



TEREZINHA ALVES TOLENTINO

**ANÁLISE DA TOXIDEZ DE Cd e Pb EM
Brachiaria brizantha UTILIZANDO MÉTODOS
QUIMIOMÉTRICOS E MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

LAVRAS – MG

2014

TEREZINHA ALVES TOLENTINO

**ANÁLISE DA TOXIDEZ DE Cd e Pb EM *Brachiaria brizantha*
UTILIZANDO MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

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

Orientador

Dr. Ruy Carvalho

LAVRAS – MG

2014

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

Tolentino, Terezinha Alves.

Análise da toxidez de Cd e Pb em *Brachiaria brizantha*
utilizando métodos quimiométricos e microscopia eletrônica de
transmissão / Terezinha Alves Tolentino. – Lavras: UFLA, 2014.
80 p. : il.

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

Orientador: Ruy Carvalho.

Bibliografia.

1. Cristais. 2. PCA. 3. Metais pesados. 4. Teor. 5. Translocação.
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 546.66

TEREZINHA ALVES TOLENTINO

**ANÁLISE DA TOXIDEZ DE Cd e Pb EM *Brachiaria brizantha*
UTILIZANDO MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS E MICROSCOPIA
ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO**

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

APROVADA em 17 de fevereiro de 2014.

Dr. Walclee de Carvalho Melo UFLA

Dra. Claudia Regina Gontijo Labory UFLA

Dr. Ruy Carvalho

Orientador

LAVRAS – MG

2014

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, força e esperança.

À minha família, por todo amor e incentivo ao longo de toda a caminhada.

Ao professor Dr. Ruy Carvalho, pela orientação, apoio e confiança na execução deste trabalho.

Aos colegas de trabalho Alexandre e Maíra, especialmente ao Alexandre, pela paciência, atenção, apoio e ensinamentos transmitidos durante todos os momentos da realização deste trabalho.

À Ana Rosa e ao Departamento de Ciência do Solo, pela parceria e disposição no auxílio dos experimentos.

Aos laboratórios de Microscopia Eletrônica e de Análise Foliar.

À Claudia Labory, pelo carinho, amizade, disposição e grande colaboração para a realização das análises ultraestruturais, além dos eventos gastronômicos, turísticos e inúmeros gestos de generosidade. A você a minha eterna gratidão!

Aos membros da banca, Walclée, Claudia e Marcele, obrigada por terem aceitado o convite!

À Janaira e Natália, amigas de república, agradeço pela amizade, incentivo e pelos inesquecíveis e suaves momentos de café e prosa.

À Sara, pela grande ajuda na organização do coffee break.

Aos amigos Letícia Garcia, Carol Guimarães, Letícia Novais e Ramom, obrigada por todos os momentos que passamos juntos.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

RESUMO GERAL

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos de contaminação de doses crescentes de cádmio (0,00; 0,025; 0,10; 0,5 e 1,00 mg.L⁻¹) e chumbo (0,00; 0,25; 1,00; 5,00 e 10,00mg.L⁻¹) no teor e na translocação de nutrientes e de matéria seca em plantas de *Brachiaria brizantha*, empregando métodos quimiométricos, por meio da análise em componentes principais (PCA). Para as plantas submetidas às maiores doses dos metais pesados (1,00 mg.L⁻¹ de Cd e 10,00 mg.L⁻¹ de Pb), avaliaram-se também os efeitos ultraestruturais, utilizando microscópio eletrônico de transmissão (MET). As plantas foram cultivadas em solução nutritiva de Hoagland, em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo e processadas no Departamento de Química, ambos na Universidade Federal de Lavras (UFLA). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições, sendo o período experimental de 90 dias. Os maiores teores de Cd e Pb foram encontrados nas raízes, devido à formação de complexos insolúveis. De modo geral, as menores doses de Cd e Pb aumentaram os teores de N, P, K, S e Cu (sinergismo). O tratamento controle apresentou os maiores teores de Ca, indicando que houve redução com a aplicação de doses dos metais. Os teores de K tiveram aumento proporcional às doses de metal pesado. Tanto Cd como Pb induziram à redução nos índices de translocação para P, Zn, Cu e Fe e ao aumento para N, S, Ca, Mg e Mn. Mesmo apresentando altos teores radiculares, Cd e Pb translocaram para a parte aérea. Os metais pesados reduziram o peso de matéria seca de raiz. Danos devido à contaminação de Cd e Pb foram mostrados nas imagens ultraestruturais, como deformações na parede celular, depósito de material eletrodense e a presença de ráfides nas raízes. Nas folhas, verificaram-se alterações nos cloroplastos e o processo de vacuolização.

Palavras-chave: Cristais. PCA. Metais pesados. Teor. Translocação.

GENERAL ABSTRACT

This study was conducted with the objective to evaluate the contamination effects of increasing doses of cadmium (0.00, 0.025, 0.10, 0.5 and 1.00 mgL⁻¹) and lead (0.00, 0.25, 1.00, 5.00 and 10.00 mg.L⁻¹) on the content, translocation of nutrients and dry matter in *Brachiaria brizantha* plants, using chemometric methods, by principal components analysis (PCA). For the plants exposed to higher doses of heavy metals (1.00 mgL⁻¹ Cd and 10.00 mg.L⁻¹ Pb), ultrastructural effects were also evaluated, using a transmission electron microscope (TEM). The plants were grown in Hoagland nutrient solution, in a greenhouse at the Department of Soil Science and processed in the Chemistry Department. The experimental design was completely randomized, with four replications, and the trial period was 90 days. The highest levels of Cd and Pb were found in the roots, due to the formation of insoluble complexes. In general, the smallest doses of Cd and Pb increased the levels of N, P, K, S and Cu (synergism). The control treatment showed the highest levels of Ca, indicating that there was a reduction, with the application of doses of the metals (antagonism). The K content had increased proportional to the dose of heavy metal. Both Cd and Pb induced a reduction in the translocation rates of P, Zn, Cu and Fe, and an increase in N, S, Ca, Mg and Mn. Even showing high root contents, Cd and Pb translocated to the aerial part. Heavy metals have reduced the weight of dry matter of root. Damage due to contamination of Cd and Pb, ultrastructural images showed deformations in the cell wall, deposit of electron-dense materials and the presence of raphides in the roots. In the leaves, changes in chloroplasts and in the vacuolization process were found. Raphids and the increase in the number of vacuoles are part of the mechanisms for metal detoxification.

Keywords: Contents. Crystals. Heavy metals. PCA. Translocation.

LISTA DE FIGURAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

- Figura 1 Teor de nutrientes e de Cd (R - raiz e F - parte aérea; doses de Cd: 0-0,00; 1-0,025; 2-0,10; 3-0,50; 4-1,00 mgL⁻¹) 36
- Figura 2 Translocação de nutrientes e de Cd (T - translocação da raiz para parte aérea; doses de Cd: 0-0,00; 1-0,025; 2-0,10; 3-0,50; 4-1,00 mgL⁻¹)..... 40

ARTIGO 2

- Figura 1 Teor de nutrientes e de Pb (R - raiz e F - parte aérea; doses de Pb: 0-0,00; 1-0,25; 2-1,00; 3-5,00 e 4- 10,00 mg.L⁻¹)..... 53
- Figura 2 Translocação de nutrientes e de Pb (T - translocação da raiz para a parte aérea; doses de Pb: 0-0,00; 1-0,25; 2-1,00; 3-5,00; 4-10,00 mgL⁻¹)..... 56

ARTIGO 3

- Figura 1 Ultraestrutura da célula de raiz do tratamento controle de *Brachiaria brizantha* 69
- Figura 2 Efeitos de Cd na ultraestrutura de células de raízes *Brachiaria brizantha*. (C-F). Plantas contaminadas com 1,00 mgL⁻¹ de Cd(NO₃)₂..... 69
- Figura 3 Efeitos de Pb na ultraestrutura de células de raízes de *Brachiaria brizantha*(A-F). Plantas contaminadas com 10,00 mg.L⁻¹ de Pb(NO₃)₂. Setas indicam acúmulo de material eletrodenso (B), vacuolização (C, D) e cristais ráfides (E, F) 70
- Figura 4 Efeitos de Cd (B-D) e Pb (E, F) na ultraestrutura de células de folhas de *Brachiaria brizantha*. (A) célula do tratamento controle. (B-D) plantas contaminadas com 1,00 mgL⁻¹ de Cd(NO₃)₂. (E, F) plantas contaminadas com 10,00 mgL⁻¹ de Pb(NO₃)₂. Setas indicam degradação (B, D) e vacuolização (C) 72

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	9
1	INTRODUÇÃO	9
2	REFERENCIAL TEÓRICO	11
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
	REFERÊNCIAS	22
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	29
	ARTIGO 1 Especificação do Cd em <i>Brachiaria brizantha</i> e biodisponibilidade dos macro e micronutrientes	29
	ARTIGO 2 <i>Brachiaria brizantha</i> submetida a concentrações de pb: tolerância e biodisponibilidade dos elementos essenciais	48
	ARTIGO 3 Análise ultraestrutural de <i>Brachiaria brizantha</i> sob estresse de cádmio e chumbo	63

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A contaminação por metais pesados é uma das maiores preocupações nos dias atuais. Esta preocupação existe pelo fato de estudos comprovarem que estes, quando em níveis acima dos permitidos, causam problemas tanto ao meio ambiente como para seres humanos, principalmente através da cadeia alimentar.

Os metais pesados se caracterizam por apresentarem baixa solubilidade e densidade acima de 5 g.dm^{-3} . Metais como cádmio (Cd) e chumbo (Pb) podem ser bioacumulados pelas plantas e causar efeitos deletérios ou ainda algumas plantas são capazes de apresentar tolerância a estes metais. Em humanos, a contaminação por metais pesados causa diversas doenças, como câncer, problemas renais, neurológicos e osteomalacia.

Plantas cultivadas em ambiente contaminado por metais pesados apresentam distúrbios nutricionais, como alteração nos teores e translocação de nutrientes que influenciam o desenvolvimento da planta. Técnicas de microscopia eletrônica têm sido empregadas para observar as alterações causadas em nível subcelular. Dentre os danos causados, podem ser citados vacuolização e dilatação dos envelopes nucleares (ZHENG et al., 2012), desintegração do citoplasma (GZYL; PRZYMUSINSKI; GWOZDZ, 2009), perda das configurações celulares, rompimento das paredes celulares, desaparecimento dos conteúdos celulares (YU et al. 2011) e mudanças estruturais de cloroplastos, mitocôndrias e núcleos (VITORIA; CUNHA; AZEVEDO, 2006).

A espécie *Brachiaria brizantha*, pertencente à família Poacea, ocupa cerca de 50% das áreas de pastagens no Brasil. É também utilizada em cultivos

consorciados e tem grande importância econômica e ambiental, pelo fato de ser utilizada em recuperação de áreas degradadas.

A técnica de solução nutritiva é inerte e necessita apenas dos nutrientes solubilizados e de oxigênio. Em se tratando de pesquisa, é a preferida para o estudo da nutrição mineral de plantas, por permitir o estudo criterioso da interferência de elementos não essenciais às plantas.

Assim, nesta dissertação, organizada em três artigos, os objetivos foram: avaliar a toxicidade de cádmio e chumbo no teor, na translocação de nutrientes e na matéria seca de *Brachiaria brizantha* cultivada em solução nutritiva e avaliar danos ultraestruturais causados por esses metais em *Brachiaria brizantha*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados

Metais pesados são definidos como um grupo de metais cuja densidade atômica é maior que 5 g/dm^3 e que estão associados à poluição ambiental e à toxicidade aos seres vivos (FERNANDES, 2006). Quando encontrados em uma concentração inferior a 0,1%, são denominados elementos-traços.

Normalmente, os metais pesados fazem parte da composição natural dos solos e das rochas, ocorrendo em baixas concentrações e não oferecendo riscos aos animais e às plantas (NELLESSEN; FLETCHER, 1993). Embora o aumento na concentração dos metais pesados possa ser também devido a processos naturais, estes costumam ser vagarosos, comparados às atividades humanas que, geralmente, são extremamente rápidas e acumulativas (PAIM et al., 2006). As atividades antrópicas que contribuem com o aumento rápido da concentração de metais pesados no meio ambiente estão associadas às operações de mineração, ao tratamento de esgotos e às atividades industriais e agrícolas (GALLEGO et al., 2012).

Presentes ou adicionados ao solo podem entrar na cadeia alimentar ou acumular no solo, no ar, nas águas superficiais e nas águas subterrâneas. Os metais pesados mais perigosos são As, Hg, Cd, Zn, Cu, Pb e Ni que, em excesso no solo, podem reduzir a produção das plantas ou degradar a qualidade dos produtos alimentares (BOSE; BHATTACHARYYA, 2008; KABATA-PENDIAS, 2011). Estes elementos podem ser acumulados no tecido vegetal e, quando ingeridos por animais, causam doenças agudas ou crônicas, incluindo diversos tipos de câncer (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2013)

Portanto, as propriedades comportamentais desses elementos em solos são um problema atual em estudos ambientais (KABATA-PENDIAS, 2004).

Esclarecer a migração desses elementos nos sistemas vegetais e sua acumulação em culturas é necessário para a produção segura de alimentos e, portanto, para a saúde humana (LI et al., 2010).

2.1.1 Chumbo

O chumbo é encontrado no ambiente principalmente como o íon Pb^{+2} . Sua densidade é de $11,34 \text{ g.cm}^{-3}$ (MALAVOLTA, 2006) e é, provavelmente, o contaminante mais comum no meio ambiente. É um metal de cor cinza-azulada, encontrado em pequenas quantidades na crosta da Terra (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2013). Seu aumento pode ocorrer por fontes naturais e antrópicas (LEONZIO; PISANI, 1987), sendo as fontes antrópicas as que contribuem com aumentos substanciais nos níveis de chumbo em áreas de atividade de mineração e refino de minérios (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2013).

A maior utilização mundial de Pb é para baterias chumbo-ácidas. Além disso, ele é utilizado em soldas, ligas, cabos, produtos químicos, cosméticos e tintas, entre outras finalidades (KABATA-PENDIAS, 2011) e dispositivos para proteger os raios X (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2013)

A contaminação em solos por este metal pode causar uma série de problemas ambientais, como toxidez da vegetação e dos animais e contaminação de águas subterrâneas (HUANG et al., 1997). O tempo de resistência no solo é extremamente longo, devido à sua baixa solubilidade e pouca modificação por atividade microbiana, o que tem permitido a sua presença na cadeia solo-planta-animal (MALAVOLTA, 1980), constituindo um grande problema ambiental (ZHENG et al., 2011).

A entrada via cadeia alimentar e a inalação do pó do solo são as principais fontes de contaminação de Pb (KABATA-PENDIAS, 2011). A toxicidade de Pb tem sido associada com o dano de alguns processos bioquímicos em mamíferos. Nos seres humanos, está associado ao desenvolvimento de problemas no sistema nervoso (LOPEZ et al., 2007).

2.1.2 Cádmio

O cádmio encontra-se, geralmente, como um mineral combinado com outros elementos, tais como oxigênio (óxido de cádmio), cloro (cloreto de cádmio) ou enxofre (sulfato de cádmio, sulfureto de cádmio). Todos os solos e rochas, incluindo carvão e fertilizantes minerais, contêm alguma quantidade de cádmio (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2013).

Níveis naturais de Cd na atmosfera, em solos agrícolas e nas águas subterrâneas, geralmente, são baixos. No entanto, áreas localizadas próximo às indústrias de fundições de metais, minas, composto de lixo de lodo de esgoto e, em alguns casos, fertilizantes fosfatados (SOARES et al., 2005) ou indústrias que utilizam Cd, podem resultar em níveis mais elevados de Cd. Esses níveis também podem atingir as culturas através de água ou solo contaminados (WESTFALL et al., 2005).

A grande preocupação em torno deste metal justifica-se pelo fato de o cádmio ser altamente tóxico, mesmo em baixas concentrações (GALLEGO et al., 2012). Trata-se de uma substância cancerígena que afeta o sistema cardiovascular, bem como o gastrointestinal, o neurológico, o renal e as vias respiratórias (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2013). Nas plantas contaminadas por cádmio podem ocorrer inibição da germinação, alongamento da raiz e morte (WANG et al., 2008). De

acordo com Costa et al. (2007), em estudo de fracionamento de solos, o Cd apresentou grande mobilidade, podendo representar maior risco ambiental, principalmente em solos com pouca matéria orgânica, baixos teores de óxidos de ferro e com baixa capacidade de troca catiônica.

2.2 Toxicidade por metais pesados em plantas

O processo de absorção dos nutrientes do solo pelas plantas não discrimina quais elementos específicos devem ser absorvidos, pelo fato de a absorção da água e de sais através das raízes ser um processo essencialmente físico, dependente das condições termodinâmicas da água e da solução de íons que constitui o solo (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Assim, as plantas podem absorver elementos que não são essenciais ou, mesmo, tóxicos, quando estas se desenvolvem em ambiente contaminado (KABATA-PENDIAS, 2004).

A absorção de elementos tóxicos pode também ser explicada pelo fato de que os elementos podem apresentar estruturas iônicas semelhantes, como no caso do zinco, benéfico e cádmio, tóxico (GREEN; TIBBETT, 2008).

Em pesquisas realizadas por diversos autores constatou-se que a absorção de metais pesados pelas plantas pode ser desfavorável para o desenvolvimento de algumas culturas (SIQUEIRA; POUYÚ; MOREIRA, 1999; BERTON et al., 2006). Em estudos com milho cultivado em solo contaminado por cádmio e zinco foram relatados sintomas visuais de toxidez de Cd apresentando clorose, encarquilhamento e enrolamento de folhas. Para Zn, os sintomas tóxicos mais comuns foram clorose internerval e marginal, associada à necrose no ápice e nas margens das folhas (CUNHA et al., 2008).

Em estudos com *Eucalyptus muculata* e *E. urophylla* foram relatados sintomas de fitotoxicidade de cádmio, murchamento de folhas, clorose

interneval, morte das gemas apicais e redução do crescimento das folhas (SOARES et al., 2005).

Em muitos trabalhos foram demonstradas desordens nutricionais, como efeito da presença de metais pesados. Nesse contexto, pode ser citado o trabalho de Cannata et al.(2013). Em estudos com feijoeiro, a adição de chumbo em solução nutritiva reduziu o acúmulo de todos os nutrientes em todos os compartimentos. Já Bertoli et al. (2011) verificaram que doses de Pb em tomateiro reduziram os teores de potássio na parte aérea, de enxofre nas raízes e de zinco nos frutos

No entanto, algumas plantas apresentam mecanismos de tolerância a metais pesados. Baseado nisso, diversos pesquisadores têm direcionado seus trabalhos a uma técnica conhecida como fitorremediação, por representar uma forma de tratamento de áreas contaminadas por metais pesados, no intuito de minimizar os impactos causados pela dispersão desses metais no solo (CUNNINGHAM; OW, 1996).

2.3 Cristais de oxalato em plantas

Cristais de oxalato de cálcio ocorrem em diferentes formas em todo o reino vegetal. Eles são classificados em vários tipos, sendo ráfides e drusas os mais conhecidos. Ráfides são feixes de agulha que representam o mais comum tipo de cristal em monocotiledôneas. Por outro lado, drusas são agregados mais ou menos esféricos de cristais que ocorrem em apenas algumas famílias de monocotiledôneas (PRYCHID; JABAILY; RUDALL, 2008).

Cristais de oxalato foram observados na maioria dos tecidos de plantas e de órgãos, como um depósito intracelular. Cristais intracelulares ocorrem frequentemente dentro dos vacúolos de células especializadas para a formação de cristais, chamadas cristal idioblastos (FRANCESCHI; NAKATA, 2005).

Idioblastos são células especializadas que não sofrem divisões e são muito grandes, quando comparadas às células vizinhas. Os cristais são considerados substâncias ergástricas, ou seja, substâncias formadas como produto final de algum metabolismo da célula (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Os principais componentes desses cristais são simples, mas os cristais resultantes podem ser complexos na sua morfologia. Cristais em plantas são formados a partir de ácido oxálico sintetizado endogenamente e combinado com o cálcio do ambiente. O ácido oxálico ($C_2H_2O_4$) é o mais simples dos ácidos dicarboxílicos e o composto orgânico mais altamente oxidado formado em plantas (FRANCESCHI; NAKATA, 2005).

O cálcio é abundante no ambiente natural no qual a maioria das plantas cresce, e desempenha um papel importante para o crescimento e o desenvolvimento (CUADRA; HERMANN, 2013).

A função dos cristais pode ser variável, dependendo da quantidade, do tamanho, da forma e da posição na planta (MAZEN; ZHANG; FRANCESCHI, 2004).

Existem diferentes explicações para a acumulação de cristais de cálcio oxalato. A primeira, e amplamente aceita, está relacionada à concentração intracelular no equilíbrio do cálcio. Um excesso interfere no metabolismo celular. Um meio viável para reduzir a sua concentração é quelar o cálcio sob a forma de um oxalato, particularmente nas espécies que, devido às condições ambientais, apresentam altas taxas de transpiração (NAKATA, 2003). Outra hipótese considera que os cristais são envolvidos na defesa contra herbívoros. O sequestro de íons metálicos potencialmente tóxicos (associados à tolerância a metais pesados), o equilíbrio de íons e o suporte tecidual são outras funções atribuídas para a formação de oxalato de cálcio (MAZEN; ZHANG; FRANCESCHI, 2004; FRANCESCHI; NAKATA, 2005; PYLRO et al., 2013).

2.4 A espécie *Brachiaria brizantha*

A espécie *Brachiaria brizantha*, família Poaceae, conhecida popularmente como braquiarião, é uma das gramíneas mais cultivadas no Brasil, ocupando cerca de 50% das áreas de pastagens. Tem origem africana, sendo uma importante forrageira tropical em diversas regiões da Ásia, da Austrália e da América do Sul. No Brasil, foi muito difundida, devido à sua boa adaptação às condições climáticas, à alta produtividade, com domínio sobre invasoras e à rusticidade (SILVA; FERRARI, 2012).

A utilização de espécies de *Brachiaria*, conhecida por ser uma excelente forrageira, tem sido feita para a renovação de pastagens, principalmente nos sistemas de integração de cultura agropecuária. A parte aérea da planta protege o solo, evitando perdas por erosão e reduzindo as temperaturas diárias, o que possibilita melhor desenvolvimento dos microrganismos (FREITAS et al., 2005). De acordo com Barducci et al. (2009), o sistema radicular dessas espécies apresenta elevada tolerância à deficiência hídrica e absorção de nutrientes em camadas mais profundas do solo, desenvolvendo-se em condições ambientais em que a maioria das culturas não se desenvolveria.

Além da utilização em pastagens, espécies deste gênero também têm sido estudadas em áreas degradadas. De acordo com Lunardi Neto et al. (2008), a semeadura de *B. brizantha* em solo corrigido de área de mineração de carvão melhorou as propriedades físicas do solo. Belo et al. (2011) observaram que *B. Brizantha*, quando cultivada em solo contaminado por herbicida, não sofreu redução nos teores de matéria seca. *B. brizantha* também se mostrou eficiente na descontaminação de solos contaminados por petróleo (MERKL; SCHULTZE-KRAFT; INFANTE, 2005). Tais informações mostram, então, a importância de se realizar estudos dessa gramínea em ambiente contaminado por cádmio e/ou chumbo, tendo em vista que poucas pesquisas, realizadas para analisar as

alterações causadas por contaminantes nos nutrientes e nas ultraestruturas desta espécie, foram realizadas.

2.5 Solução nutritiva

O cultivo em solução nutritiva não é o principal meio de cultivo de plantas, servindo simplesmente como uma técnica inerte, a fim de levar a solução nutritiva até as raízes. Em se tratando de pesquisa, essa técnica é a preferida para o estudo da nutrição mineral de plantas (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

A utilização de solução nutritiva é uma das características mais importantes no cultivo de plantas em hidroponia, ou seja, cultivo sem solo. Ela deve ser formulada de acordo com o requerimento da espécie que se deseja produzir, contendo proporções adequadas de todos os nutrientes essenciais ao desenvolvimento das plantas (PAULUS et al., 2008). Além dos nutrientes, uma solução nutritiva deve conter oxigênio e precisa estar na temperatura adequada para a absorção dos nutrientes (FERNANDES, 2006).

Assim, no contexto atual, em que há uma grande preocupação com a qualidade de vegetais para o consumo humano, pelo risco de contaminação ambiental, o cultivo em solução nutritiva é uma técnica alternativa e segura para produtos com finalidade alimentícia ou medicinal, pelo fato de a planta receber apenas os elementos essenciais à sua sobrevivência.

2.6 Microscopia eletrônica

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos equipamentos mais versáteis da atualidade, no que diz respeito à análise microestrutural de materiais sólidos. Ele permite imagens com aparência tridimensional,

característica de fácil interpretação, de grande utilidade para avaliar a estrutura superficial de uma dada amostra (BUSSOLA; RUSSEL, 1999).

A MEV tem sido utilizada para observar modificações no funcionamento da folha, ou morfologia. Isso ajuda a entender a resposta das plantas em ambientes contaminados. O estudo das alterações nas folhas é especialmente interessante porque pode mostrar se a planta apresenta características de tolerância ou toxidez por meio de alterações histológicas (SOUZA et al., 2009).

Um MEV dotado de um sistema de detecção de raios X é um dos mais importantes instrumentos para a análise de elementos químicos localizados em materiais orgânicos e inorgânicos (BUSSOLA; RUSSEL, 1999). Esta técnica é particularmente útil para o estudo da circulação de metais em plantas, uma vez que é sensível a todas as formas do elemento em estudo (BONDADA et al., 2007).

Outra técnica, a microscopia eletrônica de transmissão (MET), composta por uma fonte geradora de elétrons que caminha por um sistema de lentes eletromagnéticas dispostas em coluna, permite a visualização de organelas. No caso de plantas tolerantes ou não a metais pesados, podem-se visualizar os efeitos nas ultraestruturas celulares (TIMM, 2005).

A utilização das técnicas de microscopia eletrônica é de grande relevância nos estudos envolvendo amostras biológicas, uma vez que elas consideram a distribuição dos metais pesados nas células, sua ligação e complexação (VOLLAND et al., 2011).

2.7 Utilização de métodos quimiométricos

A obtenção de dados, principalmente de química analítica, produz grande quantidade de informações, muitas vezes variadas e complexas. Diante de tantas

informações, tornou-se necessário o uso técnicas de tratamentos de dados mais complexas de modo criterioso e científico, como métodos quimiométricos, que visam extrair o maior número de informações possível.

Assim, a quimiometria pode ser definida como uma disciplina química que utiliza métodos matemáticos, estatísticos e outros para resolver os problemas que são de interesse e de origem química, sendo empregada para fornecer o máximo de informações importantes por meio da análise de dados químicos (FERREIRA et al., 1999). A quimiometria originou-se a partir do desenvolvimento de estratégias e de algoritmos computacionais avançados para trabalhar com um imenso número de dados em química analítica (MUTIHAC; MUTIHAC, 2008), entre os quais se destacam a análise por agrupamento hierárquico (HCA) e a análise de componentes principais (PCA) (CORREIA; FERREIRA, 2007).

O modo mais comum para comprimir um conjunto de dados é utilizar PCA, que visa reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados original (SENA et al., 2000), preservando a maior quantidade de informação possível. Essa redução é obtida por meio do estabelecimento de novas variáveis ortogonais entre si, as componentes principais (OLIVERI; DOWNEY, 2012).

A PCA tem várias aplicações e abrange diversas áreas do conhecimento, principalmente a química analítica. A HCA busca agrupar as amostras em classes, a partir da similaridade dos componentes de uma mesma classe e nas diferenças entre membros de classes diferentes. Denomina-se dendograma à representação gráfica obtida por HCA. Tanto PCA como HCA são classificados como métodos não supervisionados, pelo fato de não ser considerada nenhuma informação em relação à identidade das amostras (CORREIA; FERREIRA, 2007). Estas técnicas têm grande aceitação na análise química de dados.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento de *Brachiraria brizantha* com Cd e Pb induziu aumentos nos teores de N, P, K, S, Cu, Fe, Mn e Zn sob as menores doses dos metais (0,025 mg.L⁻¹ de Cd e 0,25 mg.L⁻¹ de Pb), o que indica que Cd e Pb, nas menores doses, estimularam uma maior absorção de cátions dos elementos essenciais. Já com relação à translocação, a maioria dos nutrientes sofreu redução com a aplicação das doses dos metais, exceto Ca e Mg. Dessa forma, pode-se deduzir que os metais pesados, embora tenham aumentado a absorção de nutrientes, restringiram sua movimentação para a parte aérea. Os metais reduziram o peso de matéria seca das raízes, possivelmente pelo fato de elas estarem diretamente em contato com os contaminantes. As imagens das ultraestruturas de *Brachiraria brizantha* mostraram invaginações na parede celular, cristais de oxalato e vacuolização. Os cristais de oxalato estão relacionados aos mecanismos de tolerância da planta aos efeitos de Cd e Pb.

REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxic substances**. Atlanta: ATSDR, 2013. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/>>. Acesso em: 16 set. 2013.
- BARDUCCI, R. S. et al. Produção de *Brachiaria Brizantha* e *Panicum maximum* com milho e adubação nitrogenada. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 58, n. 222, p. 211-222, June 2009.
- BELO, A. F. et al. photosynthetic activity of plants cultivated in soil contaminated with picloram. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 29, n. 4, p. 885-892, Oct./Dec. 2011.
- BERTOLI, A. C. et al. Toxidez do chumbo no teor e translocação de nutrientes em tomateiro. **Biotemas**, Florianópolis, v. 24, n. 4, p. 7-15, dez. 2011.
- BERTON, R. S. et al. Toxicidade de níquel em plantas de feijão e efeitos sobre a microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 8, p. 1305-1312, ago. 2006.
- BONDADA, B. R. et al. Spatial distribution, localization, and speciation of arsenic in the hyperaccumulating fern *Pteris vittata* L. In: BHATTACHARYA, P. et al. (Ed.). **Trace metals and other contaminants in the environment**: volume 9. 2007. Amsterdam: Elsevier. p. 1-653.
- BOSE, S.; BHATTACHARYYA, A. K. Heavy metal accumulation in wheat plant grown in soil amended with industrial sludge. **Chemosphere**, Oxford, v. 70, n. 7, p. 1264-1272, Jan. 2008.
- BUSSOLA, J. J.; RUSSEL, L. D. **Electron microscopy: principles and techniques for biologists**. Frankfurt: Jones and Bertotlett, 1999.

CANNATA, M. G. et al. Effects of lead on the content, accumulation, and translocation of nutrients in bean plant cultivated in nutritive solution. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 44, n. 5, p. 939-951, Feb. 2013.

CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos**. Lavras: Editora da UFLA, 2009.

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 481-487, mar./abr. 2007.

COSTA, C. N. et al. Fracionamento sequencial de cádmio e chumbo em solos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1323-1328, set./out. 2007.

CUADRA, V. P.; HERMANN, P. Characterization and macropattern of calcium oxalate phytoliths in Argentinean endemic species of Chenopodioideae (Amaranthaceae). **Quaternary International**, Amsterdam, v. 287, p. 83-88, Feb. 2013.

CUNHA, K. P. V. et al. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco em milho cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 1319-1328, maio/jun. 2008.

CUNNINGHAM, S. D.; OW, D. W. Promises and prospects of phytoremediation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 110, n. 3, p. 715-719, Mar. 1996.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. 2. ed. Londrina: Planta, 2006.

FERNANDES, M. S. **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006.

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 724-731, set. 1999.

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

FREITAS, F. C. L. et al. Formação de pastagem via consórcio de *Brachiaria brizantha* com o milho para silagem no sistema de plantio direto. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 23, n. 1, p. 49-58, jan./mar. 2005.

GALLEGO, S. M. et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 83, n. 2012, p. 33-46, 2012.

GREEN, I. D.; TIBBETT, M. Differential uptake, partitioning and transfer of Cd and Zn in the soil-pea plant-aphid system. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, n. 2, p. 450-455, Jan. 2008.

GZYL, J.; PRZYMUSINSKI, R.; GWOZDZ, E. A. Ultrastructure analysis of cadmium-tolerant and -sensitive cell lines of cucumber (*Cucumis sativus*L.). **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 99, n. 2, p. 227-232, 2009.

HUANG, J. W. W. et al. Phytoremediation of lead-contaminated soils: Role of synthetic chelates in lead phytoextraction. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 31, n. 3, p. 800-805, 1997.

KABATA- PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC Press, 2011.

KABATA-PENDIAS, A. Soil-plant transfer of trace elements-an environmental issue. Amsterdam, **Geoderma**, v. 122, n. 2-4, p. 143-149, 2004.

KOPITTKE, P. M. et al. Localization and chemical speciation of Pb in roots of signal grass (*Brachiaria decumbens*) and Rhodes grass (*Chloris gayana*). **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, n. 12, p. 4595-4599, June 2008.

LEONZIO, C.; PISANI, A. An evaluative model for lead distribution in roadside ecosystems. **Chemosphere**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 1387-1394, 1987.

LI, F. et al. Cultivation practices affect heavy metal migration between soil and *Vicia faba* (broad bean). **Chemosphere**, Oxford, v. 80, n. 11, p. 1393-1398, Sept. 2010.

LOPEZ, M. L. et al. Gibberellic acid, kinetin, and the mixture indole-3-acetic acid-kinetin assisted with EDTA-induced lead hyperaccumulation in alfalfa plants. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 41, n. 23, p. 8165-8170, Dec. 2007.

LUNARDI NETO, A. et al. Atributos físicos do solo em área de mineração de carvão influenciados pela correção da acidez, adubação orgânica e revegetação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, p. 1379-1388, 2008.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1980.

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

MAZEN, A. M. A.; ZHANG, D. Z.; FRANCESCHI, V. R. Calcium oxalate formation in *Lemna minor*: physiological and ultrastructural aspects of high capacity calcium sequestration. **New Phytologist**, Cambridge, v. 161, n. 2, p. 435-448, Feb. 2004.

MERKL, N.; SCHULTZE-KRAFT, R.; INFANTE, C. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 165, n. 1-4, p. 195-209, 2005.

MUTIHAC, L.; MUTIHAC, R. Mining in chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 612, n. 1, p. 1-18, Mar. 2008.

NAKATA, P. A. Advances in our understanding of calcium oxalate crystal formation and function in plants. **Plant Science**, Limerick, v. 164, n. 6, p. 901-909, June 2003.

NELLESSEN, J. E.; FLETCHER, J. S. Assessment of published literature on the uptake, accumulation, and translocation of heavy metals by vascular plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 27, n. 9, p. 1669-1680, Nov. 1993.

OLIVERI, P.; DOWNEY, G. Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 35, p. 74-86, May 2012.

PAIM, L. A. et al. Estudo dos efeitos do silício e do fósforo na redução da disponibilidade de metais pesados na área de mineração. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 28-33, jan./fev. 2006.

PAULUS, D. et al. Solução nutritiva para produção de menta em hidroponia. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 1, p. 61-67, 2008.

PRYCHID, C. J.; JABAILY, R. S.; RUDALL, P. J. Cellular ultrastructure and crystal development in *Amorphophallus* (Araceae). **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 7, p. 983-995, May 2008.

PYLRO, V. S. et al. Calcium oxalate crystals in eucalypt ectomycorrhizae: morphochemical characterization. **Plos One**, México, v. 8, n. 7, p. 1-6, July 2013.

- SENA, M. M. et al. Evaluation of the use of chemometric methods in soil analysis. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p. 547-556, jul./ago. 2000.
- SILVA, S. F.; FERRARI, J. L. Descrição botânica, distribuição geográfica e potencialidades de uso da *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex. A. Rich) Stapf. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 302-314, 2012.
- SIQUEIRA, J. O.; POUYÚ, E.; MOREIRA, F. M. S. Micorrizas arbusculares no crescimento pós-transplante de mudas de árvores com excesso de metais pesados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 23, p. 569-580, 1999.
- SOARES, C. R. F. S. et al. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus muculata* e *E. europila* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 175-183, 2005.
- SOUZA, V. L. et al. Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 23, n. 2, p. 343-354, abr./jun. 2009.
- TIMM, L. de L. Técnicas rotineiras de preparação e análises de lâminas histológicas. **Caderno La Salle XI**, Canoas, v. 2, n. 1, p. 231-239, 2005.
- TUNG, G.; TEMPLE, P. J. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 188, n. 2-3, p. 71-85, Oct. 1996.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos**. New England: EPA, 2013. Disponível em: <<http://www.epa.gov/ncer/rfa>>. Acesso em: 16 set. 2013.
- VITÓRIA, A. P.; CUNHA, M. da; AZEVEDO, R. A. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 58, n. 1-3, p. 47-52, Dec. 2006.

VOLLAND, S. et al. Intracellular metal compartmentalization in the green algal model system *Micrasterias denticulata* (streptophyta) measured by transmission electron microscopy-coupled electron energy loss spectroscopy. **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 47, n. 3, p. 565-579, June 2011.

WANG, K. S. et al. Phytoextraction of cadmium by *Ipomoea aquatica* (water spinach) in hydroponic solution: effects of cadmium speciation. **Chemosphere**, Oxford, v. 72, n. 4, p. 666-672, June 2008.

WESTFALL, D. G. et al. Efficient and environmentally safe use of micronutrients in agriculture. **Communications in Soil Science Plant Analysis**, Colorado, v. 36, n. 1-3, p. 169-182, 2005.

ZHENG, L. J. et al. Effects of Lead and EDTA-Assisted lead on biomass, lead uptake and mineral nutrients in *Lespedeza chinensis* and *Lespedeza davidii*. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 220, n. 1-4, p. 57-68, Sept. 2011.

ZHENG, L. J. et al. Pb-induced ultrastructural alterations and subcellular localization of Pb in two species of *Lespedeza* by TEM-coupled electron energy loss spectroscopy. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 77, p. 196-206, Apr. 2012.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

Especiação do Cd em *Brachiaria brizantha* e biodisponibilidade dos macro e micronutrientes

Artigo submetido conforme normas da revista de Ciências Agrárias

Short title: Toxicity of cadmium in *Brachiaria brizantha*.

Terezinha Tolentino¹, Alexandre Bertoli¹, Ruy Carvalho¹, Ana Rosa Bastos²,
Maíra Pires¹

¹Department of Chemistry and ²Department of Soil Science, Federal University of Lavras, PO Box 3037, CEP 37200 000, Lavras – MG, Brazil

* Corresponding author: bertolialexandre@yahoo.com.br

Resumo

Com o objetivo de avaliar a influência de Cd no teor, na translocação de nutrientes e no crescimento em *Brachiaria brizantha*, foi montado um experimento em solução nutritiva nas condições da casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. Utilizaram-se as doses de 0; 0,025; 0,50 e 1,00 mg.L⁻¹ de Cd. O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (DIC) com quatro repetições. Os dados foram tratados por quimiometria, por meio de análise em componentes principais (PCA). Os resultados mostraram raízes com altos teores de nutrientes e de Cd e partes aéreas com altos teores de Mg. Os teores de Ca foram maiores no tratamento-controle. As menores doses de Cd induziram aumento nos teores de Cu, Mn, Zn, Fe, N, P, K e S. Os teores de K e Cd foram crescentes com a aplicação de doses de Cd. O índice de translocação foi reduzido para Cu, Mn, Zn, Fe e N, embora seus teores tenham sido crescentes, o que indica que o metal aumentou sua absorção, mas restringiu a movimentação para partes aéreas. Já para Ca, Mg e Cd, houve aumento na translocação, o que está relacionado com a competição dos cátions. S apresentou variações irregulares nos índices de translocação. As doses de Cd causam redução na matéria seca da raiz e crescimento na matéria seca da parte aérea, fato atribuído à maior concentração do metal na raiz.

Palavras-chave: metal pesado, nutrientes, PCA.

Abstract

In order to assess the influence of Cd on the content, translocation of nutrients and growth of *Brachiaria brizantha*, an experiment was set up in nutrient solution under the conditions of the greenhouse in the Department of Soil Science, at Universidade Federal de Lavras . The doses 0, 0.025, 0.50 and 1.00 mg.L⁻¹ Cd were used. The experiment was conducted in completely randomized design (CRD) with four replications. Data were processed by chemometrics by principal component analysis (PCA).The results showed roots with high amounts of nutrients and Cd, and aerial parts with high levels of Mg. Ca levels were higher in the control treatment. Smaller doses of Cd induced an increase in the levels of Cu, Mn, Zn, Fe, N, P, K and S. The levels of K and Cd increased with the application of Cd doses. The translocation rate decreased for Cu, Mn, Zn, Fe and N, and increased for Ca, Mg and Cd. S showed irregular variations in translocation rates.The concentration of Cd cause reduction in root dry matter and growth of the dry matter of the shoot, which was attributed to higher metal concentration in the root..

Keywords: Heavy metals; Nutrients, PCA.

1. Introdução

O cádmio está naturalmente presente na crosta terrestre, em níveis baixos. Níveis elevados de Cd resultam de atividades de indústrias, fundições de metais, mineração, composto de lodo de esgoto e, em alguns casos, fertilizantes fosfatados (Soares *et al.*, 2005). O cádmio pode atingir as plantas através da água ou de solo contaminados e pela deposição atmosférica causada por atividade vulcânica ou proximidade a áreas de mineração (Westfall *et al.*, 2005).

De acordo com a Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2013), agência de saúde pública dos EUA, o cádmio é uma substância cancerígena que afeta os sistemas cardiovascular, gastrointestinal, neurológico, renal e as vias respiratórias. Dentre outras moléstias causadas por este metal, uma muito conhecida é a doença do itai-itai, devido ao consumo de arroz contaminado por Cd, que causa osteomalacia, com severa deformidade óssea e fortes dores renais. A contaminação do arroz se deu pela irrigação com água proveniente de indústrias, ocorrida no Japão, às margens do rio Jintsu.

O Cd apresenta grande mobilidade, podendo apresentar maior risco ambiental, principalmente em solos com pouca matéria orgânica, baixos teores de óxidos de ferro e baixa capacidade de troca catiônica (Costa *et al.*, 2007).

Elementos tóxicos, como cádmio, podem ser absorvidos pelas plantas, quando estas se desenvolvem em ambiente contaminado (Kabata-Pendias, 2004). Isso ocorre pelo fato de a absorção de nutrientes ser um processo meramente físico, dependente das condições termodinâmicas da água e da solução de íons que constitui o solo (Castro *et al.*, 2009).

Nas plantas contaminadas por cádmio podem ocorrer inibição da germinação, alongamento da raiz e morte. Em estudos com *Eucalyptus muculata* e *E. urophylla*, há relatos de sintomas de fitotoxicidade, como murchamento de folhas, clorose interneval, morte das gemas apicais e redução do crescimento das folhas (Soares *et al.*, 2005).

Devido aos prejuízos ambientais causados pelo cádmio, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de doses crescentes de cádmio no teor e na translocação do próprio elemento, nos teores e na translocação de nutrientes essenciais e no crescimento de plantas de *Brachiaria brizantha* cultivadas em solução nutritiva.

2. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo e no Laboratório de Análise Foliar, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando vinte blocos experimentais, sendo o período experimental de noventa dias. Determinaram-se a massa seca e os teores de Cd na parte aérea e nas raízes das plantas. A análise de Cd e de micronutrientes foi realizada por espectrofotômetro de absorção atômica Varian, modelo Spectraa110. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 1. A análise de macronutrientes foi feita utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis, da Perkin Elmer, modelo lambda 25, para determinar S e P, e um fotômetro de chama para determinar K. O nitrogênio foi analisado por microdestilador Tecnal TE0363.

Tabela 1 Parâmetros espectroscópicos utilizados na determinação dos teores dos elementos

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Fenda (mm)
Ca	422,7	0,5
Mg	285,2	0,5
Fe	248,3	0,2
Cu	324,7	0,2
Mn	279,5	0,2
Zn	213,9	0,2
Cd	228,8	0,5

2.1 Cultivo das mudas de *Brachiaria brizantha*

A produção de mudas foi realizada em bandejas de isopor em substrato orgânico, comercialmente chamado de Plantmax. As mudas foram irrigadas diariamente e transplantadas para uma bandeja com solução de Hoagland (Hoagland; Arnon, 1950) quando atingiram cerca de 10 cm de altura, permanecendo nesta condição por quatro semanas: na primeira semana, com 25% da concentração máxima da solução; na semana seguinte, com 50% da concentração; na terceira, com 75% da concentração e, na quarta, com 100%. Terminada a adaptação, o experimento foi montado em frascos individuais de polietileno com solução de Hoagland a 100%, incluindo a adição do Cd. As doses de Cd utilizadas neste experimento foram de 0; 0,025; 0,10 e 0,50 e 1,00 mg L⁻¹. A fonte contaminadora de cádmio foi Cd(NO₃)₂.4H₂O. A preparação das amostras foi feita a partir de uma digestão nitroperclórica na proporção de 2:1 (v/v) de HNO₃ e HClO₄, e em seguida, os teores dos nutrientes foram determinados conforme metodologia utilizada por Malavolta *et al.* (1997).

Os resultados dos macro e micronutrientes foram tratados por quimiometria por meio do software Chemoface (Nunes *et al.*, 2012). Ao final do experimento, as raízes e a partes aérea foram separadas e secas em estufa, à

temperatura entre 65 e 70 °C, até peso constante e, posteriormente, pesadas e trituradas em moinho tipo Willey.

3. Resultados e Discussão

Foram analisadas 10 amostras oriundas das partes de *B. brizantha* contaminada com cádmio, sendo 5 amostras da parte aérea e 5 das raízes. Os valores médios referentes aos teores de nutrientes nas doses crescentes de cádmio por absorção atômica e foram organizados na forma matricial, com dimensões 10 (amostras) x 11 (variáveis). As variáveis referem-se aos nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Mn, Fe) e Cd. Os resultados foram avaliados com a utilização de métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões com emprego do PCA. O pré-processamento utilizado foi o autoescalado. Neste modelo, obtiveram-se os gráficos biplot.

Por meio do gráfico da PCA observou-se que a análise em componentes principais permitiu a separação nítida das amostras de raiz e parte aérea (Figura 1) e também permitiu verificar a influência do metal pesado na translocação dos nutrientes das raízes para partes aéreas (Figura 2) em apenas um gráfico.

3.1. Teores de nutrientes e Cd

A influência de Cd nos teores dos nutrientes nas raízes e partes aéreas de *Brachiaria brizantha* pode ser observada na Figura 1. Altos teores de Mg foram observados nas partes aéreas das plantas e isso pode estar relacionado à sua função na composição da clorofila, ou seja, às porfirinas magnesianas (Faquin, 2005). Os teores de Mg não se diferenciaram muito em relação ao tratamento-controle e às doses de Pb. Pode-se atribuir o decréscimo nas maiores doses de Pb à competição com os cátions do metal pesado (Mg^{2+} e Cd^{2+}).

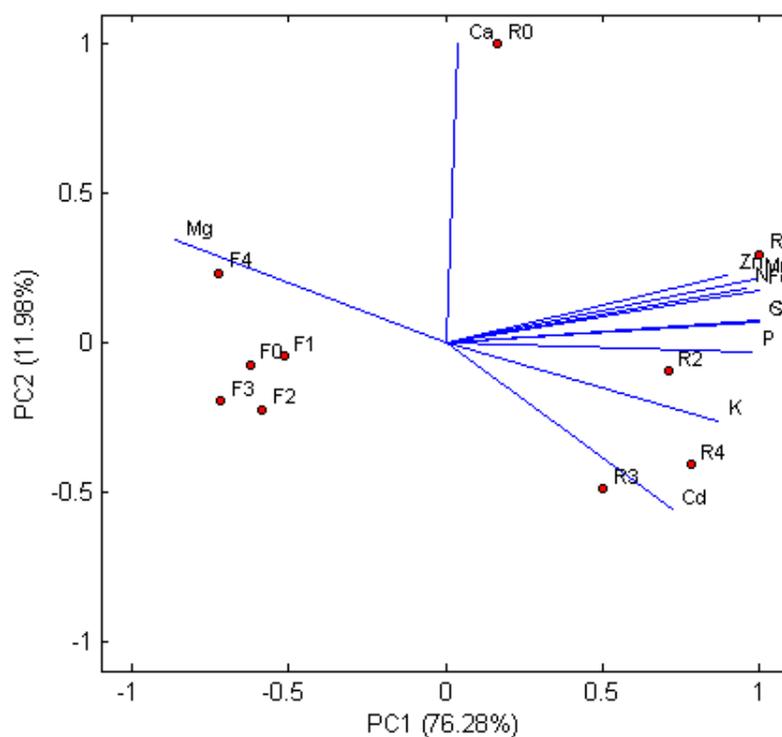


Figura 1 Teor de nutrientes e de Cd (R - raiz e F - parte aérea; doses de Cd: 0-0,00; 1-0,025; 2-0,10; 3-0,50; 4-1,00 mgL^{-1})

Os teores de cálcio foram maiores no tratamento-controle do que nas amostras que receberam doses de Cd. Estes resultados estão de acordo com os estudos com mostarda indiana, em que Jiang *et al.* (2004) verificaram que o aumento das doses de Cd reduziu a absorção de Ca. Para Wang (1987), uma forte interação entre Ca e constituintes da parede celular pode ser importante no fornecimento suficiente de Ca para a membrana plasmática para manter a sua integridade. Um aumento da concentração de Ca sob estresse seria um possível mecanismo para a redução dos efeitos tóxicos de Cd. Uma diminuição da

concentração de Ca sob toxicidade Cd pode ser um sintoma de um sistema de defesa intercelular interferindo nesse mecanismo.

Os altos teores radiculares de N, P e S nas menores doses de Cd (0,025 mg.L⁻¹ e 0,10 mg.L⁻¹) podem ser explicados pela competitividade dos cátions que conseguem ter maior absorção que os metais, nas menores concentrações. Guimaraes et al. (2008) explicam que a presença de Cd afeta a absorção e o transporte de macronutrientes e um dos motivos está relacionado com a alteração na permeabilidade da membrana plasmática.

Quanto aos teores de N, observou-se que houve um aumento na menor dose de Cd (0,025mg.L⁻¹) e uma redução à medida que aumentaram as doses do metal pesado. Os mecanismos envolvidos no aumento da tolerância ao Cd, depois de abaixar a translocação de N como nitrato em brotos vegetais, são desconhecidos (Gallego *et al.*, 2012). Outra possibilidade envolve um mecanismo mais geral de resposta ao estresse, relacionado a um aumento da produção de óxido nítrico (Quiao e Fan, 2008).

Para o S, foram encontrados resultados semelhantes ao N. O aumento para o teor de S pode estar intimamente ligado com os mecanismos de formação de complexo fitoquelatina-Cd, responsável pelo sequestro vacuolar do metal (Cobbett e Goldsbrough, 2002). Neste mecanismo, as fitoquelatinas atuam como transportadores do elemento contaminador, carregando-o para compartimentos celulares, impedindo que o metal cause danos a estruturas importantes das células, a exemplo das enzimas (Guimarães *et al.*, 2008).

Os teores de fósforo também aumentaram com a aplicação de doses de Cd, sendo este aumento mais significativo nas menores doses do metal. Esses resultados concordam com os relatados por Jiang *et al.* (2004) que observaram, em mostarda indiana, aumento no teor radicular de fósforo com aplicações de cádmio. Os autores sugerem um possível efeito sinérgico para explicar o

aumento. O sinergismo estará no estímulo do Cd à precipitação de fosfatos radiculares, com solubilidade lenta e gradual em função do pH rizosférico.

Teores de K foram superiores ao do tratamento controle, de maneira que se pode deduzir que o cádmio aumentou a absorção do K. Estes resultados concordam com os relatados por Jiang *et al.* (2004), em estudos de nutrição com mostarda indiana, no qual o aumento de doses de Cd aumentou o teor de K. Os autores sugerem que a membrana plasmática de células da raiz foi danificada a partir da exposição ao Cd. Assim, a permeabilidade da membrana alterada teria facilitado a absorção de K pelas raízes.

Os teores de Cu foram maiores na presença das menores doses de Cd. Resultado semelhante foi encontrado por Bertoli *et al.* (2012), em estudo com tomateiro na presença de Cd. Em estudos realizados por Wang *et al.* (2007), com cultivares de milho na presença de cádmio, algumas plantas apresentaram aumento no teor de cobre enquanto outras tiveram redução. De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001), a presença de cádmio provoca interação com absorção de Cu, podendo, em alguns vegetais, ter um efeito sinérgico e, em outros, antagônico.

Comportamento semelhante ao do Cu ocorreu com os teores de Mn e Fe (apresentaram teores mais significantes nas menores doses do metal). Em estudos com *B. Decumbens*, o aumento de doses de Cd não teve nenhuma influência sobre as concentrações de nutrientes na parte aérea e no tecido da raiz, com exceção de Mn, que foi reduzido com o aumento das doses (Kopittke *et al.* 2010). Em pesquisas com tomateiro contaminado com Cd, Lopez-Millan *et al.* (2009) observaram aumento de Cu e diminuição progressiva de Mn.

Para o zinco, nas menores doses de Cd, a absorção foi maior que nas maiores doses do metal. Segundo Faquin (2005), existe uma competição entre Zn e Cd na absorção da planta, quando a concentração do primeiro é menor do que a de Cd. Efeitos competitivos entre elemento contaminante e nutriente em

solução nutritiva podem conter complexidades de interpretação difícil das respostas das plantas às interações Cd-Zn (Chaoui *et al.* 1997).

Paiva *et al.* (2004) ressaltaram que a resposta de diversas espécies submetidas a ambientes contaminados por Cd é muito variável, sendo necessário testar o comportamento individual de cada espécie em face da contaminação. Lopez-Millan *et al.* (2009) explicam que diferenças entre as espécies podem surgir de diferentes homeostases de micronutrientes e mecanismos de desintoxicação de Cd

Em relação ao Cd, observa-se que seus teores foram maiores nas raízes, o que indica que a maior quantidade do metal ficou concentrada na raiz. O baixo transporte para a parte aérea pode ser considerado o possível mecanismo pelo qual o sistema radicular contribui para uma tolerância a metais pesados (Arduini *et al.* 1996). Esse fato pode ser uma característica interessante, do ponto de vista zootécnico: quanto menor a translocação do Cd para a parte aérea menor será a ingestão do elemento pelos animais. Os resultados concordam com os de Santos *et al.* (2006), que verificaram concentrações de metais nas partes aéreas de *B. decumbens* consideravelmente inferiores às observadas nas raízes.

3.2. Translocação de nutrientes e Cd

Na Figura 2 observa-se o gráfico biplot para a translocação de nutrientes e de Cd. Os resultados para N e Cu mostram que o índice de translocação destes elementos foi crescente apenas na menor dose do metal e decrescente com incremento das doses de Cd. Pahlsson (1989) cita uma possível fixação de N nas raízes por inibição da enzima nitrogenase-redutase pelo Cd. Quanto ao Cu, os resultados estão de acordo com os de Obata e Umebayashi (1997), que verificaram que a presença de Cd restringiu a translocação de Cu para a parte aérea.

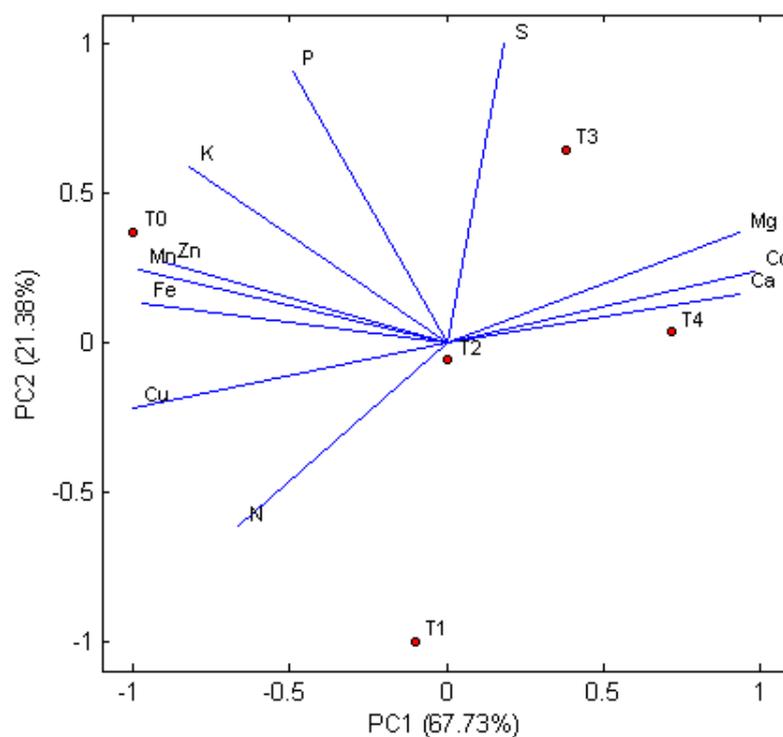


Figura 2 Translocação de nutrientes e de Cd (T - translocação da raiz para parte aérea; doses de Cd: 0-0,00; 1-0,025; 2-0,10; 3-0,50; 4-1,00 mgL⁻¹)

Para o P, S e K, no tratamento controle e na dose 0,5mg.L⁻¹ de Cd houve os maiores valores da translocação e, nas demais concentrações, houve redução, mostrando, então, que houve efeito sinérgico em algumas doses e antagônico em outras. Bertoli *et al.* (2012) verificaram aumento na translocação de P para a parte aérea do tomateiro. A translocação de S pode ser estimulada ou inibida na presença de metais pesados, como Cd e Ni, mostrando comportamento diferenciado entre as espécies (Yang *et al.*, 1996a,b). Cannata *et al.* (2013), em plantas de feijão, na presença de doses crescentes de chumbo, observaram a redução dos índices de translocação do K.

O cádmio estimulou a translocação de Ca, visto que seus índices aumentaram em função das doses de Cd. Já Yang *et al.* (1996a) verificaram redução na translocação deste nutriente em diversas espécies vegetais. Choi *et al.* (2001) explicam que o aumento de Ca nas partes aéreas pode estar relacionado com mecanismo de tolerância, uma vez que a formação de cristais de cálcio diminuirá os efeitos tóxicos do metal para as partes aéreas.

Os índices de translocação para Mg aumentaram com as doses de Cd. Estes resultados concordam com os relatados por Cannata *et al.* (2013) que, em frutos de plantas de feijoeiro, constataram um aumento linear do índice de translocação.

As doses de Cd reduziram a translocação de Cu, Zn, Mn e Fe. Outros estudos também mostraram redução na translocação de Mn em diferentes espécies vegetais (Yang, *et al.*, 1996a,b). Com relação à translocação de Fe, os resultados concordam com os relatados nos estudos de Paiva *et al.* (2002) que, em plantas de cedro e ipê-roxo contaminadas com Cd, observaram a redução do índice de translocação de Fe. Faquin (2005), explica que ocorre uma competição entre o zinco e o cádmio, quanto à absorção pelas plantas

Com relação ao índice de translocação para o Cd, observou-se que ele aumentou conforme as doses aplicadas, indicando que o metal se movimentou para as partes aéreas.

Segundo Gallego *et al.* (2012), as plantas utilizam várias estratégias para neutralizar o efeito inibidor do Cd. Pensa-se que a administração de nutrientes competitivos com o Cd é uma possível maneira de superar a sua toxicidade.

3.3. Produção de matéria seca de *Brachiaria brizantha*

Houve redução da matéria seca de *Brachiaria* nas raízes das plantas, conforme Tabela 2, sendo este efeito mais visível nas doses 0,025 e 0,10 mg.L⁻¹ do que nas doses maiores. Para Guo e Marschner (1995), a inibição do

alongamento da raiz de diferentes espécies de plantas é o parâmetro mais sensível de toxicidade do Cd. Esses resultados concordam com pesquisas realizadas com plantas de salvinia e de aguapé, por Oliveira et al. (2001), cujas raízes das plantas apresentaram maior redução da taxa de crescimento. Para os autores, a redução ocorre pelo fato de as raízes estarem em contato direto com o metal pesado.

Tabela 2 Média dos valores de matéria seca da planta em função da aplicação de Cd

Doses de Cd(mg.L ⁻¹)	Peso de matéria seca (g)	
	MSR*	MSPA*
Tratamento controle	1,3470 a**	4,8982 d**
0,025	0,6241 d	5,7670 a
0,10	0,6241 d	5,0595 b
0,50	0,7163 c	5,0094 c
1,00	0,7478 b	4,2822 e

*Matéria seca de raízes e partes aéreas, respectivamente

**Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

De acordo com Cobbett e Goldsbrough (2002), a capacidade das plantas em se manter expostas por tempo prolongado a Cd depende da capacidade das raízes de sintetizar fitoquelatinas, as quais têm sido identificadas em diversas espécies de plantas, sendo o indutor mais forte do acúmulo de metais pesados.

Na parte aérea, houve acréscimo nos pesos, quando aplicadas doses de Cd. A única que não apresentou esse comportamento foi a dose 1,00 mg.L⁻¹, sob a qual o crescimento da planta foi inferior ao tratamento controle. Em geral, a redução do crescimento de plantas deve-se à exposição a níveis tóxicos, que resulta na redução generalizada nas taxas metabólicas. Para Nascimento e

Pereira (1997), no caso de estresse, a parte aérea é a mais afetada, possivelmente por induzir limitações na translocação de nutrientes.

4. Conclusão

A partir dos resultados foi possível concluir que o Cd nas menores doses aumentou os teores de N, P, S, Cu, Mn, Zn e Fe. Teores de K e Cd aumentaram conforme a dose do metal. O Cd concentrou-se nas raízes, tendo as doses crescentes deste metal reduzido o índice de translocação para N, Cu, Fe, Mn e Zn. Em contrapartida, o índice de translocação aumentou para Mg, Ca, e Cd. Já para os nutrientes S, P e K, o índice de translocação mostrou-se irregular com as doses do metal. Os pesos de matéria seca tiveram redução nas raízes e acréscimos nas partes aéreas. Portanto, as doses de Cd não influenciaram de forma diferenciada o crescimento das partes das plantas.

Agradecimentos

À CAPES, ao Departamento de Ciência do Solo e ao Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (MG).

5. Referências

- ATSDR. *Toxic substances portal*. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/>. acesso em 16 de setembro de 2013.
- Arduini, I.; Godbold, D. L. e Onnis, A. (1996) - Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiologia Plantarum*, v. 97, p. 111-117.
- Bertoli, A. C.; Cannata, M. G.; Carvalho, R. e Bastos, A. R. R.; Freitas, M. P.; Augusto, A. D. (2012) - *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v 86, p. 176-181.

- Cannata, M. G.; Carvalho, R.; Bertoli, A. C.; Bastos, A. R. B.; Carvalho, J. G.; Freitas, M. P. e Augusto, M. S. (2013) - Effects of lead on the content, accumulation, and translocation of nutrients in bean plant cultivated in nutritive solution. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 44, p. 939-951.
- Castro, E. M.; Pereira, F. J. e Paiva, R. (2009) - *Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos*. Lavras: UFLA. 239 p.
- Chaoui, A.; Ghorbal, M. H. e Elferjani, (1997) - E. Effects of cadmium-zinc interactions on hydroponically grown bean (*Phaseolus vulgaris* L). *Plant Science*, 126, p. 21-28.
- Choi, Y. E.; Harada, E.; Wada, M.; Tsuboi, H.; Morita, Y.; Kusano, T. e Sano, H. (2001) - Detoxification of cadmium in tobacco plants: formation and active excretion of crystals containing cadmium and calcium through trichomes. *Planta*, v. 213, p. 45-50.
- Cobbett, C. e Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology*, v. 53, p. 159-182.
- Costa, C. N.; Meurer, E. J.; Bissani, C. A. e Tedesco, M. J. (2007) Fracionamento sequencial de cádmio e chumbo em solos. *Ciência Rural*, v. 37, p. 1323-1328.
- Faquin, V. (2005) - *Nutrição mineral de plantas*. Lavras: Centro de Editoração/FAEPE. 182 p.
- Gallego, S. M.; Pena, L. B.; Barcia, R. A.; Azpilicueta, C. E.; Iannone, M. F.; Rosales, E. P. e Benavides, M. P. (2012) - Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*, v. 83, p. 33-46.
- Groppa, M. D.; Rosales, E. P.; Iannone, M. F. e Benavides, M. P. (2008) - Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry*, v. 69, p. 2609-2615.

- Guimarães, M. A.; Santana, T. A.; Silva, E. Z.; Zenzen, I. L. e Loureiro, M. E. (2009) - Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*, v. 1, p. 58-69.
- Guo, Y. e Marschner, H. (1995) Uptake, distribution and binding of cadmium and nickel in different plant species. *Journal of Plant Nutrition*, v. 18, p. 2691-2706.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. R. (1950) - *The water culture methods for growing plants without soil*. (Bulletin. 347 ed.). Berkeley: California Agriculture Experiment Station. 39 p.
- Jiang, X. J.; Luo, Y. M.; Liu, Q.; Liu, S. L. e Zhao, Q. (2004) - G. Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by Indian Mustard. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 26, p. 319-324.
- Kabata-Pendias, A. (2004) - Soil-plant transfer of trace elements-an environmental issue. *Geoderma*, v. 122, p.143-149.
- Kabata-Pendias, A. e Pendias, H. (1984) *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton. 432 p.
- Kabata-Pendias, A., e Pendias, H. (2001) - *Trace elements in soils and plants*. 2001. 315 p.
- Kopittke, P. M.; Blamey, F. P. C. e Menzies, N. W. (2010) - Toxicity of Cd to signal grass (*Brachiaria decumbens* Stapf.) and Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth.). *Plant and Soil*, v.330, p. 515-523.
- Lopez-Millan, A. F.; Sagardoy, R.; Solanas, M.; Abadia, A. e Abadia, J. (2009) Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany*, v.65, p. 376-385.
- Malavolta, E. (1980) - *Elementos de Nutrição Mineral de Plantas*. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres. 251 p.
- Malavolta, E.; Vitti, C. C. e Oliveira, S. A. (1997) - *Avaliação do estado nutricional das plantas*. Piracicaba: ESALQ USP. 319 p.

Nascimento, C. W. A. e Pereira, I., B. M. (1997) - Absorção e distribuição de cádmio e micronutrientes em cultivares de feijoeiro expostas a doses de cádmio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 32, p. 1303-1308..

Nunes, C. A.; Freitas, M. P.; Pinheiro, A. C. e Bastos, S. C.(2012) - Chemoface: A novel free user friendly interface for chemometrics. *Journal Brazilian.Chemical.Society.*, v. 23, p. 2003-2010.

Obata, H. e Umabayashi, M. (1987) - Effects of cadmium on mineral nutrient concentrations in plants differing in tolerance for cadmium. *Journal of Plant Nutrition*, v.20, p. 97-105.

Oliveira, J. A. D.; Cambraia, J.; Cano, M. A. O. e Jordão, C. P. . Cadmium absorption and accumulation and its effects on the relative growth of water hyacinths and salvinia. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.13, p. 329-341, 2001.

Pahlsson, A. M. B. (1989) - Toxicity of heavy-metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants - a literature-review. *Water Air and Soil Pollution*, v. 47, p. 287-319.

Paiva, H. N.; Carvalho, J. G. e Siqueira, J. O. (2002) - Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. *Revista Árvore*, v.26, p. 467-473.

Paiva, H. N.; Carvalho, J. G.; Siqueira, J. O.; Miranda, J. R. P. e Fernandes, A. R. (2004) - Nutrients absorption by seedlings of ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) in nutrient solution contaminated by cadmium. *Revista Árvore*, v. 28, p.189-197.

Quiao, W. e Fan, L. M. (2008) - Nitric oxide signalling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 50, p.1238-1246.

Santos, F. S.; Hernandez-Allica, J.; Becerril, J. M.; Amaral-Sobrinho, N., Mazur, N.; e Garbisu, C. (2006) - Chelate-induced phytoextraction of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere*, v. 65, p. 43-50.

Soares, C. R. F. S.; Siqueira, J. O., Carvalho, J. G. e Moreira, F. M. S. (2005) - Fitotoxidez de cádmio para *Eucalyptus muculata* e *E. euophila* em solução nutritiva. *R. Árvore*, v. 29, p. 175-183.

Wang, M.; Zou, J.; Duan, X.; Jiang, W. e Liu, D. (2007) - Cadmium accumulation and its effects on metal uptake in maize (*Zea mays* L.). *Bioresource Technology*, v.98, p. 82-88.

Wang, W. C. (1987) - Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.6, p. 409-414.

Westfall, D. G.; Mortvedt, J. J.; Peterson, G. A. e Gangloff, W. J. (2005) Efficient and environmentally safe use of micronutrients in agriculture. *Communication in Soil and Science Plant Analysis.*, v. 36, p. 169-182.

Yang, X.; Baligar, V. C.; Martens, D. C. e Clark, R. (1996) - Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plant species. *Journal of Plant Nutrition*, v.19, p. 643-656a.

Yang, X.; Baligar, V. C.; Martens, D. C. e Clark, R. B. (1996) - Plant tolerance to nickel toxicity: II nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *Journal of Plant Nutrition*, v. 19, p. 256-279b.

ARTIGO 2

***Brachiaria brizantha* submetida a concentrações de pb: tolerância e biodisponibilidade dos elementos essenciais**

Artigo submetido conforme normas da Revista Ciências Agrárias/Amazonian
Journal of Agricultural and Environmental Sciences

Terezinha Alves Tolentino ^{1*}

Alexandre Carvalho Bertoli ¹

Ruy Carvalho¹

Ana Rosa Ribeiro Bastos ²

Maíra dos Santos Pires ¹

¹ Departamento de Química

Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP 37200 000, Lavras – MG,
Brasil

² Departamento de Ciência do Solo, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG,
Brasil

* Autor para correspondência

therezinha.quim@hotmail.com

Resumo: O chumbo é um dos contaminantes mais comuns no meio ambiente. O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a toxidez deste metal pesado no capim braquiária, cultivado em solução nutritiva de Hoagland. As plantas receberam doses crescentes de Pb, em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Avaliaram-se teores e índices de translocação de macro e micronutrientes, Pb e matéria seca. Observou-se que os teores radiculares de Ca foram reduzidos. As menores doses de Pb induziram o aumento de N, S, Mn, Cu, Zn e Fe. Nas maiores doses do metal obtiveram-se maiores teores de K e Pb. As doses de Pb aumentaram os índices de translocação de N, Ca, Mg, S e Pb e reduziram para P, Cu, Zn e Fe. A matéria seca reduziu com as doses de Pb. Dessa forma, pressupõe-se que as doses utilizadas do metal pesado reduziram o crescimento das plantas.

Palavras-chave: metal pesado, macronutrientes, micronutrientes

Abstract: Lead is one of the most common contaminants in the environment; therefore, the objective of the present study was to evaluate the toxicity of this heavy metal in brachiaria grass, grown in Hoagland nutrient solution. The plants received increasing doses of Pb, in completely randomized design (CRD). The levels and rates of translocation of macro and micronutrients, Pb and dry matter were evaluated. It was observed that root Ca levels were lowered. Smaller doses of Pb induced an increase in N, S, Mn, Cu, Zn and Fe. At the highest doses of the metal, higher levels of K and Pb were obtained. Pb doses increased the translocation rates of N, Ca, Mg, S and Pb, and reduced them for P, Cu, Zn and Fe. The dry matter decreased with doses of Pb. Thus, it is assumed that the doses used heavy metal reduced plant growth.

Keywords: heavy metal, macronutrients, micronutrients

1 Introdução

Comparativamente, poucos são os estudos relacionados com a influência da presença de metais pesados sobre a toxicidade de gramíneas, espécies amplamente estudadas em ambientes contaminados.

Dentre os metais pesados mais comumente encontrados em ambientes contaminados encontra-se o chumbo. De acordo com Sharma e Dubey (2005), o excesso de Pb causa vários sintomas em plantas, como redução de crescimento, clorose e escurecimento do sistema radicular. Além disso, inibe a fotossíntese e altera a nutrição mineral das plantas.

Desordens nutricionais, como efeito da presença de chumbo, foram observadas por Cannata et al. (2013), em estudos com feijoeiro, tendo a adição de chumbo em solução nutritiva reduzido o acúmulo de todos os nutrientes em todos os compartimentos vegetais. Já Bertoli et al. (2011) verificaram que doses de Pb em tomateiro reduziram os teores de potássio na parte aérea, de enxofre nas raízes e de zinco nos frutos.

A espécie *Brachiaria brizantha*, pertencente à família Poacea, é encontrada em diversos continentes, comportando-se como uma planta robusta e de boa produtividade. É cultivada em todo o território brasileiro e ocupa cerca de 50% das pastagens.

Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de observar o comportamento de plantas de *Brachiaria brizantha* na presença de doses crescentes de Pb, analisando a influência deste metal nos teores, na translocação de macro e micronutrientes e no crescimento das plantas.

2 Material e Métodos

O trabalho foi realizado em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo e no Laboratório de Análise Foliar, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições, totalizando vinte blocos experimentais, sendo o período experimental de noventa dias.

A produção de mudas foi realizada em bandejas de isopor, em substrato orgânico Plantmax®. As mudas foram irrigadas diariamente e transplantadas quando atingiam cerca de 10 cm de altura, quando foi feito o transplante para a fase de adaptação, em uma bandeja com solução de Hoagland (HOAGLAND; ARNON, 1950), permanecendo nessa condição por quatro semanas: na primeira semana, com 25% da concentração máxima da solução; na seguinte, com 50% da concentração; na terceira, com 75% da concentração e na quarta, com 100%. Terminada a adaptação, o experimento foi montado em frascos individuais de polietileno com solução de Hoagland a 100%, incluindo a adição do Pb. As doses de Pb utilizadas neste experimento foram 0; 0,25; 1,00, 5,00 e 10,00 mg L⁻¹. A fonte contaminadora foi Pb(NO₃)₂.4H₂O. As doses foram determinadas de modo a contaminar, sem destruir as plantas.

Ao final do experimento, as raízes e a parte aérea foram separadas e secas em estufa, em temperatura entre 65 e 70 °C e, a seguir, foram trituradas. A análise de Pb e de micronutrientes foi realizada por espectrofotômetro de absorção atômica Varian, modelo Spectraa110. Os parâmetros utilizados estão descritos na Tabela 1. A análise de macronutrientes foi feita utilizando-se um espectrofotômetro UV-Vis da Perkin Elmer, modelo lambda 25, para determinar S e P, e um fotômetro de chama para determinar K. O nitrogênio foi analisado por microdestilador Tecnal TE0363.

Tabela 1 Parâmetros espectroscópicos utilizados na determinação dos teores dos elementos

Elemento	Comprimento de onda (nm)	Fenda (mm)
Ca	422,7	0,5
Mg	285,2	0,5
Fe	248,3	0,2
Cu	324,7	0,2
Mn	279,5	0,2
Zn	213,9	0,2
Pb	217	1,0

A preparação das amostras foi feita a partir de uma digestão nitroperclórica na proporção de 2:1 (v/v) de HNO₃ e HClO₄ e, em seguida, os teores dos nutrientes foram determinados conforme Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). Os resultados dos macro e micronutrientes foram tratados por quimiometria, por meio do software Chemoface (NUNES et al., 2012).

3 Resultados e Discussão

3.1 Teores de macro, micronutrientes e de Pb

O gráfico biplot com vetores mostra os teores para macronutrientes, micronutrientes e Pb em *B. brizantha* sob influência de doses crescentes de Pb.

Pode-se notar que as amostras das raízes no gráfico biplot (PC1) são caracterizadas pelos maiores teores dos nutrientes, exceto Mg. Doses crescentes de Pb influenciaram os teores de Ca. Os teores mais elevados nas amostras das raízes do tratamento controle indicam que Ca foi reduzido em função do aumento das doses do metal. Esses dados concordam com os relatados por Huang e Cunningham (1996), que verificaram, em plantas de milho, a redução do teor de Ca nas raízes, em função de doses crescentes de doses de Pb.

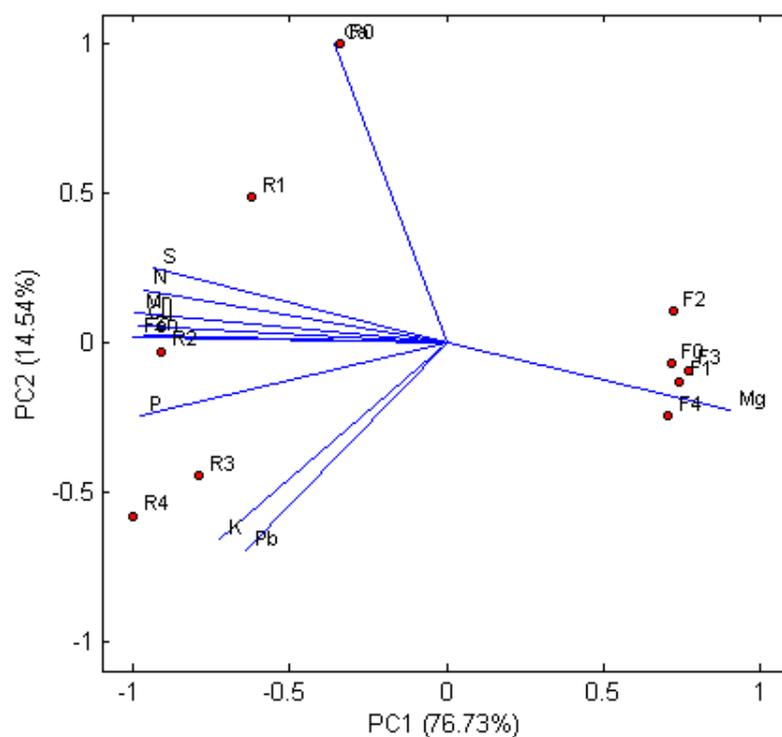


Figura 1 Teor de nutrientes e de Pb (R - raiz e F - parte aérea; doses de Pb: 0-0,00; 1-0,25; 2-1,00; 3-5,00 e 4- 10,00 mg.L⁻¹)

Quanto aos teores de N e P, houve acréscimos com a aplicação de doses de Pb, sendo mais expressivos nas menores doses. Em estudos com raízes de mudas de pepino, Burzynski e Grabowski (1984) constataram que a atividade da enzima nitrito-redutase reduz a absorção de nitrato na presença de chumbo, concluindo que o chumbo tem um papel inibitório na ação da referida enzima. Kabata-Pendias e Pendias (1984) afirmam que o aumento no teor radicular de P pode ser explicado pela precipitação do fósforo como fosfato de chumbo (II), pela facilidade de combinação do Pb^{2+} com ânions $H_2PO_4^-$, forma predominante de absorção de P.

Com relação ao K, a presença de Pb induziu seu aumento. O aumento foi maior nas maiores doses aplicadas. Já Zheng et al. (2011) observaram redução do teor de K em raízes de *L. davidii* contaminada com Pb. Os teores de K podem ser devido à competição direta ou podem ser relacionados à sensibilidade dos grupos K^+SH de $K^+ATPase$ e proteínas da membrana celular sensíveis ao Pb (SHARMA; DUBEY, 2005).

Para os teores de S, nas raízes foi observado um aumento dos teores nas menores dose de Pb. Porém, Kabata-Pendias e Pendias (1984) explicam que a presença de metais pesados, como o Pb, não exerce qualquer efeito sobre a absorção de S.

Os teores de Mg foram superiores nas partes aéreas de *B. brizantha*. Estes resultados divergem dos relatados por Huang e Cunningham (1996), que observaram uma redução do Mg nas partes aéreas de plantas de milho. Cátions como K, Ca e Mg competem com metais como Pb e Cd em pequenas concentrações, tornando-se mais seletivos para os ligantes orgânicos, fazendo com que a sua absorção pelas plantas seja maior. Em maior disponibilidade de Pb e Cd, a competitividade desses nutrientes diminui, causando redução da sua concentração em plantas (KHAN; KHAN, 1983).

Em muitos casos, o chumbo bloqueia a entrada de cátions e de ânions no sistema radicular. Dois mecanismos para a redução da absorção de nutrientes na presença de chumbo têm sido sugeridos. O primeiro, denominado físico, depende do tamanho dos raios do íon do metal, enquanto o segundo, denominado químico, baseia-se no distúrbio induzido pelo metal no metabolismo celular, levando a mudanças nas atividades enzimáticas e na estrutura da membrana (SHARMA; DUBEY, 2005).

Quanto aos micronutrientes Cu, Mn, Zn e Fe, eles tiveram teores crescentes com aplicação das doses de chumbo, sendo mais expressivos os aumentos nas menores doses, sugerindo que houve um efeito sinérgico com Pb

nessas doses. Estes resultados concordam com os relatados por Kibria, Islam, Osman (2009), que observaram teores de Fe em raízes de *Amaranthus gangeticus* e *Amaranthus oleracea*, com aumento gradual em todas as doses de Pb.

Para o Cu, os resultados discordam dos de Kabata-Pendias e Pendias (1984) que afirmam que este elemento não interfere na absorção de Cu. Em estudos realizados com tomate, Khan e Khan (1983) verificaram que o teor de Mn e Fe aumentou com o aumento da taxa de aplicação de metais pesados. Para os autores, isso se deve à ligação do Pb com os outros ligantes de natureza química diferente do conteúdo da seiva do xilema do tomateiro.

Zn aumentou seus teores em baixas doses de Pb e reduziu nas maiores doses. Estes resultados estão de acordo com os de Kibria, Islam, Osman (2009), que verificaram a redução de Zn em *A. gangeticus* e *A. oleracea* com o aumento da taxa de aplicação Pb. Para os autores, estes resultados mostram uma relação negativa entre Pb e Zn.

Embora Pb seja um elemento não essencial, é prontamente absorvido pelas raízes das plantas. Almeida et al. (2008) observaram que, à medida que a dose de Pb aumentou, a concentração nos tecidos de feijão-de-porco também aumentou. Este fato foi observado neste trabalho. Kopittke et al. (2008) observaram a presença de Pb na parede celular e nos vacúolos da raiz de *Brachiaria decumbens* e *Chloris gayana* como cloropiromorfite ($Pb_5(PO_4)_3Cl$), que é um complexo muito estável. Assim, o complexo insolúvel de Pb nas raízes pode explicar sua maior concentração e a baixa translocação deste para as partes aéreas.

3.2 Translocação

Na Figura 2 mostram-se os índices de translocação para macro e micronutrientes e para o Pb. O índice de translocação dos nutrientes sob

influência de Pb (IT) foi calculado com base na relação entre a quantidade de metal acumulado na parte aérea e a acumulada na planta.

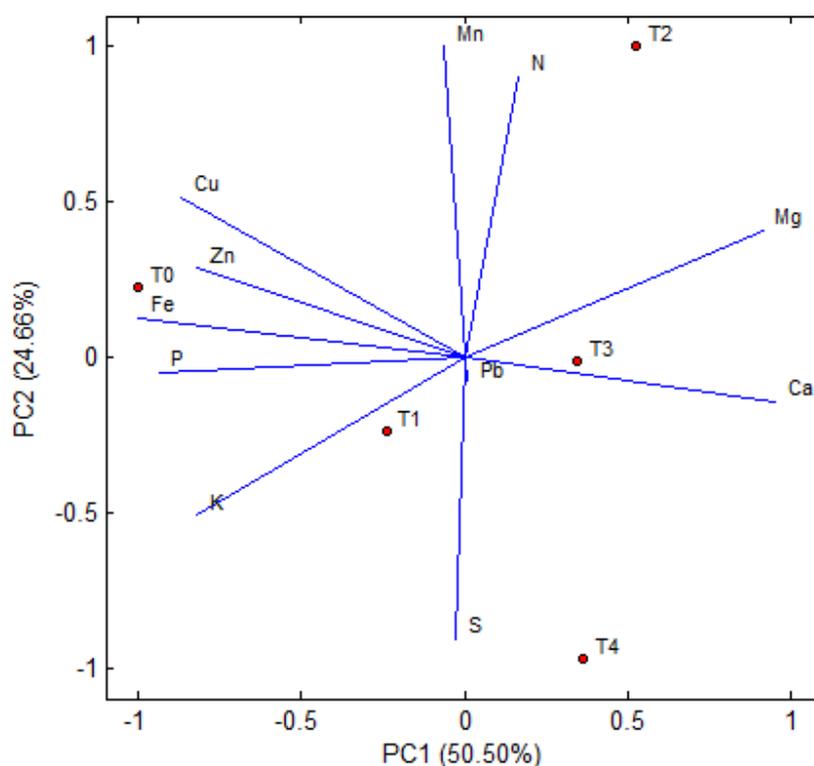


Figura 2 Translocação de nutrientes e de Pb (T - translocação da raiz para a parte aérea; doses de Pb: 0-0,00; 1-0,25; 2-1,00; 3-5,00; 4-10,00 mgL^{-1})

O índice de translocação para o N foi crescente com as doses de Pb, sendo o aumento maior nas menores doses, não diferindo muito nas doses maiores. Uma explicação para isso pode estar relacionada à inibição da nitrato-reductase que, possivelmente, pode não ter sido inibida nas doses de chumbo empregadas neste trabalho.

Para o P, observou-se redução na translocação com o aumento das doses do metal. Estes resultados concordam com os relatados por Cannata et al. (2013), em plantas de feijoeiro. Segundo Huang e Cunningham (1996), o aumento da concentração de P na raiz de ambrósia pode ser em forma de complexo Pb-P, uma forma praticamente insolúvel de Pb que, provavelmente, não estará disponível para a translocação das raízes à parte aérea.

Para o S, o índice de translocação foi maior na dose mais alta e nas menores doses de Pb. Outros autores concluíram que a translocação de S diante da aplicação de metais pesados pode ser estimulada em culturas de milho e inibida em repolhos (YANG et al., 1996 a, b)

O K apresentou índices de translocação crescente até a dose 0,25 mg/L de Pb, decrescendo nas doses maiores, o que pode estar relacionado ao efeito de competição dos cátions (KHAN; KHAN, 1983). Estes resultados discordam dos de Bertoli et al. (2011) que observaram que aplicação do metal não promoveu efeito significativo na translocação de K na parte aérea do tomateiro.

Para o Fe e o Cu, notou-se que os índices de translocação reduziram conforme aumentaram as doses de Pb. Esse resultado contrasta com o de Bertoli et al. (2012) que, em estudos com plantas de tomate, não observaram efeitos significativos das doses de Pb na translocação do Fe. Já em mudas de cedro, Paiva et al. (2000) detectaram que pouco efeito tem o Pb sobre a translocação de Cu.

Na presença de Pb, Ca e Mg tiveram índices de translocação maiores que o tratamento controle. Paiva et al. (2003) também verificaram aumento nesta translocação de Mg com aplicações de Pb e outros metais estudados. Já com relação ao Ca, o autor verificou que não houve influência no índice de translocação em plantas de ipê-roxo.

Para o Mn houve um incremento no índice de translocação na menor dose de Pb, enquanto nas demais notou-se redução, percebendo-se um aparente

antagonismo neste caso. Cannata et al. (2013) verificaram, em plantas de feijão, redução do índice de translocação de Mn com a aplicação de Pb.

O maior índice de translocação para o Pb ocorreu na sua menor dose. Isso indica que, mesmo aumentando as doses do metal, apenas uma pequena quantidade foi transferida para as partes aéreas. A translocação de metais pesados pode ser limitada pelo “sequestro” do metal que se concentra no vacúolo das células radiculares (VERBRUGGEN; HERMANS; SCHAT, 2009). A redução de Pb na parte aérea está relacionada com a alta afinidade pelas cargas negativas resultantes da dissociação de ácidos carboxílicos presentes nas paredes celulares dos tecidos radiculares, principalmente rizoderma e córtex (SEREGIN; IVANOV, 2001). Para Silva et al. (2007), em estudos de síntese e caracterização de quelatos de Pb, dentre outros metais pesados, estes compostos formam estruturas com elevado impedimento estérico, o que pode, aparentemente, explicar a dificuldade de translocação do metal pesado em plantas.

3.3 Crescimento de *Brachiaria brizantha*

Houve redução do crescimento de *Brachiaria brizantha*, tanto na parte aérea quanto nas raízes. A concentração de 1,00 mg.L⁻¹ apresentou maior redução que as demais concentrações, nas duas partes analisadas. A redução foi significativa pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Esses resultados discordam dos de Romeiro et al. (2007), com *Canavalia ensiformes*, em que a redução do crescimento foi diretamente proporcional às concentrações de Pb.

Observou-se que o crescimento das raízes foi mais prejudicado que o das partes aéreas. A redução acentuada da raiz ocorre pelo fato de que esta parte da planta está continuamente em contato com metal pesado. Assim, o Pb absorvido se acumula nas paredes celulares, notadamente das raízes, o que parece contribuir para diminuir seu efeito tóxico para a planta (FAQUIN, 2005).

Tabela 2 Massa seca do sistema radicular e da parte aérea de *Brachiaria brizantha*, sob influência de doses de chumbo

Pb (mg.L ⁻¹)	Peso de matéria seca (g)	
	MSR*	MSPA*
0,00	1,3470 a**	4,8982 a**
0,25	0,6851b	4,3023 c
1,0	0,4539 e	3,1988 e
5,0	0,5186 d	4,3699 b
10,0	0,5508 c	4,1506 d

*Matéria seca de raízes e partes aéreas, respectivamente

**Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade

Em trabalho realizado com *Brachiaria decumbens* em solo contaminado com metais pesados, Santos et al. (2006) verificaram a ausência de sintomas de toxicidade e crescimento comparável com o das plantas do controle. Os autores verificaram que o crescimento reduzido de plantas de *B. decumbens* foi, provavelmente, devido às condições experimentais, tais como a baixa intensidade de luz e uma quantidade de massa de solo por vaso muito baixa para suportar adequadamente o crescimento ideal de *B. decumbens*. Então, concluíram que as plantas foram tolerantes à presença dos metais pesados.

4 Conclusões

As menores doses de Pb aumentaram os teores de S, N, S, Mn, Zn, Cu e Fe. As maiores doses induziram o aumento de K e Pb. Os índices de translocação foram reduzidos para P, Fe, Zn e Cu. Os maiores teores radiculares de Pb indicam que este se concentrou na raiz. Com a aplicação das doses de Pb notou-se aumento na translocação para N, Mg, S, Ca, Mn e Pb e redução ocorreu para P, Zn, Cu e Fe. A translocação para Pb indica que a planta não conseguiu limitar a movimentação do metal para a parte aérea. A redução dos pesos de

matéria seca mostra que o metal nas doses utilizadas interferiu no crescimento das plantas.

Agradecimentos

À CAPES, ao Departamento de Ciência do Solo e ao Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

Referências

ALMEIDA, E. L.; MARCOS, F. C. C.; SCHIAVINATO, M. A.; LAGÔA, A. M. M. A.; ABREU, M. F. Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. *Bragantia*, v. 37, n. 3, p. 569-576, 2008.

BERTOLI, A. C.; CANNATA, M. G.; CARVALHO, R.; BASTOS, A. R. R.; FREITAS, M. P.; AUGUSTO, A. S. *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 86, p. 176-181, 2012..

BERTOLI, A. C.; CARVALHO, R.; CANNATA, M. G.; BASTOS, A. R. R.; AUGUSTO, A. S. Toxidez do chumbo no teor e translocação de nutrientes em tomateiro. *Biotemas*, v. 24, n. 4, p. 7-15, 2011.

BURZYNSKI, M.; GRABOWISKI, A. Influence of lead on NO₃ uptake and reduction in cucumber seedlings. *Acta Societatis Botanicorum*, v. 53, n.1, p. 77-86, 1984.

CANNATA, M. G.; CARVALHO, R.; BERTOLI, A. C.; BASTOS, A. R. R.; CARVALHO, J. G.; FREITAS, M. P.; Augusto, A. S. Effects of lead on the content, accumulation, and translocation of nutrients in bean plant cultivated in nutritive solution. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 44, n. 5, p. 939-951, 2013.

FAQUIN, V. *Nutrição mineral de plantas*. Lavras: Centro de Editoração/FAEPE, 2005. 182 p.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. R. *The water culture methods for growing plants whiout soil*. Bulletin. 347. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 39 p.

HUANG, J. W.; CUNNINGHAM, S. D. Lead phytoextraction: Species variation in lead uptake and translocation. *New Phytologist*, v. 134, n. 1, p. 75-84, 1996.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. Boca Raton: 1984. 432 p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. 2001. 315 p..

KIBRIA, M. G.; ISLAM, M.; OSMAN, K. T. Effects of lead on growth and mineral nutrition of *Amaranthus gangeticus* L. and *Amaranthus oleracea* L. *Soil and Environment*, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2009.

KHAN, S.; KHAN, N. N. Influence of lead and cadmium on the growth and nutrient concentration of tomato (*Lycopersicon-esculentum*) and egg-plant (*Solanum-melongena*). *Plant and Soil*, v. 74, n. 3, p. 387-394, 1983.

KOPITTKE, P. M.; ASHER, C. J.; BLAMEY, F. P. C.; AUCHTERLONIE, G. J.; GUO, Y. N.; MENZIES, N. W. Localization and chemical speciation of Pb in roots of signal grass (*Brachiaria decumbens*) and Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Environmental Science & Technology*, v. 42, n. 12, p. 4595-4599, 2008.

MALAVOLTA, E.; VITTI, C. C.; OLIVEIRA, S. A. *Avaliação do estado nutricional das plantas*. 2 ed. Piracicaba: ESALQ USP, 1997. 319 p.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO, A. C.; BASTOS, S. C. Chemoface: A novel free user friendly interface for chemometrics. *J. Bras. Chem. Soc.*, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012.

PAIVA, H. N. D.; CARVALHO, J. G. D.; SIQUEIRA, J. O., FERNANDES, A. R.; MIRANDA, J. R. P. D. Influence of increasing lead levels on nutrient and Pb content and accumulation in ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) seedlings. *Rev. Árvore*, v. 27, n. 2, p. 151-158, 2003.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R.; ABREU, C. A. D.; PEREIRA, B. F. F.. Lead uptake and potential for fitoremediation of *Canavalia ensiformes* L. *Bragantia*, v. 66, n. 2, p. 327-334, 2007.

SANTOS, F. S.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J. M.; AMARAL-SOBRINHO, N.; MAZUR, N.; GARBISU, C. Chelate-induced phytoextraction

of metal polluted soils with *Brachiaria decumbens*. *Chemosphere*, v. 65, n. 1, p. 43-50, 2006.

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

SHARMA, P.; DUBEY, S. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant. physiol.*, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SILVA, V. L.; CARVALHO, R.; FREITAS, M. P.; TORMENA, C. F.; MELO, W. C. Spectrometric and theoretical investigation of the structures of Cu and Pb/DTPA complexes. *Structural Chemistry*, v. 18, n. 5, p. 605-609, 2007.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanism of metal hyperaccumulation in plants. *New Phytol.*, v. 181, n. 4, p. 759-776, 2009.

YANG, X.; BALIGAR, V. C.; MARTENS, D. C.; CLARK, R. B. Cadmium effects on influx and transport of mineral nutrients in plants species. *J. of Plant Nutrition*, v. 19, n. 3-4, p. 643-656, 1996a.

YANG, X.; BALIGAR, V. C.; MARTENS, D. C.; CLARK, R. B. Plant tolerance to nickel toxicity: II nickel effects on influx and transport of mineral nutrients in four plant species. *J. of Plant Nutrition*, v. 19, n. 2, p. 256-279, 1996b.

ZHENG; L.; LIU, X. M.; LÜTZ-MEINDL, U.; PEER, T. Effects of lead and edta-assisted lead on biomass, lead uptake and mineral nutrients in *Lespedeza chinensis* and *Lespedeza davidii*. *Water Air and Soil Pollution*, v. 220, n. 1-4, p. 57-68, 2011.

ARTIGO 3

Análise ultraestrutural de *Brachiaria brizantha* sob estresse de cádmio e chumbo

Artigo submetido conforme normas da revista Ecotoxicology and Environmental Safety

Terezinha Alves Tolentino^{1*}, Alexandre Carvalho Bertoli¹, Ruy Carvalho¹, Claudia Regina Gontijo Labory², Janaira Santana Nunes³, Ana Rosa Ribeiro Bastos², Maíra dos Santos Pires¹

¹Department of Chemistry, ²Department of Soil Science and ³ Department of Agricultural Microbiology, Federal University of Lavras, PO Box 3037, CEP 37200 000, Lavras – MG, Brazil.

* Corresponding author: Phone: +55 35 3829 1891; Fax: +55 35 3829 1271

Email addresses: therezinha.quim@hotmail.com (T.A. Tolentino), bertolialexandre@yahoo.com.br (A.C. Bertoli), clabory@hotmail.com (C.R.G. Labory), ruy@dqi.ufla.br (R. Carvalho), janairasnunes@hotmail.com (J.S. Nunes), arosa@dcs.ufla.br (A.R.R. Bastos), mairapires15@hotmail.com (M.S. Pires).

Highlights:

- Cd and Pb induced invaginations in the cell walls of the root ultrastructures.
- The presence of crystals and the increase in vacuoles are related to the defense mechanism of plants.
- The leaves suffered less damage than the roots.

Abstract

Cadmium and lead are known for their toxicity both in animals and plants. In order to evaluate the toxicity of these contaminants, *Brachiaria brizantha* plants were grown in a Hoagland nutrient solution for 90 days, where they received doses of cadmium and lead. Cellular ultrastructures of leaves and roots were analyzed by transmission electron microscopy (TEM). Among the most important changes observed in both the treatment with cadmium and with lead, there were cell wall invaginations in the ultrastructures of root cells, the presence of crystals raphids in root cells, and accumulation of material within the cells and vacuolar compartmentalization. On the other hand, the degradation of chloroplasts and an increase in the number of vacuoles were observed in the leave ultrastructures. It was possible to observe that leaf cells suffered less damage than root cells. TEM was important to observe the damage caused by Cd and Pb in the cell ultrastructures of *Brachiaria brizantha*.

Keywords:

heavy metal

invaginations

crystals

1. Introdução

A toxicidade causada por cádmio e chumbo tem sido bem documentada (Pahlsson, 1989; Sharma e Dubey, 2005; Guimarães et al., 2008; Feleafel e Mirdad, 2013). Ela provoca diversos efeitos tóxicos aos organismos (Carvalho et al., 2003; Carvalho et al., 2013), sendo uma das maiores preocupações, na atualidade. Quando absorvidos pelas plantas, esses metais podem causar redução do crescimento, clorose, escurecimento do sistema radicular (Wang et al., 2008) e desbalanço nutricional (Cannata et al., 2013).

Em vários trabalhos analisou-se a ultraestrutura de diferentes espécies vegetais na presença de metais pesados. Tung e Temple (1996) verificaram o acúmulo de chumbo nas ultraestruturas de *Zea mays* L. Kopittke et al. (2008) observaram o acúmulo de chumbo nas membranas celulares de *B. decumbens* e constataram que sua absorção ocorre via apoplasto. Zheng *et al.* (2012) verificaram alterações, como vacuolização e dilatação dos envelopes nucleares, induzidas por chumbo nas ultraestruturas de folhas e raízes de duas espécies de *Lespedeza*. Yu et al (2011) observaram, em plantas de soja expostas ao alumínio, a perda de todas as suas configurações celulares, como rompimento das paredes celulares e desaparecimento dos conteúdos celulares. Células do mesófilo da folha de mudas de rabanete expostas a cádmio por algumas horas apresentaram mudanças estruturais de cloroplastos, mitocôndrias e núcleos (Vitoria, Cunha e Azevedo, 2006). Na presença de cádmio, alterações na ultraestrutura de *Cucumis sativus* L. incluíram grandes danos estruturais, como desintegração do citoplasma e desenvolvimento de vacúolos (Gzyl, Przymusinski e Gwozdz, 2009).

Embora as gramíneas sejam comumente utilizadas para a revegetação de áreas contaminadas, pouca informação encontra-se disponível sobre alterações ultraestruturais causadas por metais pesados. A *Brachiaria brizantha* pertence à família Poaceae, sendo uma das gramíneas mais cultivadas no Brasil. Essa

espécie tem origem africana e constitui uma importante forrageira tropical em diversas regiões da Ásia, Austrália e América do Sul. No Brasil, foi muito difundida devido à sua boa adaptação às condições climáticas, alta produtividade, com domínio sobre invasoras e rusticidade (Silva e Ferrari, 2012).

Diante da importância da microscopia eletrônica de transmissão (MET) como técnica que permite estudar as ultraestruturas celulares afetadas pela toxidez por metais pesados, este trabalho foi realizado com o objetivo de visualizar as alterações causadas nas ultraestruturas de *Brachiaria brizantha* cultivadas em solução nutritiva, na presença de cádmio (Cd) e chumbo (Pb).

2. Material e métodos

As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), durante 90 dias. Sementes de *Brachiaria brizantha* foram germinadas em substrato Plantmax. Mudanças com tamanho uniforme foram transplantadas para a fase de adaptação em solução nutritiva de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950), por quatro semanas. A solução nutritiva foi trocada semanalmente, aumentando a força a partir de 25% até 100%. Após essa etapa, foi transferida para frascos individuais, aos quais se adicionaram os metais pesados Cd (1,00 mg/L) e Pb (10,00 mg/L), durante quatro semanas. Cd foi fornecido como nitrato de cádmio e o Pb, como nitrato de chumbo. Durante o cultivo hidropônico, a solução nutritiva de Hoagland foi trocada uma vez por semana. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em quatro repetições.

2.1 Microscopia eletrônica de transmissão

Amostras de folhas e sistema radicular foram coletadas e imersas em solução fixativa de Karnovsky modificado, por 24 horas. Posteriormente, a

solução fixativa foi retirada e as amostras foram lavadas, por três vezes, em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Em seguida, tetróxido de ósmio foi adicionado às espécimes, permanecendo por 3 horas. As amostras foram lavadas, por três vezes, em água destilada, para a retirada do tetróxido de ósmio. Prosseguiu-se com adição de acetato de uranila, por 18 horas. Fez-se a desidratação em gradiente de acetona (25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95% e três vezes a de 100%), em intervalos de 15 minutos cada. Posteriormente, os espécimes foram infiltrados em séries graduais de acetona-resina (3:1, 2:1, 1:1, 1:2 e três vezes de 100%), durante três dias, seguindo-se a inclusão em bloco em resina pura e polimerizando-se em estufa, a 70 °C, por 8 horas. Seções ultrafinas foram feitas com navalha de diamante em ultramicrótomo, contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo (durante três minutos em cada) e secas à temperatura ambiente. As amostras foram visualizadas e registradas em microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss EM 109), a 80 Kv. As imagens foram editadas no software Corel Draw X6 Photo Paint.

3. Resultados e discussão

3.1. Alterações causadas por Cd e Pb, nas ultraestruturas de células das raízes

As ultraestruturas celulares da raiz de *Brachiaria brizantha* mostraram os efeitos tóxicos de Cd e Pb. As células do controle da raiz apresentaram estruturas regulares com rigidez estrutural (Figura 1). O efeito mais proeminente de Cd e Pb sobre a ultraestrutura das células das raízes apareceu na parede celular, em comparação com o tratamento controle.

Na Figura 2 mostram-se as alterações causadas por Cd, em que se observou a presença de ráfides (Figura 2A e B) e invaginações (Figura 2A a D) e acúmulo de material eletrodensos (D). Na Figura 3 podem ser vistas as alterações causadas por Pb, em que foram verificadas também invaginações na parede

celular (Figura 3A e B), vacuolização (Figura 3C e D), acúmulo de material eletrodenso (Figura 3B) e cristais ráfidés (Figura 3E e F).

As alterações na configuração da parede celular podem estar relacionadas com o deslocamento dos íons Ca^{2+} , pelos metais pesados. As ligações dos íons metálicos ocorrem, preferencialmente, com os polissacarídeos na parede celular, de modo a causar inchaço e deformação na parede celular (Krzeslowska, 2011). Assim, a parede celular funciona como um filtro que previne a célula contra danos graves causados por metais pesados e permite a sobrevivência da célula sem considerável alteração fisiológica (Yu et al., 2011).

Cristais em forma de agulha no interior das células, denominados ráfidés, são formados a partir de ácido oxálico sintetizado a partir do ambiente. Ácido oxálico ($\text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$) é o mais simples dos ácidos dicarboxílicos e o composto orgânico mais oxidado formado em plantas (Franceschi e Nakata, 2005).

Em estudos realizados com *Brachiaria decumbens* constatou-se que o Pb acumula-se intracelularmente em depósitos aciculares (Kopittke et al., 2008). Os cristais podem ter diversas funções, entre elas a regulação de cálcio no organismo e a proteção herbívora (Prychid, Jabaily e Rudall, 2008), mas, neste caso, como foram vistas apenas nas células que receberam Cd e Pb, os resultados podem estar relacionados à detoxificação metálica. A tolerância ao metal se dá pela complexação deste pelos cristais, de modo a diminuir sua toxicidade (Franceschi e Nakata, 2005).

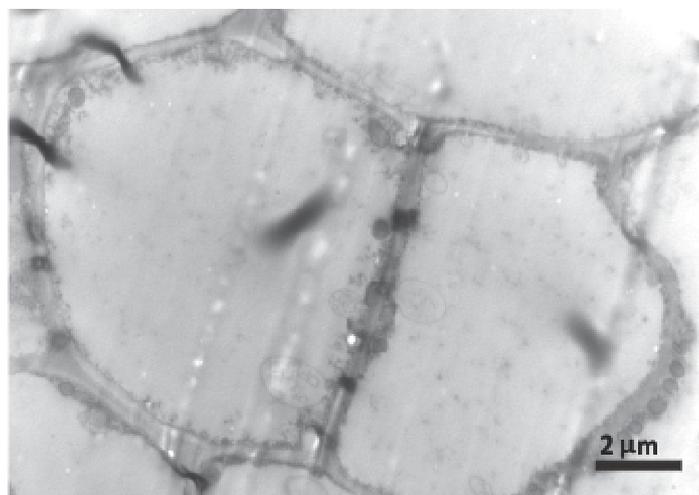


Figura 1 Ultraestrutura da célula de raiz do tratamento controle de *Brachiaria brizantha*

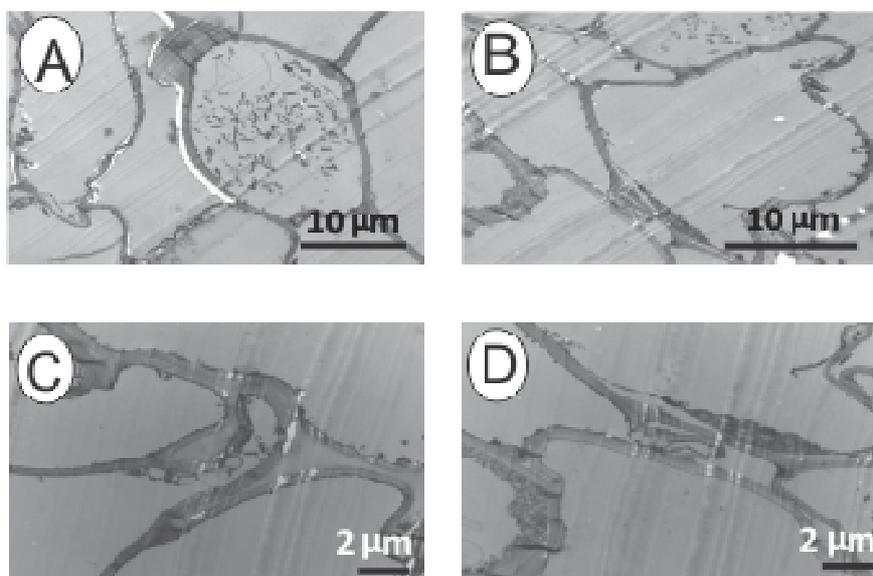


Figura 2 Efeitos de Cd na ultraestrutura de células de raízes *Brachiaria brizantha*. (C-F). Plantas contaminadas com $1,00 \text{ mg.L}^{-1}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$

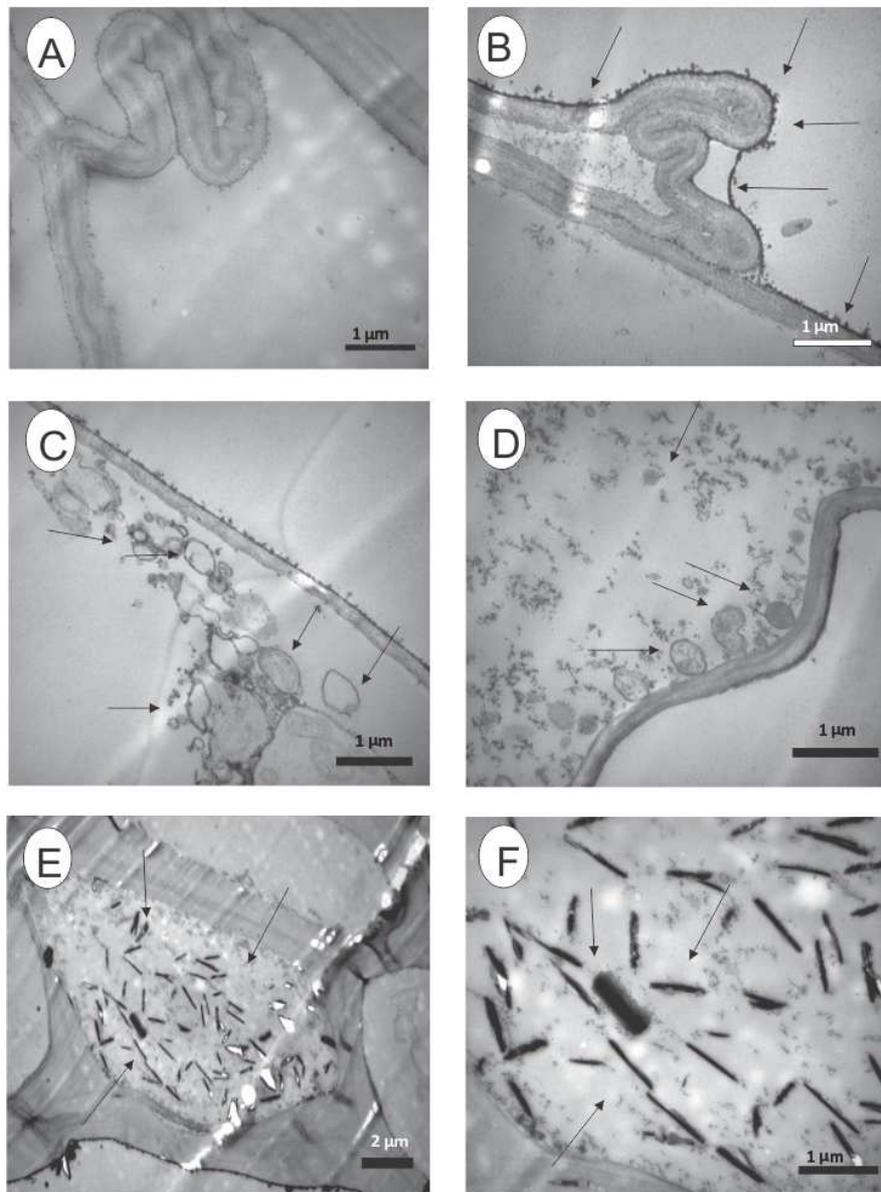


Figura 3 Efeitos de Pb na ultraestrutura de células de raízes de *Brachiaria brizantha*(A-F). Plantas contaminadas com 10,00 mg.L⁻¹ de Pb(NO₃)₂. Setas indicam acúmulo de material eletrodense (B), vacuolização (C, D) e cristais ráfides (E, F)

O processo de vacuolização observado serve para compartimentar substâncias tóxicas, de modo de modo a proteger as organelas. A compartimentação a um nível subcelular desempenha papel importante na desintoxicação de metais pesados nos tecidos das plantas. Zeng et al. (2012) verificaram a compartimentação vacuolar de Pb em células de *Lespedeza chinensis* e *Lespedeza davidii*, após exposição a Pb. Para estes autores, a compartimentação vacuolar desempenha papel importante na tolerância e na detoxificação de metais pesados, o que limita sua fitotoxicidade. O vacúolo das células vegetais é uma das organelas com as mais variadas funções (Yu et al., 2011). No nosso trabalho, a vacuolização parece ter ocorrido em função de morte celular.

3.2 Alterações causadas por Cd e Pb nas ultraestruturas das folhas

Pode-se notar que as células das folhas na presença dos metais Cd e Pb foram menos influenciadas que as células das raízes. O efeito mais notável da presença do metal pesado foi o aumento do número de vacúolos (Figura 4C) que serviram de depósitos granulares. Alguns cloroplastos apresentaram alterações nas formas (Figuras 4B e D). O nível de danos variou entre células com estruturas relativamente preservadas (Figura 4C e F); há indícios de degeneração dos cloroplastos (Figuras 3B e D) e alteração da drástica da configuração celular.

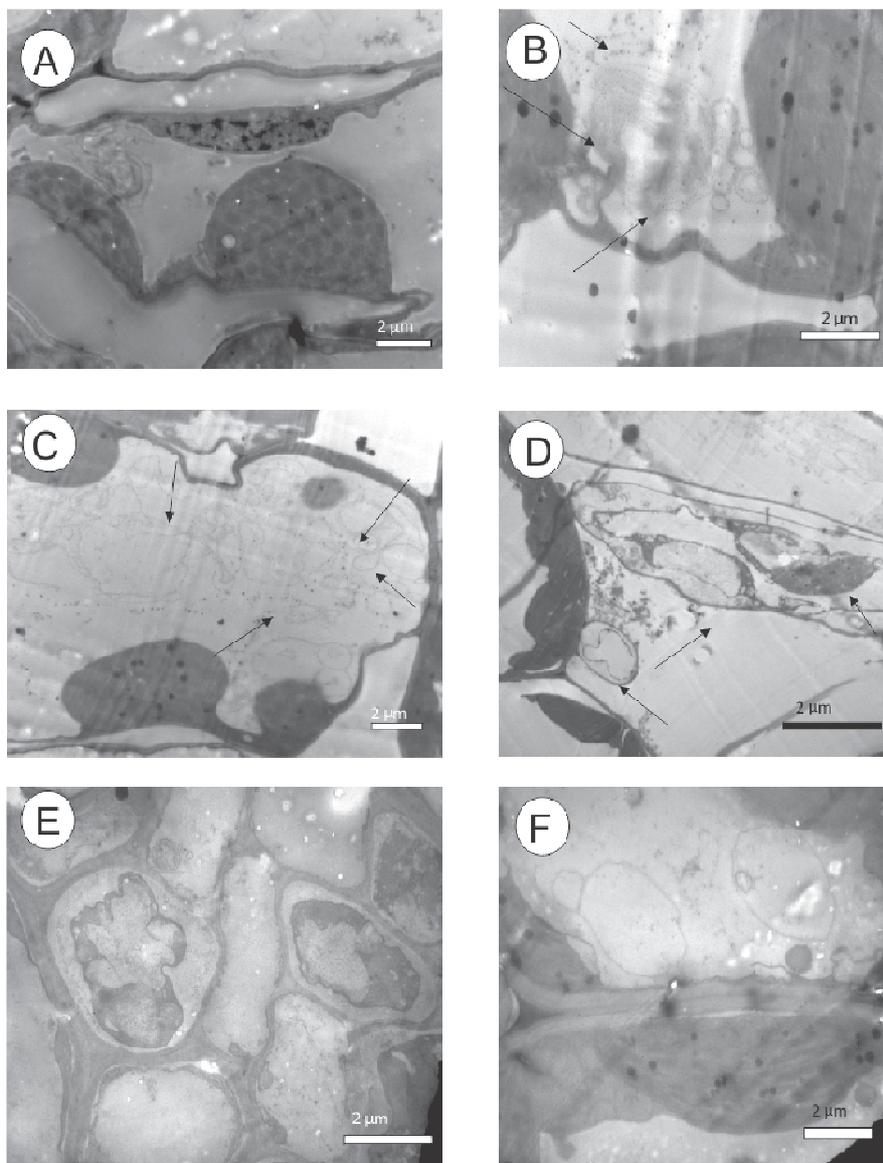


Figura 4 Efeitos de Cd (B-D) e Pb (E, F) na ultraestrutura de células de folhas de *Brachiaria brizantha*. (A) célula do tratamento controle. (B-D) plantas contaminadas com $1,00 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$. (E, F) plantas contaminadas com $10,00 \text{ mgL}^{-1}$ de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Setas indicam degradação (B, D) e vacuolização (C)

O número de vacúolos sugere que a compartimentação do metal pesado ocorre nessas estruturas, de modo a contribuir para a tolerância e a desintoxicação (Zheng et al., 2012). O aumento de vacúolos pode ser importante para íons tóxicos, como Cd^{2+} e Pb^{2+} e, portanto, contribui para a sobrevivência da célula sob condições de estresse. O número de vacúolos sugere que a compartimentação do metal pesado ocorre nessas estruturas, de modo a contribuir para a tolerância e a desintoxicação (Zheng et al., 2012). Os depósitos no interior do vacúolo aparentemente fazem parte do mecanismo de defesa da planta.

Alguns cloroplastos não apresentaram modificações, enquanto outros tiveram distorções e apresentaram uma estrutura distendida. A alteração nas formas dos cloroplastos pode indicar um início da degradação destes. Schneider et al. (2013) verificaram processo de degradação do cloroplasto, microvesículas e morte celular em folhas de *Leucaena leucocephala*, na presença de arsênio. Alteração na configuração dos cloroplastos em rabanete foi citada por Vitoria et al. (2006).

Os sintomas de toxicidade de metais pesados podem ser atribuídos a uma extensa interação em níveis celulares e moleculares (Hall, 2002). A toxicidade é, em parte, consequência da interferência destes metais com percursos homeostáticos para elementos essenciais. Os metais pesados podem interferir no equilíbrio nutricional, de modo que resultam na degradação ultraestrutural (Gzyl, Przymusinski e Gwozdz, 2009).

Os resultados deste trabalho mostraram que as folhas foram menos afetadas que as raízes, conforme observado nas estruturas celulares danificadas. Yu et al. (2011), em estudos com alumínio em soja, observaram que a raiz apresenta a maioria dos mecanismos de exclusão, mas recebe, de imediato, os efeitos tóxicos do metal.

4. Conclusões

Cd e Pb causaram maiores danos nas ultraestruturas das raízes do que em folhas.

O efeito mais proeminente do Cd e do Pb foi a indução de invaginações nas paredes celulares e a formação de ráfides.

A presença de cristais e vacúolos são mecanismos principais que o vegetal utiliza para se proteger dos efeitos tóxicos de Cd e Pb.

A MET foi eficaz na determinação da toxicidade de Cd e Pb em *Brachiaria brizantha*.

Agradecimentos. Os autores agradecem à FAPEMIG, à CAPES, ao Departamento de Ciência do Solo e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) da Universidade Federal de Lavras.

5. Referências

- Cannata, M. G., Carvalho, R., Bertoli, A. C., Bastos, A.R.R., Carvalho, J.G., Augusto, M.S. 2013. Effects of lead on the content, accumulation, and translocation of nutrients in bean plant cultivated in nutritive solution. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. 44, p. 939-951.
- Carvalho, F. M., Silvany Neto, A.M., Tavares, T.M, Costa, A.C.A., Chaves, C.R., Nascimento, L.D., Reis, M.A. 2003. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. *Rev. Panam. Salud Publica*. 13, p. 19-24,
- Carvalho, V.C.H.S., Rossato, S.L., Fuchs, F.D., Harzheim, E., Fuchs, S.C. 2013. Assessment of primary health care received by the elderly and health related quality of life: a cross-sectional study. *Bmc Public Health*. 13.1471-2458.
- Castro, E.M.; Pereira, F.J.; Paiva, R. 2009. *Histologia vegetal: estrutura e função de órgãos vegetativos*. Lavras: UFLA. 234p.

- Feleafel, M.N., Mirdad, Z.M. 2013. Hazard and effects of pollution by lead on vegetable crops. *Journal of Agricultural & Environmental Ethics*. 26. 547-567,
- Franceschi, V.R.; Nakata, P.A. 2005. Calcium oxalate in plants: Formation and function. *Annual Review of Plant Biology*. 56. 41-71.
- Guimarães, M. A., Santana, T.A., Silva, E. Z., Zenzen, I.L., Loureiro, M.E. 2008. Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *R. Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas*. 1. 58-69, .
- Gzyl, J., Przymusiński, R., Gwozdz, E.A. 2009. Ultrastructure analysis of cadmium-tolerant and -sensitive cell lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 99. 227-232.
- Hall, J.L. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 53, 1-11.
- Hoagland, D. R.; Arnon, D. R. 1950. The water culture methods for growing plants without soil. *Bulletin*. 347. Berkeley: California Agriculture Experiment Station. 32 p
- Kopittke, P.M., Asher, C.J., Blamey, F.P.C., Auchterlonie, G.J., Guo, Y. N., Menzies, M.W. 2008. . Localization and chemical speciation of Pb in roots of signal grass (*Brachiaria decumbens*) and Rhodes grass (*Chloris gayana*). *Environmental Science & Technology*. 42. 4595-4599.
- Krzyszowska, M., Lenartowska, M., Mellerowicz, S., Wozny, A. 2009. Pectinous cell wall thickenings formation-A response of moss protonemata cells to lead. *Environmental and Experimental Botany*. 65. 119-131.
- Pahlsson, A. M. B. 1989. Toxicity of heavy-metals (Zn, Cu, Cd, Pb) to vascular plants - a literature-review. *Water Air and Soil Pollution*. 47. 287-319.
- Prychid, C. J.; Jabaily, R. S.; Rudall, P. J. 2008. Cellular ultrastructure and crystal development in *Amorphophallus* (Araceae). *Annals of Botany*. 101. 983-995.

- Santos, R.W.; Schmidt, E.C.; Bouzon, Z.L. 2013. Changes in ultrastructure and cytochemistry of the agarophyte *Gracilaria domingensis* (Rhodophyta, Gracilariales) treated with cadmium. *Protoplasma*. 250, 297-305,
- Sharma, P.; Dubey, S. 2005. Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant. physiol.* 17, 35-52.
- Silva, S. F.; Ferrari, J. L. 2012. Descrição botânica, distribuição geográfica e potencialidades de uso da *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex. A. Rich) Stapf. *Enciclopédia Biosfera Goiânia*. 8, 302-314 .
- Schneider, J., Labory, C.R.G., Rangel, W.M., Alves, E., Guilherme, L.R.G. 2013. Anatomy and ultrastructure alterations of *Leucaena leucocephala* (Lam.) inoculated with mycorrhizal fungi in response to arsenic-contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*. 262, 1245-1258.
- Tung, G.; Temple, P. J. 1996. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L.) seedlings, a study by histochemical and electron microscopy. *Science of The Total Environment*. 188, 71-85.
- Vitoria, A. P.; Cunha, M., Azevedo, R. A. 2006. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*. 58, 47-52.
- Volland, S., Lutz, C., Michalke, B. Lutz-Meindl, U. 2012. Intracellular chromium localization and cell physiological response in the unicellular alga *Micrasterias*. *Aquatic Toxicology*. 109, 59-69.
- Wang, K. S, Huang, L.C, Lee, H.S. Chen, P.Y., Chang, S.H. 2008. Phytoextraction of cadmium by *Ipomoea aquatica* (water spinach) in hydroponic solution: Effects of cadmium speciation. *Chemosphere*. 72, 666-672.
- Yu, H. N., Liu, P., Wang, Z.Y., Chen, W.R., Xu, G.D. 2011. The effect of aluminum treatments on the root growth and cell ultrastructure of two soybean genotypes. *Crop Protection*. 30, 323-328.

Zheng, L. J., Peer, T., Seybold, V., Lutz-Meidl, U. 2012. Pb-induced ultrastructural alterations and subcellular localization of Pb in two species of *Lespedeza* by TEM-coupled electron energy loss spectroscopy. *Environmental and Experimental Botany*. 77, 196

ANEXO

Tabela 1 Teores de nutrientes e Pb (mg.kg⁻¹) após aplicações de Pb (mgL⁻¹)

Parte da planta	Pb(mgL ⁻¹)	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Zn	Fe	Pb
Raiz	0,00	32125,0	6850,0	12800,0	9375,0	3275,0	3475,0	23,225	593,375	70,950	446,85	0,0000
	0,25	32800,0	8225,0	14225,0	6950,0	3375,0	4575,0	31,350	613,575	95,925	482,50	28,650
	1,00	31425,0	9500,0	25200,0	6175,0	2775,0	5000,0	26,425	617,350	93,200	607,10	278,225
	5,00	31950,0	9375,0	24750,0	5600,0	3400,0	3575,0	33,475	651,975	85,475	611,025	963,215
	10,0	33975,0	10550,0	23425,0	5900,0	3275,0	3500,0	31,3000	708,425	89,350	579,675	1828,95
Parte aérea	0,00	25975,0	4925,0	13675,0	5475,0	3850,0	1550,0	4,7500	244,325	52,725	110,925	0,0000
	0,25	24400,0	4725,0	15300,0	5575,0	4000,0	1525,0	4,9500	264,975	55,800	101,900	10,2750
	1,00	26425,0	4525,0	9475,0	5650,0	3825,0	1550,0	4,4250	295,900	56,625	101,250	21,4750
	5,00	26200,0	5200,0	13200,0	5650,0	4300,0	1500,0	4,1250	246,425	56,000	95,275	41,7000
	10,0	25750,0	5375,0	17375,0	5475,0	4200,0	1775,0	3,9000	238,075	54,175	95,175	63,4000

Tabela 2 Índices de translocação (IT%) para nutrientes e PB, após aplicação de doses de Pb

Pb(mgL ⁻¹)	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Zn	Fe	Pb
0,00	44,7851	42,0511	51,6707	37,4984	54,0625	30,8517	18,7894	29,0857	43,0999	19,8302	0,0000
0,25	42,6684	36,5525	53,9084	45,8035	54,7106	26,2999	14,5876	30,1312	38,1599	17,4587	26,6427
1,00	45,7355	32,3287	30,2287	48,1751	58,2531	24,8125	14,4130	32,3958	38,2271	14,5648	7,46766
5,00	45,0682	36,8237	34,8094	50,9905	56,4009	29,7137	11,2667	27,5880	39,8097	14,3423	4,18200
10,00	43,2132	33,9466	42,9732	48,1523	56,4174	36,8765	11,2612	25,2570	37,6932	14,2472	3,35047

Tabela 3 Teores para nutrientes e Cd (mg.kg⁻¹) após aplicação de doses de Cd

Parte da planta	Cd (mg.L ⁻¹)	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Zn	Fe	Cd
Raiz	0,00	32125,0	6850,0	12800,0	9375,0	3275,0	3475,0	23,225	593,375	70,950	446,85	0,0000
	0,025	32700,0	11350,0	27050,0	6125,0	3200,0	5450,0	31,45	838,625	95,150	674,90	30,825
	0,10	32250,0	9125,0	23575,0	5575,0	2850,0	4325,0	30,925	648,125	83,350	518,55	76,900
	0,50	324750,0	7575,0	18875,0	4200,0	2250,0	4150,0	28,25	588,625	63,425	466,43	80,450
	1,00	312000	10025,0	24125,0	6200,0	2175,0	4500,0	26,975	590,15	71,100	486,58	157,05
Parte aérea	0,00	25975,0	4925,0	13675,0	5475,0	3850,0	1550,0	4,750	244,325	52,725	110,93	0,000
	0,025	26650,0	4975,0	16600,0	5325,0	4125,0	1775,0	4,950	283,15	62,825	126,55	0,6750
	0,10	24500,0	5700,0	15550,0	4950,0	3825,0	1675,0	4,400	231,075	56,750	103,95	2,0750
	0,50	24600,0	5225,0	12725,0	5225,0	3850,0	1775,0	2,250	209,575	42,650	88,225	4,5500
	1,00	24100,0	4650,0	15550,0	7550,0	4200,0	2075,0	1,875	188,675	41,700	93,275	11,300

Tabela 4 Índice de translocação (IT %) de nutrientes e Cd, após aplicação de doses de Cd

Cd(mgL ⁻¹)	N	P	K	Ca	Mg	S	Cu	Mn	Zn	Fe	Cd
0,00	44,7851	42,0511	51,67079	37,49847	54,0625	30,8517	18,7895	29,0857	43,0999	19,8302	0,0000
0,025	44,9620	31,3764	38,35743	46,83622	56,3632	24,7879	13,8054	26,2754	40,2688	16,8391	2,1464
0,10	43,0839	38,2085	39,90199	47,11622	57,3381	28,0686	12,6181	26,2607	40,5204	16,7103	2,6078
0,50	43,0140	41,3380	41,71108	55,79946	63,4388	31,1497	7,53676	26,2387	40,8758	15,8843	5,3977
1,00	43,5941	32,3425	39,59109	51,47051	65,5132	31,7355	6,56305	24,2117	36,9874	16,0661	6,8647