fator de translocação	Elementos			
	Ca	P	K	S
	(++)*	(- -)	(++)	0

*comparando-se teores obtidos com a aplicação da maior e menor concentração de Zn+Cd. (-/+ redução/ incremento de até 25%; (-/+) redução/ incremento entre 25 e 50%; (---/+++) redução/ incremento maior que 50%; 0 sem efeito

Os FTs de P aos 45 DCP mostraram resposta quadrática positiva com translocação mínima (0,18) na concentração 475 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn+Cd. (Tabela 5). Já o índice de translocação mínimo deste elemento (16,5%) foi atingido na concentração Zn+Cd de 550 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (dados não mostrados). Em diferentes espécies de plantas, o índice de translocação de P é aumentado com a contaminação de Cd no meio (PAIVA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2002; YANG et al., 1996). O efeito fitotóxico do Zn na perda da seletividade da membrana também poderia ter provocado influxo passivo deste nutriente para a parte aérea, implicando no incremento da translocação de P na planta.

Os FTs de K aos 45 DCP mostraram resposta quadrática com ponto mínimo (1,1) na concentração 377,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd (Tabela 5). Neste trabalho, o índice de translocação mínimo de K (69,8%) foi atingido na concentração de Zn+Cd de 555,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (dados não mostrados). Resposta quadrática negativa foi observada em mudas de ipê-roxo, tendo o IT de K aumentado até a dose de 98 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd (PAIVA; CARVALHO; SIQUEIRA, 2002).

Quanto ao S os FTs variaram de 0,21 a 1,81 (Tabela 4), porém, não foram afetados significativamente pelas concentrações de Zn+Cd aplicadas aos 45 DCP (Tabela 5). Geralmente, são observados incrementos na translocação de S em resposta às concentrações de Zn+Cd aplicadas principalmente em função

dos mecanismos de tolerância das plantas ao excesso destes metais. Isso ocorre por meio da produção de fitoquelatinas, que são substâncias intercelulares ricas em grupos tiol (-SH), presentes na cisteína (DING et al., 1994).

4.4 Fator de translocação de Fe, Cu, Mn, Zn e Cd sob influência das concentrações de Zn+Cd aplicadas e épocas de colheita

Os fatores médios de translocação de Fe, Cu, Mn, Zn e Cd determinados para *Gomphrena claussenii* estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 Fator médio de translocação de Fe, Cu, Mn Zn e Cd em *Gomphrena claussenii* expostas a concentrações crescentes de Zn+Cd em solução nutritiva e três épocas de colheita

		Concentração de Zn+Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
		16,25 (16+0,25)	162,5 (160+2,5)	325 (320+5)	975 (960+15)
Épocas		Fator de translocação (%)			
Fe	15	0,027	0,014	0,019	0,018
	30	0,023	0,014	0,009	0,008
	45	0,110	0,023	0,058	0,075
Cu	15	0,608	1,329	1,098	0,632
	30	0,667	1,064	0,863	0,698
	45	1,086	0,211	0,859	0,637
Mn	15	1,089	1,693	1,531	1,153
	30	1,321	0,844	1,240	0,970
	45	1,312	0,347	1,082	1,320
Zn	15	0,418	0,895	0,858	1,015
	30	0,300	0,505	0,713	1,047
	45	0,185	0,425	0,505	1,069
Cd	15	0,066	0,372	0,238	0,250
	30	0,026	0,161	0,102	0,253

45 0,148 0,143 0,159 0,122

O FT de Fe mostrou ajuste quadrático positivo aos 30 DCP (Tabela 8). Observando-se a Tabela 7, verifica-se que este elemento translocou-se pouco da raiz para a parte aérea da planta, com fatores que variaram, em média, de 0,008 a 0,11.

Tabela 8 Equações de regressão do fator de translocação (FT em %) de Fe, Cu, Mn, Zn e Cd de *Gomphrena clausenii*, em resposta a concentrações de Zn+Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$) e épocas de colheita

Nutriente	Época de colheita (dias)	Equação de regressão	R ²
Fe	15	s.a.	-
	30	$y=0,023-6.10^{-5}x+3,4.10^{-7}x^2$	0,83
	45	s.a.	-
Cu	15	$y=0,69+0,0027x-2,8.10^{-6}x^2$	0,68
	30	$y=0,73+0,0011x-1,2.10^{-6}x^2$	0,48
	45	s.a.	-
Mn	15	$y=1,15+0,0023x-2,4.10^{-6}x^2$	0,70
	30	s.a.	-
	45	s.a.	-
Zn	15	$y=0,45+0,002x+1,46.10^{-6}x^2$	0,82
	30	$y=0,37+0,00072x$	0,93
	45	$y=0,22+0,00089x$	0,99
Cd	15	s.a.	-
	30	$y=0,063+0,0002x$	0,76
	45	n.s.	-

n.s. não significativo a 5% de probabilidade, pelo teste F

s.a. sem ajuste para os modelos testados

De acordo com Yang et al. (1996), a aplicação de metais pesados, incluindo o Cd, pode restringir o transporte de Fe em várias espécies de plantas. Em soja, verificou-se que a aplicação de doses crescentes de Zn em solução nutritiva interferiu a translocação de Fe. Este efeito estaria relacionado a uma

inibição na redução de Fe nas raízes ou, até mesmo, no transporte de Fe (AMBLER; BROWN; GAUCH, 1970). A baixa translocação de Fe é compatível com a clorose internerval observada nas plantas, uma vez que este elemento participa da molécula de clorofila, além de ser essencial para o funcionamento dos cloroplastos (MARSCHNER, 1995). A similaridade do raio iônico do Fe e Zn tem sido apontada como mecanismo do fenômeno de deficiência induzida de Fe na presença de Zn (WOOLHOUSE, 1983). Diante da reduzida translocação de Fe observada nas plantas pode-se inferir que a clorose observada nas mesmas, possivelmente, não seria provocada por alterações na absorção de Fe e, sim, pela reduzida translocação deste elemento das raízes para a parte aérea. Considerando que parte do Fe também possa ser transportado na forma de quelatos, a formação destes com carga negativa dificultaria a fixação do cátion na parede celular dos vasos (MALAVOLTA, 2006).

Resposta quadrática negativa foi observada para a translocação de Cu aos 15 e 30 DCP (Tabela 8). Até a concentração de $482,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd (15 DCP) e $458,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd (30 dias) foi possível observar aumento na translocação de Cu e, a partir destas, a mesma decaiu. Segundo Obata e Umebayashi (1997), a presença do Cd é capaz de estimular a absorção de Cu, porém, restringe seu transporte para a parte aérea.

As adições combinadas de Zn+Cd proporcionaram resposta quadrática negativa para o FT de Mn aos 15 DCP, com aumento da translocação até a concentração de $479,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd, diminuindo a partir desta (Tabela 8). Neste trabalho, observou-se aumento no índice de translocação de Mn aos 15 DCP até a concentração de Zn+Cd de $606 \mu\text{mol L}^{-1}$, diminuindo a partir desta (dados não mostrados). O mesmo efeito no índice de translocação de Mn foi observado por Paiva, Carvalho e Siqueira (2002), em mudas de cedro submetidas às doses crescentes de Cd. Segundo Nagajyoti, Lee e Sreekanth

(2010), o excesso de Zn causaria deficiências de Mn e Cu na parte aérea das plantas, sendo atribuídas à dificuldade de transferência destes elementos da raiz para os órgãos aéreos.

No processo de fitoextração, geralmente, é requerida máxima translocação de metais pesados para partes facilmente coletáveis das plantas, ou seja, a parte aérea. As plantas tolerantes tendem a restringir transferências solo-raiz e raiz-folhas e, dessa forma, acumulam menos metais em sua biomassa. Já as plantas hiperacumuladoras ativamente absorvem e translocam os metais para a parte aérea (YOON et al., 2006). Dessa forma, plantas que apresentam reduzida translocação de metais são consideradas inadequadas para fitoextração.

No presente estudo, os fatores de translocação de Zn e Cd variaram de 0,185 a 1,069 para Zn e de 0,026 a 0,372 para Cd (Tabela 7).

Alguns trabalhos destacam a importância de fatores de translocação de metais >1 para classificação de espécies hiperacumuladoras (BAKER; WHITING, 2002; LUBBEN; SAUEERBECK, 1991; WEI; SHU; LAN, 2004). Os resultados mostraram que a espécie *Gomphrena claussenii* apresentou FTs de Zn maiores que 1, com a aplicação da última concentração de Zn+Cd ($975 \mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 7), implicando que, nesta condição, a proporção deste elemento é maior na parte aérea que na raiz das plantas. Observaram-se também incrementos maiores que 50% no fator de translocação de Zn, comparando-se os dados obtidos com a aplicação da primeira e da última concentração de Zn+Cd (Tabela 9). Para o Zn, aos 15 DCP, a translocação apresentou resposta quadrática negativa, sendo a maior translocação observada na concentração $684,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ Zn+Cd. Aos 30 e 45 DCP, a aplicação das concentrações exerceu aumento linear na translocação de Zn (Tabela 7). Os índices de translocação de Zn em *Gomphrena claussenii* variaram de 38,3% a 79,7% (dados não mostrados). Lombi et al. (2001) encontraram valores de translocação de Zn de

54 a 52% na espécie hiperacumuladora de Cd/Zn, *Thlaspi caerulescens*. Soares et al. (2001) apontaram que índices de translocação de Zn superiores a 40% indicam a alta capacidade deste elemento em translocar-se das raízes para a parte aérea em plantas de eucalipto. Comparado a estes trabalhos, observa-se que, neste, as combinações de Zn+Cd aplicadas não prejudicaram a translocação de Zn. Trabalhos com diferentes espécies concluíram que a absorção de Zn pode ser reduzida devido à presença de Cd na solução, prejudicando a translocação deste elemento (JALIL; SELLES; CLARK, 1994; NASCIMENTO; FONTES; NEVES, 1998; SOARES, 1999; YANG et al., 1996), embora se saiba que a proporção de Cd e Zn nas plantas é um dos principais controladores da ocorrência de sinergismo e antagonismo entre estes cátions (KABATA-PENDIAS, 2011).

Tabela 9 Efeito das concentrações de Zn+Cd no fator de translocação de Fe, Cu, Mn, Zn e Cd em *Gomphrena claussenii*, aos 45 dias de coleta das plantas

Fator de translocação	Elementos				
	Fe	Cu	Mn	Zn	Cd
	(- -)*	(- -)	(+)	(+++)	0

*comparando-se fatores obtidos com a aplicação da maior e menor concentração de Zn+Cd. (-/+) redução/ incremento de até 25%; (--/++) redução/ incremento entre 25 e 50%; (---/+++) redução/incremento maior que 50%; 0 sem efeito

A translocação de Cd aos 30 DCP em *Gomphrena claussenii* aumentou de forma linear, obtendo fator máximo estimado de 0,26 com a aplicação da última concentração de Zn+Cd (975 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (Tabela 8). Os FTs de Cd do presente estudo não foram superiores a 1 em nenhuma concentração de Zn+Cd aplicada (Tabela 7), indicando que pode haver certa restrição na translocação deste elemento uma vez que $[\text{Cd}]_{\text{raiz}} > [\text{Cd}]_{\text{parte aérea}}$. O mesmo comportamento foi observado nesta espécie, ao ser submetida a concentrações

combinadas de Zn (2; 50 e 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Cd (5; 25 e 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), nas quais os fatores de translocação de Cd variaram entre 0,13 e 0,36 (BORIN, 2010). Alguns estudos sugerem que a mobilidade de Cd no floema das plantas é inibida pelo aumento do fornecimento de Zn na solução. A inibição de absorção de Cd pelo Zn pode ser resultado de interações de competição por transportadores de membrana entre estes íons na membrana plasmática das células de raízes. Ao extrapolar esta situação para campo, pode-se supor que concentrações adequadas de zinco aplicadas no solo poderiam diminuir a absorção de Cd pelas plantas e também seu efeito fitotóxico (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997). Além disso, deficiências de Zn nos horizontes superficiais do solo poderiam estimular o movimento de Cd no floema de raízes superficiais e o desenvolvimento de raízes no subsolo (WELCH et al., 1999).

Reduções na translocação de Cd também podem ser consequência da síntese imediata de fitoquelatinas que ocorre após a exposição de células e tecidos vegetais a íons de metais pesados (GUO; MARSCHNER, 1995; RAUSER, 1995). A fitoquelatina é uma estrutura complexa, formada por peptídeos ricos em cisteína que se ligam fortemente a metais pesados nas células radiculares e o sequestram nos vacúolos, tendo maior afinidade para o Cd do que para Zn. O grupo -SH dessas moléculas é capaz de formar compostos de coordenação com metais pesados, como o Cd, contribuindo para a desintoxicação metálica pela redução na concentração de metal livre no citosol, limitando sua reatividade e solubilidade (SANTOS et al., 2006).

O transporte de Cd para a parte aérea com possíveis efeitos de toxidez pode ter um impacto direto sobre a produção de biomassa e altura de plantas. O desenvolvimento da parte aérea e o número total de folhas determinam o rendimento de culturas no crescimento característico da folha, servindo como

bioindicadores adequados de poluição por metais pesados e na seleção de espécies resistentes

4.5 Influência do aumento da concentração de Zn aplicada *in vitro* no desenvolvimento de *Gomphrena claussenii*

A espécie *Gomphrena claussenii* respondeu aos tratamentos com Zn, apresentando alterações morfológicas evidentes conforme a concentração empregada no meio de cultura *in vitro*.

De acordo com a análise de variância das características mensuradas, houve efeito significativo somente para ALT, MS e COM das plântulas de *Gomphrena claussenii* submetidas às concentrações de Zn.

Em termos gerais, observa-se que a aplicação de concentrações crescentes de Zn levou à redução do crescimento em altura das plântulas com ajuste quadrático positivo (Figura 12). Os tratamentos 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn proporcionaram os maiores valores médios observados em altura (13,67 e 10,86 cm, respectivamente). As plântulas atingiram altura mínima estimada (4,7 cm) quando submetidas à concentração de 558,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. Redução no crescimento também foi observada na espécie *Populus tremula*, com a aplicação da maior concentração de Zn (0,5 mM) *in vitro* (KALIŠOVÁ-ŠPIROCHOVÁ et al., 2003). Jain et al. (2010) sugerem que as causas para redução da biomassa de plantas submetidas à presença de metais como o Zn em níveis tóxicos estão relacionadas à inibição do alongamento celular e alterações na síntese de DNA, que levariam a reduções na velocidade mitótica e, conseqüentemente, no crescimento da planta.

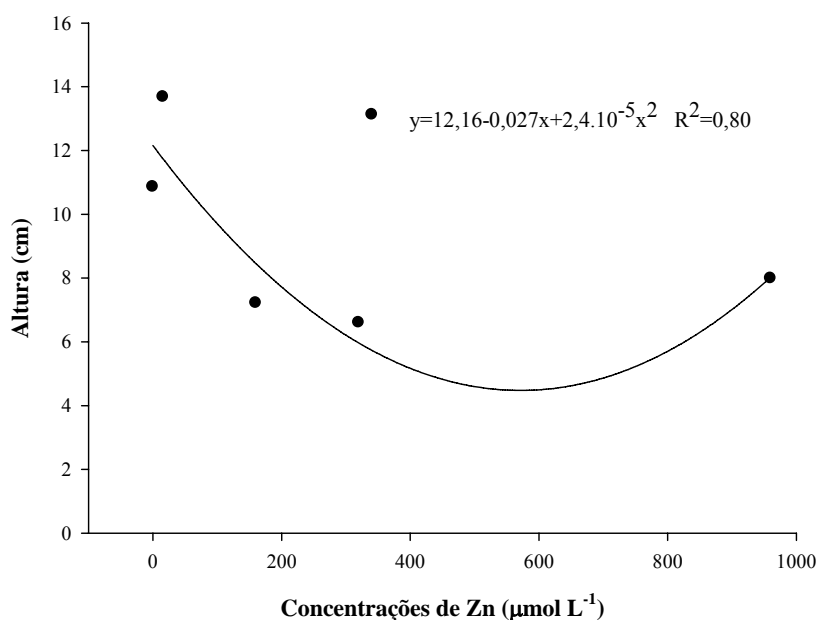


Figura 12 Altura das plântulas (cm) em função das concentrações de Zn (0; 16; 160; 320 e 960 µmol L⁻¹) aplicadas

Houve efeito quadrático positivo para peso de matéria seca da plântula na medida em que se aumentaram as concentrações de Zn no meio de cultura (Figura 13). Os tratamentos que receberam as concentrações de 0 µmol L⁻¹ e 16 µmol L⁻¹ de Zn proporcionaram, em média, os maiores valores observados de massa de matéria seca (16 e 17 mg, respectivamente). Já o tratamento 160 µmol L⁻¹ de Zn condicionou o menor valor médio desse parâmetro avaliado (9,5 mg). Segundo Malavolta, Vitti e Oliveira (1997), no xilema de algumas plantas intoxicadas por Zn acumulam-se tampões “plugs” contendo o elemento, os quais dificultam a ascensão da seiva bruta, caracterizando também o efeito depressivo

na produção de massa seca da planta, quando submetidas a elevadas concentrações de Zn.

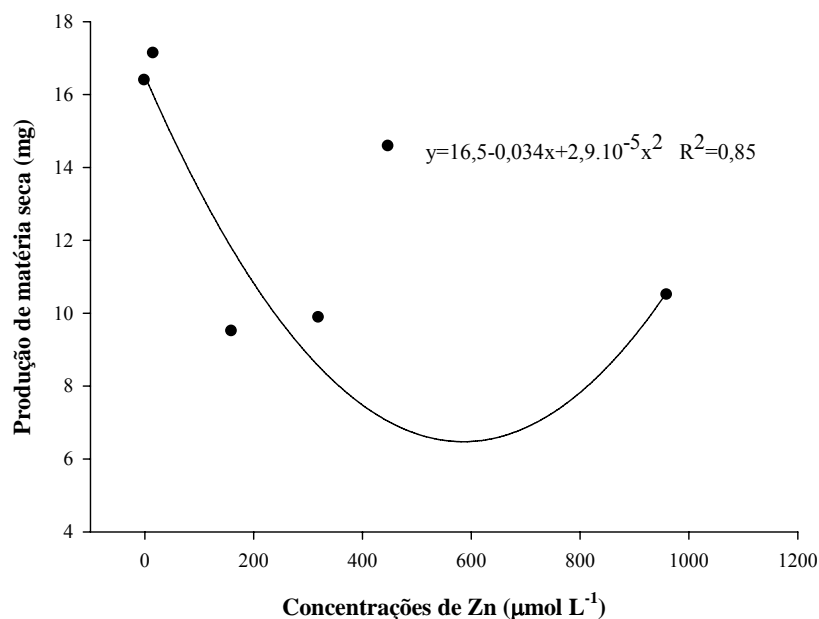


Figura 13 Produção de matéria seca (mg) em função das concentrações de Zn (0; 16; 160; 320 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$) aplicadas

Observa-se, na Figura 14, que ocorreu redução no comprimento da raiz, atingindo valor mínimo estimado quando submetidas à concentração de 533,73 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. O maior valor médio observado (6,7 cm) foi devido à aplicação do tratamento 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. Embora tenha ocorrido crescimento reduzido das raízes, todos os explantes de *Gomphrena claussenii* apresentaram capacidade espontânea de enraizamento adventício, independente da concentração de Zn suplementada ao meio de cultura, efeito que também foi verificado por Ghnaya et al. (2007), no cultivo *in vitro* de *Brassica napus* em concentrações crescentes de Zn. O adequado desenvolvimento radicular desta

espécie e sua posterior utilização em campo são de fundamental importância, uma vez que a penetração e a exploração de solos contaminados pelas raízes de plantas hiperacumuladoras é um pré-requisito para a remoção eficiente de metais pesados, promovendo a eficácia da fitoextração.

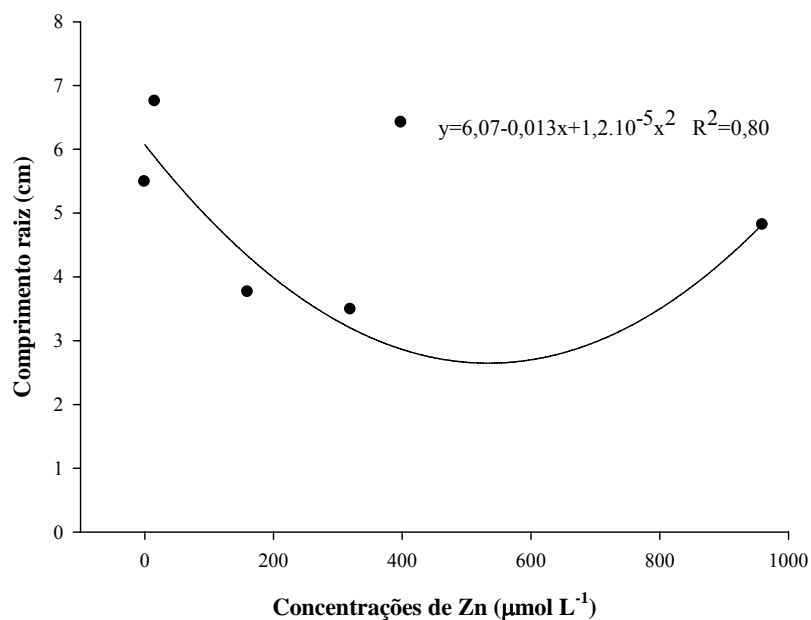


Figura 14 Comprimento da raiz (cm) em função das concentrações de Zn (0; 16; 160; 320 e 960 µmol L⁻¹) aplicadas

Em termos gerais, os menores valores médios dos parâmetros biométricos observados nos tratamentos 160 µmol L⁻¹, 320 µmol L⁻¹ e 960 µmol L⁻¹ em relação aos tratamentos 0 µmol L⁻¹ e 16 µmol L⁻¹ de Zn possivelmente ocorreram devido à presença de maior quantidade de formas disponíveis de Zn no meio de cultura. Contudo, no período estudado e nas condições *in vitro* testadas, mesmo com a redução da biomassa apresentada nas maiores concentrações de Zn, a planta foi capaz sobreviver em todos os tratamentos, até

mesmo nas condições mais extremas. Este comportamento é buscado em programas de fitorremediação, nos quais é essencial que a planta possa sobreviver em condições de estresse nutricional, o que foi verificado com a espécie *Gomphrena claussenii*. Cabe ressaltar também que a espécie utilizada neste estudo tem origem de solos com elevados teores de Zn e possui elevada capacidade de absorção deste elemento. Assim, sugere-se que a produção *in vitro* de mudas de *Gomphrena claussenii* deve ser realizada com um maior fornecimento de Zn, implicando, possivelmente, em uma pré-adaptação da espécie nesta fase e facilitando, posteriormente, seu crescimento e estabelecimento em solo contaminado.

Aos 30 dias após a instalação do experimento, foi possível observar, a partir da diagnose visual, clorose pronunciada das folhas, nos tratamentos 0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (Figura 15B e 15C).

A clorose observada na concentração de 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn pode ser atribuída a um possível efeito de diluição do Zn, em função da maior produção de massa de matéria seca nas plantas (Figura 13). De forma geral, a aplicação da concentração 16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn foi insuficiente para o adequado desenvolvimento da espécie devido à clorose observada nas folhas, evidenciando uma maior exigência desse nutriente para plantas de *Gomphrena claussenii*. Contudo, o desenvolvimento da espécie foi reduzido com a aplicação das demais concentrações (160, 320 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn). Sugere-se, dessa forma, que o desenvolvimento adequado da espécie seria observado com a aplicação de determinada concentração entre 16 e 160 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn.

Já nas concentrações mais elevadas (160, 320 e 960 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn), foi observada nas folhas uma coloração pardo-avermelhada (Figura 15 D, E, F). Tal caracterização está associada a fatores de toxidez de Zn para a maioria das

espécies cultivadas e é atribuída a uma deficiência de P provocada pelo antagonismo entre este elemento e o Zn (LEE; CHOI; PAK, 1996).

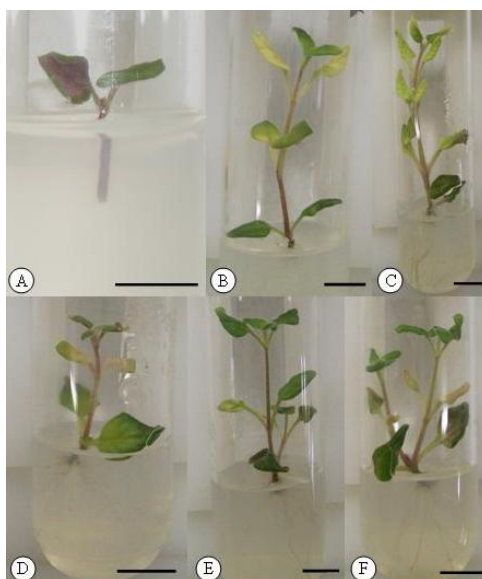


Figura 15 Detalhe do crescimento *in vitro* de *Gomphrena claussenii* em relação às concentrações de Zn.

(A): explante padronizado para a instalação do experimento (1 cm), (B): meio de cultura isento de Zn ($0 \mu\text{mol L}^{-1}$) apresentando clorose nas folhas mais jovens aos 30 dias, (C): meio de cultura suplementado com $16 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn apresentando clorose nas folhas mais jovens aos 30 dias, (D): meio de cultura suplementado com $160 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn aos 30 dias, (E) meio de cultura suplementado com $320 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn aos 30 dias, (F): meio de cultura suplementado com $960 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn aos 30 dias. Barra = 1 cm

5 CONCLUSÕES

Elevadas concentrações combinadas de Zn e Cd afetaram significativamente o teor e o acúmulo de macro e micronutrientes em *Gomphrena claussenii*, com resposta diferenciada de acordo com o elemento e a época de colheita analisada. A aplicação das concentrações crescentes de Zn+Cd

exerceu efeitos no fator de translocação, diferindo quanto ao elemento e à época de colheita, com destaque para a expressiva redução na translocação de Fe e Cd.

Os teores médios encontrados na parte aérea das plantas no intervalo de contaminação de Zn e Cd estudados foram: 18,8 g kg⁻¹, para Ca; 26,3 g kg⁻¹, para P; 4,7 g kg⁻¹, para K; 848,3 g kg⁻¹, para S; 132 mg kg⁻¹, para Fe; 12 mg kg⁻¹, para Cu e 29,6 mg kg⁻¹, para Mn.

As variações encontradas nos mecanismos de absorção, transporte e acúmulo dos elementos da espécie estudada, atrelados aos resultados obtidos por Carvalho (2010), implicam em um melhor desempenho da técnica de fitorremediação de áreas contaminadas com Zn e Cd.

Embora tenham sido observadas reduções de massa de matéria seca, altura e comprimento de raiz em *Gomphrena claussenii* cultivadas em meio *in vitro* contaminado com zinco, a espécie foi capaz de se desenvolver até a maior concentração de Zn aplicada (960 µmol L⁻¹).

Sugere-se que a concentração de Zn mais adequada para o desenvolvimento *in vitro* de plântulas da espécie estudada esteja entre a faixa de 16 a 160 µmol L⁻¹.

REFERÊNCIAS

ABICHEQUER, A. D.; BOHNEN, H. Eficiência de absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 22, n. 1, p. 21-26, 1998.

ABOU-HADID, A. F. et al. Effect of different zinc concentrations in the solution on uptake and translocation of macro and micro nutrients in cucumber grown in NFT. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 361, n. 1, p. 325-331, June 1994.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES E DISEASE REGISTRY. **The priority list of hazardous substances**: that will be the subject of toxicological profiles. Atlanta, 2011. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/spl/>>. Acesso em: 24 fev. 2012.

ALLOWAY, B. J. **Heavy metals in soils**. 2nd ed. Glasgow: Blackie Academic, 1995. 339 p.

AMBLER, J. E.; BROWN, J. C.; GAUCH, H. C. Effect of zinc on translocation of iron in soybean plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 46, p. 320-323, 1970.

BAKER, A. J. M. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 3, n. 1/4, p. 643-654, Apr. 1981.

BAKER, A. J. M.; WHITING, S. N. In search of the Holy Grail: a further step in understanding metal hyperaccumulation? **New Phytologist**, Cambridge, v. 155, n. 1, p. 1-4, 2002.

BAKER, C. J.; ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, Madison, v. 33, n. 1, p. 299-321, Dec. 1995.

BARANČÍKOVÁ, G.; MADARAS, M.; RYBÁR, O. Crop contamination by selected trace elements. **Journal of Soils and Sediments**, New York, v. 4, n. 1, p. 37-42, Jan. 2004.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal Plant Nutrition**, New York, v. 13, n. 1, p. 1-37, Mar. 1990.

BARCELÓ, J.; VASQUES, M.; POSCHENRIEDER, C. Structural and ultrastructural disorders in cadmium treated bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 108, n. 1, p. 37-49, Apr. 1988.

BERGMANN, W. **Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis**. New York: G. Fischer, 1992. 741 p.

BIGARELLI, W.; ALVES, F. Minas Gerais: mantendo-se como líder na mineração brasileira. **Brasil Mineral**, São Paulo, v. 162, p. 14-18, 1998.

BORIN, A. L. D. C. **Fitorremediação de cádmio e zinco por Amaranthaceae**. 2010. 181 p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

BROADLEY, M. R. et al. Phylogenetic variation in heavy metal accumulation in angiosperms. **New Phytologist**, Cambridge, v. 152, n. 1, p. 9-27, Mar. 2001.

_____. Zinc in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 123, n. 4, p. 677-702, Mar. 2007.

BROWN, S. L. et al. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* grown in nutrient solution. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 59, n. 1, p. 125-133, Feb. 1995.

CARVALHO, M. T. V. **Fitoextração de Cd e Zn e atividade de enzimas antioxidantes em ecótipos de *Gomphrena elegans***. 2010. 95 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

CHOU, A.; GHORBAL, M. H.; FERJANI, E. E. Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 126, n. 1, p. 21-28, Jan. 1997.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase of intact maize roots. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 23, n. 3, p. 458-460, 1975.

CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, Berlin, v. 212, n. 4, p. 475-486, Mar. 2001.

_____. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, p. 1707-1719, juil. 2006.

- COHEN, C. K. et al. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 3, p. 1063-1072, Mar. 1998.
- CONN, S.; GILLIHAM, M. Comparative physiology of elemental distributions in plants. **Annals of Botany**, London, v. 105, n. 7, p. 1081-1102, Apr. 2010.
- COSIO, C.; MARTINOIA, E.; KELLER, C. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level 1. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, p. 716-725, Feb. 2004.
- DAS, P.; SARAMANTAY, S.; ROUT, G. R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 98, n. 1, p. 29-36, Mar. 1997.
- DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Micronutrientes. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 327-354.
- DIETZ, K. J.; BAIER, M.; KRÄMER, U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metal toxicity in plants. In: PRASAD, M. N. V.; HAGEMEYER, J. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems**. Berlin: Springer-Verlag, 1999. p. 73-97.
- DING, X. et al. Bioconcentration of cadmium in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) in relation to thiol group content. **Environmental Pollution**, Barking, v. 84, n. 1, p. 93-96, Feb. 1994.
- DONG, J.; WU, F.; ZHANG, G. Influence of cadmium on antioxidant capacity and four microelement concentrations in tomato seedlings (*Lycopersicon esculentum*). **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 10, p. 1659-1666, Feb. 2006.
- FAGERIA, N. K.; BALIGAR, C.; CLARK, R. B. Micronutrients in crop production. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 77, p. 185-268, Nov. 2002.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR - sistema de análise de variância**. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010. Software.
- FILATOV, V. et al. Comparison of gene expression in segregating families identifies genes and genomic regions involved in a novel adaptation, zinc

hyperaccumulation. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 15, n. 10, p. 3045-3059, Sept. 2006.

GHNAYA, A. B. et al. Morphological and physiological characteristics of rapeseed plants regenerated *in vitro* from thin cell layers in the presence of zinc. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 330, n. 10, p. 728-734, oct. 2007.

GUERRINOT, M. L. The ZIP family of the metal transporters. **Biochimica Biophysica Acta**, Alberta, v. 1465, n. 1/2, p. 190-198, 2000.

GUO, Y.; MARSCHNER, H. Uptake, distribution, and binding of cadmium and nickel in different plant species. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 18, n. 12, p. 2691-2706, Dec. 1995.

GUSSARSON, M. Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of *Betula pendula* seedlings: the significance of fine roots as a primary target for cadmium toxicity. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 17, n. 12, p. 2151-2163, Dec. 1994.

HALL, J. L.; WILLIAMS, L. E. Transition metal transporters in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 393, p. 2601-2613, Sept. 2003.

HARDIMAN, R. T.; JACOBY, B.; BANIN, A. Factor affecting the distribution of cadmium, copper and lead and their effect upon yield and zinc content in bush beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, The Hague, v. 81, n. 1, p. 17-27, Feb. 1984.

ISHIMARU, Y.; BASHIR, K.; NISHIZAWA, N. K. Zn uptake and translocation in rice plants. **Rice**, Raleigh, v. 4, n. 1, p. 21-27, 2011.

ISHIMARU, Y. et al. ZIP 4, a novel zinc-regulated zinc transporter in rice. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 422, p. 3207-3214, Dec. 2005.

JABEEN, R.; AHMAD, A.; IQBAL, M. Phytoremediation of the metals: physiological and molecular mechanisms. **Botanical Review**, Bronx, v. 75, p. 339-364, Nov. 2009.

JAIN, R. et al. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of

sugarcane (*Saccharum spp.*). **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 32, n. 5, p. 979-986, Mar. 2010.

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**, Monticello, v. 17, n. 11, p. 1839-1858, Nov. 1994.

JESUS, C. A. G. et al. **Balanço mineral brasileiro**. Brasília: Departamento Nacional de Produção Mineral, 2001. Disponível em: <http://www.dnpm.gov.br/mostra_arquivo.asp?IDBancoArquivoArquivo=361>. Acesso em: 12 fev. 2012.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 4th ed. Boca Raton: CRC, 2011. 505 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 413 p.

KALISOVA-SPIROCHOVÁ, I. et al. Accumulation of heavy metals by *in vitro* cultures of plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 3, n. 3, p. 269-276, May 2003.

KORSHUNOVA, Y. O. et al. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 40, n. 1, p. 37-44, Jan. 1999.

KURDZIEL, B. M.; PRASAD, M. N. V.; STRZALKA, K. **Photosynthesis in heavy metal stressed plants**. 2nd ed. New York: G. Fischer, 2004. 181 p.

KVESITADZE, G. I. et al. **Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants: basis of phytoremediation**. Berlin: Springer-Verlag, 2006. 262 p.

LEE, C. W.; CHOI, J. M.; PAK, C. H. Micronutrient toxicity in seed geranium (*Pelargonium x hortorum* Baley). **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 121, n. 1, p. 77-82, Feb. 1996.

LOMBI, E. et al. Physiological evidence for a high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. **New Phytologist**, Cambridge, v. 149, n. 1, p. 53-60, Jan. 2001.

LUBBEN, S.; SAUERBECK, D. The uptake and distribution of heavy metals by spring wheat. **Water, Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 57, n. 8, p. 239-247, Aug. 1991.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, 1997. 319 p.

MARIA, S. de et al. Interactions between accumulation of trace elements and macronutrients in *Salix caprea* after inoculation with rhizosphere microorganisms. **Chemosphere**, Oxford, v. 84, n. 9, p. 1256-1261, May 2011.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2nd ed. London: Academic, 1995. 889 p.

MEMON, A. R.; SCHODER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environment Science Polluted**, New York, v. 16, p. 162-175, Dec. 2009.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 3rd ed. Worblanfen-Bern: International Potash Institute, 1982. 655 p.

MOREAU, S. ZIP 1 encodes a symbiosis-specific zinc transporter in soybean. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 7, p. 4738-4746, Feb. 2002.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, New York, v. 8, n. 3, p. 199-216, July 2010.

NASCIMENTO, C. W. A.; FONTES, L. R. F.; NEVES, J. C. L. Mineral composition of two Brazilian corn cultivars as a function of cadmium in the nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 21, n. 11, p. 2369-2379, Nov. 1998.

NRIAGU, J. O. A history of global metal pollution. **Science**, New York, v. 272, n. 5259, p. 223-224, Apr. 1996.

OBATA, H.; UMEBAYASHI, M. Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing tolerance to cadmium. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 20, n. 1, p. 97-105, Jan. 1997.

OLIVEIRA, J. A. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. **Revista de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 13, n. 3, p. 329-341, Nov. 2001.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Efeito da aplicação de cádmio sobre o teor de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 2, p. 153-162, mar./abr. 2001.

_____. Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. **Sociedade de Investigações Florestais**, Viçosa, MG, v. 26, n. 4, p. 467-473, 2002.

PENCE, N. S. et al. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn+Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Processes National Academy Sciences**, Washington, v. 97, n. 9, p. 4956-4960, Apr. 2000.

PERFUS-BARBEOCH, L. et al. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v. 32, n. 4, p. 539-548, Nov. 2002.

PRASAD, M. N. V. Phytoremediation of metal-pollution ecosystems: hype for commercialization. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 50, n. 5, p. 686-700, 2003.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulation plants: how and why do they do it?: and what makes them so interesting? **Plant Science**, Shannon, v. 180, n. 2, p. 169-181, Feb. 2010.

RAUSER, W. E. Phytochelatins and related peptides. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 109, n. 4, p. 1141-1149, Dec. 1995.

- RIBEIRO-FILHO, M. R. et al. Metais pesados em solos de área de rejeitos de indústria de processamento de zinco. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 23, n. 3, p. 453-464, maio/jun. 1999.
- SAGARDOY, R. et al. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 11, n. 3, p. 339-350, Mar. 2009.
- SALT, D. E. et al. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard. **Plant Physiology**, Rockville, v. 109, n. 4, p. 1427-1433, Dec. 1995.
- SANTOS, F. S. et al. Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados. In: FERNANDES, M. S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 419-432.
- SANTOS, J. V. D. **Biomassa e atividade microbiana como indicadoras da reabilitação de áreas contaminadas por elementos-traço**. 2010. 47 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- SARWAR, N. et al. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 6, p. 925-937, Mar. 2010.
- SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants: review. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 48, n. 4, p. 523-544, July/Aug. 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**. New Delhi: Narosa, 2004. p. 84-126.
- SILVA, S. R. et al. Caracterização de rejeito de mineração de ouro para avaliação de solubilização de metais pesados e arsênio e revegetação local. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 189-196, fev. 2004.
- SINGH, R. et al. Heavy metals and living systems: an overview. **Indian Journal of Pharmacology**, New Delhi, v. 43, n. 3, p. 246-253, Mar. 2011.

SKREBSKY, E. C. et al. Effect of cadmium on growth, micronutrient concentration, and δ -aminolevulinic acid dehydratase and acid phosphatase activities in plants of *Pfaffia glomerata*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 20, n. 4, p. 285-294, Aug. 2008.

SOARES, C. R. S. F. **Toxidez de zinco, cobre, cádmio e chumbo para eucalipto em solução nutritiva**. 1999. 132 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1999.

SOARES, C. R. F. S. et al. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 339-348, fev. 2001.

STEFFENS, J. C. Heavy metal-binding peptides of plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 553-575, 1990.

THOMINE, S. et al. Cadmium and iron transport by members of a plant metal transporter family in *Arabidopsis* with homology to Nramp genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 97, n. 9, p. 4991-4996, Apr. 2000.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **USEPA 3051a**: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Washington, 1995. Disponível em:
<<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3051.pfd>>. Acesso em: 28 mar. 2012.

WEI, L.; SHU, W.; LAN, C. *Viola baoshanensis*, a plant that hyperaccumulates cadmium. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 49, n. 1, p. 29-32, 2004.

WELCH, R. M. et al. Effects of nutrient solution zinc activity on net uptake, translocation, and root export of cadmium and zinc by separated sections of intact durum wheat (*Triticum turgidum* L. var *durum*) seedling roots. **Plant and Soil**, The Hague, v. 208, n. 2, p. 243-250, Jan. 1999.

WOOLHOUSE, H. W. Toxicity and tolerance in the responses of plant to metals. In: LANGE, O. L.; OSMOND, C. B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: Springer, 1983. v. 12C, p. 245-300.

WU, G. et al. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 174, p. 1-8, Sept. 2010.

YANG, X. et al. Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 19, n. 3/4, p. 643-656, 1996.

YOON, J. et al. Accumulation of Pb, Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 368, n. 2/3, p. 456-464, Sept. 2006.

ZHAO, F. J. et al. Characteristics of cadmium uptake in two contrasting ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 368, p. 535-543, Jan. 2002.