



MINA TOMAZ VILLAFORT CARVALHO

**FITOEXTRAÇÃO DE Cd E Zn E ATIVIDADE DE
ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM ECÓTIPOS DE
*Gomphrena elegans***

LAVRAS - MG

2010

MINA TOMAZ VILLAFORT CARVALHO

**FITOEXTRAÇÃO DE Cd E Zn E ATIVIDADE DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES EM ECÓTIPOS DE *Gomphrena elegans***

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

Orientador
Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

LAVRAS-MG

2010

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

Carvalho, Mina Tomaz Villafort.

Fitoextração de Cd e Zn e atividade de enzimas antioxidantes em ecótipos de *Gomphrena elegans* / Mina Tomaz Villafort Carvalho. – Lavras : UFLA, 2010.

95 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Bibliografia.

1. Elementos-traço. 2. Amarantaceae. 3. Fitorremediação. 4. Mineração. 5. Plantas hiperacumuladoras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.89

MINA TOMAZ VILLAFORT CARVALHO

**FITOEXTRAÇÃO DE Cd E Zn E ATIVIDADE DE ENZIMAS
ANTIOXIDANTES EM ECÓTIPOS DE *Gomphrena elegans***

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

APROVADA em 6 de agosto de 2010.

Dr. Antônio Chalfun Junior UFLA

Dr. Cláudio Roberto FôNSECA Sousa Soares UFSC

Dra. Cleide Aparecida de Abreu Inst. Agronômico de Campinas

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Orientador

LAVRAS – MG

2010

Ao Senhor da minha vida, Jesus Cristo,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao concluir este trabalho, agradeço ao Senhor Jesus, pelo sustento, misericórdia e infinito amor na minha vida. A Ele toda honra e toda glória.

Sou grata a minha família e aos meus pais, Wagner e Maria José, que sempre me guiaram no melhor caminho e me permitiram crescer amada. Eles me ensinaram valores que não se apreendem em salas de aula, mas são essenciais para viver. Meu irmão Iori, pelo carinho e companheirismo, um grande amigo.

Agradeço ao meu esposo, Álvaro, por estar ao meu lado em todos os momentos, pela amizade e incentivo, pelo amor e cuidado. Sem a sua ajuda eu não teria concluído essa etapa.

Também agradeço a Deus, pela oportunidade de conviver com pessoas tão especiais durante esse período.

A orientação e os ensinamentos do professor Beбето serão guardados com muito carinho. A sua capacidade e motivação me incentivam a continuar no caminho da pesquisa e ensino.

Ao professor Cláudio, o meu reconhecimento e o mérito deste trabalho. As suas ideias e conhecimentos, junto a sua disponibilidade, permitiram que cada detalhe fosse pensado e executado de maneira tranquila e eficiente.

A participação presente do professor Chalfun, desde o início da minha vida acadêmica, e os conselhos e auxílios me encorajaram a concluir essa etapa.

Quero agradecer, em especial, a Ana Luiza, que me permitiu continuar este trabalho. Sua amizade foi muito especial, dentro e fora dos estudos. Ao concluir essa etapa, Deus me presenteou com uma grande amiga.

Meus sinceros agradecimentos aos professores do DCS e de outros departamentos da UFLA, como o professor José Eduardo, que contribuiu para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Ciência do Solo, que proporcionou um ambiente para o desenvolvimento do trabalho. Agradeço, em especial, aos técnicos de laboratório João Gualberto, Roberto e Evaldo, que auxiliaram na execução das práticas deste trabalho.

Gostaria de mencionar a importância da amizade e convívio com pessoas que me ajudaram durante todo esse tempo, em especial Dani, Paulo, Cleide, Geila, Guilherme, Ênio e a todos que de alguma forma me auxiliaram.

A Cleide, membro da banca, que fez contribuições valiosas pro meio de suas sugestões.

Ao CNPq, o órgão financiador da pesquisa, provedor da bolsa de estudo, respaldando financeiramente minha pesquisa com a aprovação do projeto.

À Companhia Mineira de Metais (CMM), por ter permitido as visitas e as coletas para a realização da pesquisa.

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução geral	8
	RESUMO GERAL	9
	GENERAL ABSTRACT	10
1	INTRODUÇÃO	11
	REFERÊNCIAS	14
	CAPÍTULO 2 Potencial fitorremediador para Cd e Zn dos ecótipos de <i>Gomphrena elegans</i>	16
1	INTRODUÇÃO	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1	Caracterização do local	26
2.2	Coleta das plantas	28
2.3	Identificações da espécie	30
2.4	Análise do solo	30
2.5	Propagação	30
2.6	Condução experimental	31
2.7	Análise do cádmio e do zinco na planta	32
2.8	Cálculo do FB e IT	33
2.9	Análises estatísticas	34
3	RESULTADO E DISCUSSÃO	34
3.1	Identificação da espécie	34
3.2	Teores totais de Cd e Zn no solo	34
3.3	Produção de matéria seca	35
3.4	Concentração de Cd e Zn na planta	39
3.5	Coefficientes de bioacumulação e translocação	46
3.6	Conteúdo de Cd e Zn	50
4	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58
	CAPÍTULO 3 Atividade de enzimas antioxidantes na espécie <i>Gomphrena elegans</i> em condição de contaminação com cádmio e zinco	65
1	INTRODUÇÃO	68
2	MATERIAL E MÉTODOS	73
2.1	Obtenção das plantas	73
2.2	Propagação	73
2.3	Condução experimental	74
2.4	Análise do cádmio e do zinco	75

2.5	Análises enzimáticas	76
2.5.1	Obtenção do extrato enzimático	76
2.5.2	Determinação da atividade da SOD	77
2.5.3	Determinação da atividade da CAT	77
2.5.4	Determinação da atividade da GR	78
2.6	Análises estatísticas	78
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
3.2	Produção da matéria seca	78
3.2	Concentração e Conteúdo de Cd e Zn na planta	81
3.3	Atividade das enzimas antioxidantes	84
4	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	90

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO GERAL

As atividades humanas, como a extração e o beneficiamento de metais, têm contribuído para a poluição do ambiente com metais pesados que, atualmente, é um dos mais sérios problemas ambientais. A fitorremediação, uma técnica emergente de baixo custo que usa a habilidade de plantas em concentrar ou tolerar metais pesados, pode ser utilizada para remediar áreas contaminadas. Nestas áreas impactadas negativamente pela atividade de mineração podem ser encontradas espécies apropriadas para a fitorremediação. Este trabalho foi realizado com os objetivos de: i) avaliar o potencial fitoextrator para cádmio e zinco da espécie *Gomphrena elegans* em concentrações crescentes destes elementos em solução nutritiva e ii) investigar a atividade de enzimas antioxidantes para neutralização do efeito dos elementos cádmio e zinco na espécie *Gomphrena elegans* em concentrações crescentes destes elementos em solução nutritiva. O estudo foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade de Lavras, em Lavras, MG, Brasil. As plantas foram cultivadas em vasos com solução de Clark com concentrações crescentes e combinadas de Cd e Zn. Após o período de exposição, raízes e parte aérea foram coletadas e obtidas a matéria seca e a concentração de Cd e Zn da planta. Os resultados mostraram que essa espécie tolera e acumula altas concentrações desses elementos na sua parte aérea. Através da obtenção do extrato protéico foliar, foram avaliadas as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, catalase e glutathione redutase. As enzimas superóxido dismutase e glutathione redutase apresentaram relação direta com o incremento de metais na solução, sendo utilizadas por essa espécie como mecanismo de proteção aos efeitos negativos dos metais. Entretanto, a enzima catalase não é utilizada na via principal de neutralização da ação desses elementos na espécie *Gomphrena elegans*. Os resultados evidenciaram que *Gomphrena elegans* é uma planta hiperacumuladora de Cd e Zn, apresentando potencial para ser utilizada em programas de fitorremediação de áreas contaminadas com esses elementos.

Palavras-chave: Fitorremediação. Elementos-traço. Amarantaceae.

GENERAL ABSTRACT

Human activities such as extraction and smelter of metals, have contributed to environmental pollution with heavy metals which is currently one of the most serious environmental problems. Phytoremediation, an emerging and low-cost technology that uses plants in the ability to concentrate or tolerate heavy metals, can be used to remediate contaminated areas. In these areas impacted by mining activity, you can find species suitable for phytoremediation. Our objectives were i) evaluate cadmium and zinc phytoextraction in potential specie *Gomphrena elegans* increasing concentrations of these elements in nutrient solution, ii) to investigate the activity of antioxidant enzymes to neutralize the effect of the elements cadmium and zinc in specie *Gomphrena elegans* increasing concentrations of these elements in nutrient solution. The study was conducted in a greenhouse at the University of Lavras, Brazil. Plants were grown in pots with a solution of Clark with combined and increasing concentrations of Cd and Zn. After the exposure period, the roots and shoots were collected and obtained the dry matter and the concentration of Cd and Zn from the plant. Through the protein leaf extract antioxidant enzymes were evaluated. The results showed that the specie tolerated and accumulate high concentrations of these elements in their shoots. The enzymes superoxide dismutase and glutathione reductase showed a direct relation to the increase of metals in the solution being used by this specie as a protective mechanism for the negative effects of metals. However the enzyme catalase is not used on the main road to neutralize the action of these elements in specie *Gomphrena elegans*. The results showed that plant *Gomphrena elegans* is a hyperaccumulator of Cd and Zn, with potential to be used in phytoremediation programs in areas contaminated with these elements.

Keywords: Phytoremediation. Trace elements. Amarantaceae.

1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental com metais é, atualmente, um assunto debatido mundialmente, devido aos problemas que tem causado diretamente a humanidade. As principais fontes dessa poluição são a queima de combustíveis fósseis, a mineração e a fundição de minérios metálicos, resíduos urbanos, fertilizantes, pesticidas e esgotos (WEI; ZHOU, 2008).

As atividades mineradoras foram, são e serão sempre importantes para o desenvolvimento da humanidade. Porém podem ocasionar a deposição de elementos contaminantes na superfície do solo, destacando-se alguns denominados elementos-traço (metais pesados e metalóides) tais como cádmio (Cd), chumbo (Pb) e zinco (Zn), entre outros, os quais são importantes poluentes ambientais e tóxicos mesmo em pequenas concentrações (MEMON; SCHRODER, 2009). Nessa condição, há um risco de contaminação de todo o ecossistema, inclusive do homem, que se encontra presente na área.

Um exemplo dessa situação ocorre em Minas Gerais, já que o estado detém 92% das reservas brasileiras de Zn, sendo responsável por praticamente 100% da produção (BIGARELLI; ALVES, 1998). Uma das empresas produtoras é a Companhia Mineira de Metais (CMM), com atividades de mineração localizadas em Vazante e Paracatu, MG e processamento do minério realizado em Três Marias, MG, sendo os rejeitos depositados nessa região.

Na unidade de processamento e beneficiamento de Zn sediada em Três Marias, MG, a deposição de rejeito contaminado com diversos metais pesados se espalhou para uma área de 18 ha. Nas áreas adjacentes à indústria de processamento do minério, ocorreu a contaminação via deposição de rejeito sobre o solo, que se iniciou de modo localizado e se espalhou por processos físicos, como carregamento pela ação erosiva da chuva e movimentação programada de solo. Embora com distribuição horizontal e vertical não

homogênea, o solo apresenta níveis extremamente elevados de vários metais em formas potencialmente tóxicas, destacando-se: Zn = 18.600 mg kg⁻¹, Cd = 135 mg kg⁻¹, Cu = 596 mg kg⁻¹ e Pb = 600 mg kg⁻¹. Em áreas de deposição de rejeito industrial há a predominância de formas trocáveis de Zn e Cd, os quais oferecem maior risco ambiental, enquanto Cu e Pb encontram-se preferencialmente em forma residual (RIBEIRO FILHO et al., 2001). Portanto, os teores elevados desses elementos no solo são responsáveis pelo avançado estado de degradação da área e pela dificuldade de revegetação espontânea. Situações como estas podem gerar efeitos secundários, como o aumento de erosão do solo e o transporte de solo contaminado para os mananciais hídricos próximos à área, comprometendo a qualidade da água e a saúde humana (SOARES et al., 2002).

Buscando manter o desenvolvimento das tecnologias geradas pela atividade mineradora, diminuindo os efeitos negativos causados ao meio ambiente, são desenvolvidas estratégias para remediar tais áreas degradadas a partir de tratamentos químicos, físicos e biológicos, buscando uma futura recuperação desses locais. Dentre essas técnicas, há, atualmente, grande ênfase na fitorremediação (MEMON; SCHRODER, 2009). O termo fitorremediação tem sido aplicado a uma extensão de processos envolvidos no uso de plantas para estabilizar, extrair ou promover a degradação de poluentes no solo (SCULLION, 2006).

A descoberta de plantas com capacidade de acumular grandes quantidades de metais (hiperacumuladoras) resultou em avanços no uso de plantas na remediação de solos contaminados (BAKER; BROOKS, 1989). Entretanto, a maioria das espécies estudadas é de clima temperado, sendo escassas e necessárias as informações a respeito desta característica para espécies tropicais.

Importante fonte potencial de espécies apropriadas para a fitorremediação é a vegetação encontrada naturalmente em áreas contaminadas

(WATANABE, 1997). Um exemplo desta situação é que envolve a espécie *Gomphrena elegans* (primeiramente identificado como *Pfaffia* sp.), encontrada em área de mineração de calamina (minério de Zn), conhecida vulgarmente por calaminaceae, a qual se se mostrou bem adaptada às condições de multicontaminação por Zn, Cu, Cd e Pb, em relação a outras espécies estudadas (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002).

Estudos com esse enfoque são escassos nas condições brasileiras, onde a contaminação do solo e a existência de áreas degradadas pelo excesso de metais são cada vez mais numerosas. Portanto, o conhecimento do comportamento de espécies herbáceas com potencial para fitorremediação dessas áreas se reveste de maior importância (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002).

Além da identificação das espécies, é necessários um melhor conhecimento e entendimento dos mecanismos de absorção, transporte e acúmulo dos metais nas plantas, o que implica em melhor desempenho da técnica de fitorremediação. Esses conhecimentos podem ser aplicados por meio da engenharia genética, com a introdução de genes específicos das plantas hiperacumuladoras em espécies de crescimento mais rápido e maior biomassa, já que essas características são importantes no processo de fitorremediação (MEMON; SCHODER, 2009).

Diante desse conhecimento, destaca-se a importância de estudos para a identificação de espécies hiperacumuladoras que se adaptem às áreas contaminadas encontradas em regiões tropicais, assim como seus mecanismos fisiológicos relacionados à acumulação dos elementos-traço.

REFERÊNCIAS

BAKER, A. M. J.; BROOKS, R. R. Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements: a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, Great Britain, v. 1, n. 2, p. 81-126, 1989.

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

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1629-1638, nov. 2002.

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

RIBEIRO FILHO, M. R. et al. Fracionamento e biodisponibilidade de metais pesados em solo contaminado, incubado com materiais orgânicos e inorgânicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 2, p. 495-507, 2001.

SCULLION, J. **Review remediation polluted soils**. [S.l.]: Springer-Verlag, 2006. Disponível em:
<<http://www.springerlink.com/content/f334x20112133313/>>. Acesso em: 09 fev. 2008.

SOARES, C. R. F. S. et al. **Diagnóstico e reabilitação de área degradada pela contaminação por metais pesados**. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE RECUPERAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS, 5., 2002, Belo Horizonte. **Palestras...** Lavras: SOBRADE, 2002. v. 1, p. 56-82.

WATANABE, M. E. Phytoremediation on the brink of commercialization. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 31, p. 182A-186A, 1997.

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

CAPÍTULO 2

**POTENCIAL FITORREMEDIADOR PARA Cd e Zn DOS ECÓTIPOS
DE *Gomphrena elegans***

RESUMO

A poluição ambiental, como resultado das atividades humanas, tem se tornado um dos mais sérios problemas mundiais atualmente. A atividade mineradora e de beneficiamento dos metais pode resultar na exposição a concentrações elevadas de metais pesados, colocando essa atividade como uma das mais relevantes com relação aos potenciais impactos negativos decorrentes da contaminação ambiental. A fitorremediação possui mecanismos promissores para remediar áreas contaminadas por essas atividades. O primeiro passo para implementação dessa técnica é o estudo de espécies com potencial fitoestabilizador ou fitoextrator dos metais presentes na área. Este trabalho objetivou avaliar a capacidade da espécie *Gomphrena elegans* em tolerar e acumular os elementos Zn e Cd em condições de contaminação crescente e múltipla. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial, sendo os tratamentos constituídos da combinação de sete ecótipos da espécie *Gomphrena elegans* e quatro doses crescentes combinadas de Zn+Cd (9,14; 91,4; 914 e 9.140 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na relação Zn/Cd = 64,3) com quatro repetições. Após 30 dias, as plantas foram colhidas e a produção de matéria seca da parte aérea e raízes, assim como as concentrações de Zn e Cd foram mensuradas. Os resultados mostraram que o aumento das concentrações na solução nutritiva afetou a produção de matéria seca significativamente e de maneira distinta entre os ecótipos. O aumento das concentrações de Zn/Cd testadas proporcionou um maior teor e acúmulo desses elementos na parte aérea. A proporção da concentração de Zn e Cd da parte aérea pela concentração disponível foi maior que 1 em todos os tratamentos. Já o índice de translocação para parte aérea foi no máximo de 87,43% no ecótipo 5B. O teor de Zn foi maior que 7.000 mg kg^{-1} e o de Cd maior que 200 mg kg^{-1} na parte aérea de todos os ecótipos de *Gomphrena elegans*. Essa espécie pode ser considerada como hiperacumuladora de Zn e Cd e possui elevado potencial em programas de fitorremediação de áreas contaminadas com esse elemento.

Palavras-chave: Fitorremediação. Elementos-traço. Amarantaceae.

ABSTRACT

Environmental pollution as a result of human activities has become one of the most serious global problems nowadays. Mining and beneficiation of metals might result in exposure to high concentrations of heavy metals, which makes such activities relevant in terms of environmental contamination. Phytoremediation has promising mechanisms to remediate areas contaminated by these activities. The first step to implementing this technique is the study of species presenting a potential for phytostabilization and phytoextraction of metals in the area. This study evaluated the ability of the species *Gomphrena elegans* to tolerate and accumulate the elements Zn and Cd under conditions of increasing and multiple contamination. The experiment was conducted in a randomized factorial design, and the treatments consisted of combinations of seven ecotypes of the species *Gomphrena elegans* and four increasing combined doses of Zn+Cd (9.14, 91.4, 914 and 9140 mmol L⁻¹, with a Zn/Cd ratio of 64.3) with four replicates. After 30 days, the plants were harvested and shoots and roots dry matter production, as well as concentrations of Zn and Cd were measured. The results showed that increasing Zn+Cd concentrations in the nutrient solution affected the dry matter production significantly and differently among ecotypes. Increasing concentrations of Zn/Cd provided greater content and accumulation of these elements in the shoot. The ratio of Zn and Cd shoot concentration over the available concentration was greater than 1 in all treatments. Nevertheless, the rate of translocation to shoots was at a maximum of 87.43% in ecotype 5B. The zinc content was greater than 7000 mg kg⁻¹ and that of Cd was greater than 200 mg kg⁻¹ in shoots of all *Gomphrena elegans* ecotypes. This species can be considered as a Zn and Cd hyperaccumulator, and has high potential in phytoremediation programs in areas contaminated with these elements.

Keywords: Phytoremediation. Trace elements. Amarantaceae.

1 INTRODUÇÃO

A introdução de qualquer tipo de elemento, composto ou energia no meio ambiente, em níveis que alterem o funcionamento do mesmo ou que resulte em algum tipo de risco à sociedade ou ao ecossistema, é considerado como poluição (SCOLLUION, 2006).

Desde a Revolução Industrial, toneladas de rejeitos inorgânicos e orgânicos vêm sendo produzidas por meio de atividades como a mineração, a queima de combustíveis fósseis, a indústria metalúrgica e a aplicação de produtos agrícolas, como fertilizantes e pesticidas (WU et al., 2010).

As atividades de extração e beneficiamento de metais promovem uma contaminação constante do ambiente, levando à população que reside próximo à região diferentes níveis de exposição aos metais pesados. Diferentemente dos poluentes orgânicos, os metais pesados não são degradados por meio de processos químicos ou biológicos. Essa característica leva à permanência desses elementos dentro do ecossistema, podendo ser eventualmente acumulados nos seres humanos por meio da bioacumulação, durante a cadeia alimentar (PUERTAS-MEJÍA; RUIZ-DÍEZ; FERNÁNDEZ-PASCUAL, 2010).

Dentre os diferentes compartimentos da biosfera, no solo, ao contrário do ar e da água, existe maior permanência dos metais pesados, o que justifica uma maior preocupação com a poluição causada por esses elementos neste compartimento biológico (LASAT, 2002).

Com a continuação do desenvolvimento e do crescimento populacional, tornam-se imprescindíveis a remediação e a recuperação das áreas contaminadas por metais. Atualmente, tem sido proposta a existência de quatro categorias de métodos remediadores: a remediação química e física; a remediação por meio de animais, como minhocas; a fitorremediação com o uso de plantas e a microrremediação por meio de microrganismos (WU et al., 2010).

Tratamentos químicos e físicos, como remoção, lavagem do solo e estabilização física, comparados aos métodos de remediação biológicos, apresentam desvantagens por afetar as propriedades dos solos de maneira irreversível e destruir a biodiversidade do ambiente em que são adotados. Além disso, o custo dessas técnicas pode ser entre 4 a 100 vezes maior que o dos tratamentos biológicos (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007).

A fitorremediação tem sido enfatizada entre as técnicas bioremediadoras dentro das pesquisas em remediação de áreas contaminadas com elementos-traço devido à sua maior eficiência e sustentabilidade. De acordo com Memon e Schoder (2009), a fitorremediação é uma técnica emergente para descontaminação ambiental, sendo definida pelo uso de plantas e sua microbiota associada para extrair, sequestrar e ou desintoxicar, a partir da água, sedimentos, solo e ar, vários tipos de ambiente poluídos com substâncias orgânicas e inorgânicas. Essa definição se enquadra também no recente conceito de fitotecnologia, o qual abrange, além da fitorremediação, a contenção dos contaminantes nas áreas poluídas (INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY COUNCIL – ITRC, 2009).

Por gerar o mínimo de perturbação ao ambiente, a fitorremediação se caracteriza como uma técnica ambientalmente correta, uma vez que, em vez de simplesmente mover a poluição para um local diferente, a reabilitação é realizada *in situ* (HENRY, 2000; SALT; SMITH; RASKIN, 1998). Outras vantagens dessa técnica são proteção contra a erosão do solo que pode ser tanto eólica como hídrica, melhorias na estrutura do solo e do aumento da sua fertilidade, contenção da lixiviação e possível contaminação do lençol freático, assim como recuperação da estética das áreas contaminadas (RASKIN; ENSLEY, 2000).

A fitorremediação é estudada em vários países e a indústria mundial de fitorremediação já abrange dezenas de empresas. Um exemplo desse

crescimento é o investimento dos Estados Unidos na remediação, da ordem de 7 a 8 bilhões de dólares ao ano, sendo 35% desse valor gastos com a remediação de metais (MEMON; SCHRODER, 2009).

Entretanto, no Brasil, esta técnica ainda não é explorada, por razões como desconhecimento do mercado, falta de capacitação técnica (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000) e pelo fato de serem as espécies de plantas hiperacumuladoras conhecidas, em sua maioria, de clima temperado (BAKER; BROOKS, 1989).

Existem diferentes mecanismos dentro da fitorremediação e, para a escolha da estratégia adequada a ser implementada, é preciso considerar as condições do local contaminado, as características do elemento contaminante, os níveis de contaminação e a vegetação presente na área (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007). Os mecanismos fitorremediadores são classificados conforme o destino dado aos contaminantes que podem ser contidos (fitoimobilização), estabilizados (fitoestabilização), degradados (fitodegradação e rizodredação), volatilizados (fitovolatilização) ou extraídos (fitoextração) (CUNINGHAM; BERTI, 1993).

Para a recuperação de áreas contaminadas com elementos-traço, as estratégias mais indicadas são a fitoestabilização e a fitoextração. A fitoestabilização consiste na imobilização dos metais pela planta sem a sua posterior colheita. Esse mecanismo é aplicado em regiões onde o solo possui contaminação elevada e apenas plantas tolerantes são capazes de se estabelecer. As espécies tolerantes geralmente têm raízes com grande biomassa, capazes de adsorver, precipitar ou absorver e acumular os elementos-traço sem os translocar para a parte aérea. Apesar de os contaminantes não serem removidos do local, a fitoestabilização permite a redução do risco de erosão e a lixiviação dos poluentes, evitando a contaminação dos lençóis freáticos, além de reduzir o risco

da entrada dos metais pesados na cadeia alimentar, evitando possíveis contaminações ao homem e ao meio ambiente (ZHAO; MCGRANTH, 2009).

A fitoextração, também conhecida como fitoacumulação, ocorre quando as plantas absorvem os metais presentes no solo e os translocam para a parte aérea, onde os mesmos são acumulados (CUNINGHAM; BERTI, 1993; SANTOS; AMARAL SOBRINHO; MAZUR, 2006). O potencial de fitoextração depende da interação entre solo, metal, planta e microrganismos do solo (LASAT, 2002). De acordo com Zhao e McGranth (2009), a fitoextração de metais é, provavelmente, o maior desafio a ser vencido dentro da técnica de fitorremediação. Isso se deve ao número restrito de espécies que possuem mecanismos adequados para a fitoextração, já que uma espécie ideal precisa tolerar e acumular altas concentrações do elemento-traço na parte aérea e, ainda, possuir alta taxa de crescimento, elevada produção de biomassa e um sistema radicular abundante (GARBUSU; ALKORTA, 2001; VASSILEV; VANGRONSVELD; YORDANOV, 2002).

Ao final do ciclo do vegetal, é possível, por meio da colheita da planta, retirar o metal que foi translocado da raiz para parte aérea. Durante muitos anos, foi questionado qual o destino seria aplicado ao material após a colheita. Entretanto, muitos trabalhos recentes têm sugerido diferentes alternativas, como a reciclagem e a recuperação do metal, assim como a utilização da biomassa como biocombustível para a geração de energia (LIEVENS et al., 2008; SCHRÖDER et al., 2008).

O desenvolvimento da tecnologia fitorremediadora só é possível uma vez que algumas espécies vegetais adquiriram, durante o seu processo evolutivo, a capacidade de tolerar ou, até mesmo, absorver e acumular elementos não essenciais, que não têm função biológica, ou metais essenciais que se encontram em concentrações de toxidez no ambiente (CLEMENS, 2006). Em relação à absorção de metais, Baker (1981) classifica as plantas em: i) excludentes: cuja

concentração é mantida em nível constante até que se atinja um valor crítico no solo, no qual esse mecanismo é quebrado, resultando na não restrição ao transporte do metal; ii) indicadoras: nas quais a absorção e o transporte de metais são regulados, sendo que a concentração interna reflete o nível externo e iii) acumuladoras: nas quais há acumulação de metais nas partes da planta em baixo ou alto nível de metais no solo.

Aproximadamente 450 espécies de plantas superiores são identificadas como hiperacumuladoras de metais (MAESTRI et al., 2010), sendo um mecanismo restrito entre as inúmeras espécies vegetais encontradas. As características estabelecidas para definir uma espécie como hiperacumuladora têm sido questionadas. O parâmetro mais utilizado nos trabalhos foi estabelecido por Baker e Brooks (1989) e Baker et al. (1994) e define como hiperacumuladora a espécie que tem a habilidade de absorver e reter na parte aérea (caule e folhas), no mínimo, as seguintes concentrações: 10 mg kg⁻¹ para Hg, 100 mg kg⁻¹ para Cd e As, 1.000 mg kg⁻¹ para Co, Cr, Cu e Pb e 10.000 mg kg⁻¹ para Zn e Ni.

Entretanto, de acordo com Baker e Whiting (2002), os valores prévios foram sugeridos apenas como um guia de direcionamento e não como valores absolutos. Uma espécie capaz, por exemplo, de absorver altas concentrações de Zn na parte aérea (e.g. >1000 mg kg⁻¹), mas que não alcançou a taxa de 10.000 mg kg⁻¹, pode ser considerada hiperacumuladora, de acordo com o autor. Da mesma maneira, nem sempre espécies que apresentaram concentração acima de 10.000 mg kg⁻¹ de Zn serão, apenas por esse parâmetro, hiperacumuladoras. É necessário observar outras características, como a capacidade da espécie de tolerar altas concentrações biodisponíveis do metal, acumular na parte aérea concentrações superiores comparadas a outras espécie/genótipos e, preferencialmente, translocar o metal para a parte aérea (BAKER, 1981). Para Cd e Zn, os teores encontrados na parte aérea da maioria das plantas, em

condições normais, variam entre 0,03-2 e 10-150 mg kg⁻¹, respectivamente (MAESTRI et al., 2010; PADMAVATHIAMMA; LI, 2007). Reeves e Baker (2000) consideram níveis próximos a 3.000 mg kg⁻¹ como suficientes para considerar uma espécie hiperacumuladora de Zn.

Outros parâmetros capazes de auxiliar na definição de uma espécie como hiperacumuladora são o fator de acumulação (concentração do metal na parte aérea/concentração no solo) e o fator de translocação (concentração do metal na parte aérea/concentração na raiz). Quando esses parâmetros apresentam valores maiores que 1, há uma indicação da elevada taxa de absorção do elemento e sua preferência em se acumular na parte aérea (BAKER; WHITING, 2002; MCGRATH; ZHAO, 2003).

De acordo com Franco-Hernández et al. (2010), quatro critérios devem ser considerados para a identificação de espécies capazes de acumular grandes quantidades de metal. Primeiro, a elevada concentração do elemento na parte aérea. Segundo, essas concentrações devem ser de 10 a 500 vezes superiores às concentrações normalmente encontradas nas plantas. Terceiro, a concentração deve ser, preferencialmente, maior na parte aérea do que na raiz. Quarto, a concentração do elemento na parte aérea deve ser maior do que aquela presente no meio.

As principais espécies utilizadas como modelo para hiperacumulação de Cd e Zn são *Thlaspi caerulescens* e *Arabidopsis halleri*, ambas com hábitat em clima temperado, encontradas, principalmente, no continente europeu (BAKER; WHITING, 2002).

A primeira planta nativa hiperacumuladora citada na literatura brasileira como sendo de ecossistema tropical é a espécie *Gomprena elegans*, da família Amarantaceae, que foi primeiramente identificada como pertencente do gênero *Pfaffia*, que sobreviveu em uma condição de multicontaminação com Cd, Zn, Cu e Pb e acumulou concentrações elevadas de Cd na sua parte aérea (CARNEIRO;

SIQUEIRA; MOREIRA, 2002). Santos (2008) também identificou uma planta nativa, do cerrado brasileiro, capaz de absorver Cd e que se mostrou promissora para a absorção de outros tipos de metais pesados. Trata-se da *Galianthe grandifolia* - Rubiaceae, uma herbácea da família do café, encontrada de forma abundante em áreas de cerrado do estado de São Paulo, mais precisamente na cidade de Itirapina.

Estudos envolvendo fitorremediação podem ser realizados em solos ou em solução nutritiva por meio do cultivo hidropônico (ZABŁUDOWSKA et al., 2009). Apesar de o solo representar as condições encontradas na prática, devido à complexidade das suas características, os estudos em solução nutritiva são preferidos, sendo essenciais na determinação do acúmulo e da translocação do metal pela planta (BAKER; WHITING, 2002). Entretanto, respostas encontradas em solução nutritiva nem sempre são semelhantes quando passam a ser estudadas no solo (ZABŁUDOWSKA et al., 2009). Portanto, as concentrações biodisponíveis no solo devem ser previamente definidas para que as respostas obtidas por meio do estudo com hidroponia possam representar os estudos na área contaminada.

As respostas encontradas na presença de altas doses de metal variam entre espécies distintas e, até mesmo, entre ecótipos ou populações diferentes. Lombi et al. (2001), estudando dois ecótipos, Ganges e Prayon, da espécie *Thlaspi caerulescens*, encontraram diferentes respostas na absorção de Cd e Zn entre eles. Macnair (2002) também encontrou diferentes resultados na absorção de Zn entre populações de *Arabidopsis halleri*.

Diante da importância da fitoextração como técnica remediadora para áreas contaminadas por elementos-traço, é fundamental o desenvolvimento de estudos que estabeleçam a capacidade da tolerância e do acúmulo de espécies de clima tropical, buscando o cultivo de hiperacumuladoras nas áreas contaminadas no Brasil. Acredita-se que a espécie *Gomphrena elegans*, comumente

encontrada em área de mineração de zinco, possa ser utilizada em programas de fitorremediação de solos contaminados com Cd e Zn. Neste contexto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a capacidade fitoextratora de diferentes ecótipos da espécie *Gomphrena elegans* crescidas em solução nutritiva, com concentrações crescentes e combinadas dos elementos Cd e Zn.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Caracterização do local

A área onde as plantas foram coletadas localiza-se nas serras do Poço Verde e do Sucuri, entorno de uma região de mineração de zinco na cidade de Vazante, no noroeste de Minas Gerais (Figuras 1 e 2). O clima é considerado tropical semiúmido e a média de temperatura anual varia de 21° a 24°C, sendo, nos meses mais quentes, de 21° a 26°C e, nos meses mais frios, de 17° a 22°C. A umidade relativa, no verão, oscila entre 75% e 80% e, no inverno, entre 50% e 60%

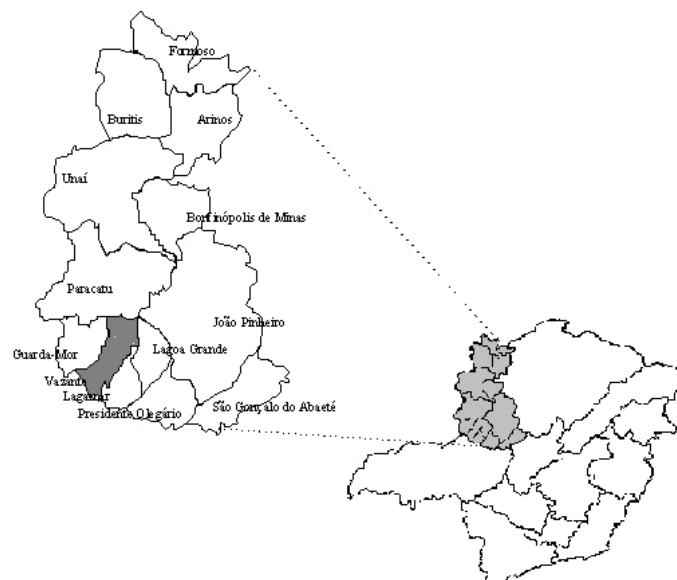


Figura 1 Mapa de Minas Gerais, com destaque para a região noroeste do estado, onde se encontra o município de Vazante



Figura 2 Localização da área de estudo em unidade de mineração de zinco em Vazante, MG. A.M.= área de mineração e A.U.= área urbana

2.2 Coleta das plantas

As plantas foram coletadas na área descrita anteriormente, uma vez que essas se encontravam estabelecidas e adaptadas às condições edafoclimáticas locais, principalmente no que diz respeito aos altos teores de metais pesados comumente encontrados em áreas de mineração. As plantas e as amostras de solo foram coletadas, em dezembro de 2007, em cinco locais diferentes, conforme se observa na Figura 3. Oito plantas foram coletadas e identificadas como 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 4A, 5A e 5B, conforme a posição do local de coleta. As plantas foram coletadas com o auxílio de enxadão, tomando-se o cuidado de manter o torrão de solo, visando à manutenção do sistema radicular (Figura 4). Imediatamente após a coleta, as plantas foram acondicionadas em sacos plásticos.

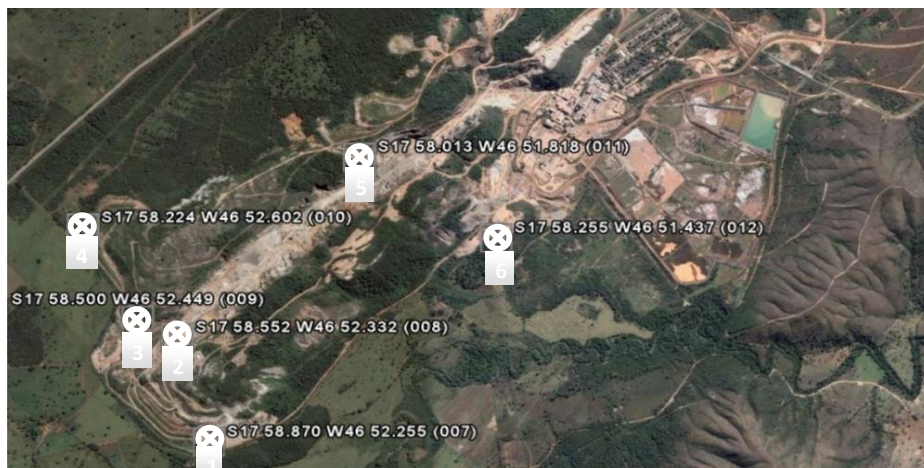


Figura 3 Locais de coleta de plantas e solo (1, 2, 3, 4 e 5) e sementes (6), em área de mineração de zinco, em Vazante, MG



Figura 4 Detalhes das coletas de plantas em diferentes locais em área de mineração de zinco, em Vazante, MG

2.3 Identificações da espécie

Foram encaminhadas exsicatas dos diferentes ecótipos para o professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira, da Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro e para a professora Dra. Maria Salete Marchioretto, pesquisadora da Universidade do Vale do Rio dos Sinos, especialistas no estudo da família Amarantaceae. Também foi enviado um exemplar à pesquisadora Maria Raquel Cota, da Universidade de Brasília, para a identificação.

2.4 Análise do solo

O solo coletado foi digerido segundo o método 3051 da United States Environmental Protection Agency – USEPA (1995) e os teores de Cd e Zn foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800® com atomizador tipo chama. O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd e nutrientes foram assegurados pelo uso de material de referência NAPT (*Orange Burg*) em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 74% a 122%.

2.5 Propagação

Visando à manutenção das características genéticas de cada uma das plantas coletadas, a multiplicação do material foi realizada, por meio da técnica de micropropagação, no Laboratório de Cultura de Tecidos, Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras. Após a coleta, as plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação, tendo sobrevivido sete das oito plantas coletadas. Para a propagação, foram utilizadas como explantes gemas

vegetativas novas apicais e laterais. O processo de assepsia foi de 10 minutos em água corrente, seguido por imersão sob agitação em hipoclorito de sódio (40%) e Tween-20, durante 15 minutos. Ao final, foram realizados 5 enxágues com água destilada autoclavada, dentro de um fluxo laminar. Os explantes foram inoculadas em frascos de 25 x 150 mm contendo 12 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962), com 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, autoclavado durante 20 minutos (1 atm, 120°C). Os frascos foram mantidos durante 40 dias em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. A aclimatização das plântulas foi realizada em bandejas de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax, por um período de duas semanas.

2.6 Condução experimental

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

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 7 x 4, sendo 7 ecótipos (1A, 1B, 2A, 2B, 4A, 5A, E 5B) e 4 concentrações crescentes de Zn/Cd. Como na área estudada existe a presença de uma contaminação múltipla, as concentrações estabelecidas seguiram uma razão Zn/Cd, em molaridade, de 64,3. Essa razão foi determinada em soluções de solo extraídas em áreas contaminadas situadas no entorno da empresa de beneficiamento de Zn. As doses foram 9,14 μmol (9,0 Zn e 0,14 Cd); 91,4 μmol (90 Zn e 1,4 Cd); 914 μmol (900 Zn e 14 Cd) e 9.140 μmol (9000 Zn e 140 Cd). As fontes dos sais foram ZnSO_4 e CdSO_4 . Os tratamentos resultaram da combinação das quatro doses com os sete ecótipos sendo um total de 32 tratamentos com três repetições, totalizando 96 parcelas. Os vasos utilizados apresentavam capacidade de 1,7 L e continham uma única planta.

As plantas foram mantidas, por um período de 30 dias, em exposição às doses de Cd e Zn, período no qual foi observada a ocorrência de eventuais sintomas de toxidez e os efeitos no crescimento das plantas. Ao final do experimento, as plantas foram colhidas e parte aérea (folha e caule) e raízes foram separadas. A parte aérea foi lavada em água deionizada e as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico 10% (v/v) por um minuto e, em seguida, enxaguadas em água deionizada. A seguir, ambas as partes foram secas em estufa em temperatura entre 65° e 75°C, até atingir massa constante. O peso da matéria seca foi determinado em balança de precisão (0,01 g) e, em seguida, a matéria seca foi moída em moinho tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm, para ser analisada quimicamente.

2.7 Análise do cádmio e do zinco na planta

O material moído foi digerido segundo o método 3051 da United States Environmental Protection Agency – USEPA (1995), utilizando-se de 0,5 g de

material em 10 mL de HNO₃ concentrado, em forno de micro-ondas, com tubos de Teflon® PTFE, à pressão 0,76 MPa, por dez minutos. A temperatura alcançada à pressão de 0,76 MPa é de, aproximadamente, 175°C. Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado até 20 mL com água destilada. A partir dos extratos, foram determinados os teores de cádmio e zinco por espectrofotometria de absorção atômica, usando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800® com atomizador tipo forno de grafite e, para os teores mais elevados (>1,0 mg L⁻¹), por meio da espectrofotometria de absorção atômica com atomizador tipo chama.

O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd e Zn foram assegurados pelo uso de material de referência BCR Lichen proveniente do Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM) em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 75% a 93% para Cd e de 70% a 73% para Zn.

O acúmulo de Cd e Zn por planta foi calculado por meio da multiplicação da matéria seca produzida na parte aérea pela concentração do elemento no tecido vegetal.

2.8 Cálculo do FB e IT

As habilidades de absorção e translocação de Cd e Zn pelas plantas foram mensuradas por meio dos fatores de bioacumulação (FB) e do índice de translocação (IT), que são definidos como a concentração do elemento na planta em relação à concentração do elemento no solo e a quantidade do elemento na parte aérea em relação à quantidade total do elemento na planta em porcentagem, respectivamente. Como o experimento foi realizado em solução

nutritiva, utilizaram-se, para os cálculos, as concentrações dos elementos presentes em solução (BAKER; BROOKS, 1989; WANG et al., 2007).

$$FB = [\text{Cd}]_{\text{parte aérea}} / [\text{Cd}]_{\text{solução}} \text{ e } [\text{Cd}]_{\text{raiz}} / [\text{Cd}]_{\text{solução}}$$

$$IT = [\text{Cd}]_{\text{parte aérea}} / ([\text{Cd}]_{\text{parte aérea}} + [\text{Cd}]_{\text{raízes}}) \times 100$$

2.9 Análises estatísticas

Os resultados da produção de matéria seca e as concentrações de Cd e Zn na parte aérea e raízes foram submetidos à análise de variância, por meio do uso do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003). As equações de regressão foram determinadas pelo melhor ajuste, por meio do programa Table Curve 2D for Windows v. 5.01 (SYSTAT Software Inc),

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Identificação da espécie

As exsiccatas das plantas encaminhadas para os especialistas foram classificadas como pertencentes à família Amaranthacea, gênero *Gomphrena* espécie *Gomphrena elegans*. Diante desse resultado, as diferentes plantas coletadas foram identificadas, no presente trabalho, como ecótipos dessa espécie, uma vez que elas apresentaram diferentes resultados com relação à capacidade fitoextratora dos elementos Cd e Zn.

3.2 Teores totais de Cd e Zn no solo

Os valores encontrados para os elementos Cd e Zn nas análises das amostras de solos, na profundidade de 0 a 20 cm, das áreas onde foram coletadas

as plantas, indicaram riscos potenciais de contaminação, conforme os padrões estabelecidos pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2009) (Tabela 1). Os valores para concentração de Cd e Zn no solo (mg kg^{-1}) sugeridos por esse órgão como padrões acima dos quais existem riscos, diretos ou indiretos, à saúde humana e ao meio ambiente são: área agrícola = Cd 3 e Zn 450; área residencial = Cd 8 e Zn 1.000 e área industrial = Cd 20 e Zn 2.000.

Tabela 1 Teores de Cd e Zn (mg kg^{-1}) em amostras de solo (0-20 cm) dos locais de coleta das plantas de *Gomphrena elegans*

	Teor total	
	Cd	Zn
Média	60,7	6.592
Mediana	1,9	135
Máximo	2.443	21.304
Mínimo	< LD	23

*LD = limite de detecção; Cd – USEPA 3051

3.3 Produção de matéria seca

Os resultados da produção de matéria seca foram influenciados tanto pelos ecótipos como pelas doses, tendo apenas o ecótipo 5B apresentado significativamente os maiores resultados para matéria seca da parte aérea, da raiz e total, nas quatro doses estudadas (Tabela 2).

Tabela 2 Matéria seca (gramas) de 7 ecótipos de *Gomphrena elegans* em 4 doses crescentes de metais (Zn e Cd)*

Ecótipos		Concentração Zn + Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$)			
		9,14 (9+0,14)	91,4 (90 +1,4)	914 (900+14)	9140 (9000+140)
Parte aérea	1A	9,03 Ab	7,53 Ab	8,75 Aa	5,69 Ba
	1B	7,53 Ab	6,07 Ac	4,80 Bb	4,49 Bb
	2A	9,95 Aa	8,46 Aa	8,36 Aa	4,13 Bb
	2B	9,53 Aa	9,83 Aa	8,33 Aa	3,97 Bb
	4A	8,26 Ab	7,99 Ab	6,87 Aa	3,67 Bb
	5A	11,04 Aa	9,24 Ba	7,91 Ca	7,09 Ca
	5B	10,03 Aa	9,62 Aa	8,55 Ba	7,13 Ba
Raiz	1A	2,21 Ab	2,05 Ab	2,41 Aa	0,99 Ba
	1B	2,63 Aa	2,23 Ab	1,37 Bb	0,82 Ca
	2A	2,94 Aa	2,08 Bb	2,42 Ba	0,63 Ca
	2B	2,39 Ab	2,64 Aa	2,22 Aa	0,57 Ba
	4A	2,44 Ab	2,07 Ab	2,13 Aa	0,89 Ba
	5A	1,76 Bc	2,39 Ab	2,50 Aa	0,97 Ca
	5B	3,04 Aa	2,83 Aa	2,33 Ba	0,67 Ca
Total	1A	11,24 Ab	9,58 Ba	11,16 Aa	6,68 Ca
	1B	10,16 Ab	8,30 Bb	6,17 Cb	5,32 Cb
	2A	12,89 Aa	10,54 Ba	10,78 Ba	4,76 Cb
	2B	11,91 Aa	12,47 Aa	10,55 Ba	4,55 Cb
	4A	10,71 Ab	10,06 Aa	9,00 Aa	4,56 Bb
	5A	12,80 Aa	11,62 Aa	10,42 Ba	8,06 Ca
	5B	13,07 Aa	12,46 Aa	10,88 Ba	7,79 Ca

*razão molar Zn/Cd igual a 64,3.

** valores seguidos da mesma letra na minúscula (a) na mesma coluna ou (A) na mesma linha não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

Em todos os sete ecótipos de *Gomphrena elegans* houve um decréscimo na matéria seca relativa à primeira dose. Na dose 4, os ecótipos 1A, 5A e 5B apresentaram redução de apenas 40% na produção de matéria seca, obtendo os melhores resultados entre os ecótipos (Gráfico 1).

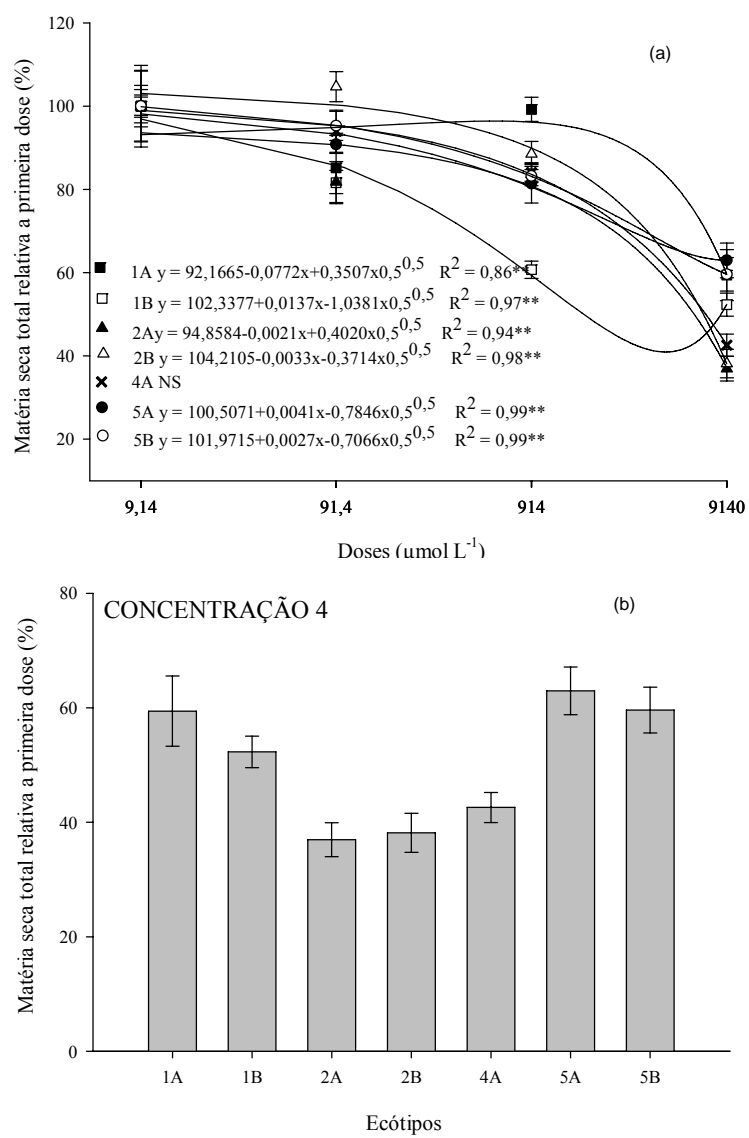


Gráfico 1 Matéria seca dos ecótipos, relativa à menor dose (a) e matéria seca relativa dos 7 ecótipos na dose 4 (b)

Em todos os ecótipos estudados não foram encontrados sintomas de toxidez ou deficiência nutricional nas três primeiras doses combinadas de Zn e Cd. Entretanto, na maior dose, os ecótipos apresentaram sintomas de clorose nas folhas mais novas e distúrbio no balanço hídrico da planta (murchamento) (Figura 5). Esses sintomas podem ser explicados pela absorção do Cd através dos transportadores de Fe e Zn, o que leva à deficiência desses outros elementos (CLEMENS, 2006). Em outros trabalhos nos quais se estudou o efeito das doses crescentes de Cd e Zn também foram encontrados sintomas de toxidez semelhante (BROWN, 1995; SOARES et al., 2005).

Os valores da produção de matéria seca encontrados para a espécie *Gomphrena elegans* foram elevados quando comparados com os resultados das espécies *Thlaspi caerulescens* e *Arabidopsis halleri*, principais hiperacumuladoras de Cd e Zn. Cosio, Martinoia e Keller (2004) não encontraram valores maiores que 3 g na parte aérea dessas espécies, quando expostas à concentração de até $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd e $500 \mu\text{mol}^{-1}$ de Zn em solução nutritiva, durante 12 semanas, em condições semelhantes às deste trabalho.

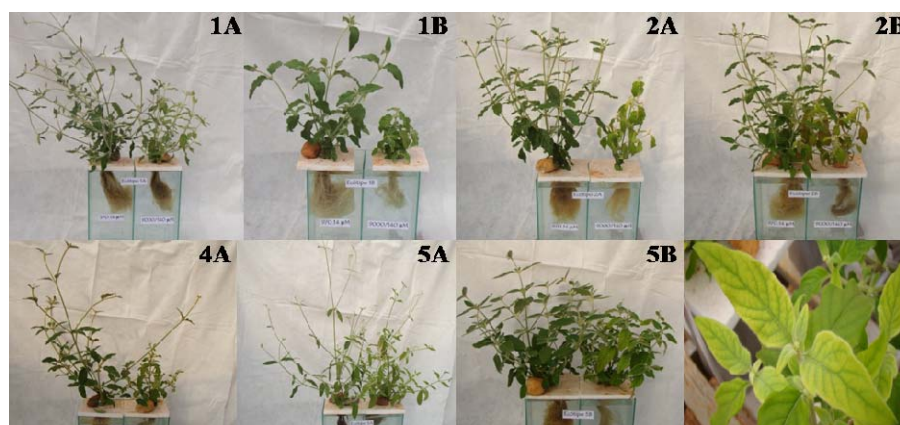


Figura 5 Crescimento da parte aérea e raízes dos 7 ecótipos de *Gomphrena elegans* em solução nutritiva controle (a esquerda) e $9.140 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn/Cd (à direita). Última foto à direita, detalhe do sintoma de clorose nas folhas. Foto obtida no 42º dia após exposição aos

Brown et al. (1995), estudando a espécie *T. caerulescens*, em doses combinadas de Zn/Cd que variaram de 3,16/0,063 a 10.000/200 $\mu\text{mol L}^{-1}$, durante 28 dias, em solução nutritiva, não encontraram valores superiores a 4 g de matéria seca na parte aérea e maiores que 1 g na raiz.

3.4 Concentração de Cd e Zn na planta

Com o acréscimo de Cd e Zn na solução houve um aumento da concentração dos dois elementos na parte aérea e na raiz de todos os ecótipos de *Gomphrena elegans*, tendo as maiores concentrações desses elementos na planta sido obtidas na dose de 9.140 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Gráficos 2, 3, 4 e 5). Todos os tratamentos apresentaram maior teor de Cd e Zn na raiz, comparada à parte aérea, observação encontrada na maioria das espécies tolerantes e acumuladoras desses metais (BROWN et al., 1995; PUERTAS-MEJÍA; RUIZ-DÍEZ; FERNÁNDEZ-PASCUAL, 2010). Entretanto, de acordo com Franco-Hernández et al. (2010), algumas espécies podem apresentar maiores concentrações na parte aérea, dependendo das condições às quais elas são submetidas.

Todos os ecótipos apresentaram o teor de Cd maior que 200 mg kg^{-1} na parte aérea e 400 mg kg^{-1} na raiz (Gráficos 2 e 3), valores superiores à faixa tolerável normalmente encontrada na parte aérea da maioria das espécies, que varia entre 0,05 a 0,5 mg kg^{-1} (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001). Os valores máximos encontrados foram 432 mg kg^{-1} , na parte aérea e 1.425 mg kg^{-1} , na raiz, correspondentes aos ecótipos 1A e 5B, respectivamente (Gráficos 2 e 3).

A diferença dos teores de Cd apresentados entre os 7 ecótipos da espécie *Gomphrena elegans* também ocorre com a hiperacumuladora *T. caerulescens*. Hutchinson et al. (2000), estudando 4 ecótipos dessa espécie (Prayon, Ganges,

Darley e Whitesike), encontraram valores da concentração de Cd na parte aérea que variaram entre 122 a 2.404 mg kg⁻¹.

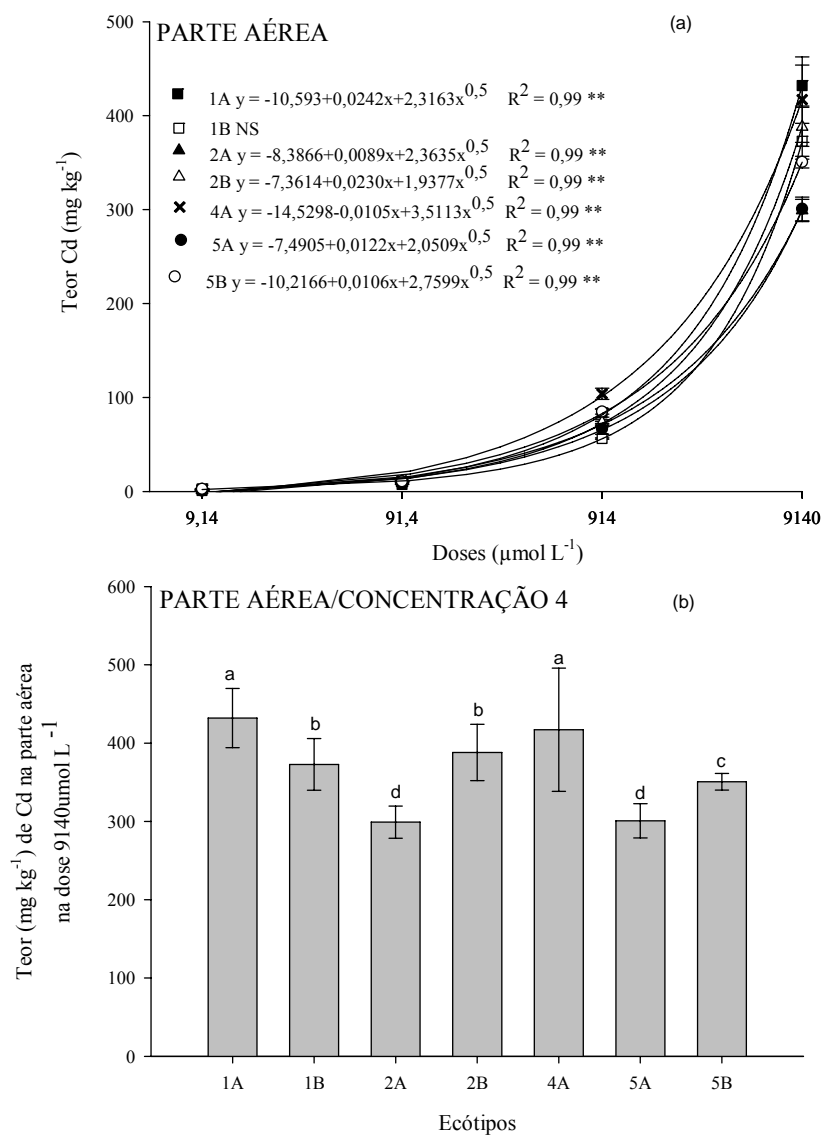


Gráfico 2 Concentração de Cd na parte aérea dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e concentração de Cd nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

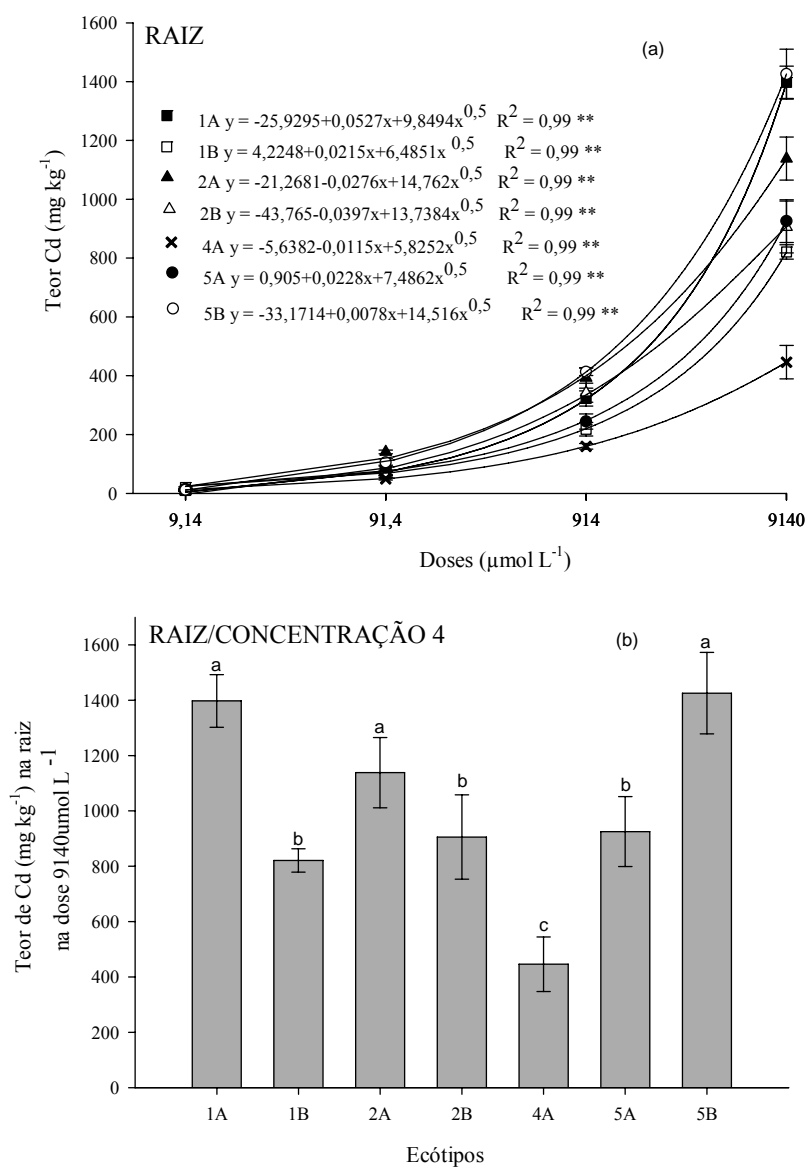


Gráfico 3 Concentração de Cd na raiz dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e concentração de Cd nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

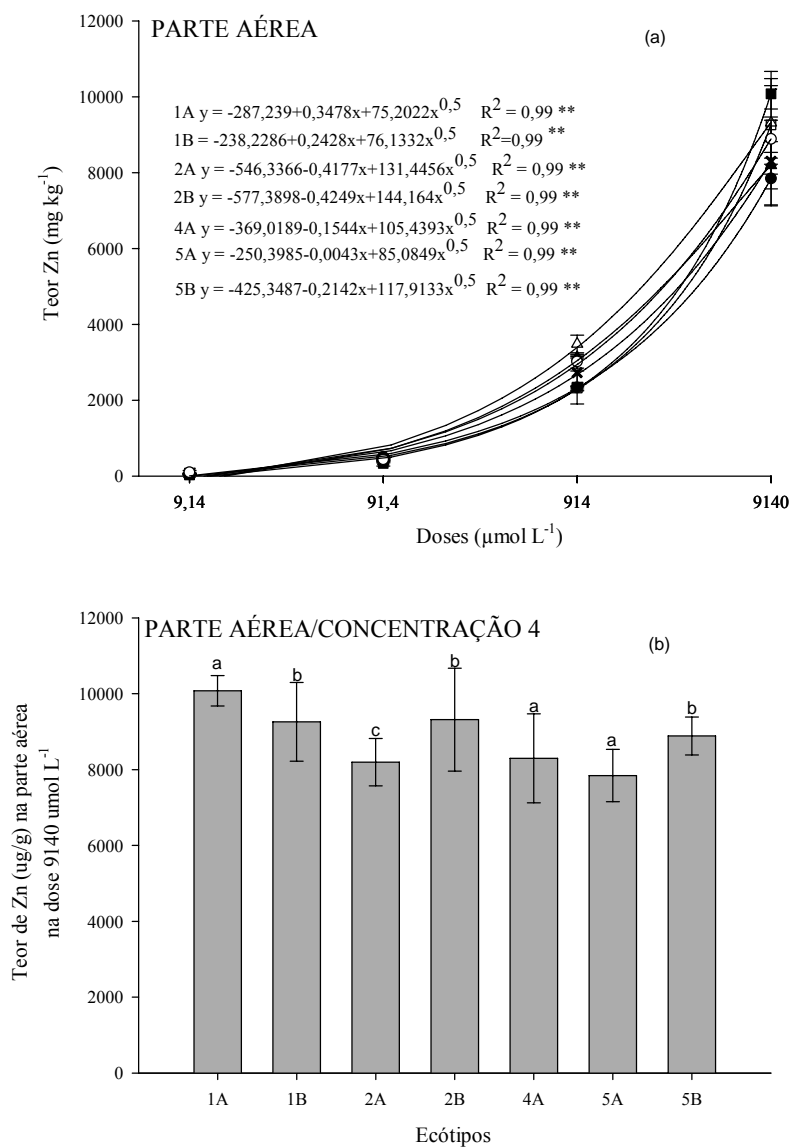


Gráfico 4 Concentração de Zn na parte aérea dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e concentração de Zn nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

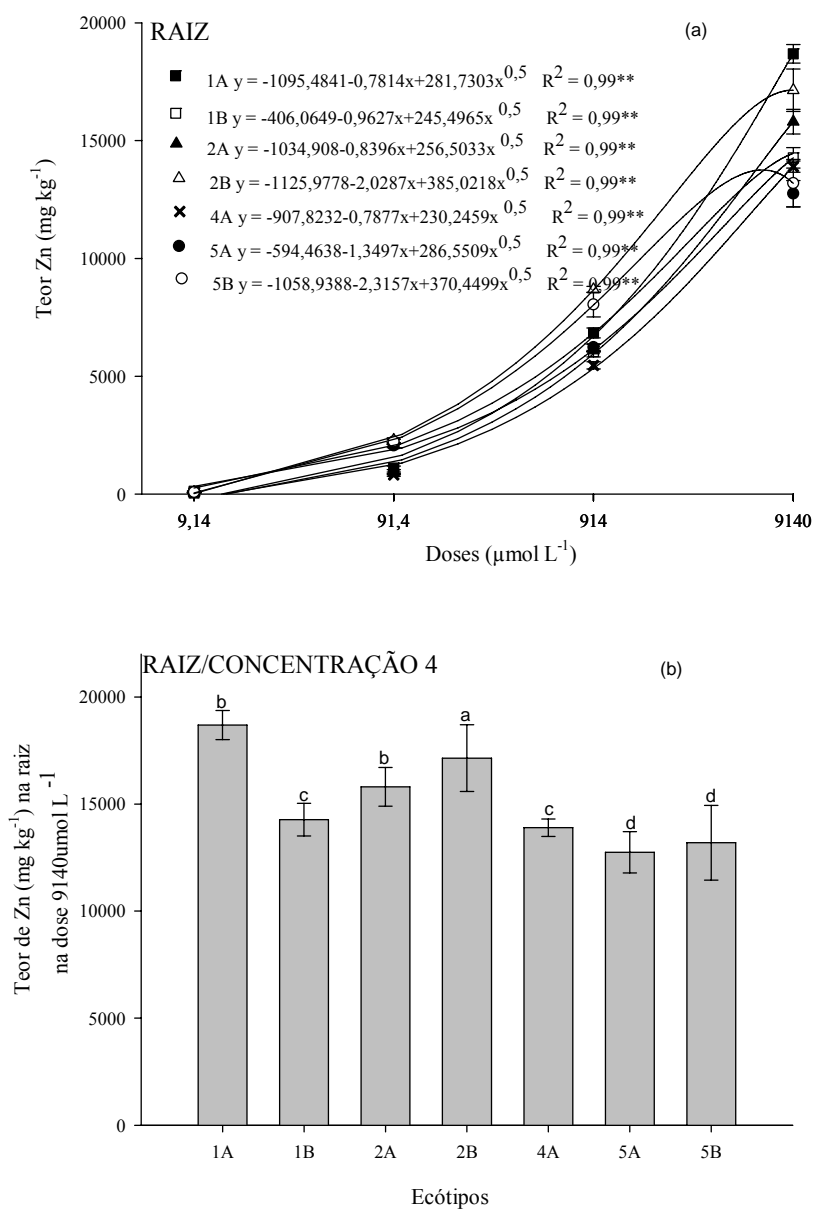


Gráfico 5 Concentração de Zn na raiz dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e concentração de Zn nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

Outro exemplo é o trabalho de Cosio, Martinoia e Keller (2004) que, estudando os ecótipos Prayon e Ganges, também encontraram diferentes teores de Cd na parte aérea, 287 e 1.274 mg kg⁻¹, respectivamente.

A concentração de Zn encontrada foi superior a 7.000 e 12.000 mg kg⁻¹ na parte aérea e raiz, em todos os ecótipos estudados, tendo as concentrações máximas sido de 18.688 mg kg⁻¹ na raiz e 10.078 mg kg⁻¹ na parte aérea, encontradas no ecótipo 1A (Gráficos 4 e 5).

Esses resultados demonstram que a espécie *Gomphrena elegans* tem mecanismos específicos para acumulação desse metal, uma vez que, de acordo com Franco-Hernández et al. (2010), as concentrações de Zn encontradas nos vegetais em condições normais variam entre 15 e 150 mg kg⁻¹.

Dentre as espécies capazes de acumular altas concentrações de Cd e Zn, poucas têm o mecanismo de acumulação dos dois elementos, simultaneamente. Phaenark et al. (2009) avaliaram o potencial fitoextrator de Cd e Zn em 36 espécies e revelaram 4 como hiperacumuladoras de Cd e apenas 1 com capacidade de fitoextrair tanto Cd como Zn. Essa capacidade fitoextratora múltipla é essencial para remediação das áreas contaminadas por meio da mineração ou beneficiamento de Zn, uma vez que ambos os elementos se encontram presentes nessa condição. Essa característica foi relatada para as espécies *Thlaspi caerulescens*, *Arabidopsis halleri*, *Sedum alfredi*, *Picris divaricata* e *Justicia procumbens* e é encontrada nos melhores ecótipos fitoextratores de *Gomphrena elegans* (Tabela 3).

Tabela 3 Exemplos de espécies vegetais hiperacumuladoras dos dois elementos-traço, cádmio e zinco

ESPÉCIES ACUMULADORAS DE Cd E Zn						
Espécies	PARTE AÉREA					Referência
	Teor Cd (mg kg ⁻¹)	Teor Zn	Biomassa (mg)	Conteúdo Cd (µg/planta)	Conteúdo Zn	
<i>Arabidopsis halleri</i>	1.927	32.000	1.090	2.100	34.880	Cosio, Martinoia e Keller (2004)
<i>Gomphrena elegans</i>	350	8.884	7.000	2.493	62.534	-
<i>Justicia procumbens</i>	548	10.741	-	-	-	Phaenark et al. (2009)
<i>Picris divaricata</i>	364	15.183	-	-	-	Ying et al. (2010)
<i>Salix smithiana</i>	250	3.000	-	-	-	Wieshammer et al. (2007)
<i>Sedum alfredi</i>	2.143	6.279	-	-	-	Zhuang et al. (2007)/ Jin et al. (2008)
<i>Thlaspi caerulescens</i>	1.290	26.000	1.800	1.700	35.000	Brown et al. (1995)

* valores apresentados para *Gomphrena elegans* correspondem ao ecótipo 5B

A relação da concentração Zn/Cd na parte aérea variou entre os diferentes ecótipos e com o aumento das concentrações (Tabela 4). Na maioria dos ecótipos foi observada uma relação inferior à disponível na solução (37,5, se expressa em mg Zn/mg Cd, que corresponde à relação molar Zn/Cd igual a 64,3) nas doses 1 e 4 e superior à mesma nas doses 2 e 3. Para todos os ecótipos, a

relação Zn/Cd é menor na planta, comparada à solução na concentração 4, ou seja, há, proporcionalmente, maior absorção de Cd do que Zn. Esse resultado demonstra maior mobilidade do Cd para a parte aérea na espécie *Gomphrena elegans*.

Tabela 4 Relação entre os teores (mg kg^{-1}) de Zn/Cd obtidos pelos diferentes ecótipos nas 4 doses estudadas

RELAÇÃO Zn/Cd NA PARTE AÉREA				
ECÓTIPOS	Doses (mg Zn/mg Cd)			
	9,14 (9+0,14)	91,4 (90+1,4)	914 (900+14)	9140 (9000+140)
1A	32,86	45,03	28,21	23,41
1B	29,07	40,41	41,24	25,11
2A	25,16	36,03	43,27	27,39
2B	38,20	52,00	47,38	23,94
4A	28,04	40,96	26,68	20,14
5A	67,11	47,76	35,06	26,06
5B	35,43	41,06	35,62	25,38

3.5 Coeficientes de bioacumulação e translocação

Os fatores de bioacumulação (FB) e o índice de translocação (IT) auxiliam na classificação da planta como hiperacumuladora, uma vez que o IT demonstra a eficiência da planta no transporte do elemento das raízes para a

parte aérea e o FB avalia a eficiência da planta em absorver o elemento que se encontra em uma determinada concentração (NASCIMENTO; XING, 2006). Os fatores determinados para os ecótipos de *Gomphrena elegans* estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Os ITs de Cd e de Zn em *Gomphrena elegans* foram de até 79,35% para Cd e de 87,43% para Zn (Tabela 5). Esse comportamento mostra certa restrição na translocação de Cd e Zn para a parte aérea, nas três primeiras concentrações. Entretanto, na última concentração, os ecótipos, apresentaram elevada taxa de translocação tanto de Cd como de Zn, ou seja, existe um aumento da translocação com o aumento da concentração nessa espécie.

Tabela 5 Índice de translocação (%) para os ecótipos de *Gomphrena elegans* expostas a concentrações crescentes de Cd e Zn em solução nutritiva

Ecótipos	Dose de Zn/Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
	9,14 (9+0,14)	91,4 (90+1,4)	914 (900+14)	9140 (9000+140)	
	Índice de translocação (%)				
Cd	1A	30,56	29,63	48,55	63,81
	1B	29,12	27,04	48,10	71,36
	2A	46,41	23,86	39,14	62,95
	2B	33,45	35,36	44,66	74,58
	4A	39,91	46,97	67,82	79,35
	5A	23,55	32,03	46,31	70,32
	5B	43,90	25,68	42,87	72,41
	Zn	1A	77,71	57,57	60,77
1B		66,18	34,25	44,66	80,57
2A		75,72	62,46	64,64	77,14
2B		74,59	39,82	56,20	81,62
4A		75,85	71,73	62,70	72,45
5A		83,34	51,58	57,78	82,31
5B		83,10	40,19	56,59	87,43

Para todos os ecótipos, em todas as doses, os valores do FB foram superiores a 18, tanto para Cd como para Zn (Tabela 6). Em geral, plantas hiperacumuladoras têm valores elevados do fator de bioacumulação. Entretanto, a comparação do FB entre as espécies é limitada, uma vez que ele é dependente da espécie e pode ser alterado de acordo com a concentração do elemento disponível para a planta, seja no solo ou na solução nutritiva (LIANG et al., 2009). De acordo com esses autores, o aumento da concentração do elemento no meio proporciona uma queda do FB nas espécies.

Os resultados encontrados por meio desses fatores revelam que a espécie *Gomphrena elegans* tem alguns mecanismos que evitam a translocação de Cd e Zn absorvido para a parte aérea. Entretanto, há uma elevada concentração dos dois elementos na parte aérea dessa espécie, sugerindo a existência de mecanismos específicos relacionados a absorção, transporte e acúmulo, que permitem e facilitam a permanência de valores elevados de Cd e Zn nos tecidos vegetais foliares dessa espécie.

Tabela 6 Fatores de bioacumulação para os ecótipos de *Gomphrena elegans* expostas a concentrações crescentes de Cd e Zn em solução nutritiva

Ecótipos	Dose de Zn/Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$)				
	9,14 (9+0,14)	91,4 (90+1,4)	914 (900+14)	9140 (9000+140)	
	Fator de bioacumulação (parte aérea)				
Cd	1A	68,2	51,4	66,0	26,2
	1B	178,8	69,1	44,5	22,6
	2A	114,3	74,5	57,3	18,1
	2B	105,0	62,5	58,1	23,5
	4A	144,3	78,2	82,1	25,3
	5A	45,8	72,5	52,6	18,2
	5B	175,9	73,6	67,1	21,2
	Zn	1A	58,1	64,8	52,4
1B		142,4	78,2	52,0	23,4
2A		79,1	75,5	70,1	20,7
2B		105,3	90,7	78	23,5
4A		109,7	89,1	61,0	20,9
5A		83,6	97,2	52,3	19,8
5B		175,2	84,7	67,6	22,4

3.6 Conteúdo de Cd e Zn

De acordo com Zhang et al. (2010), para avaliar a capacidade fitoextratora de uma espécie, devem ser considerados tanto o seu fator de

bioacumulação como a sua biomassa. O parâmetro de avaliação capaz de unir esses dois fatores é o conteúdo, que representa o que foi acumulado por planta de um determinado elemento em uma condição específica. Os ecótipos de *Gomphrena elegans* translocaram para a parte aérea entre 1.231 a 2.493 $\mu\text{g planta}^{-1}$ de Cd e 32.274 a 63.534 $\mu\text{g planta}^{-1}$ de Zn na dose mais elevada (Gráficos 6 e 7). Os melhores resultados foram apresentados pelos ecótipos 1A e 5B, tendo o último apresentado os maiores valores, tanto para o acúmulo de Cd como de Zn. Brown et al. (1995) determinaram, em seu trabalho, o conteúdo de Cd e Zn na parte aérea para a espécie *T. caerulea* e, devido à baixa produção de biomassa dessa espécie, os valores acumulados não ultrapassaram 1.700 $\mu\text{g planta}^{-1}$ de Cd e 35.000 $\mu\text{g planta}^{-1}$ de Zn.

A avaliação de espécies para utilização do mecanismo de fitoestabilização deve ser embasada no conteúdo do elemento presente na raiz. Neste trabalho, os ecótipos de *Gomphrena elegans*, na dose 4, apresentaram os conteúdos de Cd de 393 a 1.378 $\mu\text{g planta}^{-1}$ e Zn de 8.944 a 19.078 $\mu\text{g planta}^{-1}$. Ao contrário da parte aérea, na raiz, os maiores valores acumulados são correspondentes à dose 3, devido à maior produção de matéria seca nessa dose (Gráficos 8 e 9).

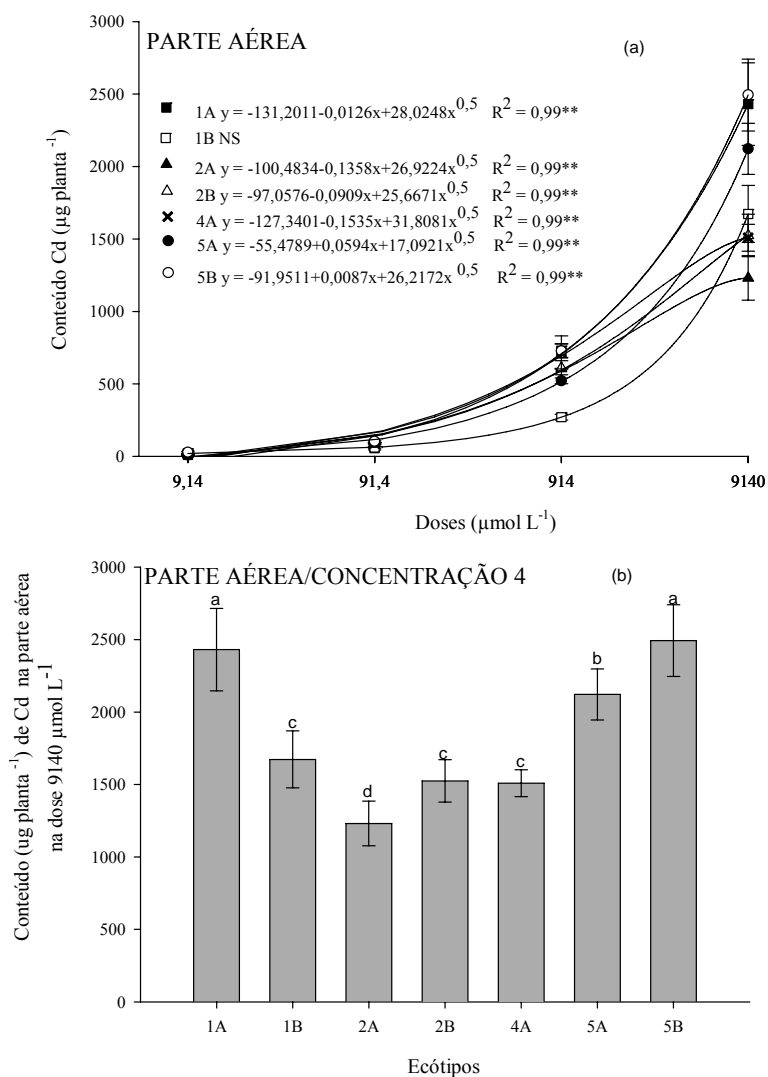


Gráfico 6 Conteúdo de Cd na parte aérea dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e conteúdo de Cd nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

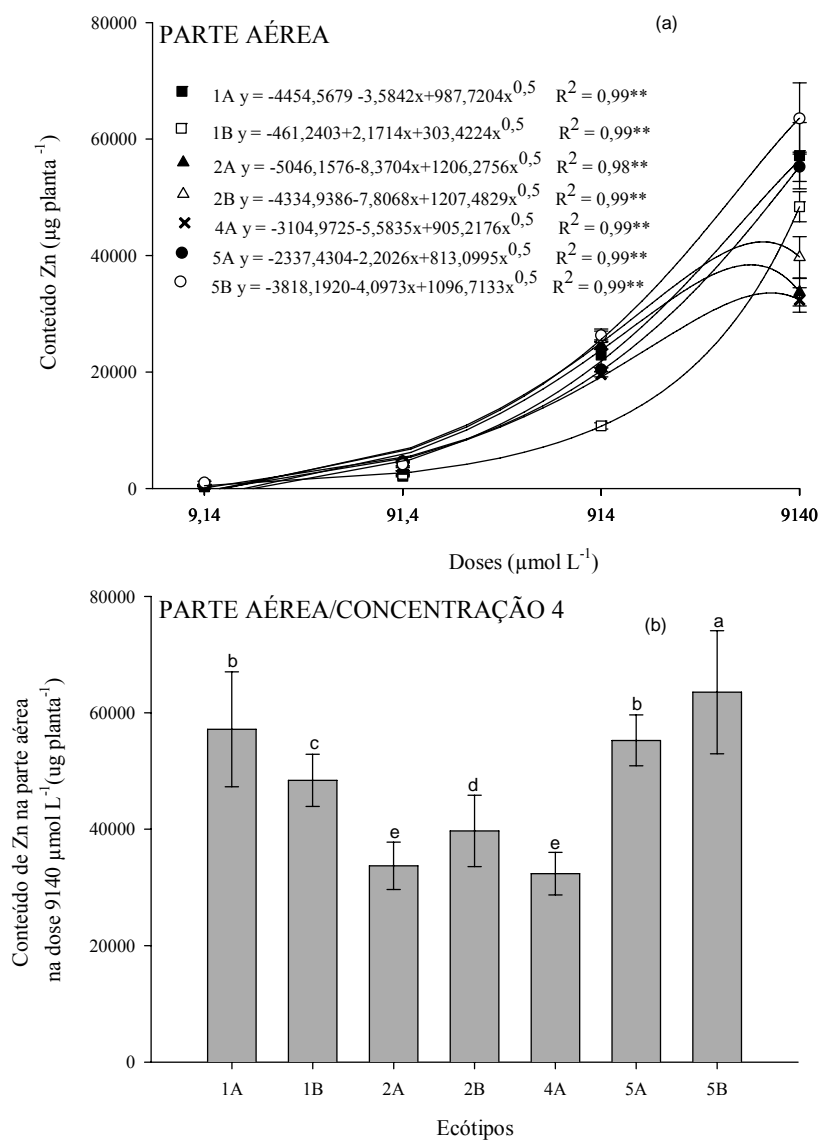


Gráfico 7 Conteúdo de Zn na parte aérea dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e conteúdo de Zn nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

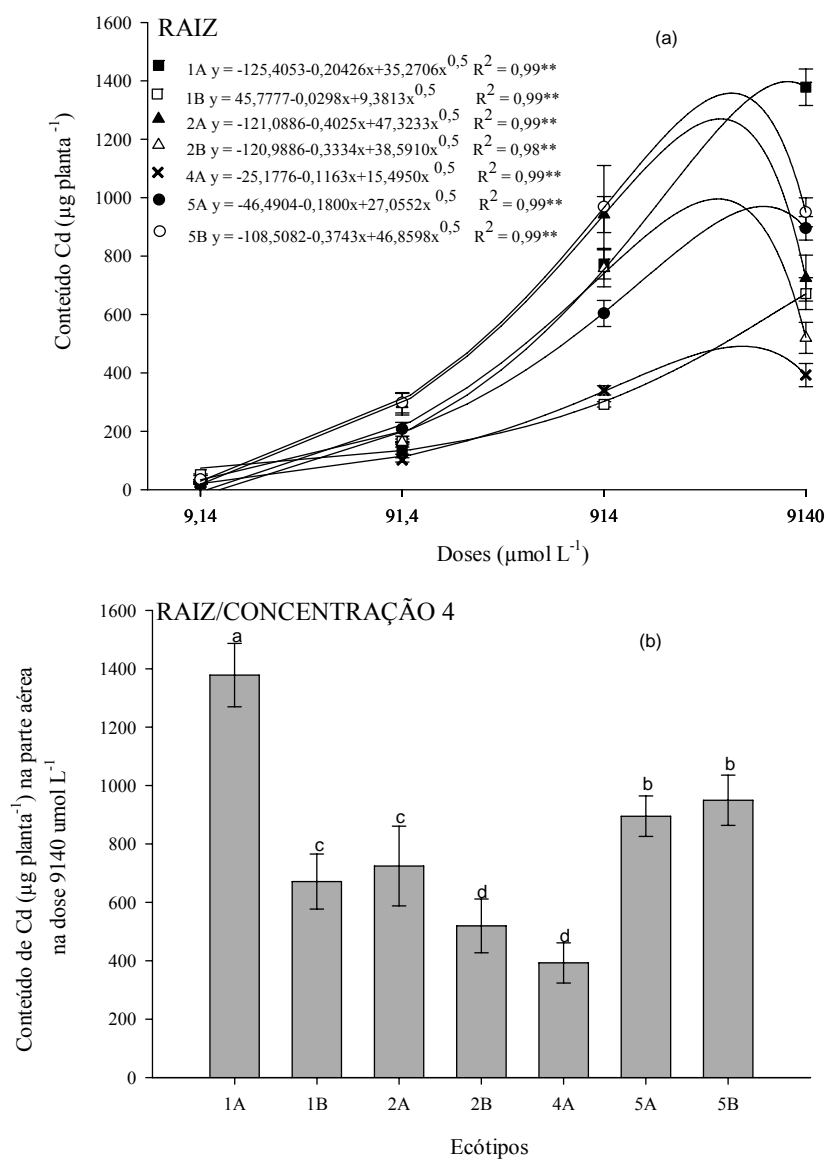


Gráfico 8 Conteúdo de Cd na raiz dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e conteúdo de Cd nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

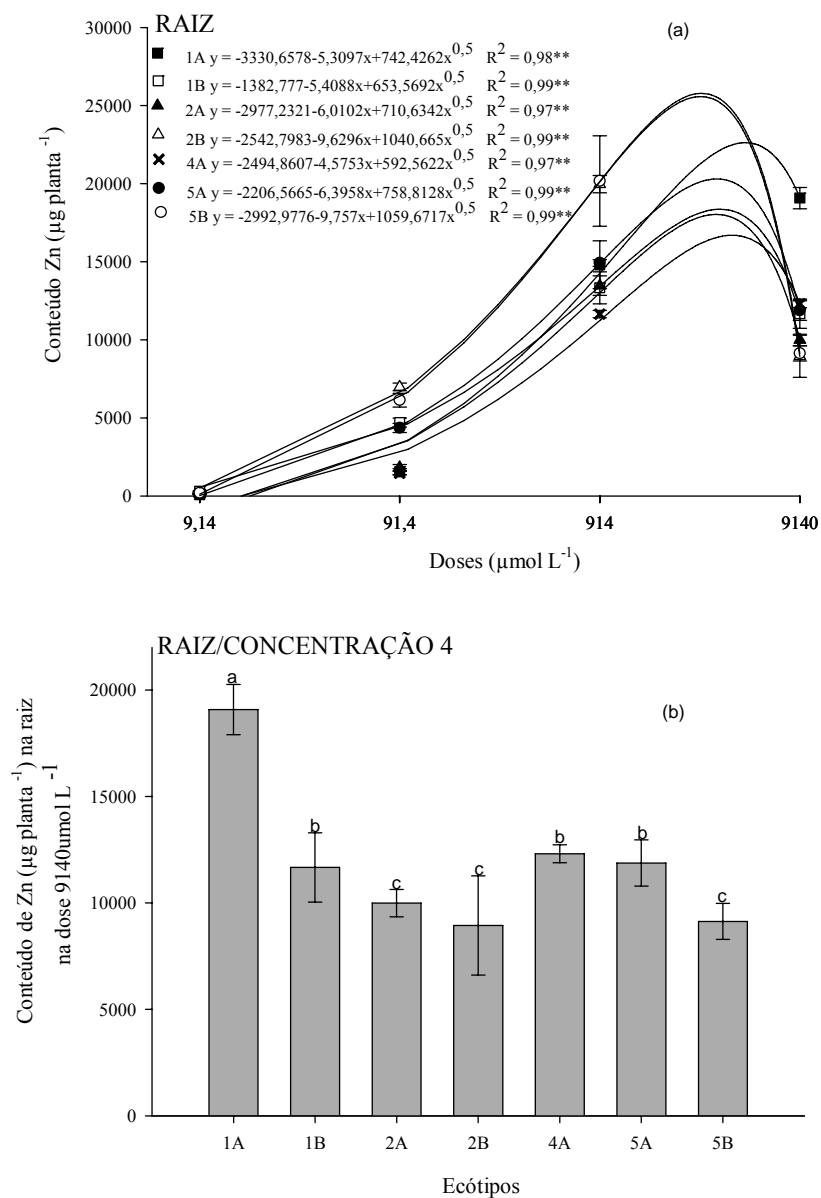


Gráfico 9 Conteúdo de Zn na raiz dos 7 ecótipos nas 4 doses estudadas (a) e conteúdo de Zn nos 7 ecótipos na dose 4 (b). Ecótipos seguidos da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de significância

Devido à baixa produção de biomassa das plantas hiperacumuladoras, muitas vezes espécies não acumuladoras podem ser tão eficientes quanto as primeiras no processo de fitoextração (LIANG et al., 2009). Dessa maneira, apesar de não apresentar teores tão elevados de Cd e Zn como *T. caerulescens* e *A. halleri*, a espécie *Gomphrena elegans* é potencialmente mais eficiente no processo de fitoextração, uma vez que o acúmulo de Cd e Zn nessa espécie é comparativamente maior (Tabela 3).

A espécie *Gomphrena elegans* apresentou elevada concentração de Cd ($>100 \text{ mg kg}^{-1}$) e Zn ($>10.000 \text{ mg kg}^{-1}$) na parte aérea, com valores 800 vezes maiores para Cd e 67 vezes maiores para Zn que as concentrações normalmente encontradas nas plantas. Além disso, essa espécie também demonstrou alta capacidade de bioacumulação de Cd e Zn na parte aérea e grande produção de biomassa. O conjunto dessas características permite a classificação dessa espécie como hiperacumuladora de Cd e Zn, assim como sua indicação para programas de fitorremediação de áreas contaminadas com esses elementos.

4 CONCLUSÃO

A espécie *Gomphrena elegans* é uma fitoextratora que pode ser utilizada em áreas contaminadas com Cd e Zn. O conjunto das características apresentadas por essa espécie permite a sua classificação como hiperacumuladora de Cd e Zn. O ecótipo 5B, devido aos elevados teores de Cd e Zn e à sua alta produção de biomassa na parte aérea, se destaca dentre todos os ecótipos avaliados.

REFERÊNCIAS

ACCIOLY, A. M. A.; SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; SCHAEFER, C. E. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v. 1, p. 299-352.

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

BAKER, A. J. M. et al. The possibility of *in situ* heavy metal decontamination of polluted soils using crops of metal accumulating plants. **Resources, Conservation and Recycling**, Amsterdam, v. 11, p. 41-49, 1994.

BAKER, A. J. M.; WHITING, S. N. In search of the Holy grail – a further step in understanding metal hyperaccumulation? **New Phytologist**, Cambridge, v. 155, p. 1-7, 2002.

BAKER, A. M. J.; BROOKS, R. R. Terrestrial higher plants with hyperaccumulate metallic elements – a review of their distribution, ecology and phytochemistry. **Biorecovery**, [S.l.], v. 1, p. 81-126, 1989.

BROWN, S. L. et al. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge amended soils. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 29, n. 6, p. 1581-1585, Mar. 1995.

CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1629-1638, nov. 2002.

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

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução n° 420, de 28 de dezembro de 2009.** Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 30 jul. 2010.

COSIO, C.; MARTINOIA, E.; KELLER, C. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level 1. **Plant Physiology**, Washington, v. 134, p. 716-725, Feb. 2004.

CUNINGHAM, S. D.; BERTI, W. R. Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. **Vitro Cellular and Developmental Biology**, Columbia, v. 29, n. 4, p. 207-212, Oct. 1993.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos.** Lavras: UFLA, 2003.

FRANCO-HERNÁNDEZ, M. O. et al. Heavy metals concentration in plants growing on mine tailings in Central Mexico. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 3864-3869, 2010.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Phytoextraction: a cost effective plant-based technology for the removal of metals from the environment. **Bioresource Technology**, Essex, v. 77, n. 3, p. 229-236, May 2001.

HENRY, J. R. **An overview of the phytoremediation of lead and mercury.** 2000. 51 p. Disponível em: <<http://www.clu-in.gov>>. Acesso em: 25 ago. 2008.

HUTCHINSON, J. J. et al. Determining uptake of 'non-labile' soil cadmium by *Thlaspi caerulescens* using isotopic dilution techniques. **New Phytologist**, Cambridge, v. 146, p. 453-460, 2000.

INTERSTATE TECHNOLOGY & REGULATORY COUNCIL.

Phytotechnologies. Washington, 2009. Disponível em:

<<http://www.itrcweb.org/Documents/PHYTO-3.pdf>>. Acesso em: 26 jul. 2010.

JIN, X. F. et al. Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 997-1006, 2008.

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

LASAT, M. M. Phytoextraction of toxic metals: a review of biological mechanisms. **Journal Environmental Quality**, Madison, v. 31, p. 109-120, Jan./Feb. 2002.

LIANG, H. et al. Model evaluation of the phytoextraction potential of heavy metal hyperaccumulators and non-hyperaccumulators. **Environmental Pollution**, Barking, v. 157, p. 1945-1952, 2009.

LIEVENS, C. et al. Study of the potential valorisation of heavy metal contaminated biomass via phytoremediation by fast pyrolysis. **Fuel**, London, v. 87, p. 1906-1916, 2008.

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

MACNAIR, M. R. Within and between population genetic variation for zinc accumulation in *Arabidopsis halleri*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 155, p. 59-66, 2002.

MAESTRI, E. et al. Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 68, p. 1-13, 2010.

MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, p. 277-282, 2003.

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

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

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Science Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 299-311, maio/jun. 2006.

PADMAVATHIAMMA, P. K.; LI, L. Y. Phytoremediation technology: hyper-accumulation metals in plants. **Water Air Soil Pollut**, [S.l.], v. 184, p. 105-126, 2007.

PHAENARK, C. et al. Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng Zinc Mine area. **International Journal of Phytoremediation**, London, v. 11, n. 5, p. 479-495, July 2009.

PUERTAS-MEJÍA, M. A.; RUIZ-DÍEZ, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Effect of cadmium ion excess over cell structure and functioning of *Zea mays* and *Hordeum vulgare*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 38, p. 285-291, 2010.

RASKIN, I.; ENSLEY, B. D. Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment. In: MEMON, A. R.; SCHODER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environment Science Polluted**. New York: J. Wiley, 2009. p. 162-175.

REEVES, R. D.; BAKER, A. J. M. Metal-accumulating plants. In: RASKIN, H.; ENSLEY, B. D. (Ed.). **Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment**. London: J. Wiley, 2000. p. 193-230.

SALT, D. E.; SMITH, R. D.; RASKIN, I. Phytoremediation. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S.l.], v. 49, p. 643-668, 1998.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados. In: FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. p. 419-432.

SANTOS, R. C. Planta do cerrado absorve metal nocivo ao meio ambiente. **Jornal da UNICAMP**, Campinas, v. 23, n. 409, set. 2008. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/node/152>>. Acesso em: 03 nov. 2008.

SCHRÖDER, P. et al. Bioenergy to save the world - producing novel energy plants for growth on abandoned land. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsburg, v. 15, n. 3, p. 196-204, May 2008.

SCULLION, J. **Review remediation polluted soils**. [S.l.]: Springer-Verlag, 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/f334x20112133313/>>. Acesso em: 09 fev. 2008.

SOARES, C. R. F. S. et al. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 339-348, fev. 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test methods for evaluating soil waste, physical/chemical methods SW-846**. 3. ed. Washington, 1995. Disponível em: <<http://www.epa.gov/SW-846/3051a.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2010.

VASSILEV, A.; VANGRONSVELD, J.; YORDANOV, I. Cadmium phytoextraction: present state, biological backgrounds and research needs: reviews. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, Sofia, v. 28, n. 3/4, p. 68-95, 2002.

WANG, H. B. et al. Uptake and accumulation of arsenic by 11 *Pteris* taxa from southern China. **Environmental Pollution**, Barking, v. 145, n. 1, p. 225-233, Jan. 2007.

WIESHAMMER, G. et al. Phytoextraction of Cd and Zn from agricultural soils by *Salix* ssp. and intercropping of *Salix caprea* and *Arabidopsis halleri*. **Plant and Soil**, The Hague, v. 298, n. 1/2, p. 255-264, Aug. 2007.

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

YING, R. et al. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplastin Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 81-87, Jan. 2010.

ZABŁUDOWSKA, E. et al. Search for a plant for phytoremediation – what can we learn from field and hydroponic studies? **Chemosphere**, Oxford, v. 77, p. 301-307, 2009.

ZHANG, X. et al. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, p. 2063-2066, 2010.

ZHAO, F.; MCGRATH, S. P. Biofortification and phytoremediation. **Current Opinion in Plant Biology**, [S.l.], v. 12, p. 373-380, 2009.

ZHUANG, P. et al. Phytoextraction of heavy metals by eight plant species in the field. **Water Air Soil Pollution**, [S.l.], v. 184, n. 1/4, p. 235-242, 2007.

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES NA ESPÉCIE *Gomphrena elegans* EM CONDIÇÃO DE CONTAMINAÇÃO COM CÁDMIO E ZINCO

RESUMO

As plantas submetidas à condição de contaminação com metais pesados sofrem uma série de alterações com a finalidade de suportarem esse estresse. Em geral, espécies acumuladoras de Cd e Zn produzem enzimas antioxidantes para proteção do metabolismo contra elementos que venham a ficar disponível no citosol da célula. Dentre as enzimas antioxidantes se destacam a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona redutase (GR). O objetivo desse trabalho foi avaliar, ao longo do tempo, a produção dessas enzimas na espécie *Gomphrena elegans* ecótipo 5B em condições de contaminação crescente combinada de Zn+Cd. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, sendo os tratamentos constituídos de quatro doses crescentes de Zn+Cd (16,25; 162; 325; 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$, na relação Zn/Cd = 64) e três diferentes tempos (15; 30; 45 dias), com quatro repetições. Foram avaliados tanto os teores de Zn e Cd, quanto a atividade das enzimas CAT, SOD e GR. Os resultados mostraram que o aumento da concentração dos metais proporcionou um aumento dos teores dos dois metais nos três tempos estudados na parte aérea da espécie *Gomphrena elegans*. A atividade da SOD e da GR aumentou com a elevação da concentração dos metais, demonstrando a relação dessas enzimas com o mecanismo antioxidante da espécie *Gomphrena elegans*. Já a atividade da CAT decaiu, provavelmente por essa não participar diretamente do sistema de proteção dessa espécie. Uma vez que a GR está diretamente relacionada a produção de moléculas quelantes de Cd e Zn, como as fitoquelatinas, existe uma indicação de que essas moléculas participem do acúmulo desses metais na espécie *Gomphrena elegans*.

Palavras-chave: Fitorremediação. Elementos-traço. Amarantaceae.

ABSTRACT

Plants subjected to heavy metals contamination develop a series of defense mechanisms in order to withstand this stress. In general, Cd and Zn accumulating species produce antioxidant enzymes that protect the plant against metabolic alterations caused by the presence of the metal in the cell's cytosol. Catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), and glutathione reductase (GR) are examples of such antioxidant enzymes. The aim of this study was to assess the production over time of these enzymes in the species *Gomphrena elegans*, 5B ecotype, subjected to increasing and multiple contamination of Zn/Cd. The experiment was conducted in a randomized design with treatments consisting of four increasing doses of Zn+Cd (16,25; 162; 325; 975 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a Zn/Cd ratio of 64) and three times – 15, 30 and 45 days – with four replications. We evaluated dry matter production, Zn and Cd tissue concentration, as well as the activity of the enzymes CAT, SOD, and GR. The results showed that increasing the concentration of metals caused an increase in tissue concentrations of both Zn and Cd in the species *Gomphrena elegans* at the three times studied. The activity of SOD and GR increased with increasing concentrations of the metals, which indicates a relationship of these enzymes with the antioxidant mechanism of the *Gomphrena elegans* species. The activity of CAT decreased probably because it does not participate directly in the protection mechanism of such species. Since GR is directly related to the production of Cd- and Zn-chelating molecules (e.g., phytochelatins) this might indicate that these molecules are associated with metal accumulation by the species *Gomphrena elegans*.

Keywords: Phytoremediation. Trace elements. Amarantaceae.

1 INTRODUÇÃO

A contaminação do ambiente com elementos-traço é um problema ambiental cada vez mais relevante. Dentre as técnicas remediadoras dessa contaminação destaca-se a fitorremediação, por apresentar resultados satisfatórios, além de possuir inúmeras vantagens, como o baixo custo e o fato de ser ambientalmente correta.

Importante fonte potencial de espécies apropriadas para a fitorremediação é a vegetação encontrada naturalmente em áreas contaminadas, pois essas plantas são adaptadas ao ambiente contaminado (WATANABE, 1997). Um exemplo desta situação é o genótipo de planta encontrado em área de mineração de calamina (minério de Zn), identificado como *Gomphrena elegans* (primeiramente identificado como *Pfaffia* sp.) (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002).

Gomphrena é o gênero com maior número de espécies dentro da família Amarantaceae. A distribuição desse gênero, assim como da espécie *Gomphrena elegans*, é restrita à América do Sul tropical e subtropical, sendo encontrado na Argentina, Paraguai, Peru, Uruguai e Brasil (CARNEIRO; IRGANG, 2005). A ocorrência frequente dessa espécie abrange cerrados, campos rupestres, caatingas, vazantes e vegetação ciliar (LEITE, 2009; MUSSURY et al., 2006). Os principais estudos dessa espécie são relacionados às suas características medicinais e antimicrobianas, e os relativos ao acúmulo e à tolerância de metais são, até então, inexistentes na literatura (MUSSURY et al., 2008; SCHNEIDER et al., 2008).

Além da identificação das espécies, é necessário melhor conhecimento e entendimento dos mecanismos de absorção, transporte e acúmulo dos metais nas plantas, o que implica em melhor desempenho da técnica de fitorremediação. O conhecimento da interação metal-planta é importante para a segurança do

ambiente e também para a redução dos riscos associados com a introdução dos elementos-traço na cadeia alimentar (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005).

Para que a técnica de fitorremediação seja otimizada e utilizada com elevada eficiência, a investigação dos mecanismos responsáveis pela tolerância e hiperacumulação é fundamental e deve ser realizada utilizando como modelo espécies naturalmente hiperacumuladoras (CHAO et al., 2008; JIN, X. et al., 2008).

O cádmio é um elemento não essencial às plantas e, geralmente, ocorre em ambientes naturais como um metal acompanhante em minerais ricos em Zn e Pb (BAKER et al., 1990). Devido à sua longa meia vida biológica, é considerado um elemento com alta de toxidez às plantas. Os efeitos de fitotoxicidade do Cd estão relacionados a clorose, inibição do crescimento, desbalanço hídrico, deficiência de nutrientes como fósforo e nitrogênio, assim como aceleração da senescência (IQBAL et al., 2010; MISHRA et al., 2006). Nas plantas, o Cd interfere e interage com a fotossíntese, a respiração e o metabolismo dos nutrientes, interferindo em processos fisiológicos e moleculares (XU et al., 2010). De acordo com Ying et al. (2010), o Cd tem se mostrado um dos inibidores mais efetivos da atividade fotossintética, o que pode ser relacionado à sua atividade em interromper a biossíntese dos pigmentos fotossintéticos.

Em contrapartida, o zinco, que é um elemento essencial, pode ser fitotóxico, dependendo da sua concentração disponível. Esse elemento atua como cofator em processos de catálises enzimáticas e é importante durante a redução e o fluxo de elétrons, principalmente nas desidrogenases, proteinases e peptidases. Sua atuação está relacionada, principalmente, à síntese de proteínas e carboidratos e no metabolismo dos ácidos nucleicos e lipídeos (RADIC et al., 2010). Entretanto, o acúmulo desse elemento em altas concentrações ou distribuição irregular pode levar a distúrbios celulares. Os principais sintomas de

toxidez do zinco são a clorose em folhas mais novas e a inibição da elongação do sistema radicular (LYUBENOVA et al., 2009).

Para superar o estresse causado pela toxidez de Cd e Zn, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa como a ligação desses à parede celular, a diminuição do transporte através da membrana plasmática, a compartimentalização no vacúolo e a quelatação em ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, fitoquelatinas e metalotioneínas (NOUAIRI et al., 2009). Entretanto, em altas concentrações, os metais pesados levam ao estresse oxidativo, induzindo a produção de radicais de oxigênio (JIN, X. F. et al., 2008; LYUBENOVA et al., 2009).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas com respostas a estresse bióticos e abióticos, sendo a alta reatividade dessas moléculas devido a um par de elétrons não pareados que essas possuem (GZYL; RYMER; GWÓZDŹ, 2009). Quando esse grupo de moléculas não é adequadamente removido da célula, ocorre um estresse oxidativo (YADAV, 2010). A produção das espécies reativas de oxigênio (EROS) envolve radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH \cdot), oxigênio singleto (1O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GZYL; RYMER; GWÓZDŹ, 2009; ODJEGBA; FASIDI, 2007). As EROs são produzidas diretamente por meio da transferência de elétrons envolvendo metais catiônicos, assim como em consequência da inibição de reações metabólicas (FARSHIAN; KHARA; MALEKZADEH, 2007). A maioria dos compartimentos celulares tem potencial de produção dessas moléculas (ODJEGBA; FASIDI, 2007).

As espécies tóxicas derivadas do oxigênio são altamente citotóxicas e podem provocar, por meio dos danos oxidativos, vários distúrbios no metabolismo, podendo causar danos diretos aos lipídeos, oxidação e modificação de aminoácidos e proteínas, e impedir a replicação e o reparo do DNA. Além disso, são altamente destrutivas para as membranas celulares

(ODJEGBA; FASIDI, 2007; RADIC et al., 2010; SAFFAR; NAJJAR; MIANABADI, 2009; YADAV, 2010). De acordo com Chaoui et al. (1997), um dos principais danos causados por essas espécies é causado pela peroxidação nas membranas lipídicas, que leva ao aumento da permeabilidade da membrana plasmática e não permite a regulação correta das trocas iônicas, levando à morte celular. Tanto a presença do Cd como do Zn em elevadas concentrações pode levar à produção de EROs (NOUAIRI et al., 2009; RADIC et al., 2010).

Para reduzir esses danos, as plantas desenvolveram dois sistemas antioxidantes de defesa e proteção (ODJEGBA; FASIDI, 2007). Esses mecanismos permitem, de maneira eficiente, o controle das EROs, evitando a produção e degradando essas moléculas (LYUBENOVA et al., 2009; NOUAIRI et al., 2009; SCHICKLER; CASPI, 1999). O mecanismo antioxidante não enzimático envolve moléculas de baixo peso molecular, como ascorbato, glutatona, prolina e carotenoides. Já o sistema antioxidante enzimático inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), peroxidase (POD), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona peroxidase (GPX) (FARSHIAN; KHARA; MALEKZADEH, 2007; RADIC et al., 2010). O ciclo das enzimas antioxidantes envolve, principalmente, cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos, glioxissomos e membrana plasmática (SHI et al., 2010).

A SOD é responsável pela conversão do O_2^- em H_2O_2 ou O_2 e é considerada a primeira enzima de defesa a atuar contra as EROs. O peróxido de hidrogênio produzido é facilmente difundido, mas tóxico à célula, sendo então degradado por CAT, GPX e APX (LYUBENOVA et al., 2009). Três tipos de isoformas dessa enzima são encontrados nas plantas, os quais se distinguem pelos diferentes cofatores (Mn, Fe e Cu/Zn). O Mn atua em mitocôndrias e peroxissomos, Fe em cloroplastos e Cu/Zn no citosol, peroxissomos e cloroplastos. A resposta da SOD a metais varia com a espécie, o tecido, o tipo de

metal, a concentração e o tempo de exposição (GRATÃO et al., 2005; LYUBENOVA et al., 2009).

A CAT metaboliza o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Essa enzima é naturalmente expressa pelas plantas durante o ciclo da beta-oxidação e para catalisar o H_2O_2 produzido no peroxissomo durante a fotorespiração (GRATÃO et al., 2005).

A GR é classificada como uma flavoproteína e catalisa a redução da GSSG (glutathiona na forma oxidada) em GSH (glutathiona na forma reduzida), reação dependente do NADPH. O envolvimento dessa enzima na defesa contra estresse oxidativo está relacionado à importante manutenção da taxa GSH/GSSG elevada, uma vez que a GSH tem papel fundamental no metabolismo de metais pesados nos vegetais (NOUAIRI et al., 2009; SCHICKLER; CASPI, 1999). A maioria dos trabalhos tem mostrado que a concentração da GR aumenta na presença do Cd e Zn como forma de defesa (GRATÃO et al., 2005).

As espécies hiperacumuladoras, mesmo em altas concentrações de elementos-traço, mantêm seu sistema antioxidante ativo, o que as protege de possíveis danos causados por elementos que podem estar disponíveis em suas formas iônicas (SUN; JIN; ZHOU, 2010). Consequentemente, o aumento das doses de elemento-traço promove o aumento da atividade de pelo menos uma enzima antioxidante, o que não ocorre em espécies não acumuladoras (WOJCIK; SKORZYNSKA-POLIT; TUKIENDORF, 2006).

Diante do conhecimento do potencial fitorremediador da espécie *Gomphrena elegans* e da inexistência de estudos relacionados aos mecanismos de tolerância e acúmulo de elementos-traço por essa espécie, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de produzir enzimas antioxidantes, em diferentes períodos, na espécie *Gomphrena elegans*, crescida em solução nutritiva com concentrações crescentes e combinadas dos elementos Cd e Zn.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das plantas

O local escolhido para a coleta das plantas matrizes de *Gomphrena elegans* foi a área de rejeito da Companhia Mineira de Metais (CMM), localizada na cidade de Vazante, noroeste do estado de Minas Gerais. Inicialmente, foi determinado, dentre os indivíduos coletados, o melhor ecótipo a ser estudado, visando à aplicação em técnicas de fitorremediação. De acordo com os resultados encontrados, foi escolhido o ecótipo denominado 5B (posição da coleta -S1758013 W4651818).

2.2 Propagação

A planta matriz de *Gomphrena elegans*, ecótipo 5B foi multiplicada por meio da técnica de micropropagação no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas como explantes gemas novas apicais e laterais. O processo de assepsia foi de 10 minutos em água corrente, seguido por imersão sob agitação em hipoclorito de sódio (40%) mais Tween-20, durante 15 minutos. Ao final, foram realizados cinco enxágues com água destilada autoclavada, dentro de um fluxo laminar. Os explantes foram inoculadas em frascos de 25 x 150 mm contendo 12 mL de meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) com 3% de sacarose, 0,6% de ágar e pH ajustado para $5,7 \pm 0,1$, autoclavado durante 20 minutos (1 atm, 120°C). Os frascos foram mantidos, durante 40 dias, em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16/8 horas luz/escuro fornecido por lâmpadas fluorescentes do tipo luz do dia, com intensidade luminosa de $25 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e temperatura de $26 \pm 1^\circ\text{C}$. A aclimatização das plântulas foi realizada em bandejas

de isopor de 128 células contendo substrato comercial Plantmax, por um período de duas semanas.

2.3 Condução experimental

O estudo foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com solução nutritiva em sistema hidropônico, sob aeração constante. As plântulas permaneceram em solução de Clark, para adaptação, por três semanas, com concentrações crescentes correspondentes a 25%, 50% e 100% da força iônica. A solução nutritiva de Clark (1975) contém: 7,26 mmol L⁻¹ N – NO₃⁻; 0,90 mmol L⁻¹ N – NH₄⁺; 0,07 mmol L⁻¹ P; 1,80 mmol L⁻¹ K; 2,60 mmol L⁻¹ Ca; 0,60 mmol L⁻¹ Mg; 0,50 mmol L⁻¹ S; 7,0 μmol L⁻¹ Mn; 2 μmol L⁻¹ Zn; 0,5 μmol L⁻¹ Cu; 19 μmol L⁻¹ B; 0,60 μmol L⁻¹ Mo e 38 μmol L⁻¹ Fe complexado com Na₂-EDTA. As soluções foram trocadas semanalmente, renovando a contaminação com Zn/Cd e o pH da solução mantido em 5,5 com adição de NaOH ou HCl 0,1 mol L⁻¹, quando necessário.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 4, sendo três períodos (15, 30 e 45 dias) e 4 concentrações crescentes de Cd e Zn. Como na área estudada existe a presença de contaminação múltipla, as concentrações estabelecidas foram baseadas na soma das concentrações de Zn e Cd, seguindo-se uma razão Zn/Cd, em molaridade, de 64. As doses foram 16,25 μmol L⁻¹ (16,0 Zn e 0,25 Cd); 162,5 μmol L⁻¹ (160 Zn e 2,5 Cd); 325 μmol L⁻¹ (320 Zn e 5 Cd) e 975 μmol L⁻¹ (960 Zn e 15 Cd), definidas de acordo com os resultados encontrados no capítulo 1, estabelecendo como maior dose aquela na qual as plantas não apresentaram sintomas de toxidez. As fontes dos sais foram ZnSO₄ e Cd SO₄. Os tratamentos resultaram da combinação dos três períodos com as quatro doses, num total de

12 tratamentos com 4 repetições, totalizando 48 parcelas. Os vasos utilizados tinham capacidade de 1,7 L e continham uma única planta.

As plantas foram coletadas com 15, 30 e 45 dias de exposição às doses de Cd e Zn, período no qual foi observada a ocorrência de eventuais sintomas de toxidez e os efeitos no crescimento das plantas. Ao final de cada período, as plantas foram colhidas e parte aérea (folha e caule) e raízes foram separadas. A parte aérea foi lavada em água deionizada e as raízes foram imersas em solução de ácido clorídrico 10% (v/v) por um minuto e, em seguida, enxaguadas em água deionizada. Em seguida, ambas as partes foram secas em estufa, à temperatura entre 65° e 75°C, até atingir massa constante. O peso da matéria seca foi determinado em balança de precisão (0,01 g) e, em seguida, a matéria seca foi moída em moinho tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm, para ser analisada quimicamente.

2.4 Análise do cádmio e do zinco

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

O controle e a garantia da qualidade dos resultados das análises de Cd e Zn foram assegurados pelo uso de material de referência BCR Lichen proveniente do Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM) em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperação de 75% a 93% para Cd e 70% a 73% para Zn.

O acúmulo de Cd e Zn por planta foi calculado por meio da multiplicação da matéria seca produzida na parte aérea pela concentração do elemento no tecido vegetal.

2.5 Análises enzimáticas

Ao final de cada período, uma amostra de duas folhas medianas, por repetição, foi coletada para extração enzimática. Imediatamente após a coleta, cada amostra foi condicionada em papel alumínio, mergulhada em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenada a -80°C , até as análises.

2.5.1 Obtenção do extrato enzimático

Trezentos miligramas de tecido foliar foram macerados em nitrogênio líquido, com 50% de polivinilpolipirrolidona (PVPP), seguido da adição de 1,5 mL do seguinte tampão de extração: tampão fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7) EDTA 100 mmol L^{-1} , DTT 500 mmol L^{-1} , PMSF 100 mmol L^{-1} e ácido ascórbico 10 mmol L^{-1} . Após a centrifugação a 12.000 RPM, por 30 minutos, a 4°C , o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C , no período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e glutatona redutase (GR).

2.5.2 Determinação da atividade da SOD

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). O meio de reação adicionado ao extrato enzimático é composto por: tampão fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8) metionina 14 mmol L⁻¹, EDTA 0,1 μmol L⁻¹, NBT 75 μmol L⁻¹ e riboflavina 2 μmol L⁻¹. Os tubos contendo o meio de incubação mais amostra foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W, por 10 minutos. Foi utilizado o mesmo meio de reação sem a amostra como controle. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição} = (A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima}) \times 100.$$

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

2.5.3 Determinação da atividade da CAT

A CAT foi determinada segundo descrito por Havir e McHale (1987), em que uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de reação contendo fosfato de potássio 200 mmol L⁻¹ (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5 mmol L⁻¹, incubado a 28°C. A atividade desta enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio.

2.5.4 Determinação da atividade da GR

A atividade da GR foi determinada de acordo com o método estabelecido por Cakmak, Strabac e Marschner (1993), por meio do monitoramento da taxa de oxidação do NADPH pelo decréscimo na absorbância a 340 nm, a cada 15 segundos, durante 3 minutos. O meio de reação a 28°C foi constituído por fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8), glutathiona oxidada 1 mmol L⁻¹ e NAPH 0,075 µmol L⁻¹.

2.6 Análises estatísticas

Os resultados da produção de matéria seca e as concentrações de Cd e Zn na parte aérea e raízes foram submetidos à análise de variância, por meio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2003). As equações de regressão foram determinadas pelo melhor ajuste, pelo programa Table Curve 2D for Windows v. 5.01 (SYSTAT Software Inc),

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção da matéria seca

As plantas de *Gomphrena elegans* expostas às doses crescentes de Cd e Zn na solução apresentaram sintomas de toxidez, apenas na maior dose estudada, sendo caracterizada por uma clorose generalizada, pouco acentuada (Figura 1). A produção de matéria seca da espécie *Gomphrena elegans*, como era esperado, foi maior no tempo de 45 dias (Gráfico 1). Nas quatro doses estudadas, independentemente do tempo, o crescimento da biomassa da parte aérea superou o crescimento da raiz (Gráfico 1).

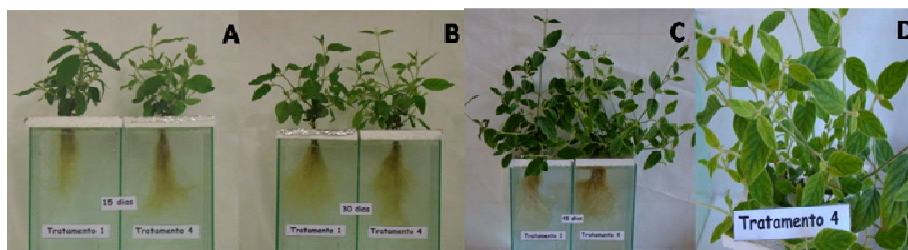


Figura 1 Crescimento da parte aérea e raízes de *Gomphrena elegans*, nos três tempos A (15dias), B (30 dias) e C (45 dias). Controle (à esquerda) e maior dose de Zn/Cd (à direita). Última foto à direita (D) detalhe do sintoma de clorose nas folhas

Em todos os três tempos estudados, não houve um decréscimo relevante da maior dose comparada com o controle, o que demonstra a tolerância dessa espécie à condição de contaminação com Cd e Zn (Gráfico 1). Comparada com outras espécies hiperacumuladoras, que, em geral, apresentam de 3 a 5 g de matéria seca por planta, a espécie *Gomphrena elegans* pode ser classificada como uma herbácea com elevada produção de biomassa, uma vez que a produção da parte aérea na maior dose foi superior a 8 g (Gráfico 1).

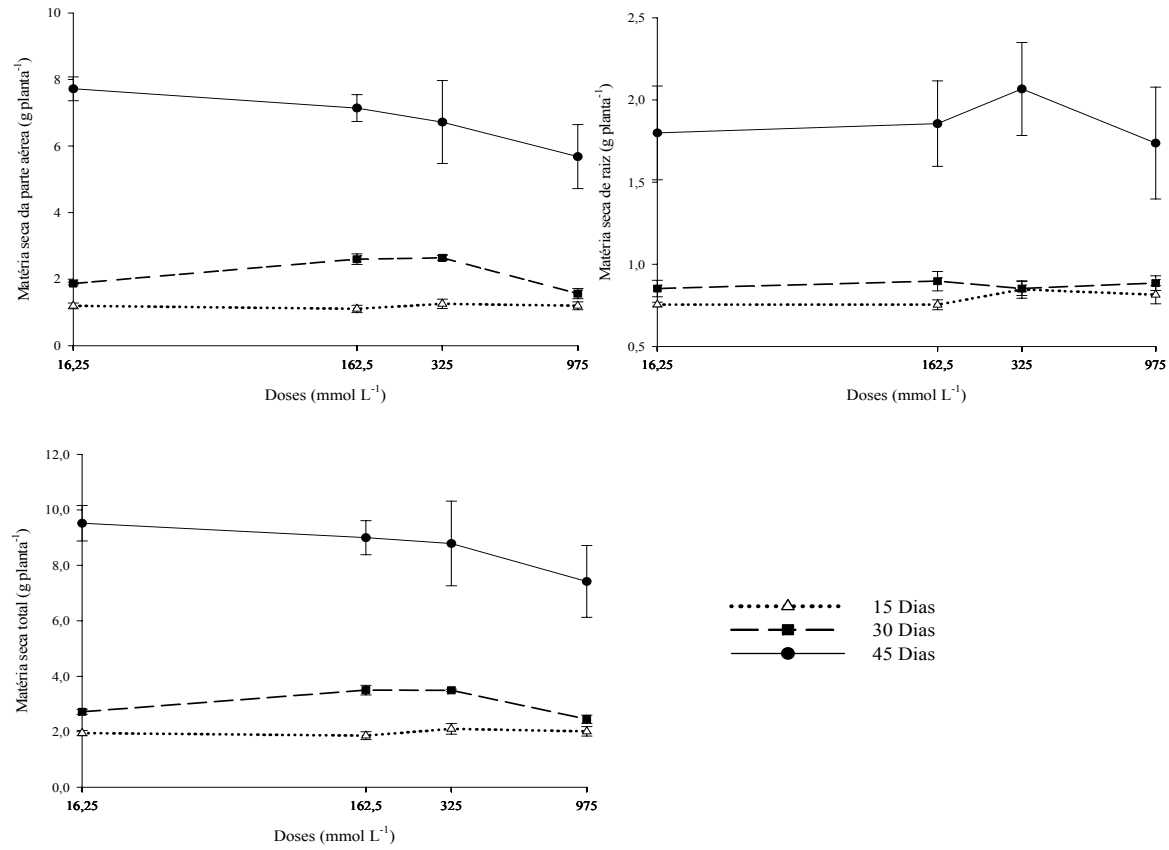


Gráfico 1 Matéria seca (g) referente à parte aérea, raiz e total, nas quatro doses de Zn+Cd, nos tempos de 15, 30 e 45 dias

3.2 Concentração e conteúdo de Cd e Zn na planta

Os teores de Cd e Zn, tanto na parte aérea como na raiz, aumentaram com a elevação das doses e do tempo (Gráfico 2). O teor de Zn na parte aérea aumentou, em média, 4.000 mg kg^{-1} com o aumento das doses, tendo o teor máximo encontrado sido de 5.572 mg kg^{-1} , correspondente à maior dose no tempo de 45 dias. Já o teor de Cd na parte aérea teve um aumento de 127 mg kg^{-1} , em média, devido à elevação das doses e o maior teor encontrado corresponde a 166 mg kg^{-1} . Os valores encontrados permitem classificar essa espécie como hiperacumuladora de Cd e Zn, sustentando o emprego da mesma para fitorremediar áreas contaminadas. Em todas as concentrações de metais adicionadas, as concentrações de Cd e Zn na raiz foram maiores que na parte aérea. Uma vez que o aumento nas doses de Zn não proporcionou o decréscimo do teor de Cd, pode-se afirmar que, possivelmente, esses elementos possuam mecanismos de absorção distintos e não competem pelo mesmo sítio de transporte.

O acréscimo de Cd e Zn na solução proporcionou um maior acúmulo desses elementos nas plantas (Gráfico 3). Apesar de a produção da matéria seca ter variado pouco, o conteúdo de Cd e Zn aumentou em função do incremento da concentração desses elementos nas plantas. Os resultados encontrados para o acúmulo corroboram com os determinados para os teores. Os dois parâmetros são muito importantes para avaliar o potencial de hiperacumulação da planta para que essa seja utilizada na fitorremediação (YANG et al., 2002).

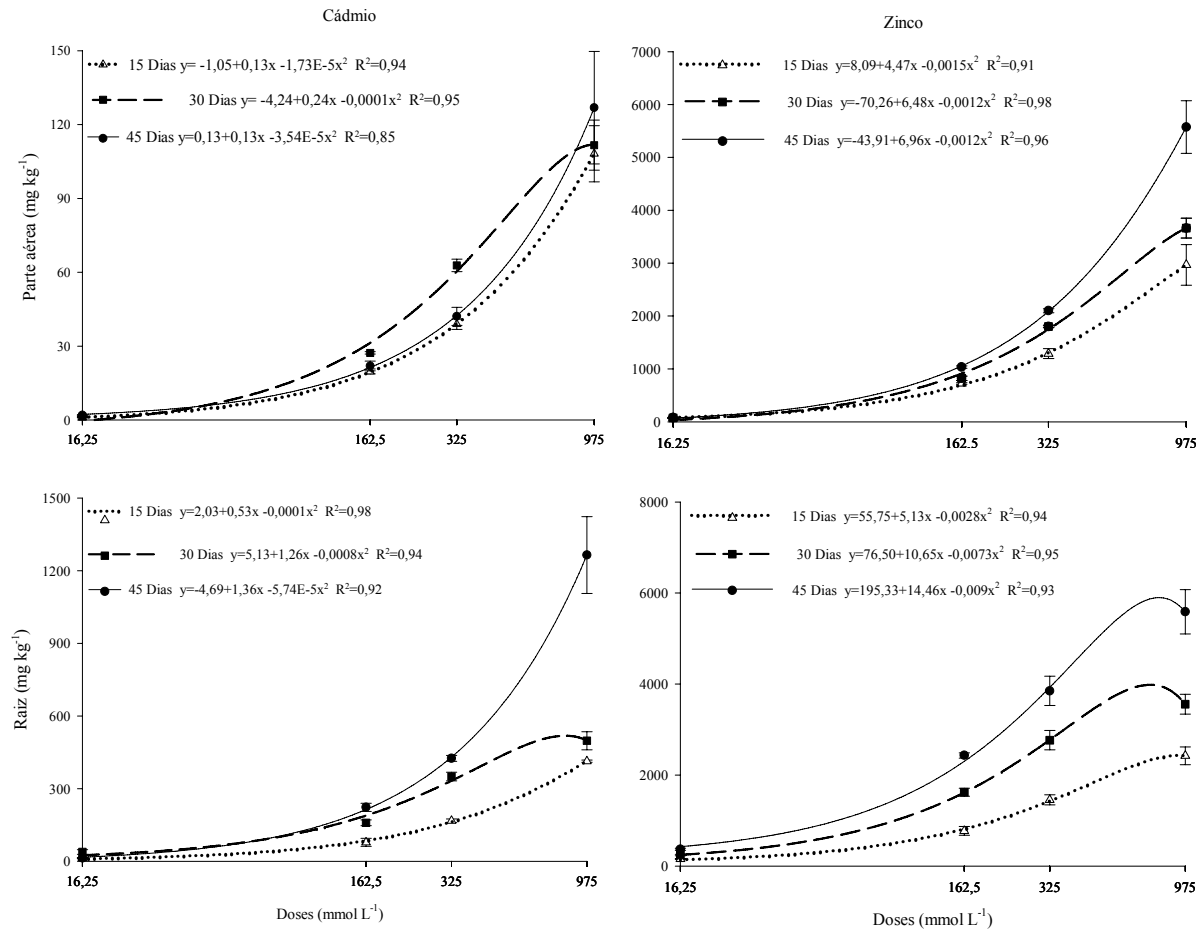


Gráfico 2 Teor de Cd e Zn na parte aérea e na raiz da espécie *Gomphrena elegans* cultivada sob diferentes doses de Zn/Cd, nos tempos 15, 30 e 45 dias

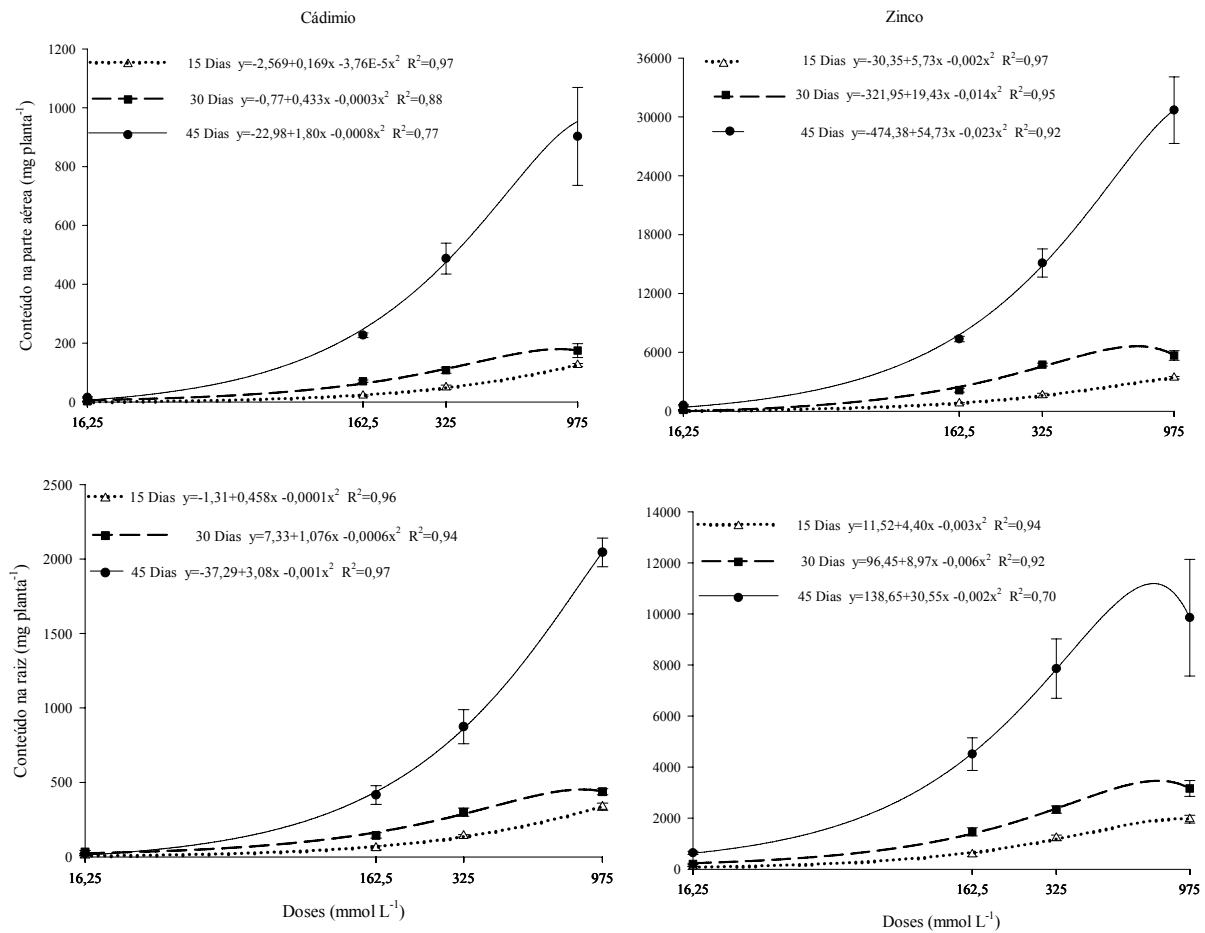


Gráfico 3 Conteúdo acumulado de Cd e Zn na parte aérea e na raiz em *Gomphrena elegans*, nos tempos de 15, 30 e 45 dias

3.3 Atividade das enzimas antioxidantes

A SOD, primeira enzima antioxidante a atuar promovendo dismutação do radical superóxido (O_2^-) a hidróxido de hidrogênio (H_2O_2), apresentou pequena variação em função das doses de Zn/Cd, nos tempos de 15 e 45 dias, com o aumento das doses dos metais. Entretanto, no tempo de 30 dias houve um aumento da produção dessa enzima, em função das concentrações de Zn/Cd (Gráfico 4). O comportamento da atividade dessa enzima também foi avaliado por Scebba et al. (2006), Schickler e Caspi (1999) e Wojcik, Skorzynska-Polit e Tukiendorf (2006), os quais estudaram, respectivamente, as espécies *Miscanthus sinensis*, *Alyssum maritimum* e *Thlaspi caerulescens*, em doses crescentes de Cd e Zn.

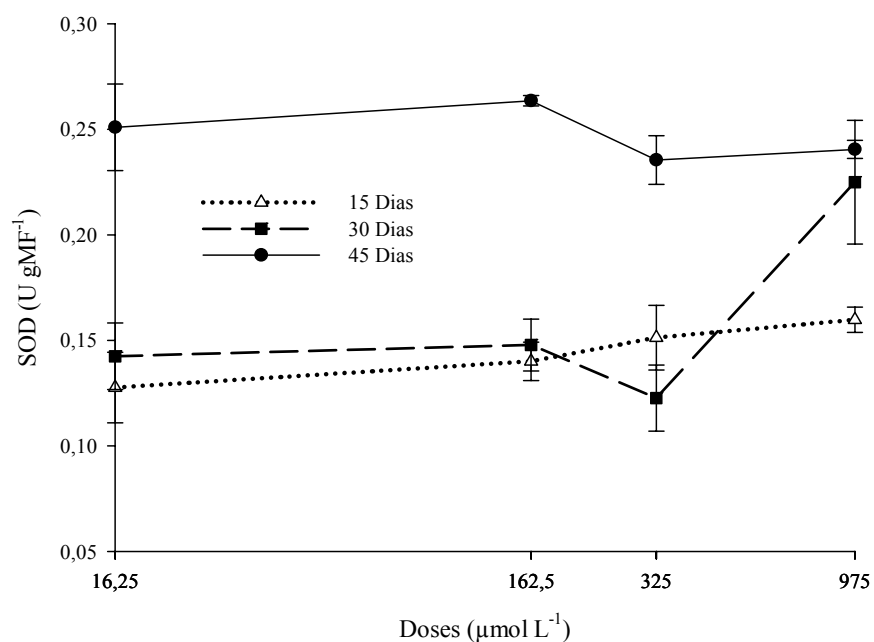


Gráfico 4 Atividade da SOD na parte aérea de *Gomphrena elegans* cultivada em solução nutritiva sob doses crescentes de Zn/Cd

A atividade da enzima CAT decresceu com o aumento das doses de Zn/Cd, para os tempos de 15 e 30 dias. Para o tempo de 45 dias, nas doses de 162,5 e 325 $\mu\text{mol L}^{-1}$, houve um aumento para depois decrescer (Gráfico 5). Possivelmente, essa enzima não é a principal via de degradação do H_2O_2 , produto tóxico resultante da atividade da SOD. Outra via de defesa contra essa espécie reativa de oxigênio é a enzima APX, que pode estar sendo utilizada nessa situação. Na literatura, são encontradas espécies que aumentam a atividade dessa enzima, que as mantêm constante ou que diminuem na presença de metais (GRATÃO et al., 2005).

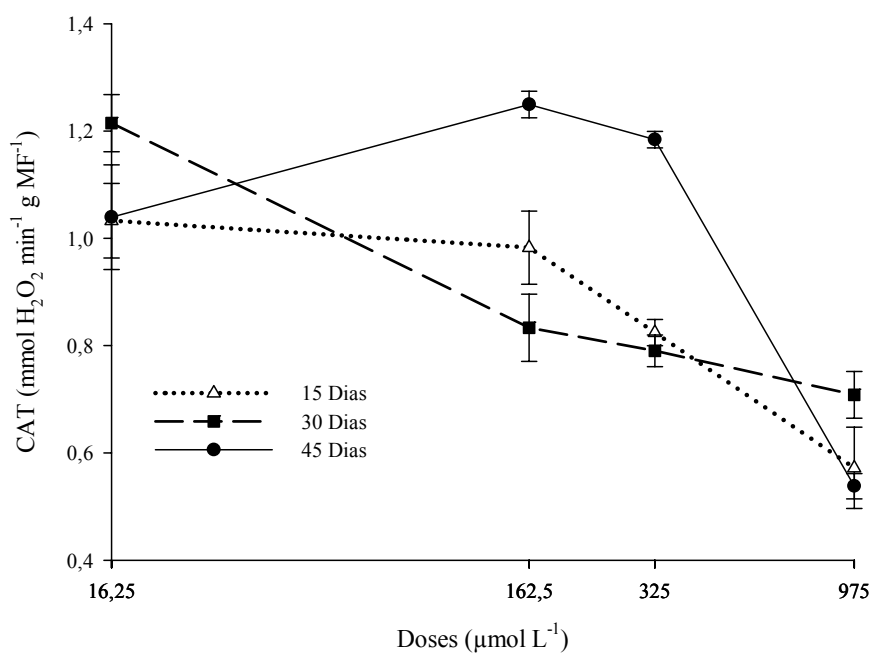


Gráfico 5 Atividade da CAT em doses crescentes de Zn/Cd na parte aérea de *Gomphrena elegans*

Entretanto, em estudos com outras espécies hiperacumuladoras de Cd e Zn, como *Sedum alfredii* e *Thlaspi caerulescens*, foram obtidos resultados semelhantes aos aqui encontrados para o comportamento da CAT na parte aérea (JIN, X. F. et al., 2008; WOJCIK; SKORZYNSKA-POLIT; TUKIENDORF, 2006).

A enzima GR, responsável pela taxa GSH/GSSG na célula, apresentou um aumento acentuado da sua atividade no tempo de 30 e 45 dias, com a elevação das doses dos metais na solução. Aos 15 dias houve diminuição da atividade da GR (Gráfico 6).

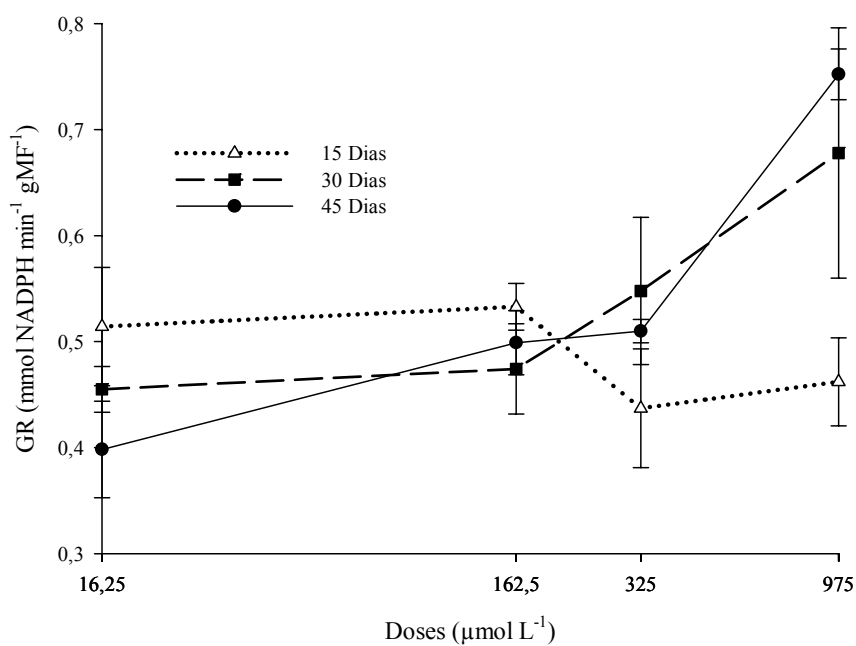


Gráfico 6 Atividade da GR em doses crescentes de Zn/Cd na parte aérea de *Gomphrena elegans*

O aumento da atividade da GR, juntamente a diminuição da CAT e possível aumento da enzima APX, pode ser justificado pela rota metabólica de produção das enzimas antioxidantes, em que as enzimas GR e APX são diretamente dependentes (Figura 2).

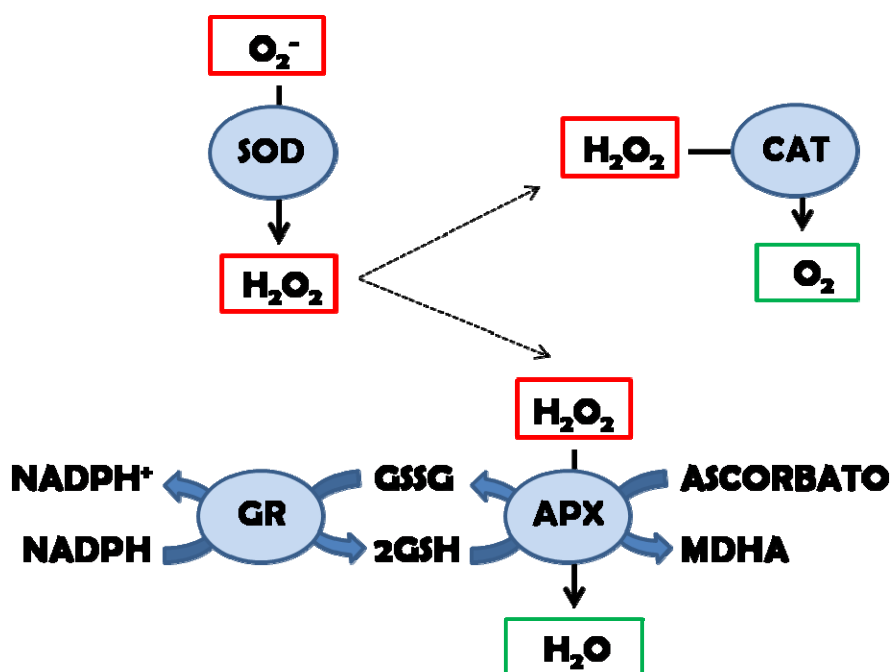


Figura 2 Rota das principais enzimas antioxidantes (GR, APX, SOD e CAT). (Adaptado de GRATÃO et al., 2005)

Como consequência do comportamento da atividade enzimática da GR e com base na função exercida pela mesma, é possível afirmar que ocorreu um aumento da produção de GSH dentro da célula nas condições apresentadas. Esse resultado sugere que um dos mecanismos relacionados ao acúmulo de Cd e Zn na espécie *Gomphrena elegans* esteja relacionado à disponibilidade da GSH, como, por exemplo, por meio da complexação desses metais com quelantes,

como as fitoquelatinas (FORNAZIER et al., 2002). As fitoquelatinas contribuem para a ligação do metal, reduzindo sua concentração livre no citosol, limitando sua reatividade e solubilidade. A síntese dessas moléculas é catalisada pela enzima fitoquelatina sintase e tem como substrato o tripeptídeo glutationa (GSH; Glu-Cys-Gly) (PAL; RAÍ, 2009). Outras espécies hiperacumuladoras de Cd e Zn também aumentam a produção de GSH na presença de doses crescentes desses elementos (CHAO et al., 2008).

Embora as espécies hiperacumuladoras possuam mecanismos fisiológicos relacionados ao acúmulo de metais que não permitem a permanência desses elementos quimicamente livres no citosol, a produção das enzimas antioxidantes nessas espécies demonstra a eficiência das mesmas em neutralizar o efeito do metal que inevitavelmente venha a ficar livre no citosol. Consequentemente, a atividade dessas enzimas é essencial em espécies hiperacumuladoras. Entretanto, a atuação dessas ocorre de maneira distinta, dependendo da espécie estudada, dos elementos, bem como de suas concentrações e do tempo de exposição (GRATÃO et al., 2005).

4 CONCLUSÃO

A espécie *Gomphrena elegans* utiliza o sistema enzimático antioxidante para acúmulo e tolerância dos elementos Cd e Zn. Dentre as enzimas antioxidantes se destaca a atividade da superóxido dismutase e da glutathione redutase.

REFERÊNCIAS

- BAKER, A. J. M. et al. The evolutionary basis of cadmium tolerance in higher plants. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENVIRONMENTAL CONTAMINATION, 4., 1990, Barcelona. **Anais...** Edinburgh: CEP Consultants, 1990. p. 23-29.
- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.
- BROWN, S. L. et al. Zinc and cadmium uptake by hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* and metal tolerant *Silene vulgaris* grown on sludge amended soils. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 29, n. 6, p. 1581-1585, Mar. 1995.
- CAKMAK, I.; STRABAC, D.; MARSCHNER, H. Activities of hydrogen peroxide-scavenging enzymes in germination wheat seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 44, n. 260, p. 127-132, 1993.
- CARNEIRO, A. M.; IRGANG, B. E. Origem e distribuição geográfica das espécies ruderais da Vila de Santo Amaro, General Câmara, Rio Grande do Sul. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 60, n. 2, p. 175-188, jul./dez. 2005.
- CARNEIRO, M. A. C.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Comportamento de espécies herbáceas em misturas de solo com diferentes graus de contaminação com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 11, p. 1629-1638, nov. 2002.
- CHAO, Y. et al. Differential generation of hydrogen peroxide upon exposure to zinc and cadmium in the hyperaccumulating plant specie (*Sedum alfredii* Hance). **Journal of Zhejiang University Science B**, [S.l.], v. 9, n. 3, p. 243-249, 2008.

CHAOU, A. et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Amsterdam, v. 127, p. 139-147, 1997.

FARSHIAN, S.; KHARA, J.; MALEKZADEH, P. Effect of arbuscular mycorrhizal (*G. etunicatum*) fungos on antioxidant enzymes activity under zinc toxicity in Lettuce plants. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [S.l.], v. 10, n. 11, p. 1865-1869, 2007. ISSN 1028-8880.

FERREIRA, D. F. **Programa de análises estatísticas (Statistical Analysis Software) e planejamento de experimentos**. Lavras: UFLA, 2003.

FORNAZIER, R. F. et al. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activities in sugar cane. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 45, n. 1, p. 91-97, 2002.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I. occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 59, n. 2, p. 309-314, Feb. 1977.

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

GZYL, J.; RYMER, K.; GWÓZDŹ, E. A. Differential response of antioxidant enzymes to cadmium stress in tolerant and sensitive cell line of cucumber (*Cucumis sativus* L.). **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 56, n. 4, p. 723-727, 2009.

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

IQBAL, N. et al. Photosynthesis, growth and antioxidant metabolism in Mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in cadmium tolerance. **Agricultural Sciences in China**, [S.l.], v. 9, n. 4, p. 519-527, 2010.

JIN, X. et al. Response of antioxidant enzymes, ascorbate and glutathione metabolism towards Cadmium in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* H. **Environmental Toxicology**, New York, v. 23, p. 517-529, 2008.

JIN, X. F. et al. Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 997-1006, 2008.

LEITE, C. B. **Avaliação do potencial alelopático de *Gomphrena elegans* Mart (Amaranthaceae)** - uma espécie aquática nativa de Mato Grosso do Sul. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)–Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Dourados, 2009.

LYUBENOVA, L. et al. Response of antioxidant enzymes in *Nicotiana tabacum* clones during phytoextraction of heavy metals. **Environment Science Polluted Research**, [S.l.], v. 16, p. 573-581, 2009.

MISHRA, S. et al. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 44, p. 25-37, 2006.

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

MUSSURY, R. M. et al. Caracterização morfoanatômica de plântulas de *Gomphrena elegans* Mart. (Amaranthaceae). **Acta Science Biology**, Maringá, v. 28, n. 2, p. 87-93, Apr./June 2006.

MUSSURY, R. M. et al. Morfoanatomia foliar comparada de *Gomphrena elegans* Mart. e *G. vaga* Mart. (Amaranthaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 3, p. 43-50, 2008.

NOUAIRI, I. et al. Antioxidant defense system in leaves of Indian mustard (*Brassica juncea*) and rape (*Brassica napus*) under cadmium stress. **Acta Physiology Plant**, [S.l.], v. 31, p. 237-247, 2009.

ODJEGBA, V. J.; FASIDI, I. O. Changes in antioxidant enzyme activities in *Eichhornia crassipes* (Pontederiaceae) and *Pistia stratiotes* (Araceae) under heavy metal stress. **Revista Biologia Tropical**, Costa Rica, v. 55, n. 3/4, p. 815-823, Sept./Dec. 2007.

PAL, R.; RAI, J. P. N. Phytochelatin: peptides involved in heavy metal detoxification. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 3, p. 945-963, Feb. 2009.

PHAENARK, C. et al. Cd and Zn accumulation in plants from the Padaeng Zinc Mine area. **International Journal of Phytoremediation**, London, v. 11, n. 5, p. 479-495, July 2009.

RADIC, S. et al. Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, p. 336-342, 2010.

SAFFAR, A.; NAJJAR, B.; MIANABADI, M. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Biological Sciences**, Melbourne, v. 9, n. 1, p. 44-50, 2009. ISSN 1727-3048.

SCEBBA, F. et al. Cadmium effects on growth and antioxidant enzymes activities in *Miscanthus sinensis*. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 50, n. 2, p. 688-692, 2006.

SCHICKLER, V.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 39-44, 1999. ISSN 0031-9317.

SCHNEIDER, J. et al. Antimicrobial activity “in vitro” roots of the two species of the *Amaranthaceae* family (*Pfaffia glomerata* e *Gomphrena elegans*). **Interbio**, [S.l.], v. 2, n. 1, 2008. ISSN 1981-3775.

SHI, G. et al. Silicon alleviates cadmium toxicity in peanut plants in relation to cadmium distribution and stimulation of antioxidative enzymes. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 61, p. 45-52, 2010.

SUN, R.; JIN, C.; ZHOU, Q. Characteristics of cadmium accumulation and tolerance in *Rorippa globosa* (Turcz.) Thell., a species with some characteristics of cadmium hyperaccumulation. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 61, p. 67-74, 2010.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Test methods for evaluating soil waste, physical/chemical methods SW-846**. 3. ed. Washington, 1995. Disponível em: <<http://www.epa.gov/SW-846/3051a.pdf>>. Acesso em: 29 jul. 2010

XU, W. et al. Cd uptake in rice cultivars treated with organic acids and EDTA. **Journal of Environmental Sciences**, New York, v. 22, n. 3, p. 441-447, 2010.

WATANABE, M. E. Phytoremediation on the brink of commercialization. **Environmental Science & Technology**, v. 31, p. 182A-186A, 1997.

WOJCIK, M.; SKORZYNSKA-POLIT, E.; TUKIENDORF, A. Organic acids accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. **Plant Growth Regulation**, New York, v. 48, p. 145-155, 2006.

YADAV, S. K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 76, p. 167-179, 2010.

YANG, X. E. et al. *Sedum alfredii* H: a new Zn hyperaccumulating plant first found in China. **Chinese Science Bulletin**, Beijing, v. 47, n. 19, p. 1634-1637, Oct. 2002.

YING, R. et al. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplastin Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 81-87, 2010.