



MARCIO PAULO PEREIRA

**ANATOMIA E FISILOGIA DE PLANTAS DE
Schinus molle L. (Anacardiaceae) EXPOSTAS AO
CÁDMIO: MECANISMOS DE TOLERÂNCIA E
POTENCIAL PARA FITORREMEDIAÇÃO**

LAVRAS - MG

2013

MARCIO PAULO PEREIRA

**ANATOMIA E FISIOLOGIA DE PLANTAS DE *Schinus molle* L.
(Anacardiaceae) EXPOSTAS AO CÁDMIO: MECANISMOS DE
TOLERÂNCIA E POTENCIAL PARA FITORREMEDIAÇÃO**

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

Orientador

Dr. Fabricio José Pereira

Coorientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro

LAVRAS-MG

2013

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

Pereira, Márcio Paulo.

Anatomia e fisiologia de plantas de *Schinus molle* L.
(Anacardiaceae) expostas ao cádmio : mecanismos de tolerância e
potencial para fitorremediação / Márcio Paulo Pereira. – Lavras :
UFLA, 2013.

77 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Fabricio José Pereira.

Bibliografia.

1. Aroeira. 2. Metais pesados. 3. Fitoestabilização. 4. Plantas
lenhosas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.28045222

MARCIO PAULO PEREIRA

**ANATOMIA E FISIOLOGIA DE PLANTAS DE *Schinus molle* L.
(Anacardiaceae) EXPOSTAS AO CÁDMIO: MECANISMOS DE
TOLERÂNCIA E POTENCIAL PARA FITORREMEDIAÇÃO**

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

APROVADA em 20 de setembro de 2013.

Dr. Sílvio Junio Ramos ITV-MI

Dr. Marcelo Polo UNIFAL-MG

Dr. _____
Orientador

Dr. Evaristo Mauro de Castro
Coorientador

**LAVRAS-MG
2013**

*Aos meus Pais, Paulo Antônio Pereira e Waldelicia do Carmo Pereira, por
sempre acreditarem em mim.*

A Jaqueline Gonçalves da Silva, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus amigos de Alfenas, que me ensinaram a sonhar.

*Aos meus orientadores, Fabricio José Pereira e Evaristo Mauro de Castro, por
me mostrarem a importância da pesquisa.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, pela oportunidade concedida para realização do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFLA.

Aos Laboratórios de Microscopia eletrônica e Nutrição Mineral de Plantas.

Aos professores Fabricio José Pereira e Evaristo Mauro de Castro, pela orientação e amizade.

Aos demais professores e técnicos administrativos, pela orientação e suporte técnico.

Os sonhos não determinam o lugar onde vocês vão chegar, mas produzem a força necessária para tirá-los do lugar em que vocês estão.

Augusto Cury

RESUMO

Objetivou-se, com este trabalho, avaliar o potencial para a fitorremediação da espécie arbórea *Schinus molle*, quando exposta a diferentes concentrações de Cádmiio (Cd) e os mecanismos anatômicos e fisiológicos relacionados com a tolerância. Foram montados experimentos com plantas de *S. molle* com sete meses de idade, expondo-as a diferentes concentrações de cádmio [0, 10, 20, 50, 125 e 250 μM de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$], por um período de 90 dias. Após o período experimental, foram avaliadas as variáveis relacionadas com: fotossíntese, crescimento, tolerância, estado nutricional das plantas e anatomia de raízes e folhas. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ou submetidos à regressão. A espécie *S. molle* possui índice de tolerância acima de 80% para concentrações até 20 μM de Cd. O principal mecanismo de tolerância ao Cd foi a compartimentalização desse elemento nas raízes e a diminuição da translocação para a parte aérea, por meio da formação de barreiras apoplásticas. A anatomia das folhas de *S. molle* até 20 μM de Cd apresentam características benéficas, como o espessamento do mesofilo, no entanto, a partir de 50 μM a espessura do mesofilo diminui e essa espécie apresenta diminuição do tamanho e densidade dos estômatos na presença de Cd. A concentração de Cd na parte aérea se mantém baixa e o índice de tolerância menor que 100%, pode indicar que *S. molle* não apresenta um bom desempenho para a fitoestabilização, em locais altamente contaminados. No entanto, devido à moderada tolerância apresentada pela espécie, são necessários trabalhos de campo para avaliar o potencial da mesma para a fitoestabilização de áreas contaminadas com Cd.

Palavras-chave: Aroeira. Plantas lenhosas. Metais pesados. Fitoestabilização.

ABSTRACT

This work aimed at evaluating the potential for phytoremediation of the *Schinus molle* woody species when exposed to different concentrations of Cadmium (Cd), in addition to the anatomical and physiological mechanisms related with tolerance. Experiments were assembled with seven month old *S. molle* plants exposing them to different concentrations of cadmium [0, 10, 20, 50, 125 and 250mM Cd (NO₃)₂] for a period of 90 days. After the experimental period, we evaluated variables related to: photosynthesis, growth, tolerance, nutritional status of the plants and root and leaf anatomy. The data were submitted to analysis of variance and the means compared by the Scott-Knott test or submitted to regression. The *S. molle* species presents tolerance index above 80% for concentrations up to 20mM of Cd. The main Cd tolerance mechanism was the compartmentalization of this element in the roots and the decrease in the translocation to the shoots by means of the formation of apoplastic barriers. With up to 20μM of Cd the *S. molle* leaves presented beneficial characteristics, such as thickening of the mesophyll. However, starting at 50mM, the thickness of the mesophyll decreases and this species presents a decrease in size and stomata density in the presence of Cd. The Cd concentration in the shoot remains low and the tolerance index below 100% may indicate that *S. molle* does not present a good performance for phyto-stabilization in highly contaminated sites. However, due to the moderate tolerance displayed by the species, field studies are necessary in order to evaluate the potential of the same for the phyto-stabilization of areas contaminated with Cd.

Keywords: Pepper tree. Woody plants. Heavy metals. Phyto-stabilization.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Metais pesados	13
2.2	Cádmio no ambiente	13
2.3	Cádmio, um poluente ambiental	14
2.4	Absorção do Cádmio pelas plantas	15
2.5	Efeitos tóxicos do Cádmio nas plantas	17
2.6	Fitorremediação	19
2.7	<i>Schinus molle</i> L. (Anacardiaceae)	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Local de execução	23
3.2	Condições de cultivo	23
3.3	Planejamento experimental	24
3.4	Análise de crescimento e índice de tolerância	25
3.5	Análise das trocas gasosas	25
3.6	Medição indireta de clorofila e caracterização da clorose	26
3.7	Análise nutricional	27
3.8	Análise anatômica quantitativa	28
3.9	Microanálise de raios-X (EDS)	29
3.10	Análise estatística	30
3.11	Tratamento de resíduos contaminados	30
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1	Crescimento e índice de tolerância de plantas de <i>Schinus molle</i> exposta ao Cádmio	31
4.2	Comportamento fotossintético de plantas de <i>Schinus molle</i> expostas ao Cádmio	37
4.3	Nutrição de plantas de <i>Schinus molle</i> expostas ao Cádmio	43
4.4	Anatomia de plantas de <i>Schinus molle</i> expostas ao Cádmio	55
4.5	Microanálise de raios-X (EDS) em folhas de <i>Schinus molle</i> expostas ao Cádmio	64
5	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A emissão de resíduos no solo que contaminam grandes áreas com altas concentrações de metais pesados e poluentes orgânicos é causada por atividades industriais e agrícolas. Na Europa, por exemplo, estima-se que mais de 16% das áreas, são afetadas por algum nível de degradação do solo (PEUKE; RENNENBERG, 2005). Os metais pesados, como o cádmio (Cd), depositados no ambiente podem causar problemas sérios à saúde humana e aos ecossistemas devido a uma variedade de efeitos tóxicos sobre plantas, animais e outros organismos (DEMBITSKY; REZANKA, 2003).

O Brasil, na condição de país emergente, destaca-se no cenário mundial pelo aumento de suas atividades agrícolas e industriais. Nesse contexto, um dos principais desafios para o Brasil é o de associar tecnologias ambientais que permitam seu desenvolvimento sustentável, considerando aspectos sociais e ambientais. Novas tecnologias de descontaminação do solo como, por exemplo, a fitorremediação tem atraído grande interesse científico e comercial. Essa técnica consiste na utilização de plantas ou produtos vegetais, que possuem a capacidade de crescer em solos contaminados por metais pesados e incorporar ou adsorver grandes quantidades desses metais em sua biomassa (MCINTYRE, 2003; SALT; SMITH; RASKIN, 1998).

Além de plantas herbáceas, que são normalmente utilizadas, várias espécies lenhosas são consideradas de interesse para a fitorremediação. O uso de espécies lenhosas para remediar ambientes contaminados é conhecido como dendrorremediação (GONZÁLEZ-OREJA et al., 2008). A dendrorremediação possui grande potencial para a fitoextração e fitoestabilização de áreas contaminadas com metais pesados. Isso está relacionado com o fato de que as espécies lenhosas apresentam uma elevada produção de biomassa, um sistema radicular profundo e alta taxa de crescimento, que potencializam as técnicas de

fitorremediação (CAPUANA, 2011; GONZÁLEZ-OREJA et al., 2008; MCINTYRE, 2003).

Devido ao fato de as espécie arbóreas serem perenes, isso faz com que essas possuam a capacidade de reter em sua biomassa esses metais por um longo período de tempo, sem que haja a necessidade de remoção dessas plantas e também, após o estabelecimento da vegetação, essas espécies evitam que os metais presentes no solo sejam lixiviados para outras áreas (MCINTYRE, 2003).

Dentre as plantas utilizadas em fitorremediação, reportadas na literatura, a maioria delas é herbácea terrestre ou aquática de pequeno porte (PRASAD, 2003). Atualmente, poucas plantas lenhosas são utilizadas em fitorremediação de metais pesados e esse número fica ainda menor, considerando-se apenas as que possuem algum grau de tolerância ao Cd. Esse metal está entre os poluentes que possuem o maior grau de importância ambiental, devido a sua toxicidade e ao intenso uso desse elemento pela indústria e agricultura (PRASAD, 2004; SALT; SMITH; RASKIN, 1998). Dessa forma, o estudo direcionado ao potencial de espécies arbóreas para serem utilizadas em fitorremediação de solos, como o Cd, possui grande importância para aplicações ambientais.

Schinus molle L. (Anacardiaceae), é popularmente conhecida como aroeira mansa. Essa espécie ocorre em regiões subtropicais da América do Sul como, por exemplo, Argentina, Bolívia, Chile e Brasil; ocorre ainda em regiões da Índia, África e Austrália como planta exótica (LIM, 2012; SILVA-LUZ; PIRANI, 2013). O seu sucesso como planta cultivada é atribuído a sua elevada tolerância à seca, à altas temperaturas, à competição por nutrientes e luz, bem como à elevada taxa de crescimento e produção de biomassa (DEMELASH; TIGABU; ODEN, 2003; IPONGA; MILTON; RICHARDSON, 2008).

As espécies do gênero *Schinus* são amplamente utilizadas em programas de restauração de áreas degradadas devido a suas características ecológicas que permitem que essas espécies se adaptem em diferentes ambientes (ARAÚJO;

CASTRO; ALBUQUERQUE, 2007; IPONGA; MILTON; RICHARDSON, 2008). Além disso, segundo Doganlar et al. (2012) *S. molle* é capaz de acumular níveis elevados de Cu, Zn e Pb em localidades com influência antrópica.

A forma com que as plantas toleram altas concentrações de metais, tem sido alvo de intensa investigação. A desintoxicação de sistemas vegetais pode ser caracterizada por mecanismos fisiológicos ou anatômicos que estão envolvidos na quelação, compartimentalização, biotransformação e absorção desses elementos (HALL, 2002; RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011; VACULÍK et al., 2012).

Os efeitos dos metais pesados podem ser, portanto, deletérios em função da fitotoxicidade desses elementos ou podem resultar em alterações anatômicas e fisiológicas que podem atribuir tolerância. Dessa forma, além da avaliação do potencial das espécies para remediar metais pesados, é necessário que se elucidem quais mecanismos estão relacionados com a tolerância dessas plantas, no intuito de promover o correto manejo e, possivelmente melhoramento.

A espécie *S. molle* apresenta características biológicas e ecológicas que permitem que essa espécie possa ser uma boa alternativa para ser utilizada em fitorremediação no Brasil e em outros países onde essa ocorre. Dessa forma, a avaliação da tolerância de *S. molle* a metais pesados como, por exemplo, o Cd pode auxiliar na caracterização da tolerância dessa espécie e avaliar o potencial da mesma para ser utilizada em fitorremediação. Diante disso, objetivou-se, com esse trabalho, avaliar os mecanismos anatômicos e fisiológicos relacionados com a tolerância ou sensibilidade de *S. molle*, quando exposta a diferentes concentrações de Cd e, assim, determinar o potencial dessa espécie para ser utilizada em fitorremediação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados

A expressão “metal pesado” engloba metais, semimetais e mesmo não metais, como é o caso do selênio, pois essa expressão aplica-se a elementos com peso específico maior que 5 g cm^{-3} ou que possuem número atômico maior que 20. A maioria dos metais pesados é classificada como tóxicos, como por exemplo, o Cd e outros elementos como o cromo (Cr), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb), no entanto, muitos micronutrientes catiônicos como o Cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), níquel (Ni) e zinco (Zn) são metais pesados, mas não pertencem à categoria dos tóxicos (MALAVOLTA, 2006).

2.2 Cádmio no ambiente

O Cd é um elemento do grupo 2B na tabela periódica, possui número atômico igual a 48 e massa atômica de 112,41 g. Esse elemento apresenta similaridade química com outros elementos do grupo 2B, especialmente o Zn e o Hg (HASAN et al., 2009). Na classificação geoquímica o Cd é, normalmente, considerado um elemento Calcófilo e está associado ao Zn, devido ao fato desses elementos possuírem eletronegatividade semelhante. No entanto, o raio iônico do Cd é similar ao do Ca e isso faz com que esse elemento esteja presente nos fosfatos de cálcio e apatitas, particularmente aquelas apatitas que formam certas rochas fosfáticas sedimentares, utilizadas na produção de fertilizantes agrícolas (GARRETT, 2000).

As fontes naturais de Cd para o solo e para as cadeias alimentares são as rochas que deram sua contribuição, ao longo dos processos de formação do solo.

A concentração média de Cd na crosta terrestre é da ordem de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de matéria seca e as fontes naturais mais abundantes de Cd são os sulfetos de Zn (ZnS), esfarelita, wurtzita e rochas fosfáticas (MALAVOLTA, 2006).

2.3 Cádmio, um poluente ambiental

Desde a revolução industrial, a atividade humana introduziu processos adicionais que aumentaram a taxa de redistribuição de metais, entre os compartimentos ambientais (GARRETT, 2000). Entre os metais pesados, o Cd é um dos principais contaminantes industriais particularmente em áreas associadas com a extração e fundição de Zn e está entre os poluentes que possuem o maior grau de importância ambiental (SALT; SMITH; RASKIN, 1998). Além disso, o Cd é utilizado em baterias, pigmentos, galvanoplastia, tintas e em ligas com vários outros metais (HASAN et al., 2009; SALT; SMITH; RASKIN, 1998).

O Cd no ambiente pode provocar problemas sérios à saúde, como por exemplo, o acidente ambiental ocorrido, em 1968, na bacia do rio Jinzu em Toyama, Japão, onde a contaminação com Cd causou a doença conhecida como "Doença de "Itai-Itai" (KAWANO et al., 1986).

No Brasil, para a prevenção da contaminação dos solos por Cd, a Resolução Nº 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) (BRASIL, 2009) determina que a concentração de Cd no solo não deve ultrapassar $1,3 \text{ mg kg}^{-1}$ de massa seca. Para áreas industriais, segundo a mesma resolução, esse valor pode chegar até 20 mg kg^{-1} de massa seca.

A concentração de Cd na solução do solo não poluído varia de $4,49 \text{ mg kg}^{-1}$ a $35,9 \text{ mg kg}^{-1}$ (HASAN et al., 2009). A concentração de base (concentração encontrada em um tempo particular durante um estudo ou programa de monitoramento), para o Cd no solo do bioma cerrado, segundo Campos et al. (2013), pode chegar a $2,45 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ de massa seca. No entanto, a concentração de

Cd normalmente encontrada em solos pode ser muito maior, pois quase toda a superfície terrestre já foi influenciada por algum tipo de atividade antrópica, que causa a contaminação dos solos por Cd e outros metais pesados (CAMPOS et al., 2013).

O uso de fertilizantes fosfatados pode causar a contaminação do solo por metais pesados tais como Cd, Mn, Zn, Pb, Cu e Ni que estão naturalmente associados às rochas fosfáticas (SARWAR et al., 2010). Os adubos fosfatados, os esterco e compostos e o lodo de esgoto são os principais insumos agrícolas que podem conter Cd, e sua utilização constitui um risco, tanto para saúde animal, quanto para o homem devido à grande concentração de Cd que pode entrar na cadeia alimentar (MALAVOLTA, 2006).

A adição de metais pesados nos adubos e corretivos usados no Brasil, segundo Malavolta (2006), está muito abaixo do permitido em outros países como, por exemplo, o Canadá, que permite adição de até 20 mg kg^{-1} enquanto que, nos adubos comercializados no Brasil, esse valor não ultrapassa 5 mg kg^{-1} .

2.4 Absorção do Cádmiu pelas plantas

Considerando a baixa concentração no solo e o baixo coeficiente de difusão do Cd, acredita-se que o contato desse elemento com a raiz seja por fluxo de massa (LUX et al., 2011). A absorção do Cd pelas plantas é determinada pela concentração desse elemento no solo e sua disponibilidade biológica. A biodisponibilidade do Cd é influenciada pela presença de matéria orgânica, por exsudatos radiculares, presença de micorrizas, potencial redox do solo, temperatura, concentração de outros elementos e pH (PÁL et al., 2006). Esse último é o principal fator que governa a disponibilidade do Cd no solo, devido ao seu efeito na adsorção e na especiação. Em geral, ocorre diminuição na solubilidade com o aumento do pH e pode haver a formação de espécies

hidroxiladas como o $\text{Cd}(\text{OH})_2$, $\text{Cd}(\text{OH})^+$ e compostos com fosfato $\text{Cd}_3(\text{PO}_4)_2$ (DIAS et al., 2001; MALAVOLTA, 2006).

O Cd, assim como outros elementos são absorvidos pela via simplástica ou apoplástica e são transportado radialmente através do córtex da raiz até o xilema, onde seguem para a parte aérea. O Cd pode chegar ao xilema pela via simplástica através do citoplasma de células individuais do córtex, ligadas por plasmodesmata. As espécies de Cd transportados através do simplasto são desconhecidas, mas essas espécies poderiam incluir Cd^{2+} ou quelatos de Cd (LUX et al., 2011). A maioria dos íons Cd absorvido pelas plantas permanece nas raízes e somente uma pequena parte desses íons é transportada para a parte aérea. Em geral, a distribuição de Cd nos diferentes órgãos das plantas diminui na seguinte ordem: raiz > folhas > frutos > sementes (HASAN et al., 2009).

Os mecanismos de absorção do Cd pela raiz, geralmente, envolvem a competição por sítios de absorção entre os metais pesados e vários nutrientes que compartilham propriedades químicas semelhantes. No entanto, outros nutrientes minerais que não compartilham características químicas similares com o Cd também podem ser afetados por esse metal (HASAN et al., 2009; SARWAR et al., 2010). A absorção de Cd é diminuída na presença de P, Cu, Ni, Se, Mn e Zn. Com exceção do fósforo é possível que o efeito não seja na disponibilidade, mas na absorção propriamente dita e essa diminuição pode ser devido à inibição competitiva (MALAVOLTA, 2006). O fósforo pode diminuir a mobilidade e biodisponibilidade de Cd em solos, resíduos e outros sistemas por meio da formação de compostos insolúveis desse metal. No entanto, para a formação de fosfatos de metal, é preciso que o P esteja presente como íon fosfato livre, HPO_4^{2-} , na solução do solo (PIERANGELI et al., 2004).

2.5 Efeitos tóxicos do Cádmio nas plantas

Uma visão mais holística sobre o efeito da exposição ao Cd nas plantas foi realizada por Sanita di Toppi e Gabbrielli (1999). Esses autores dizem que a exposição das plantas ao Cd evoca rápidas mudanças fisiológicas que ocorrem em paralelo com processos morfológicos lentos, onde cada mecanismo pode ser, ao mesmo tempo, causa e efeito das alterações metabólicas, que estão diretamente ou indiretamente relacionados com o estresse ao Cd.

Os metais pesados como o Cd, em altas concentrações causam efeitos de toxicidade para as plantas. Esses efeitos podem ser causados por meio da competição com nutrientes minerais, perturbando a nutrição mineral ou, após a absorção pela planta esses metais se acumulam nos tecidos vegetais e compartimentos celulares, dificultando o metabolismo geral da planta (HASAN et al., 2009).

Devido à interação do Cd com enzimas e proteínas que contêm grupos sulfidrila (Figura, 1), a contaminação por Cd causa a redução da atividade enzimática em diversos processos metabólicos, tais como na síntese de clorofila, na foto-oxidação da água, na fixação de CO₂, no ciclo de Calvin e na redução do nitrato (NO₃⁻) (SEREGIN; IVANOV, 2001). Segundo Malavolta (2006), o Cd tende a se acumular nas raízes e os principais sintomas de toxicidade são: folhas com margens pardas, clorose, pecíolos e nervuras avermelhadas, enrolamento das folhas e raízes pardas.

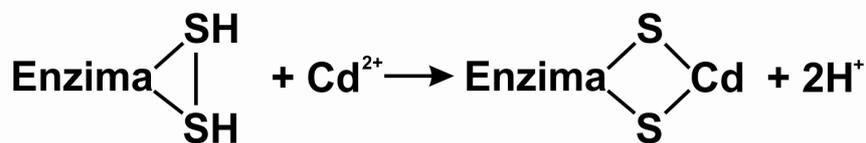


Figura 1 Mecanismos de ação do cádmio, causando a oxidação dos grupos sulfidril de duas cisteínas de uma enzima ligadas por ponte dissulfeto.

A exposição a metais pesados como o Cd, pode causar estresse oxidativo por meio de vários mecanismos de ação. Os metais pesados podem inativar ou ativar enzimas do sistema antioxidante (peroxidases, catalases, superóxido dismutase), responsáveis pela desintoxicação das células. Além da inativação de enzimas antioxidantes, os metais pesados podem perturbar vias metabólicas especialmente na membrana tilacóide e resultar no aumento da formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs). O aumento de radicais livres e EROs causam danos aos tecidos pelo aumento de processos de senescência e peroxidação lipídica (BHADURI; FULEKAR, 2012).

Outra consequência da exposição a metais pesados é que o acúmulo desses elementos nos tecidos vegetais pode resultar na depleção de antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular, tais como a glutatona (GSH), que é consumida na síntese de fitoquelatinas (PCs) (BHADURI; FULEKAR, 2012). As PCs reduzem atividade do Cd no citossol, por meio da formação de complexos Cd-PCs. Esses complexos são transportados para o vacúolo possivelmente por meio de transportadores específicos, presentes no tonoplasto (SARWAR et al., 2010).

O principal sintoma de toxicidade do Cd é a redução do crescimento, pois esse elemento pode interferir na fixação de carbono de diversas formas, como, por exemplo: inibir a cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos, inibir as enzimas do Ciclo de Calvin, provocar má formação do cloroplasto

devido ao empilhamento anormal do granum e reduzir do número e o tamanho do grana (DELMAIL et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2008).

Na anatomia da raiz, o Cd pode acelerar o desenvolvimento da endoderme e exoderme, pode causar a lignificação das paredes das células de tecidos corticais internos e de tecidos periféricos ao cilindro vascular. Essas alterações causam a diminuição da translocação desse elemento para a parte aérea (LUX et al., 2011).

Em relação à acumulação do Cd e outros metais pesados na raiz, o córtex representa um importante tecido de acumulação (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008), pois os metais pesados podem se ligar em quantidades consideráveis nas paredes das células corticais e limitar a entrada de metais para dentro do citoplasma. Dessa forma, o córtex age como um mecanismo de desintoxicação morfofisiológica, que sequestra o metal num compartimento celular de baixa atividade metabólica (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008).

Nas folhas de *Arachis hypogaea* L., o Cd pode causar aumento da densidade estomática e diminuição do tamanho dos estômatos (SHI; CAI, 2009). Em *Genipa americana* L., Souza et al. (2011) observaram aumento dos espaços intercelulares no parênquima esponjoso. Esses autores observaram ainda que altas concentrações de Cd promoveram alterações morfofisiológicas nas folhas, causada pela morte celular programada.

2.6 Fitorremediação

A poluição do solo e da água representa um grande problema para a saúde humana e para o ambiente, sendo que esse problema pode ser parcialmente resolvido pela tecnologia emergente da fitorremediação. O uso de plantas para conter, sequestrar, remover ou degradar poluentes orgânicos e

inorgânicos do solo é conhecido coletivamente como fitorremediação (TSAO, 2003). Esse conjunto de técnicas aproveita as habilidades naturais de plantas em acumular, armazenar ou degradar substâncias orgânicas ou inorgânicas (MCINTYRE, 2003). Os contaminantes, que são os principais alvos desse conjunto de técnicas, são os metais pesados e os poluentes orgânicos (SALT; SMITH; RASKIN, 1998).

As técnicas de fitorremediação possuem vantagens em relação aos métodos tradicionais de descontaminação do solo, pois as plantas que crescem em ambientes contaminados podem ser colhidas em conjunto com os poluentes que se acumularam em seus tecidos e, dependendo do tipo de contaminação, as plantas podem ser eliminadas ou eventualmente ser utilizadas em processos alternativos, tais como produção de energia e reaproveitamento dos elementos retirados do ambiente (PEUKE; RENNENBERG, 2005; SALT; SMITH; RASKIN, 1998).

Entre o conjunto de técnicas aplicados em fitorremediação, as principais estratégias para remediar locais contaminados por metais são a fitoextração rizofiltração e a fitoestabilização. A fitoextração é a utilização de plantas que são capazes de acumular grandes quantidades de elementos tóxicos na parte aérea da planta (2 a 5% por kg de massa seca), essas plantas são denominadas hiperacumuladoras (MCINTYRE, 2003; SALT; SMITH; RASKIN, 1998). A rizofiltração é a utilização de plantas que possuem a capacidade de absorver ou precipitar poluentes da água ou resíduos aquosos. Essa técnica funciona melhor onde os contaminantes estão presentes em concentrações baixas e em grandes volumes de efluentes (MCINTYRE, 2003; SALT; SMITH; RASKIN, 1998). A fitoestabilização é a utilização de plantas para estabilizar áreas contaminadas (MCINTYRE, 2003).

Áreas contaminadas, geralmente, são desprovidas de vegetação e isso resulta em processos de lixiviação e erosão do solo. Esses processos podem

causar a circulação dos poluentes dessas áreas para outros ambientes que não estão contaminados, agravando ainda mais o problema. Dessa forma, a fitoestabilização ajuda a minimizar esses efeitos, no entanto, essa técnica depende da tolerância das plantas aos poluentes (UTMAZIAN et al., 2007). Mesmo se as plantas possuem baixa capacidade de remoção física de contaminantes, ainda sim, essas podem ser úteis como agentes de fitoestabilização, desde que sejam capazes de crescer em ambientes contaminados (MCINTYRE, 2003).

2.7 *Schinus molle* L. (Anacardiaceae)

Com exceção de *Schinus molle* L., que possui distribuição do México até a América do Sul, a distribuição natural do gênero *Schinus* é limitada à América do Sul. No entanto, esse gênero se estabeleceu nas regiões temperadas, no novo e velho mundo, onde várias espécies foram introduzidas como plantas ornamentais (BARKLEY, 1944). A distribuição natural de *S. molle* no Brasil é limitada aos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, ocorrendo no Pampa em vegetação de campo limpo (SILVA-LUZ; PIRANI, 2013). No entanto, como mencionado anteriormente, essa espécie pode ser encontrada em todo o Brasil como planta cultivada, utilizada na arborização urbana.

S. molle é uma árvore de 3 a 15 m de altura, possui tronco curto, casca marrom escura, flores pequenas e amarelo-pálidas, que se desenvolvem em inflorescências indeterminada do tipo panícula (ou racemo composto). Os frutos são pequenas bagas de cor avermelhada quando maduros. As folhas do gênero *Schinus* são sempre alternas e existe uma considerável variação no tamanho, forma e contorno das folhas ou folíolos. As folhas ou folíolos possuem tricomas não ramificados ou tricomas glandulares e é comum a presença de canais secretores esquizo-lisígenos no floema (BARKLEY, 1944).

Esta espécie é popularmente conhecida como aroeira mansa, árvore de pimenta e pimenta peruana. É conhecida como árvore de pimenta, devido ao fato de seus frutos conterem sementes com sabor acentuado, usado na culinária como um substituto da pimenta (ORWA et al., 2013). O sucesso de *S. molle* como planta exótica é atribuída a sua elevada tolerância à seca, à altas temperaturas, à competição por nutrientes e luz, bem como à elevada taxa de crescimento e produção de biomassa (DEMELASH; TIGABU; ODEN, 2003; IPONGA; MILTON; RICHARDSON, 2008). As espécies do gênero *Schinus* são amplamente utilizadas em programas de restauração de áreas degradadas devido à suas características ecológicas e rusticidade (ARAÚJO; CASTRO; ALBUQUERQUE, 2007; IPONGA; MILTON; RICHARDSON, 2008).

Em um trabalho realizado por Doganlar et al. (2012) foi observado que *S. molle* acumulou níveis elevados de Cu, Zn e Pb, em localidades com influência antrópica. Esse resultado, segundo os autores, tem relação com diferentes mecanismos fisiológicos ou genéticos dessa espécie para tolerar altos níveis de metais pesados, pois neste trabalho não houve correlação entre os níveis de peroxidase e conteúdo de pigmentos (clorofila e carotenóides), em função da acumulação de metais nessa espécie. Portanto, a avaliação da tolerância de *S. molle* a metais pesados pode auxiliar na melhor caracterização da tolerância dessa espécie e avaliar o potencial da mesma para ser utilizada em fitorremediação

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, no Laboratório de Microscopia Eletrônica e no Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas da Universidade Federal de Lavras (UFLA-MG).

3.2 Condições de cultivo

Plantas de *S. molle*, obtidas por meio da germinação de sementes coletadas de uma população localizada em Alfenas, Minas Gerais, foram cultivadas por um período de dez meses, em casa de vegetação com temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, plantadas em sacos plásticos com dimensões de 10x7x5, com capacidade para 0,350 L de substrato. O substrato utilizado foi vermiculita e areia lavada na proporção 1:1. Durante o período de cultivo, essas plantas foram irrigadas em intervalos de 15 dias com solução de Hoagland e Arnon (1950), a 40% da força iônica. Quando as plantas completaram sete meses de idade ocorreu a exposição das mesmas às concentrações crescentes de Cd.

Para montagem do experimento das 300 plantas produzidas, 54 foram escolhidas e uniformizadas com base em critérios de tamanho e fitossanidade. O experimento foi montado, utilizando-se canos de policloreto de vinila (PVC), com inclinação de 3%, para evitar que a solução de Hoagland contaminada com o Cd se espalhasse no ambiente (Figura, 2).



Figura 2 Sistema de coleta da solução de Hoagland contaminada com cádmio dos diferentes tratamentos utilizando canos PVC.

3.3 Planejamento experimental

Os experimentos foram montados utilizando seis concentrações crescentes de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ (0, 10, 20, 50, 125 e 250 μM), totalizando seis tratamentos com nove repetições. As parcelas experimentais foram definidas de acordo com cada característica avaliada, sendo descritas nos tópicos específicos. As concentrações foram estabelecidas com base na resolução 420 do CONAMA (BRASIL 2009) que estabelece critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas.

O período experimental foi de 90 dias, sendo realizadas três avaliações em intervalos de 30 dias.

3.4 Análise de crescimento e índice de tolerância

Para a realização das avaliações de crescimento e posterior cálculo dos índices fisiológicos, as folhas foram digitalizadas em Scanner e por meio de análise de imagem, utilizando software ImageJ, foi determinado a área foliar total (AF) de cada planta e o número de folhas por planta (NF). Após a determinação da área foliar, as folhas, juntamente com o caule e as raízes foram secas em estufa a 60°C por 72 h e, em seguida, a massa seca (MS), de cada órgão, foi determinada em balança analítica (AY 220, Shimadzu, São Paulo, Brazil) As análises de crescimento foram realizadas utilizando seis avaliações, com parcela experimental de uma planta. Depois de realizadas essas medidas de crescimento, foram calculadas de acordo Hunt et al. (2002), a taxa de crescimento relativo (TCR), taxa assimilatória líquida (TAL).

O índice de tolerância (IT) para as diferentes concentrações de Cd e para cada órgão foi calculado, segundo Wilkins (1957), utilizando-se a seguinte fórmula: $IT = (\text{massa seca da planta na solução com Cd} / \text{massa seca da planta na solução controle} \times 100)$. Foram feitas 15 avaliações para as concentrações e 25 para os órgãos, sendo a parcela experimental composta de uma planta.

3.5 Análise das trocas gasosas

A fotossíntese líquida (A), a transpiração (E), a condutância estomática (g_s), foram avaliados utilizando um sistema portátil de fotossíntese LI-6400 (Licor, Nebraska, EUA), equipado com câmara de 6 cm² e fonte artificial de luz (6400-02 B Red Blue). A densidade de fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA) foi fixada para 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. As avaliações foram feitas no período entre as 8h e 10h da manhã. A parcela experimental foi de um folíolo, sendo avaliadas duas folhas diferentes de nove plantas por tratamento. As

leituras foram realizadas em folhas completamente expandidas, posicionadas no segundo nó, a partir do ápice.

As curvas de fotossíntese líquida por concentração intercelular de CO₂ (A/Ci) foi realizada utilizando um sistema portátil de fotossíntese LI-6400 (Li-Cor, Nebraska, EUA) com as mesmas características descritas acima. No entanto, esse foi equipado com um sistema de injeção automática de CO₂ (LI-6400-01, Li-Cor) e as medições foram realizadas de acordo com o método proposto por Long e Bernacchi (2003), com algumas modificações. Para garantir que a ativação da Rubisco fique constante, primeiramente o aparelho foi programado para injetar 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de CO₂, durante aproximadamente 2 min. (até o aparelho estabilizar). Em seguida, foram realizadas as demais leituras em 16 níveis de CO₂ (400, 300, 200, 100, 50, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 e 1500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Todas as leituras foram realizadas somente quando cv foi $\leq 0,5\%$. Foram feitas três avaliações, utilizando três plantas por tratamento, com parcela experimental de um folíolo por planta.

Após a realização das curvas A/Ci foram calculados, segundo Farquhar, Caemmerer e Berry (1980), a taxa máxima de carboxilação (V_{cmax}) da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco) e a taxa máxima de transferência de elétrons (J_{max}).

3.6 Medição indireta de clorofila e caracterização da clorose

A medição indireta do teor de clorofila nas folhas foi realizada utilizando o medidor portátil de clorofila SPAD-502 (Konica Minolta, Tokyo, Japan). A parcela experimental foi de um folíolo, sendo avaliadas duas folhas diferentes de nove plantas por tratamento.

Para a caracterização da clorose foi realizado a análise dos níveis de cinza das folhas de nove plantas por tratamento. Essas folhas foram digitalizadas em Scanner e utilizando software de análise de imagem (ImageJ). Foram determinados os níveis de cinza, utilizando nove plantas por tratamento e realizando 180 avaliações por tratamento a partir do conjunto total de folhas de cada planta, a parcela experimental foi composta de um campo na imagem.

3.7 Análise nutricional

Para a análise nutricional, raízes, caules e folhas de seis plantas por tratamento, foram lavados em água corrente e secos em estufa a 60°C por 72h. Em seguida a massa seca de cada órgão foi triturada em moinho de facas tipo Willye. Depois de triturado, 500 mg de massa seca foi pesada em balança analítica. Após esse procedimento o material vegetal foi levado para digestão nitroperclórica, segundo método proposto por Sarruge e Haag (1974). Dessa forma, foram misturados 10 mL de HNO₃ concentrado, deixando-se as amostras em repouso durante 12 h. A digestão foi feita a uma temperatura de 150 °C por 30 minutos até a redução de aproximadamente a metade do volume de ácido nítrico adicionado. Depois desse período foi adicionado 1,0 mL de HClO₄ P.A. e a temperatura do bloco digestor aumentada para 210°C por 20 minutos, até o clareamento da solução.

O produto da digestão (amostra) foi transferido para balão volumétrico de 25 mL, acrescentado 10 mL de água destilada e levados para leitura em Espectrômetro de Absorção Atômica, modalidade chama, fazendo três avaliações para cada órgão com parcela experimental de uma alíquota do produto da digestão. Foram determinados o teor de Cádmio (Cd), macronutrientes [Magnésio (Mg), Cálcio (Ca), Fósforo (P), Enxofre (S) e

Potássio (K)] e micronutrientes [Zinco (Zn), Ferro (Fe), Manganês (Mn) e Cobre (Cu)], nas raízes, caule e folhas.

3.8 Análise anatômica quantitativa

Para a realização da análise anatômica das raízes e folhas, essas foram fixadas em F.A.A._{70%}, por 72 horas (JOHANSEN, 1940). Na coleta das folhas, tomou-se o cuidado de se coletar somente as que se desenvolveram no período de exposição, para isso os primórdios foliares foram marcados no início da exposição.

As características anatômicas foram avaliadas na região pilífera das raízes e região mediana dos folíolos. Na raiz, foram avaliadas as seguintes variáveis: espessura da epiderme (EP), espessura da exoderme (EX), espessura do córtex (CT) e espessura da endoderme (ED). Nas folhas, foram avaliadas, para as secções paradérmicas, a densidade e o índice estomático, os diâmetros polar, equatorial, o comprimento do ostíolo e funcionalidade dos estômatos. Nas secções transversais foi avaliada a espessuras do mesofilo.

As secções paradérmicas das folhas foram realizadas à mão livre, com auxílio de uma lâmina de aço e coradas com safranina 0,1%. As secções transversais foram realizadas com auxílio de micrótomo manual de mesa (modelo LPC) e coradas com azul de toluidina 0,05% (FEDER; O'BRIEN, 1968). Foram montadas lâminas semipermanentes, segundo método proposto por Kraus e Arduim (1997) e, em seguida essas foram observadas em microscópio trinocular (CX31, Olympus Tokyo, Japan), com sistema de captura acoplado, sendo digitalizadas para posterior análise em software de análise de imagem (ImageJ).

Para as secções transversais das raízes, foram analisadas três plantas e seis raízes de cada planta, fazendo uma lâmina para cada raiz e analisando três

campos por lâmina, totalizando 54 avaliações por tratamento. Nas secções transversais e paradérmicas das folhas, foram analisadas em três plantas e seis folíolos de cada planta, por tratamento. Para as secções transversais das folhas foram feitas uma lâmina por folíolo e avaliados três campos por lâmina, totalizando 54 avaliações. Para as secções transversais foram feitas uma lâmina por folíolo e avaliados dois campos por lâmina, contabilizando 36 avaliações. A parcela experimental para essas avaliações foi composta de um campo por imagem.

3.9 Microanálise de raios-X (EDS)

Foram realizadas avaliações nas folhas ,utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com sistema de microanálise de raios-X. Dessa maneira, as folhas foram coletadas e fixadas em Karnovsky modificado (Glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2, CaCl₂ 0,001 M), desidratadas em concentrações crescentes de acetona (25, 50, 75, 90 e 100%), permanecendo cerca de 10 min em cada uma. Em seguida, as amostras foram levadas para secagem ao ponto crítico CPD - 030 (Baltec, Fuerstentum, Liechtenstein), montadas em stubs, cobertas de carbono (ALVES, 2006), em evaporador de carbono CED - 020 (Baltec, Balzers, Liechtenstein) e observadas em MEV, LEO Evo 40 XVP (Leo Electron Microscopy, Cambridge, England), com sistema de microanálise de raios-X (Bruker) acoplado.

3.10 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SISVAR 5.0 (FERREIRA, 2011). Antes da realização de uma análise paramétrica, os dados foram testados quanto à sua normalidade e os que não apresentaram distribuição normal, foram transformados. Os dados foram submetidos à análise de variância em delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott, com 5% de probabilidade de erro, ou submetidos ao teste de regressão.

3.11 Tratamento de resíduos contaminados

O substrato e partes de plantas contaminadas com Cd foram encaminhadas ao Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos da UFLA, para o correto tratamento e disposição final desses resíduos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Crescimento e índice de tolerância de plantas de *Schinus molle* exposta ao Cádmi

A exposição ao Cd causou redução de forma linear na área foliar (Figura, 3 A), no número de folhas (Figura, 3 B), na massa seca total das plantas (Figura, 3 C) e na massa seca das raízes e parte aérea (Figura, 3 D).

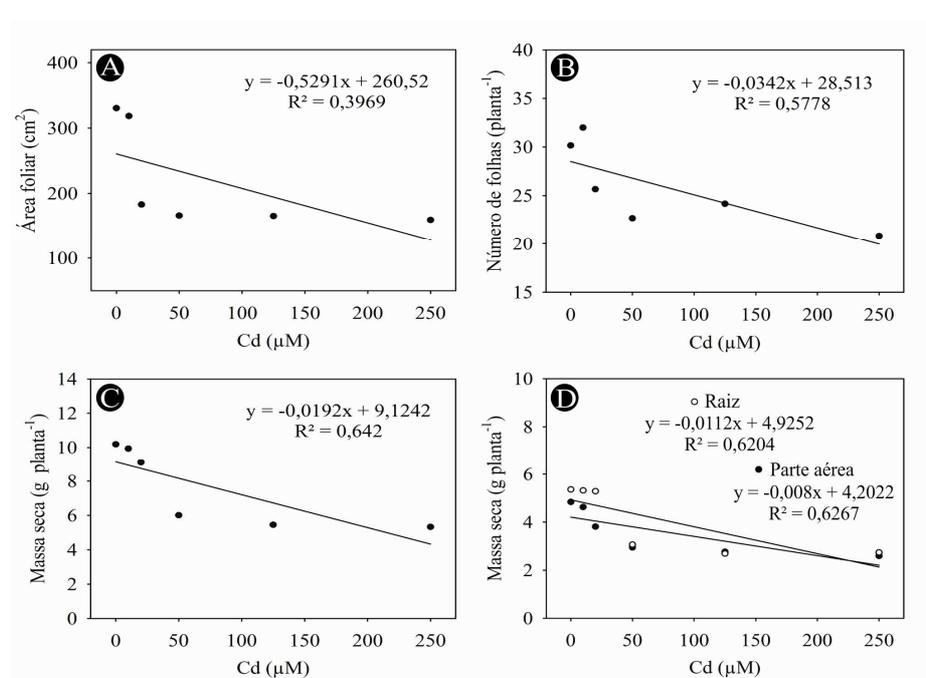


Figura 3 Área foliar (A), número de folhas (B), massa seca total (C) e massa seca da raiz e parte aérea (D) de plantas de *S. molle* exposta a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias.

A redução da área foliar e do número de folhas (Figura 3 A e B) provavelmente exerceu grande influência na diminuição da massa seca da raiz e

da parte aérea (Figura 3 C e D). A redução do crescimento, em plantas expostas ao Cd, pode ser atribuída diretamente ao Cd, devido à sua interação com grupos Sulfidril (GUIMARÃES et al., 2008) ou indução da deficiência Zn e outros micronutrientes (SARWAR et al., 2010). A interação com grupos Sulfidril causa a redução da atividade enzimática em diversos processos metabólicos, tais como, na síntese de clorofila, na foto-oxidação da água, na fixação de CO₂, no ciclo de Calvin e na redução do nitrato (NO₃⁻) (SEREGIN; IVANOV, 2001). Por outro lado, a diminuição da absorção de Zn, induzida pela exposição ao Cd, pode causar redução na síntese de proteínas, devido à participação do Zn no metabolismo dos ácidos nucleicos e na estabilidade dos ribossomos (BROADLEY et al., 2012).

Os índices fisiológicos de crescimento apresentaram queda significativa com comportamento linear, em função do aumento das concentrações de Cd. O índice fisiológico mais influenciado pela exposição foi a TAL (Figura, 4 A), apresentando uma diminuição de 63,30% em relação ao tratamento controle, seguido pela TCR (diminuição de 55,97%) (Figura, 4 B)

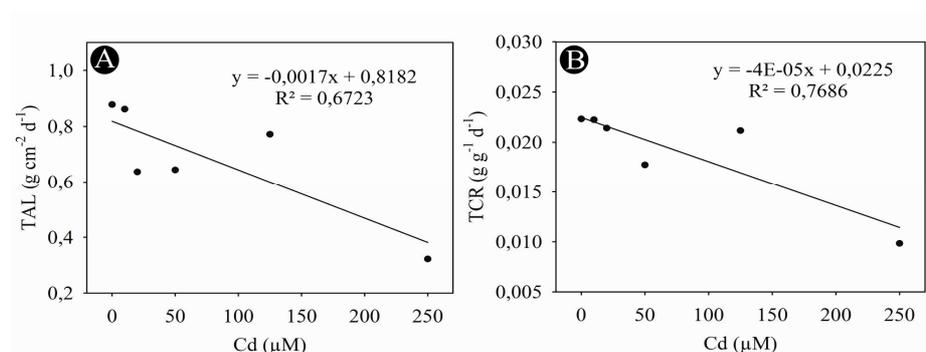


Figura 4 Taxa assimilatória líquida (A) e taxa de crescimento relativo (B) de plantas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio, por um período de 90 dias.

A TAL representa o balanço entre a massa seca produzida pela fotossíntese e a consumida através da respiração. A diminuição da TAL, da TCR e de características das trocas gasosas, segundo, Wahid et al. (2007), pode estar relacionada a perturbações na assimilação de carbono e nitrogênio. Dessa forma, a diminuição desses índices ilustra a interferência do Cd nas características do crescimento da espécie estudada.

Plantas com índice de tolerância menor que 100% apresentam redução do crescimento. Esse índice igual a 100% significa que as plantas não demonstram redução na produção de massa seca, e índices de tolerância maior que 100 indicam aumento na produção de biomassa com a exposição ao metal. O índice de tolerância da *S. molle* ao Cd nas concentrações de 10 e 20 μM estão acima de 80 %, nas maiores concentrações esse índice diminuiu em média para 60 % (Figura, 5 A). As raízes e caules possuem índice de tolerância maior que as folhas (Figura, 5 B).

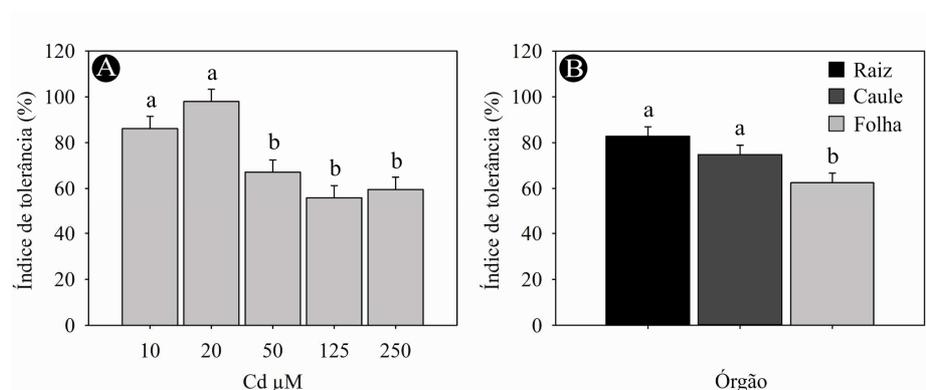


Figura 5 Índice de tolerância ao cádmio para cada concentração (A) e para cada órgão (B) de plantas de *S. molle* após 90 dias de exposição. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Segundo Utmazian et al. (2007), espécies que apresentam índice de tolerância menor que 100% podem não apresentar um bom desempenho para a fitorremediação, em locais altamente contaminados. *S. molle* apresenta índice de tolerância acima de 80 % exposta a uma concentração de 20 μM ,por 90 dias. As concentrações de Cd, utilizadas neste trabalho , estão muito acima das utilizadas em trabalhos com espécies lenhosas (KUZOVKINA; KNEE; QUIGLEY, 2004; LUKOVIĆ et al., 2012; LUNÁČKOVÁ et al., 2003; PILIPOVIC et al., 2005; STOLTZ; GREGER, 2002; UTMAZIAN et al., 2007; VACULÍK et al., 2012; WATSON; PULFORD; RIDDELL-BLACK, 1999). Além disso, o período de exposição neste trabalho, foi muito maior do que os períodos relatados na literatura. Como espécies lenhosas possuem ciclo de vida longo, a exposição por de 90 dias ou mais, talvez seja necessária, para avaliar os efeitos do Cd no crescimento.No entanto, concentrações mais baixas de Cd reproduzem melhor as condições de campo.

O índice de tolerância para cada órgão revelou que além das raízes possuem maior capacidade de acumular Cd (Figura 10 A), esse órgão apresenta maior índice de tolerância em relação às folhas. Esse resultado pode indicar que as raízes de *S. molle* possuem um mecanismo eficiente de compartimentalização de Cd. Essa compartimentalização faz com que o Cd não permaneça no citossol ou fique inativo em um compartimento celular ou subcelular de baixa atividade metabólica (GEFFARD et al., 2010; SANITA DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999).

Durante o período de exposição às concentrações de Cd ,não houve mortalidade das plantas de *S. molle*.No entanto, essas apresentaram sintomas de toxicidade, como: redução do crescimento aos 90 dias de exposição (Figura, 6 A), necrose da região apical dos folíolos e clorose severa nas folhas jovens nos tratamentos com maiores concentrações de Cd (Figura, 6 B), perda da dominância apical nos tratamentos de 10 e 20 μM , apresentando numerosas

brotações laterais (Figura, 6 C), clorose das margens dos folíolos de folhas jovens e necrose na região apical dos folíolos (Figura, 6 D).

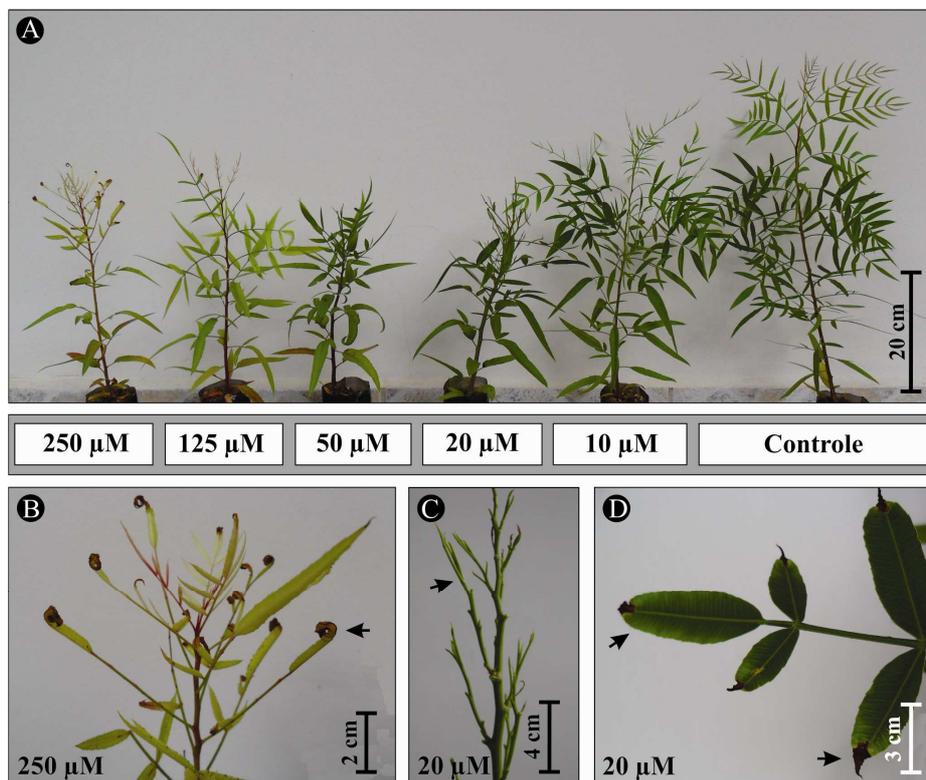


Figura 6 Principais sintomas visuais de toxicidade ao cádmio em plantas de *S. molle* após 90 dias de exposição. Na imagem (A) é possível ver a redução do crescimento das plantas. A imagem (B) mostra plantas expostas a 250 μM de Cd apresentando clorose severa e necrose da região apical dos folíolos de folhas jovens (seta). Em (C) as plantas apresentaram perda da dominância apical nas concentrações de 10 e 20 μM , havendo crescimento de numerosas brotações laterais (seta). Em (D) nas plantas expostas as menores concentrações de cádmio algumas folhas jovens apresentaram necrose da região apical dos folíolos (seta), e clorose nas margens dos folíolos (seta).

A diminuição de crescimento e perda da dominância apical são sintomas típicos de deficiência de Zn. Isso se deve à participação do Zn no metabolismo das auxinas, em particular, o ácido indolacético (AIA) (BROADLEY et al.,

2012). Portanto, a perda da dominância apical em plantas de *S. molle*, possivelmente, pode estar relacionada com a diminuição da absorção de Zn (Figura, 10 B), causada pela exposição ao Cd.

As necroses observadas principalmente na região apical dos folíolos podem ter sido provocadas pelo estresse oxidativo causado pela exposição ao Cd. Embora muitos metais sejam essenciais para as plantas, todos os metais são tóxicos em altas concentrações, uma vez que causam o estresse oxidativo, por meio da formação de radicais livres (BHADURI; FULEKAR, 2012).

Os metais pesados podem causar estresse oxidativo por meio de vários mecanismos de ação como, por exemplo, perturbar vias metabólicas, especialmente na membrana tilacóide, que resulta no aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, os metais pesados podem inativar ou ativar enzimas antioxidantes (peroxidases, catalases, superóxido dismutase), responsáveis pela desintoxicação das células. Por fim, o acúmulo de metais pesados resulta na depleção de antioxidantes não enzimáticos de baixo peso molecular tais como a glutatona (GSH), que é consumida na síntese de fitoquelatina (BHADURI; FULEKAR, 2012).

Utmazian et al. (2007), trabalhando com 20 espécies de salgueiro e álamo expostas a 4,45 μM de Cd observaram, na maioria das espécies, uma considerável diminuição da biomassa radicular. Portanto, o Cd interfere no crescimento das plantas, mesmo em espécies tolerantes como o salgueiro e o álamo. Existe uma grande variação em relação à capacidade das plantas tolerantes crescerem em ambientes contaminados por Cd. Por exemplo, *Brassica juncea* pode tolerar exposições ambientais de 2500 μM de Cd sem mostrar efeitos de fitotoxicidade ou redução no crescimento (SRIDHAR et al., 2005).

A redução das características de crescimento, o índice de tolerância menor que 100%, e também devido ao fato de não ter havido mortalidade das plantas significa que a espécie em estudo possui moderada tolerância ao Cd.

4.2 Comportamento fotossintético de plantas de *Schinus molle* expostas ao Cádmio

As trocas gasosas de *S. molle* foram modificadas pelo aumento das concentrações de Cd. A fotossíntese líquida (A) e a transpiração (E) nas concentrações de 10 e 20 μM , apresentaram um aumento de 28% e 18% respectivamente, em relação ao tratamento controle. A partir da concentração de 50 μM , tanto a A, quanto a E apresentaram uma redução, mas essa diminuição foi para níveis semelhantes ao controle (Figura, 7 A e B). A g_s foi diminuída pela exposição ao Cd, a partir da concentração de 50 μM . Os tratamentos a partir dessa concentração apresentaram, em média, valores 20% menores, para essa variável (Figura, 7 C)

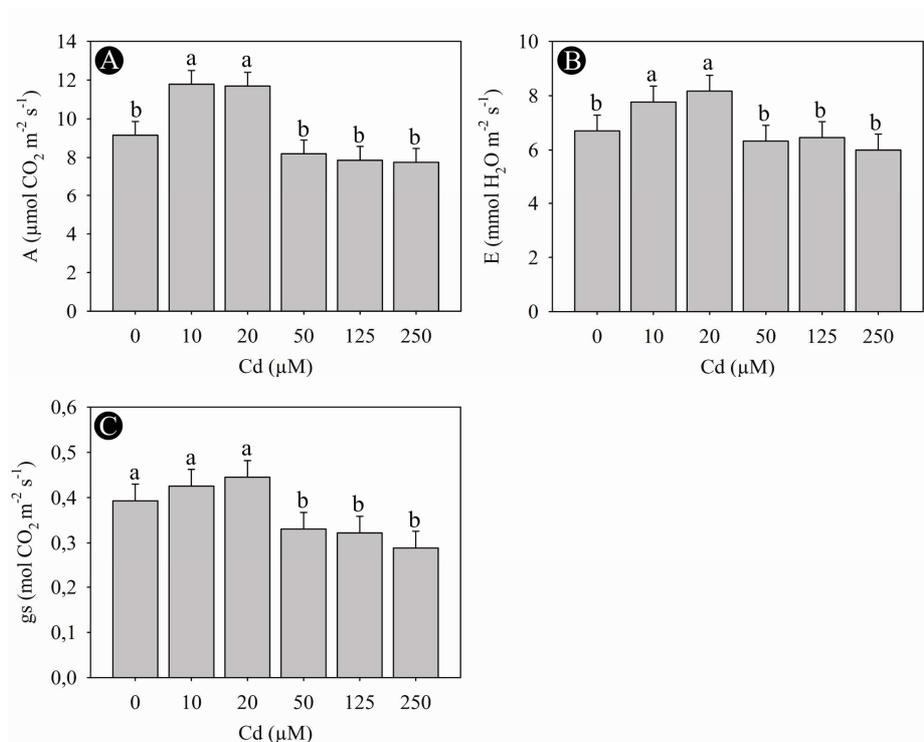


Figura 7 Trocas gasosas foliares em plantas de *S. molle* expostas à concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias. A - fotossíntese líquida, B - transpiração, C - condutância estomática. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Devido à interação do Cd com enzimas e proteínas que contêm grupos sulfidríla, esse elemento pode interferir na fotossíntese de diversas formas, como, por exemplo: inibir a cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastídios, inibir as enzimas do Ciclo de Calvin (DELMAIL et al., 2011), provocar má formação do cloroplasto, devido ao empilhamento anormal do granum e reduzir do número e o tamanho do grana (GUIMARÃES et al., 2008). Além disso, a eficiência com que a energia radiante é convertida em formas químicas depende das propriedades anatômicas das folhas (LANDSBERG; SANDS, 2010).

Desta forma, o aumento da A e E nas concentrações de 10 e 20 μM de Cd, provavelmente, estão relacionados com as características anatômicas das folhas, que podem ser modificadas pela exposição ao Cd (Figura, 15), como, por exemplo, o espessamento da lâmina foliar, do parênquima paliçádico, do parênquima esponjoso, aumento na densidade estomática (SHI; CAI, 2009) e aumento dos espaços intercelulares no parênquima esponjoso (SOUZA et al., 2011). A modificação dessas características anatômicas como, por exemplo, o aumento de espaços intercelulares, pode aumentar a área de superfície dos cloroplastos expostos ao ar e facilitar o acesso do CO_2 aos sítios de carboxilação, causando o aumentando da fotossíntese (EVANS et al., 1994).

Para a A e para a E não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos, a partir na concentração de 50 μM . No entanto, reduções na g_s , com o intuito de diminuir a perda de água, também reduzem as taxas fotossintéticas (JONES, 1998). Portanto, a redução da g_s , a partir na concentração de 50 μM pode ter contribuído para a diminuição da A e conseqüentemente do crescimento.

A atividade fotossintética diminui ,significativamente, com o aumento das concentrações de Cd, e assim essa característica pode ser considerada um indicador sensível do estresse causado por esse elemento (SOUZA et al., 2011). Dessa forma, na espécie estudada, o Cd provavelmente foi responsável por diminuir as taxas fotossintéticas, pois houve redução no crescimento (Figura, 3, 4 e 6), no entanto, os resultados das trocas gasosas foram influenciados pela anatomia da folha, que também sofreu alterações (Figura, 15 e 16, p. 59 e 61) com a exposição às concentrações crescentes de Cd.

A taxa de carboxilação da Rubisco (V_{cmax}) e a taxa de regeneração da Rubisco ,via transporte de elétrons (J_{max}) foi maior nos tratamentos de 10 e 20 μM (Figura, 8). A partir da concentração de 50 μM , houve uma queda, tanto na V_{cmax} quanto na J_{max} . Em relação ao tratamento-controle, as concentrações

seguintes de 125 e 250 μM apresentaram uma redução média de 42,62% na V_{cmax} e 46,16% na J_{max} (Figura 8).

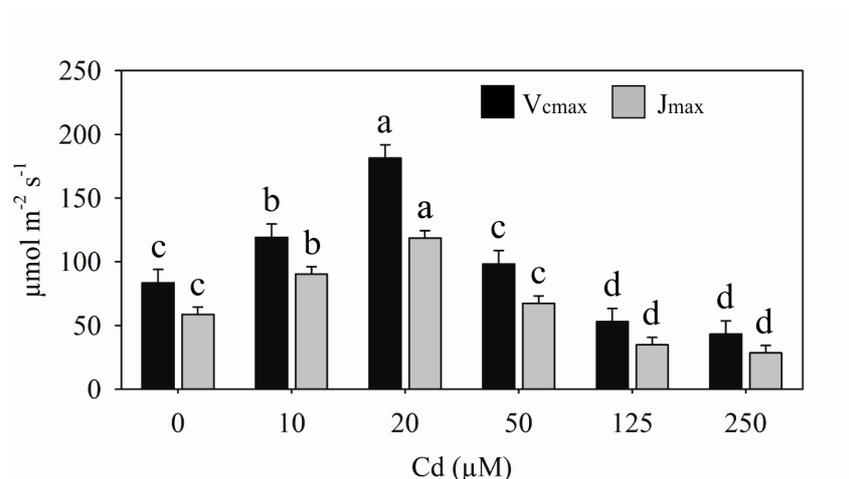


Figura 8 Características bioquímicas que influenciam as trocas gasosas em plantas de *S. molle* exposta a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias. V_{cmax} – taxa máxima de carboxilação, J_{max} – taxa máxima de transferência de elétrons. As médias seguidas de mesma letra para os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Sob concentrações baixas e intermediárias de CO_2 , a fotossíntese é limitada pela capacidade de carboxilação da Rubisco; No entanto, sob altas concentrações, a fotossíntese é limitada pela capacidade do ciclo de Calvin de regenerar a molécula aceptora ribulose-1, 5-bifosfato, que depende da taxa de transportes de elétrons (TAIZ; ZEIGER, 2004). Dessa forma, as curvas A/Ci fornecem informações sobre as limitações bioquímicas da fotossíntese.

Segundo Long e Bernacchi (2003), a interpretação prática da curva A/Ci é que essa permite a partição entre bioquímica e as limitações para a difusão de CO_2 no mesofilo. No presente trabalho, a limitação estomática para a fotossíntese não foi a responsável pelo aumento da A, E, V_{cmax} e J_{max} nas concentrações de 10 e 20 μM de Cd, pois as características estomáticas de *S.*

molle foram modificadas de modo a aumentar a resistência para a difusão de CO₂ (Figura, 16) e esse aumento da resistência pode reduzir as taxas fotossintéticas (LARCHER, 2006). Dessa forma, mais uma vez o espessamento do mesofilo (Figura, 15) influenciou os resultados das trocas gasosas.

No caso da V_{cmax} e a J_{max} , o aumento da espessura do mesofilo causou o aumento da quantidade da Rubisco por unidade de área, influenciando as taxas de carboxilação, pois segundo Larcher (2006), a eficiência e a quantidade de enzimas de carboxilação exercem grande influência nas taxas fotossintéticas. Por fim, os aumentos ocorridos nas variáveis citadas acima, nas concentrações de 10 e 20 μ M, estão relacionados com a maior capacidade por unidade de área de o mesofilo realizar a fixação do carbono, mas não significa que houve um aumento global nas taxas fotossintéticas de *S. molle*, nessas concentrações.

Nas maiores concentrações de 125 e 250 μ M de Cd, as reduções da V_{cmax} e da J_{max} para valores abaixo do tratamento- controle estão relacionadas com os efeitos tóxicos do Cd que podem variar desde a inibição enzimática (SEREGIN; IVANOV, 2001) até a geração de EROs que causam a oxidação de biomoléculas, tais como proteínas e lipídeos. Esses, por sua vez, causam lesão oxidativa a membranas e as estruturas subcelulares importantes para a realização da fotossíntese (BHADURI; FULEKAR, 2012).

As leituras SPAD apresentaram decréscimo em função do aumento das concentrações de Cd, com comportamento quadrático (Figura, 9 A). Os níveis de cinza das imagens apresentaram comportamento inverso aos dados das leituras SPAD, sendo que as plantas expostas às menores concentrações apresentaram clorose e as expostas às maiores concentrações apresentaram clorose severa (Figura 9 B).

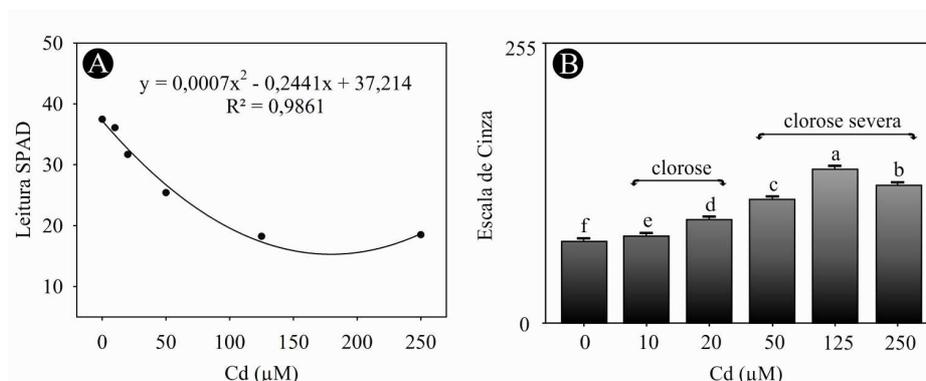


Figura 9 Leitura SPAD (A) e níveis de cinza (B) em folhas de plantas de *S. molle* exposta a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

O menor teor de clorofila em plantas expostas ao Cd é atribuído à inibição de sua síntese que, frequentemente, manifesta-se como clorose. A exposição ao Cd também pode induzir à deficiência de Mg e Fe e, dessa forma, causar diminuição nos teores de clorofila (SEREGIN; IVANOV, 2001). Portanto, a diminuição dos valores das leituras SPAD e aumento da clorose nas plantas podem estar relacionados à interferência do Cd na síntese de clorofila ou na indução de deficiência de nutrientes como, por exemplo, o Fe, que participa da biossíntese dessa molécula.

A espécie *Brassica juncea* L (Brassicaceae) é considerada uma planta tolerante à exposição ao Cd (MOHAMED et al., 2012). Essa espécie exposta a 50 μM de Cd pode apresentar clorose (EBBS; UCHIL, 2008). Dessa forma, a clorose em plantas expostas ao Cd é um sintoma típico de toxicidade, mesmo em plantas tolerantes.

É conhecido que o Cd pode inibir a biossíntese de clorofila através da inibição da enzima desidratase do delta-aminolevulinato (δ-ALA-D) e a protoclorigilida redutase, devido a sua interação com grupos sulfidril, levando à menor produção de ácido-delta-aminolevulínico (ALA), que é o primeiro

precursor comum para todos os tetrapirróis (ARAVIND; PRASAD, 2004). O Cd pode provocar a conversão da clorofila b para clorofila a em *Brassica juncea*, tendo um efeito semelhante à resposta mediada pela senescência, onde essa conversão ocorre naturalmente (EBBS; UCHIL, 2008).

4.3 Nutrição de plantas de *Schinus molle* expostas ao Cádmi

O teor de Cd nas raízes de plantas de *S. molle* foi maior do que nos caules e folhas ($F = 10,93$ e $P < 0,01$). O aumento das concentrações de Cd na solução promoveu um aumento linear no teor de Cd alocado nas raízes, sendo que esse valor chegou a atingir 458 mg kg^{-1} de massa seca, na maior concentração (Figura, 10 A). Nas folhas e caules, as concentrações de Cd permaneceram baixas, apresentando média de $5,59$ e $4,53 \text{ mg kg}^{-1}$ de massa seca, respectivamente. O teor de Cd nos caules não aumentou em função do aumento das concentrações de Cd na solução ($F = 2,49$ e $P = 0,09$) e também não houve aumento no teor de Cd nas folhas ($F = 2,72$ e $P = 0,07$).

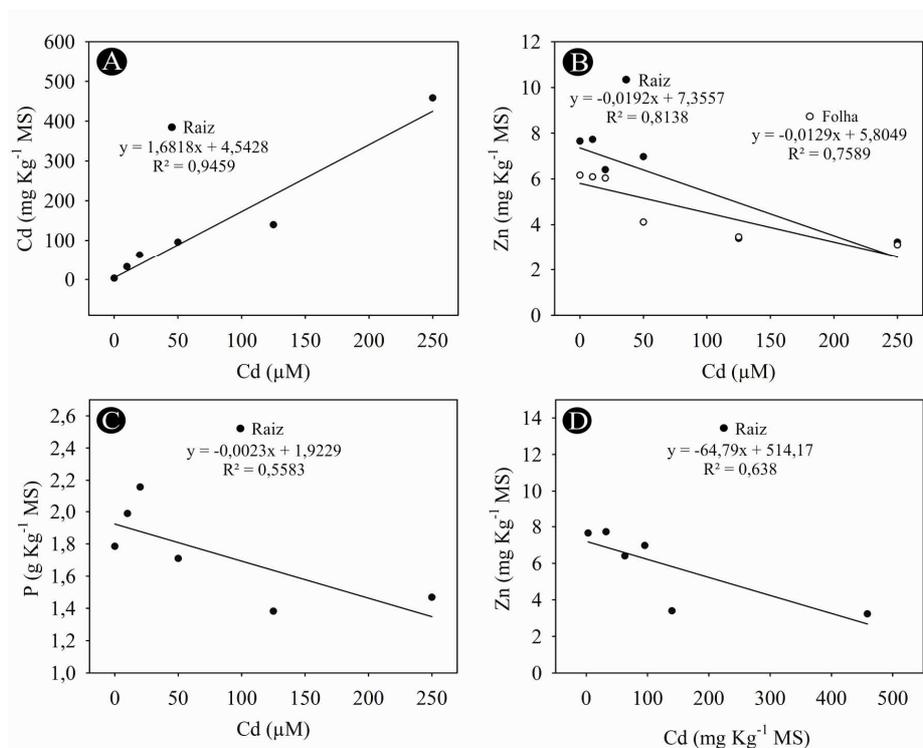


Figura 10 Teor de cádmio (A), zinco (B), fósforo (C) e correlação entre o teor de zinco e cádmio (D) na massa seca da raiz de plantas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias. MS - massa seca.

De acordo com Krämer (2010), o nível crítico para que uma planta exposta ao Cd apresente sintomas de toxicidade é de 6 a 10 mg kg⁻¹ de massa seca da parte aérea. A concentração média de Cd nas folhas e caules de *S. molle* não ultrapassa os limites que são considerados tóxicos e isso pode ter sido causado porque a translocação de Cd para a parte aérea foi diminuída em função do aumento da concentração na solução (Figura, 11 A).

Segundo Douchiche et al. (2010), a compartimentalização nas raízes contribui para a tolerância ao Cd, pois ao limitar a translocação para a parte aérea a planta evita o acúmulo de Cd nas folhas e faz com que o Cd não interfira nos

processos metabólicos que ocorrem nesse órgão como, por exemplo, a fotossíntese. Portanto, a compartimentalização do Cd nas raízes e a manutenção de teores baixos desse elemento nas folhas, pode ter sido o principal fator que determinou a sobrevivência das plantas de *S. molle* durante a exposição prolongada, caracterizando, portanto, uma estratégia de tolerância ao Cd.

Em relação à capacidade de acumular Cd nas folhas, *S. molle* apresenta baixo potencial quando comparado com espécies de salgueiro e álamo, pois a concentração de Cd nessas espécies variam entre 11,9 até 315 mg Cd kg⁻¹ de massa seca. A capacidade de acumulação de Cd nas folhas em espécies lenhosas parece exercer efeito sobre a tolerância dessas espécies. Por exemplo, *Salix dasyclados* pode acumular nas folhas até 315 mg Cd kg⁻¹ massa seca. No entanto, essa espécie, quando comparada com outras 20 espécies de salgueiro e álamo, possui baixo índice de tolerância ao Cd nas folhas (UTMAZIAN et al., 2007).

Comparando a capacidade de *S. molle* de acumular Cd nas raízes com outras espécies lenhosas consideradas com potencial para ser utilizada em fitorremediação, a espécie em estudo acumula valores que são frequentemente encontrados nessas espécies. Por exemplo, Utmazian et al. (2007), trabalhando com 20 espécies de salgueiro e álamo observaram que dez acumularam nas raízes valores abaixo de 500 mg Cd kg⁻¹ massa seca. Dessa forma, *S. molle* apresenta capacidade similar de acumular Cd nas raízes, quando comparado com outras espécies lenhosas com potencial para fitorremediação.

Devido à moderada tolerância e à baixa capacidade de acumular Cd, na parte aérea, *S. molle* possui potencial para a fitoestabilização. No entanto, trabalhos com menores concentrações de Cd e estudos de campo, devem ser realizados para melhor caracterização da tolerância dessa espécie e também, para avaliar, na prática, a capacidade de fitoestabilizar áreas contaminadas.

Os teores radicular e foliar de Zn apresentaram diminuição linear em função do aumento das concentrações de Cd na solução (Figura, 10 B). A

regressão entre o teor radicular de Zn e o teor radicular de Cd demonstrou que existe uma correlação ($F = 8,62$ e $P = 0,01$) negativa entre a absorção de Zn e Cd (Figura, 10 D). A diminuição da absorção de Zn provocada pela exposição os Cd pode estar relacionada à inibição competitiva, pois o Zn e o Cd apresentam similaridades químicas (eletronegatividade semelhante) e podem competir pelos mesmos sítios de absorção na raiz (HASAN et al., 2009; MALAVOLTA, 2006) Além disso, a perda da dominância apical das plantas expostas às concentrações de 10 e 20 μM , observada na sessão 4.1, podem estar relacionadas com a diminuição da absorção de Zn, pois o Zn participa do metabolismo do AIA (BROADLEY et al., 2012). Devido à interação do Cd com grupos sulfidrila (GUIMARÃES et al., 2008), esse elemento pode interferir na biossíntese de AIA e, possivelmente, pode causar a perda da dominância apical.

Nas raízes houve redução do teor de P em função do aumento das concentrações de Cd (Figura, 10 C). Devido à capacidade do ânion di-hidrogenofosfato (H_2PO_4^-) formar sais e complexos pouco solúveis com o Cd (CdPO_4), esse ânion diminui a disponibilidade do mesmo na solução (PAIM et al., 2006). Dessa forma, a diminuição dos teores totais de P nas raízes de plantas de *S. molle* pode estar relacionada a esses fatores, pois ao mesmo tempo em que o P diminui a disponibilidade de Cd, o contrário pode ser verdadeiro.

A porcentagem de translocação de Cd para a parte aérea diminuiu de forma linear em função do aumento das concentrações de Cd, na solução (Figura, 11 A). Esse resultado pode estar relacionado com a suberificação e lignificação da endoderme e exoderme que atuam como barreiras apoplásticas nas raízes e diminuem a translocação do Cd para a parte aérea (DOUCHICHE et al., 2010).

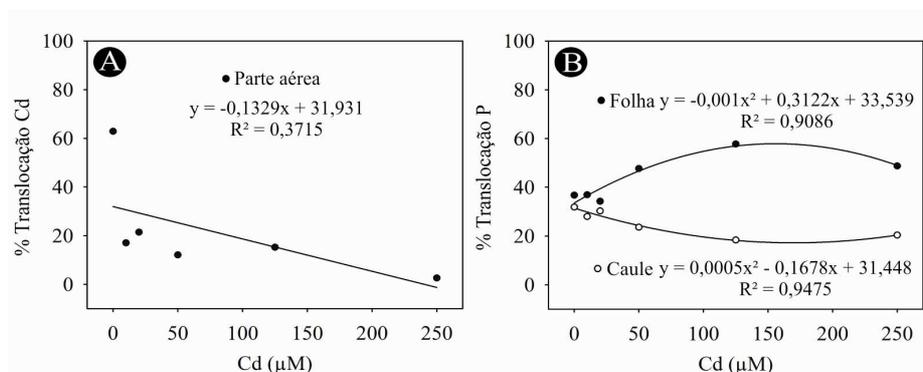


Figura 11 Translocação de cádmio (A) e fósforo (B) em plantas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias.

Como mencionado anteriormente, o teor foliar de Cd não aumentou em função do aumento da concentração na solução. Quando foi calculada a porcentagem de translocação de Cd para a parte aérea e folhas, observou-se uma relação negativa entre essa porcentagem e o aumento da concentração na solução. A redução da translocação de Cd para a parte aérea e a compartimentalização nas raízes pode auxiliar na tolerância dessa espécie, pois esse comportamento funciona como um mecanismo de compensação ao aumento da concentração de Cd na solução.

A translocação de P para as folhas foi aumentada à medida que as concentrações de Cd aumentaram. No entanto, no caule essa porcentagem de translocação foi diminuída (Figura, 11 B) O P é o macronutriente que mais limita o crescimento das plantas em campo, sendo que seu principal papel é o de armazenar e transferir energia, além de compor macromoléculas como o DNA, RNA e biomembranas (BROADLEY et al., 2012).

O fósforo está envolvido na biossíntese de glutatona (GSH), que é comumente sugerido como um precursor na síntese de fitoquelatinas (PCs). Essas PCs auxiliam na compartimentalização do Cd nos vacúolos, por meio da formação do complexo Cd/PC (SARWAR et al., 2010). Plantas tratadas com P

podem aumentar o conteúdo de GSH (WANG; WANG; ZHANG, 2009). Dessa forma, o aumento da translocação de P para as folhas pode estar relacionado com a síntese de PC, que exerce o papel de compartimentalizar o Cd nos vacúolos.

Por outro lado, segundo Cakmak e Marschner (1986), a deficiência de Zn nas folhas pode aumentar a taxa de absorção de P e sua translocação para a parte aérea devido às interações zinco-fósforo. Dessa maneira, a maior porcentagem de translocação de P para as folhas, possivelmente, pode estar associada ao baixo conteúdo de Zn nas plantas expostas ao Cd.

Os teores totais de Fe, Mn e Cu não foram modificados em nenhum órgão, pela exposição ao Cd (Figura, 12 A, B e C)

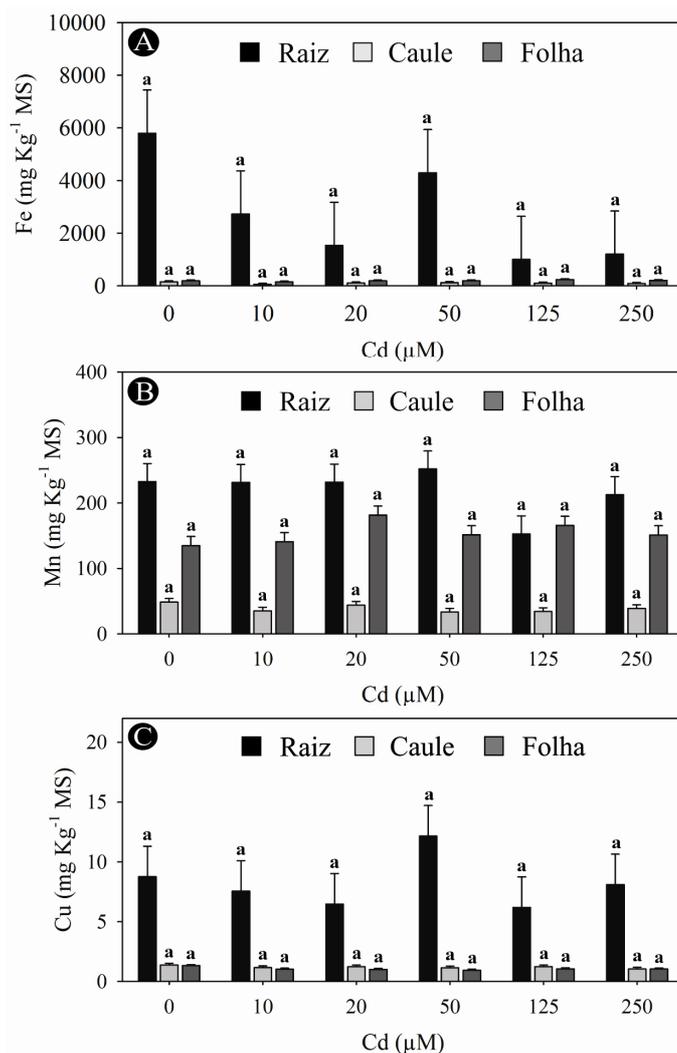


Figura 12 Teor de ferro (A), manganês (B) e cobre (C) nas raízes caule e folhas de plantas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias. MS - massa seca. As médias seguidas de mesma letra para os tratamentos com cádmio não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro

O Cd pode competir com o Fe pelo mesmo transportador de membrana e, dessa maneira, causar deficiência de Fe em plantas (SARWAR et al., 2010). No entanto, nesse trabalho não foi observada diminuição nos teores de Fe, embora, na raiz tenha havido diminuição no valor médio para os tratamentos com maiores concentrações de Cd, essas não foram significativas.

A nutrição adequada com Fe pode minimizar os efeitos tóxicos provocados pelo Cd. Os efeitos tóxicos podem ser minimizados, devido ao fato do Fe ser um importante cofator de enzimas antioxidantes, tais como, a catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX). Assim, o Fe pode aumentar a atividade dessas enzimas e atuar como um mecanismo de defesa importante contra as EROs geradas durante a exposição ao Cd (SARWAR et al., 2010).

O Mn é responsável pela ativação de enzimas que atuam na glicólise e no ciclo do ácido cítrico, participa da fotólise da água (reação de Hill), funciona como cofator na regulação do sistema e oxidação do AIA, do metabolismo do nitrogênio, na lignificação e etc (MALAVOLTA, 2006). O Cd e Mn competem pelos mesmos transportadores de membrana (GOMES; MARQUES; SOARES, 2013). Dessa forma, é esperado que o aumento da concentração de Cd, na solução, provoque a diminuição da absorção de Mn.

O Cd aumenta a absorção de Cu, mas restringe sua translocação para a parte aérea (OBATA; UMEBAYASHI, 1997). No entanto, não se observou, neste trabalho, alteração no teor de Cu na raiz e também não houve diferença ($F = 0,66$ e $P = 0,65$) na porcentagem de translocação para a parte aérea, em nenhuma concentração testada.

O Cu exerce várias funções na planta e entre elas se destacam: é componente estrutural de proteínas (Cu-proteínas), como, por exemplo, a plastocianina é um componente da cadeia de transporte de elétrons do fotossistema I, compõe isoforma da enzima superóxido dismutase (CuZnSOD) do sistema antioxidante, faz parte da estrutura da citocromo-oxidase na cadeia

mitocondrial de transporte de elétrons e etc (BROADLEY et al., 2012). Portanto, os níveis constantes de Cu em plantas de *S. molle* expostas ao Cd, pode auxiliar na tolerância dessa espécie devido à importância do Cu, no crescimento das plantas.

Entre os macronutrientes analisados, somente o teor de P e o S no caule e folhas foram modificados pelas diferentes concentrações de Cd (Figura, 13 B e C). O teor Mg tanto na raiz, caule e folhas não apresentou diferença significativa em função da exposição ao Cd (Figura, 13). O Mg é componente estrutural da molécula de clorofila e atua como cofator de muitas enzimas que ativam processos na fosforilação (GOMES; MARQUES; SOARES, 2013). Segundo Gomes, Marques e Soares (2013), a manutenção da absorção de Ca e Mg pode ser uma estratégia de tolerância para aliviar a toxicidade ao Cd. A absorção e transporte de Mg para a parte aérea pode ajudar a garantir a biossíntese de clorofila, evitando maiores danos, além dos provocados diretamente pelo Cd (ARAVIND; PRASAD, 2004).

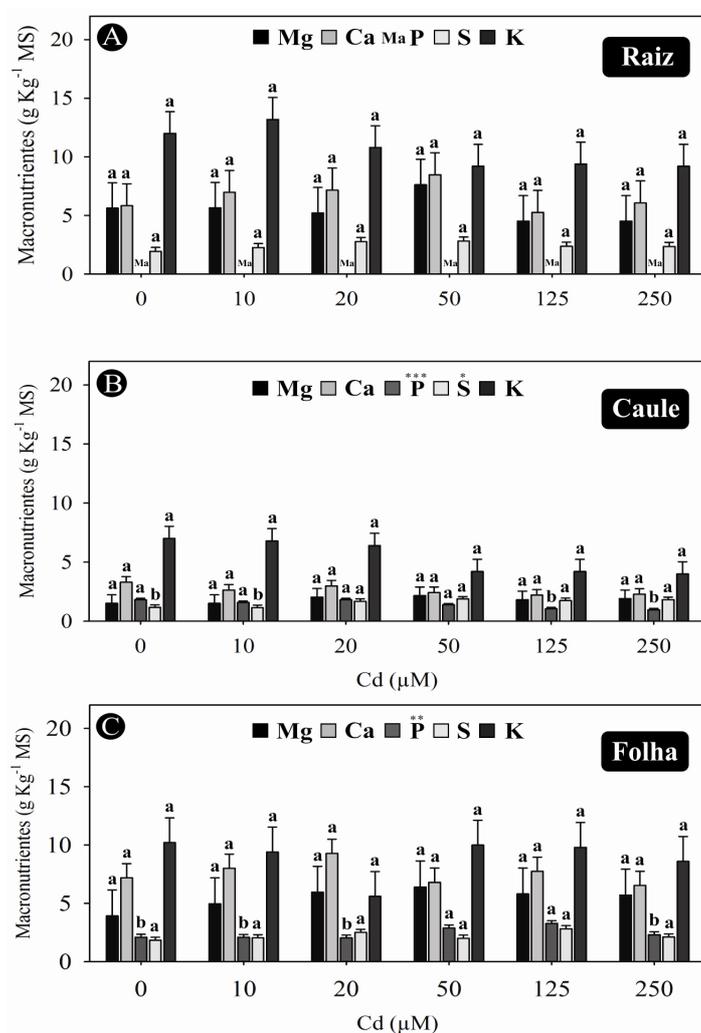


Figura 13 Teor de macronutrientes na raiz (A), caule (B) e folhas (C) de plantas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias. MS - massa seca, Ma - mostrado anteriormente. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott. Os asteriscos em B e C indicam diferenças significativas entre os tratamentos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p < 0,001$)

Para o teor de Ca nas raízes, caule e folhas de *S. molle* também não houve diferença significativa (Figura, 13). Como mencionado anteriormente, a manutenção da absorção de Ca pode auxiliar na tolerância das espécies aos efeitos tóxicos do Cd. O cálcio pode aliviar a toxicidade do Cd, pois esse compete por canais de Ca na planta. É possível que os sítios de ligação de cátions nos transportadores e canais tenham uma maior afinidade por íons Ca^{2+} do que por metais pesados (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008). Portanto, a presença de Cd na solução não influenciou alterações na absorção de Ca, devido a esses fatores.

O teor de P no caule, nas concentrações de 125 e 250 μM , foi menor em relação aos demais tratamentos (Figura, 13 B). Esse resultado pode estar relacionado com a diminuição da absorção de P nas raízes (Figura, 10 C). Nas folhas, as concentrações de 50 e 125 μM de Cd, apresentaram as maiores médias para o teor de P (Figura, 13 C). Como mencionado anteriormente, o P participa da biossíntese de GSH, que atua como um precursor na síntese de PC (SARWAR et al., 2010). Dessa forma, o aumento do teor de P nas folhas, nas concentrações supracitadas, pode estar relacionado com a síntese de PC, que reduz a reatividade do Cd no citossol, exercendo um papel importante na desintoxicação das células e compartimentalização do Cd nos vacúolos.

A análise do teor de S no caule (Figura, 13 B) apresentou um aumento, a partir da concentração de 20 μM . O teor adequado de S melhora a síntese de GSH que é considerada um importante mecanismo de defesa contra o estresse metálico. Plantas expostas ao Cd podem apresentar deficiência de S, devido à utilização desse na síntese de PCs (SARWAR et al., 2010). Metais como o Cd possuem alta afinidade por agentes quelantes com as PCs, que parecem exercer um importante papel na desintoxicação metálica em plantas (PÁL et al., 2006).

Alem disso, em plantas de arroz expostas ao Cd e nutridas com diferentes formas de nitrogênio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \text{NH}_4\text{NO}_3 \text{ e } \text{Ca}(\text{NO}_3)_2]$, Hassan et

al. (2005) observaram que a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na solução de cultivo causou inibição mínima de crescimento, e a maior taxa fotossintética nas plantas. Assim, o S não só exerce um papel importante para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas também é necessário para a desintoxicação de Cd, por meio da síntese de PCs. Portanto, o aumento no teor de S no caule pode estar relacionado ao papel do S na desintoxicação ao Cd.

O teor de K não apresentou diferença significativa em função do aumento das concentrações de Cd em nenhum órgão avaliado (Figura, 13) O potássio está estritamente ligado à atividade metabólica, exercendo várias funções na ativação enzimática, na síntese de proteínas, na fotossíntese, na osmorregulação e na abertura e fechamento dos estômatos (HAWKESFORD et al., 2012). Dessa forma, a manutenção do teor de K nas raízes, caule e folhas pode ajudar a diminuir a toxicidade do Cd, devido à importância do K em diversos processos relacionados com o crescimento.

4.4 Anatomia de plantas de *Schinus molle* expostas ao Cádmi

A raiz em estrutura primária de *S. molle* é tetrarca, com presença de canais secretores esquizo-lisígenos no floema (BARKLEY, 1944) (Figura, 14 A). O córtex possui exoderme (Figura, 14 B) e endoderme, que apresentaram alterações qualitativas com a exposição ao Cd (Figura, 14 C e D).

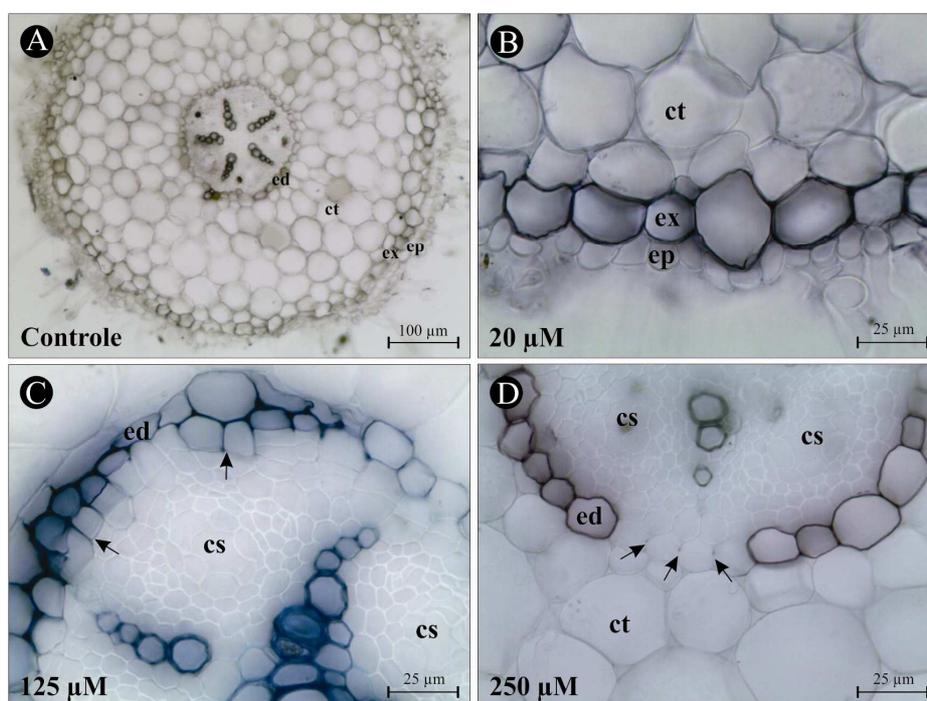


Figura 14 Características anatômicas radiculares de plantas de *S. molle* expostas ao cádmio por 90 dias. ep - epiderme, ex - exoderme, et - córtex, ed - endoderme e cs - canal secretor. As setas em C indicam lignificação ectópica e em D indicam as estrias de Caspary. Em D é possível ver a transição da endoderme primária (com presença de estrias de Caspary) para a endoderme secundária (com presença de lamelas de suberina).

O desenvolvimento da endoderme e exoderme é acelerado e muitos outros aspectos da anatomia radicular são alterados, quando as raízes estão expostas a concentrações elevadas de Cd (LUX et al., 2011; VACULÍK et al., 2012). A endoderme sob estresse do Cd, em alguns casos, chegou a apresentar lignificação ectópica (Figura, 14 C) e, na maior concentração de Cd foi possível observar a transição da endoderme em estágio primário, e com presença de estrias de Caspary para a endoderme em estágio secundário de desenvolvimento, com presença de lamelas de suberina (SCHREIBER et al., 1999) (Figura, 14 D).

A lignificação das paredes das células de tecidos corticais internos e de tecidos periféricos ao cilindro vascular (lignificação ectópica) pode restringir o movimento radial via apoplasto do Cd e diminuir sua translocação (LUX et al., 2011). Dessa forma, além da endoderme e exoderme atuarem como barreiras apoplásticas ao fluxo de Cd para a parte aérea, foi possível observar, nesse estudo, alterações como a lignificação ectópica que também atua uma barreira física contra o movimento extracelular de Cd e sua translocação para a parte aérea. Além disso, o maior índice de tolerância apresentado pelas raízes reforça a hipótese de que a formação de barreiras contra a absorção (exoderme) e translocação (endoderme) do Cd foi um fator determinante para atribuir tolerância.

Para as características quantitativas da anatomia radicular, somente a espessura da epiderme não foi modificada pelas diferentes concentrações de Cd. A espessura da exoderme foi menor nas concentrações de 10, 125 e 250 μM . No córtex, a espessura diminuiu nas concentrações de 10, 50 e 125 μM , no entanto, a espessura da endoderme aumentou nessas mesmas concentrações (Tabela 1).

Tabela 1 Características da anatomia radicular de plantas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio por um período de 90 dias – Brasil - 2013.

Característica	Cd μM					
	Controle	10	20	50	125	250
EP	10,14 a	09,43 a	09,78 a	09,43 a	09,31 a	09,36 a
EX	19,00 a	17,41 b	19,94 a	18,94 a	15,95 b	17,98 b
ED	12,93 b	15,12 a	13,23 b	14,86 a	14,19 a	13,41 b
ET	220,9 a	201,3 b	224,2 a	166,4 c	209,8 b	224,6 a

As médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro. EP - espessura da epiderme (μm), EX - espessura da exoderme (μm), ET - espessura do córtex (μm), ED - espessura da endoderme (μm).

A exoderme é, muitas vezes, considerada como uma barreira apoplástica contra a absorção de metais, no entanto, estudos demonstram que os metais são capazes de passar parcialmente através das paredes das células modificadas da exoderme (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008). No presente estudo, essa variável diminuiu nas maiores concentrações de Cd o que pode ter causado maior acúmulo desse metal nas raízes.

O papel de barreira da endoderme é devido à presença de suberina na composição das estrias de Caspary, bem como pelas características ultraestruturais das células maduras da endoderme. A endoderme atua como barreira de exclusão para Cd, em diversas plantas e a função de barreira da endoderme depende das vias de transporte (simplástica ou apoplastica), que, por sua vez, dependem de características fisiológicas das plantas e propriedades físico-químicas dos íons (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008). Segundo Seregin e Kozhevnikova (2008), o papel de barreira da endoderme em relação a compostos transportados via apoplasto é universal para todas as espécies vegetais. O Cd é absorvido pela via simplástica ou apoplástica (LUX et al.,

2011) e, dessa maneira, pode ser que as características quantitativas (espessura) da endoderme não reflita as propriedades de barreira apoplástica desse tecido contra a absorção de Cd. Os resultados da espessura da endoderme mostraram que esse tecido pode espessar na presença de Cd, mas essa variável não se correlaciona claramente com o aumento da concentração de Cd na solução.

No caso de íons de metais pesados, transportados através do simplasto, o papel do córtex é aparentemente reduzido para apenas o transporte, enquanto que, no caso de íons de metais pesados transportados através do apoplasto, o córtex representa o mais importante tecido de acumulação. Nas paredes das células corticais, os metais pesados podem se ligar em quantidades consideráveis. Essas ligações podem limitar a entrada de metal para dentro do citoplasma e funcionar como um mecanismo de desintoxicação morfofisiológica, que sequestra o metal num compartimento celular com baixa atividade metabólica (SEREGIN; KOZHEVNIKOVA, 2008).

Embora a espessura do córtex tenha diminuído em algumas concentrações, em outras, esse não sofreu alteração em função do aumento da concentração de Cd. Dessa forma, devido à grande quantidade de Cd acumulado nas raízes (Figura, 10 A) e ao fato do córtex ser o tecido mais abundante nas raízes em estrutura primária, esse tecido pode ter atuado como um local de acumulação de Cd.

Nas secções transversais das folhas, a espessura do mesofilo aumentou nas concentrações de 10 e 20 μM , no entanto, nas concentrações seguintes a espessura do mesofilo diminuiu (Figura, 15).

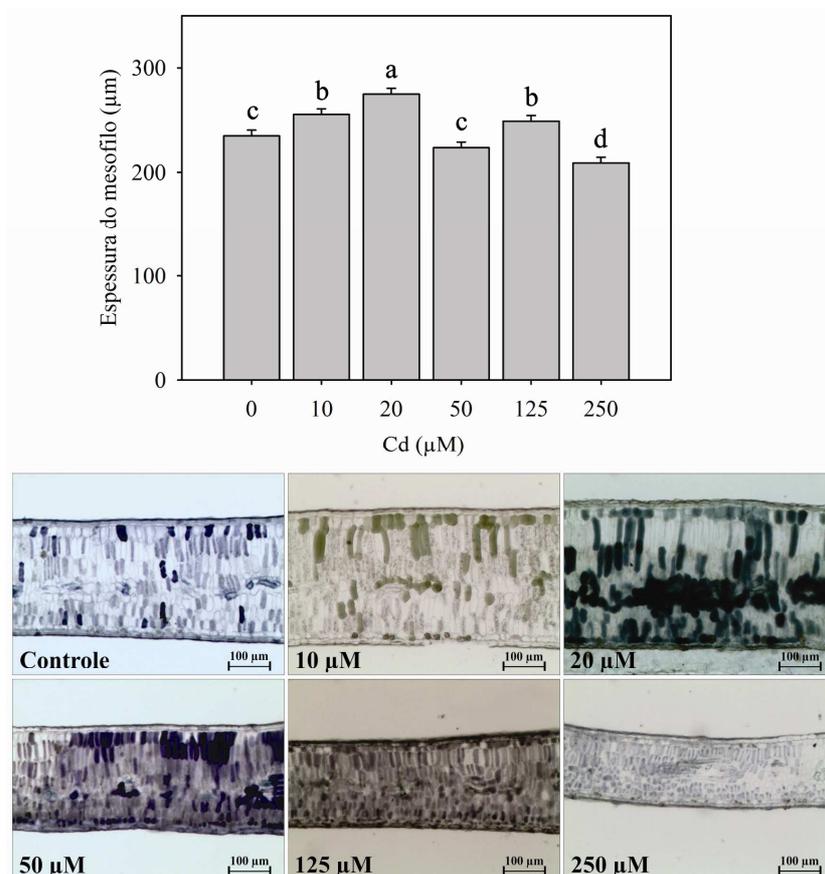


Figura 15 Espessura do mesofilo e seções transversais de folhas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio por 90 dias. As médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro

Esse resultado pode explicar os resultados obtidos para as trocas gasosas, onde a fotossíntese e a transpiração também apresentaram aumento nas concentrações de 10 e 20 μM (Figura, 3). O aumento na espessura do parênquima paliçádico na presença de concentrações crescentes de Cd, foi observado por Luković et al. (2012) em espécies de salgueiro e álamo. Segundo esses autores, esse aumento foi atribuído à expansão celular causada pelo aumento do vacúolo, que tem como função compartimentalizar o Cd.

Pereira et al. (2011), trabalhando com *Eichhornia crassipes* exposta ao arsênio verificaram aumento da fotossíntese, transpiração e condutância estomática. Nesse mesmo trabalho, os autores também verificaram aumento da espessura do mesofilo e do parênquima esponjoso que, segundo eles, foram os responsáveis pelo aumento nas trocas gasosas. O Cd pode afetar a turgescência, bem como a elasticidade da célula e também pode aumentar os espaços intercelulares no parênquima esponjoso (BARCELÓ et al., 1986; SOUZA et al., 2011). Portanto, o aumento da espessura do mesofilo em folhas de *S. molle* nas concentrações de 10 e 20 μM de Cd pode ter sido o responsável pelo aumento da fotossíntese.

O aumento das concentrações de Cd, na solução, provocou modificação nas características estomáticas. A densidade estomática na superfície adaxial foi diminuída e na superfície abaxial somente o tratamento de 10 μM apresentou diminuição em função da exposição (Figura, 16 A). Em relação ao índice estomático o tratamento de 20 μM não apresentou diferença para essa característica, em relação ao tratamento controle, no entanto, nas demais concentrações o índice estomático foi menor (Figura, 16 B). Os estômatos apresentaram diminuição do diâmetro polar, do diâmetro equatorial e do comprimento do ostíolo (Figura, 16 C, D e E). No entanto, a funcionalidade estomática foi aumentada com a exposição ao Cd (Figura, 16 F).

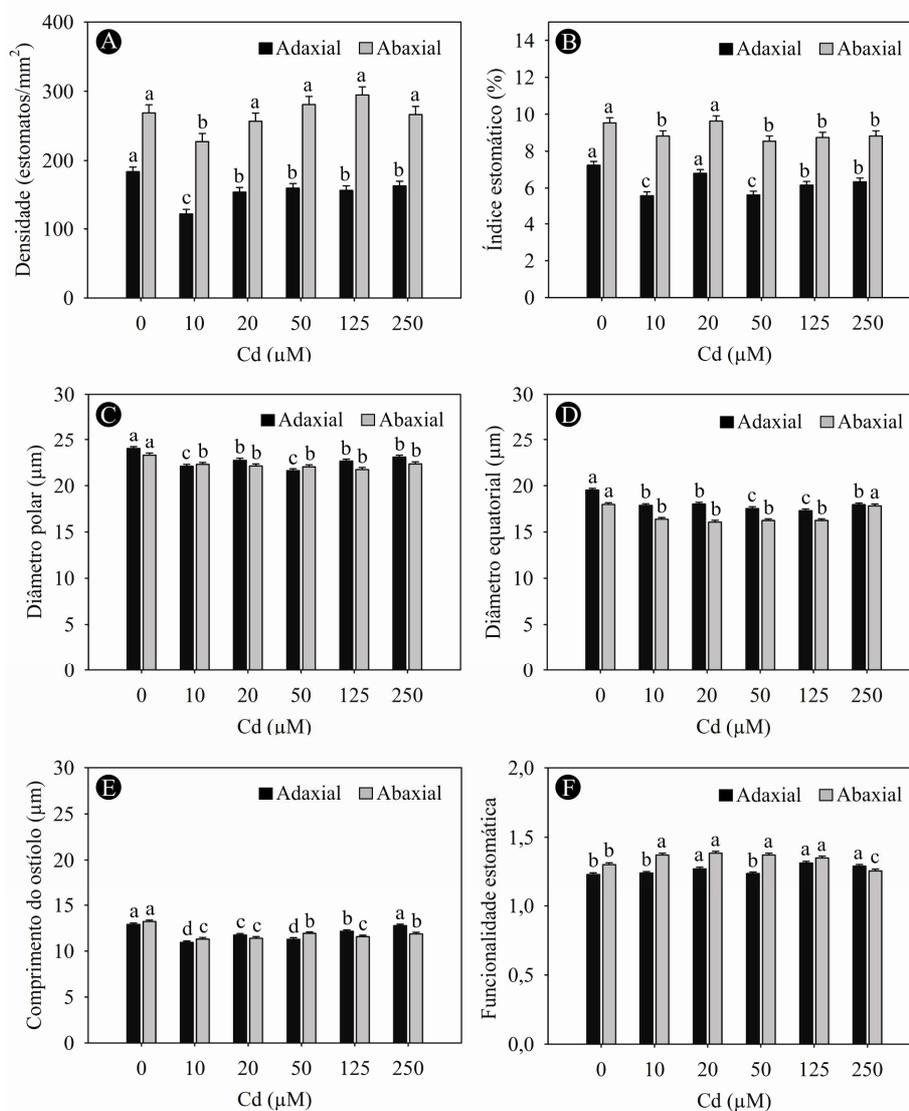


Figura 16 Características estomáticas de plantas de *S. molle* expostas a concentrações crescentes de cádmio por 90 dias. As médias seguidas mesma letra para os tratamentos não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

Os estômatos estão intimamente relacionados com os processos de fotossíntese e transpiração na planta, pois essas células exercem um papel-chave, tanto na regulação da perda de água, quanto na entrada de CO₂ no mesófilo. Dessa forma, é assumido que os estômatos fornecem o principal controle em curto prazo, tanto para a transpiração, quanto para a fotossíntese (JONES, 1998).

A diminuição da densidade estomática em plantas expostas ao Cd foi observada por Ahmad et al. (2005) e o autor atribui essa redução à diminuição da área verde (pela redução da área foliar), que induziria uma menor densidade de estômatos. Como os estômatos são células especializadas em realizar as trocas gasosas, a densidade estomática pode modificar, tanto a fotossíntese, quanto o uso eficiente da água (LAKE et al., 2001). Dessa forma, a diminuição da densidade e do índice estomáticos podem estar relacionado com a diminuição da fotossíntese, transpiração e condutância estomática, embora o teste de média aponte para um aumento dessas variáveis, nas concentrações de 10 e 20 µM, sendo esse aumento observado devido ao espessamento do mesófilo (Figura, 15).

A diminuição do diâmetro polar, equatorial e comprimento do ostíolo podem estar relacionados à diminuição da fotossíntese líquida, transpiração e condutância estomática (DELMAIL et al., 2011). Quando não há aumento da densidade estomática, a diminuição do tamanho das células estomáticas pode contribuir na redução das características das trocas gasosas, devido ao aumento da resistência à difusão de CO₂ para dentro da folha (SHI; CAI, 2009). A diminuição da fotossíntese em folhas mais velhas pode sinalizar para as folhas em formação (LAKE et al., 2001) uma menor quantidade de estômatos por unidade de área, menor investimento na produção de estômatos bem como redução do tamanho desses (AHMAD et al., 2005).

A funcionalidade estomática (DP/DE) representa principalmente o formato das células-guarda. De acordo com Khan et al. (2002), a forma elíptica é característica de estômatos funcionais, enquanto a forma arredondada, frequentemente, é associada a estômatos que não apresentam funcionamento normal. Quanto maior a relação (DP/DE), mais elipsoide é o estômato, podendo resultar em maior funcionalidade. Dessa forma, o aumento da funcionalidade dos estômatos em função do aumento das concentrações pode auxiliar na tolerância de *S. molle* a contaminação por Cd, pois estômatos mais funcionais podem auxiliar na regulação da transpiração.

4.5 Microanálise de raios-X (EDS) em folhas de *Schinus molle* expostas ao Cádmi

Nas avaliações ultraestruturais por microscopia eletrônica de varredura, com sistema de microanálise de raio-X (EDS), tanto a análise em linha, quanto o mapeamento não detectaram a presença de Cd nos cristais de oxalato de cálcio (Figura, 17).

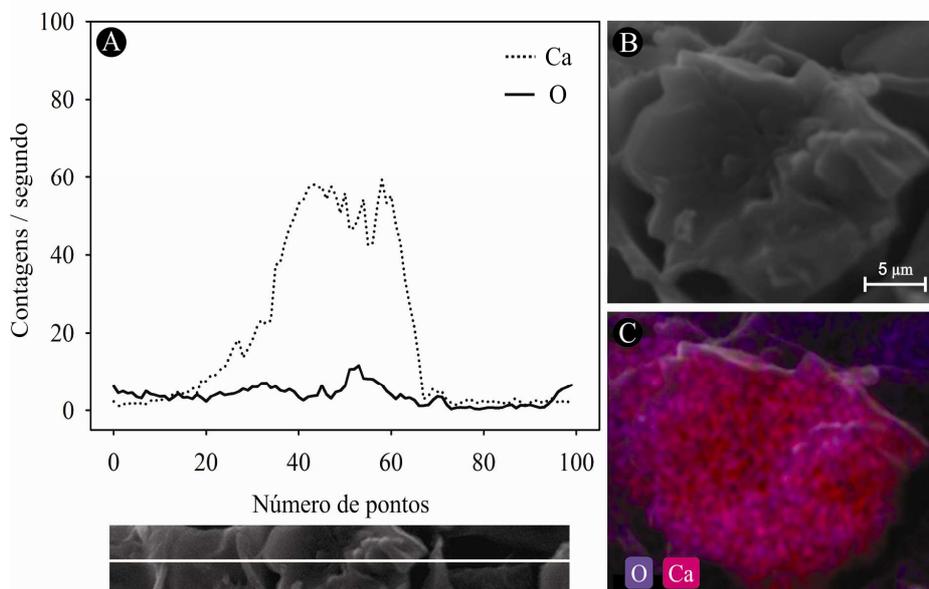


Figura 17 Eletromicrografia de varredura com sistema de microanálise de raios-X (EDS) em plantas de *S. molle* exposta a 50 μM de cádmio por um período de 90 dias. A- microanálise de raios-X em linha do cristal de oxalato, B – cristal de oxalato de cálcio, C – microanálise de raios-X por mapeamento do cristal de oxalato de cálcio.

Em algumas espécies de plantas, a tolerância a metais pesados está relacionada à utilização de ácidos orgânicos, tais como malato, citrato e oxalato. São conhecidos dois mecanismos de utilização desses ácidos, o mecanismo de exclusão e o mecanismo interno. O mecanismo de exclusão envolve a excreção

de oxalato pelas raízes, o que provoca a quelação desses metais na rizosfera. No entanto, o mecanismo interno envolve o sequestro desses metais na forma de quelato, nas partes internas da planta. Quando os metais pesados são complexados a ácidos como o oxalato, esses quelatos são transportados para o vacúolo e depositados na forma de cristais de oxalato de cálcio (FRANCESCHI; NAKATA, 2005). Dessa forma, a análise da composição de cristais de oxalato de cálcio pode ajudar a entender como as plantas podem diminuir a toxicidade de metais como o Cd (CHOI et al., 2001).

Nas folhas de *S. molle* o Cd, provavelmente, não está sendo depositado na forma de cristais, pelo menos em grandes quantidades. Isso pode ser por causa da baixa translocação do Cd (Figura, 11 A) para a parte aérea, que faz com que a concentração do Cd nas folhas permaneça baixa ($5,59 \text{ mg kg}^{-1}$ de massa seca).

5 CONCLUSÃO

- A espécie *S. molle* possui moderada tolerância às concentrações de Cd, utilizadas nesse estudo, e também a longos períodos de exposição.
- A espécie em estudo compartimentalizou nas raízes o Cd absorvido, diminuindo a translocação para a parte aérea e esse fato foi o responsável por atribuir grande parte da tolerância.
- Os sintomas de toxicidade ao Cd estão relacionados com alterações na absorção de nutrientes e modificações na fisiologia, que estão correlacionados com alterações na anatomia de folhas e raízes.
- A concentração de Cd nas folhas e caules de plantas de *S. molle* mantém-se baixa em relação a valores considerados tóxicos para plantas e esse metal não é acumulado em grandes quantidades nos vacúolos das células do mesófilo.
- *Schinus molle* pode não apresentar um bom desempenho para a fitoestabilização em locais altamente contaminados. No entanto, devido à sua moderada tolerância a esse elemento são necessários trabalhos que visem o melhoramento dessa característica e também trabalhos de campo para avaliar o potencial dessa espécie para a fitoestabilização.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, S. H. et al. Morpho-anatomical responses of *Trigonella foenum graecum* Linn. to induced cadmium and lead stress. **Journal of Plant Biology**, New York, v. 48, n. 1, p. 64-84, 2005.
- ALVES, E. **Técnicas em microscopia eletrônica**. Lavras: UFLA, 2006. 112 p.
- ARAÚJO, E. D. L.; CASTRO, C. C. D.; ALBUQUERQUE, U. P. Dynamics of Brazilian Caatinga: a review concerning the plants, environment and people. **Functional Ecosystems and Communities**, Tokyo, v. 1, n. 1, p. 15-28, 2007.
- ARAVIND, P.; PRASAD, M. N. V. Zinc protects chloroplasts and associated photochemical functions in cadmium exposed *Ceratophyllum demersum* L., a freshwater macrophyte. **Plant Science**, Shannon, v. 166, n. 5, p. 1321-1327, 2004.
- BARCELÓ, J. et al. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plants (*Phaseolus vulgaris* L. cv. Contender): I., effects of cd on water potential, relative water content, and cell wall elasticity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 125, n. 1, p. 17-25, 1986.
- BARKLEY, F. A. *Schinus* L. **Brittonia**, Bronx, v. 5, n. 2, p. 160-198, 1944.
- BHADURI, A. M.; FULEKAR, M. H. Antioxidant enzyme responses of plants to heavy metal stress. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, Cham, v. 11, n. 1, p. 55-69, 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 249, p. 81-84, 2009. Seção 1.

BROADLEY, M. et al. Function of nutrients: micronutrients. In: _____. **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. San Diego: Academic, 2012. p. 191-248.

CAKMAK, I. H.; MARSCHNER, H. Mechanism of phosphorus-induced zinc

deficiency in cotton: I., zinc deficiency-enhanced uptake rate of phosphorus.

Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 68, n. 3, p. 483-490, 1986.

CAMPOS, M. L. et al. Teores de arsênio e cádmio em solos do bioma cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 37, n. 1, p. 281-286, 2013.

CAPUANA, M. Heavy metals and woody plants: biotechnologies for phytoremediation. **Iforest-Biogeosciences and Forestry**, Bologna, v. 4, n. 27, p. 7-15, 2011.

CHOI, Y. E. et al. Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. **Planta**, Berlin, v. 213, n. 1, p. 45-50, 2001.

DELMAIL, D. et al. Physiological, anatomical and phenotypical effects of a cadmium stress in different-aged chlorophyllian organs of *Myriophyllum alterniflorum* DC (Haloragaceae). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 72, n. 2, p. 174-181, 2011.

DEMBITSKY, V. M.; REZANKA, T. Natural occurrence of arseno compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. **Plant Science**, Shannon, v. 165, n. 6, p. 1177-1192, 2003.

DEMELASH, L.; TIGABU, M.; ODEN, P. C. Enhancing germinability of *Schinus molle* L. seed lot from Ethiopia with specific gravity and IDS techniques. **New Forests**, Dordrecht, v. 26, n. 1, p. 33-41, 2003.

DIAS, N. M. P. et al. Adsorção de cádmio em dois Latossolos ácidos e um Nitossolo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 25, n. 2, p. 297-304, 2001.

DOGANLAR, Z. B. et al. Heavy metal pollution and physiological changes in the leaves of some shrub, palm and tree species in urban areas of Adana, Turkey. **Chemical Speciation and Bioavailability**, Surrey, v. 24, n. 2, p. 65-78, 2012.

DOUCHICHE, O. et al. Characteristics of cadmium tolerance in 'Hermes' flax seedlings: contribution of cell walls. **Chemosphere**, Oxford, v. 81, n. 11, p. 1430-1436, 2010.

EBBS, S.; UCHIL, S. Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard [*Brassica juncea* (L.) Czern] involves preferential loss of chlorophyll b. **Photosynthetica**, Prague, v. 46, n. 1, p. 49-55, 2008.

EVANS, J. et al. The relationship between CO₂ transfer conductance and leaf anatomy in transgenic tobacco with a reduced content of rubisco. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 21, n. 4, p. 475-495, 1994.

FARQUHAR, G. D.; CAEMMERER, S. von; BERRY, J. A. A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C3 species. **Planta**, Berlin, v. 149, n. 1, p. 78-90, 1980.

FEDER, N.; O'BRIEN, T. P. Plant microtechnique: some principles and new methods. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 55, n. 1, p. 123-142, 1968.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FRANCESCHI, V. R.; NAKATA, P. A. Calcium oxalate in plants: formation and function. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 56, p. 41-71, 2005.

GARRETT, R. G. Natural sources of metals to the environment. **Human and Ecological Risk Assessment**, New Jersey, v. 6, n. 6, p. 945-963, 2000.

GEFFARD, A. et al. Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: comparison of methods. **Chemosphere**, Oxford, v. 78, n. 7, p. 822-829, 2010.

GOMES, M. P.; MARQUES, T. C. L. L. S. M.; SOARES, A. M. Cadmium effects on mineral nutrition of the Cd-hyperaccumulator *Pfaffia glomerata*. **Biologia**, Lahore, v. 68, n. 2, p. 223-230, 2013.

GONZÁLEZ-OREJA, J. A. et al. Dendroremediation of heavy metal polluted soils. **Reviews on Environmental Health**, Research Triangle Park, v. 23, n. 3, p. 223-234, 2008.

GUIMARÃES, M. A. et al. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 2, n. 2, p. 59-60, 2008.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Elmsford, v. 53, n. 366, p. 1-11, 2002.

HASAN, S. A. et al. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 30, n. 2, p. 165-174, 2009.

HASSAN, M. J. et al. Toxic effects of cadmium on rice as affected by nitrogen fertilizer form. **Plant and Soil**, The Hague, v. 277, n. 1/2, p. 359-365, 2005.

HAWKESFORD, M. et al. Functions of macronutrients. In: _____. **Mineral nutrition of higher plants**. 3rd ed. San Diego: Academic, 2012. p. 135-189.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experiment Station**, Gainesville, v. 347, n. 1, p. 1-39, 1950.

HUNT, R. et al. A modern tool for classical plant growth analysis. **Annals of Botany**, London, v. 90, n. 4, p. 485-488, 2002.

IPONGA, D. M.; MILTON, S. J.; RICHARDSON, D. M. Superiority in competition for light: a crucial attribute defining the impact of the invasive alien tree *Schinus molle* (Anacardiaceae) in South African savanna. **Journal of Arid Environments**, London, v. 72, n. 5, p. 612-623, 2008.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

JONES, H. G. Stomatal control of photosynthesis and transpiration. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 49, p. 387-398, 1998. Special issue.

KAWANO, S. et al. A mortality study of patients with Itai-itai disease. **Environmental Research**, New York, v. 40, n. 1, p. 98-102, 1986.

KHAN, P. S. S. V. et al. Growth and net photosynthetic rates of *Eucalyptus tereticornis* Smith under photomixotrophic and various photoautotrophic micropropagation conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 71, n. 2, p. 141-146, 2002.

KRÄMER, U. Metal hyperaccumulation in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 61, p. 517-534, 2010.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1997. 198 p.

KUZOVKINA, Y. A.; KNEE, M.; QUIGLEY, M. F. Cadmium and copper uptake and translocation in five willow (*Salix L.*) species. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 6, n. 3, p. 269-287, 2004.

LAKE, J. A. et al. Plant development: signals from mature to new leaves. **Nature**, London, v. 411, n. 6834, p. 154-154, 2001.

LANDSBERG, J. J.; SANDS, P. **Physiological ecology of forest production: principles, processes and models**. New York: Academic, 2010. 352 p.

LARCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2006. 550 p.

LIM, T. K. **Schinus molle edible medicinal and non-medicinal plants**. Wageningen: Springer Netherlands, 2012. 159 p.

LONG, S. P.; BERNACCHI, C. J. Gas exchange measurements, what can they tell us about the underlying limitations to photosynthesis?: procedures and sources of error. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 392, p. 2393-2401, 2003.

LUKOVIĆ, J. et al. Quantitative assessment of effects of cadmium on the histological structure of poplar and willow leaves. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 223, n. 6, p. 2979-2993, 2012.

LUNÁČKOVÁ, L. et al. Response of fast growing woody plants from family Salicaceae to cadmium treatment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 70, n. 3, p. 576-585, 2003.

LUX, A. et al. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 21-37, 2011.

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

MCINTYRE, T. Phytoremediation of heavy metals from soils. In: _____. **Phytoremediation**. Berlin: Springer, 2003. p. 97-123.

MOHAMED, A. A. et al. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 57, n. 1, p. 15-22, Jan. 2012.

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

ORWA, C. et al. **Agroforestry database**: a tree reference and selection guide. Version 4.0. Disponível em: <<http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/>>. Acesso em: 11 ago. 2013.

PAIM, L. A. et al. Estudo dos efeitos do silício e do fósforo na redução da disponibilidade de metais pesados em área de mineração. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 28-32, jan./fev. 2006.

PÁL, M. et al. Physiological changes and defense mechanisms induced by cadmium stress in maize. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 169, n. 2, p. 239-246, 2006.

PEREIRA, F. J. et al. Mecanismos anatômicos e fisiológicos de plantas de aguapé para a tolerância à contaminação por arsênio. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 29, n. 2, p. 259-267, 2011.

PEUKE, A. D.; RENNENBERG, H. Phytoremediation. **EMBO Reports**, Oxford, v. 6, n. 6, p. 497-501, 2005.

PIERANGELI, M. A. P. et al. Adsorção e dessorção de cádmio, cobre e chumbo por amostras de Latossolos pré-tratadas com fósforo. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 377-384, mar./abr. 2004.

PILIPOVIC, A. et al. Cadmium phytoextraction potential of poplar clones (*Populus* spp.). **Zeitschrift fur Naturforschung**, Leipzig, v. 60, p. 247-251, 2005.

PRASAD, M. N. V. **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. Amsterdam: Springer, 2004. 320 p.

PRASAD, M. N. V. Phytoremediation of metal-polluted 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 hyperaccumulating plants: how and why do they do it? and what makes them so interesting? **Plant Science**, Shannon, v. 180, n. 2, p. 169-181, 2011.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 49, p. 643-668, 1998.

SANITA DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 41, n. 2, p. 105-130, 1999.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 56 p.

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, 2010.

SCHREIBER, L. et al. Apoplastic barriers in roots: chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 337, p. 1267-1280, 1999.

SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 48, n. 4, p. 523-544, 2001.

SEREGIN, I. V.; KOZHEVNIKOVA, A. D. Roles of root and shoot tissues in transport and accumulation of cadmium, lead, nickel, and strontium. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 55, n. 1, p. 1-22, 2008.

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

SILVA-LUZ, C. L.; PIRANI, J. R. **Anacardiaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB4398>>. Acesso em: 11 ago. 2013.

SOUZA, V. L. et al. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L.(Rubiaceae). **Biometals**, London, v. 24, n. 1, p. 59-71, 2011.

SRIDHAR, B. B. et al. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 54, n. 2, p. 131-141, 2005.

STOLTZ, E.; GREGER, M. Accumulation properties of As, Cd, Cu, Pb and Zn by four wetland plant species growing on submerged mine tailings. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 47, n. 3, p. 271-280, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TSAO, D. T. Overview of phytotechnologies. In: _____. **Phytoremediation**. Berlin: Springer, 2003. p. 1-50.

UTMAZIAN, S. et al. Hydroponic screening for metal resistance and accumulation of cadmium and zinc in twenty clones of willows and poplars. **Environmental Pollution**, Barking, v. 148, n. 1, p. 155-165, 2007.

VACULÍK, M. et al. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, Barking, v. 163, n. 1, p. 117-126, Feb. 2012.

WAHID, A. et al. Effects of cadmium on carbon and nitrogen assimilation in shoots of mungbean *Vigna radiata* (L.) wilczek seedlings. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 193, n. 5, p. 357-365, 2007.

WANG, H.; WANG, P. F.; ZHANG, H. Use of phosphorus to alleviate stress induced by cadmium and zinc in two submerged macrophytes. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 8, n. 10, p. 2176-2183, 2009.

WATSON, C.; PULFORD, I. D.; RIDDELL-BLACK, D. Heavy metal toxicity responses of two willow (*Salix*) varieties grown hydroponically: development of a tolerance screening test. **Environmental Geochemistry and Health**, Berlin, v. 21, n. 4, p. 359-364, 1999.

WILKINS, D. A. A technique for the measurement of lead tolerance in plants. **Nature**, London, v. 180, n. 4575, p. 37-38, 1957.