



LORENA GABRIELA ALMEIDA

**PARÂMETROS DE CRESCIMENTO,
BIOQUÍMICOS E ECOFISIOLÓGICOS EM
PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS EM
SOLOS MULTICONTAMINADOS COM CD E
ZN**

LAVRAS - MG

2015

LORENA GABRIELA ALMEIDA

**PARÂMETROS DE CRESCIMENTO, BIOQUÍMICOS E
ECOFISIOLÓGICOS EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS EM
SOLOS MULTICONTAMINADOS COM CD E ZN**

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

Orientador

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

Coorientador

Dr. Jose Donizeti Alves

LAVRAS - MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Almeida, Lorena Gabriela.

Parâmetros de crescimento, bioquímicos e ecofisiológicos em
plantas de milho cultivadas em solos multicontaminados com Cd e Zn
/ Lorena Gabriela Almeida. – Lavras : UFLA, 2015.

83 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Bibliografia.

1. EROs. 2. Elementos-traço. 3. Enzimas antioxidantes. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

LORENA GABRIELA ALMEIDA

**PARÂMETROS DE CRESCIMENTO, BIOQUÍMICOS E
ECOFISIOLÓGICOS EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS EM
SOLOS MULTICONTAMINADOS COM CD E ZN**

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

APROVADA em 26 de fevereiro de 2015.

Dr. Jose Donizeti Alves UFLA

Dr. Guilherme Lopes UFLA

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Orientador

LAVRAS – MG

2015

A todos que de alguma forma foram essenciais para a realização deste trabalho.

OFEREÇO

Aos meus pais, Bárbara e Itamar Almeida, para vocês eu conjugo o verbo amar!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho, auxiliar nas minhas escolhas e dar-me forças para sempre seguir em frente.

Aos meus pais, Bárbara e Itamar Almeida, pelo amor incondicional, compreensão, força e suporte. Por serem a base da minha vida, sempre acreditar e confiar nos meus sonhos.

Aos meus irmãos, Guilherme e Gustavo Almeida, pelo companheirismo, amizade e por serem grandes exemplos.

Ao Adelcio Jorge, por ser meu amigo e incentivador. Serei eternamente grata a Deus por colocar uma pessoa tão especial em meu caminho. Obrigada por tudo.

Ao professor Luiz Roberto Guimarães Guilherme, pela orientação, incentivo, confiança, aprendizado e pelo exemplo de ética profissional.

Ao professor José Donizeti Alves, pela orientação, por toda confiança, oportunidade e ensinamentos dispensados desde a graduação até o término dessa etapa.

Ao professor Guilherme Lopes, membro da banca, pela atenção dedicada.

Aos professores e pesquisadores pelos ensinamentos e disponibilidade em ensinar e ajudar sempre que necessário.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Molecular de Plantas: Cinthia, Cleide, Dayane, Helbert, Ian, Isabel, Iasminy, Jéssica, Kamila, Lissa, Meline, Paula que foram indispensáveis na realização desse trabalho, pela amizade e agradável convivência.

Em especial quero agradecer: Kamila Dázio, Dayane Meireles, Cinthia Andrade, Cleide Campos, Iasminy, Isabel Brandão e Hugo Bentzen por me ajudarem em todos os momentos.

Aos funcionários do setor de Fisiologia Vegetal: “Barrinha”, Daniela, Odorêncio, Joel, Lena, Tanham, Evaristo, pela disponibilidade em auxiliar.

Aos colegas do Departamento de Ciência do Solo: Gabriel, Geila Carvalho, “Pezão”, pela grande colaboração para a realização deste trabalho

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, e à FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa através da Rede Recuperamina.

À Universidade Federal de Lavras, ao Setor de Fisiologia Vegetal e ao Departamento de Ciência do Solo-DCS, pela oportunidade e infraestrutura disponibilizadas.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fisiologia Vegetal, por me proporcionar uma oportunidade de crescimento profissional.

A todos que, de alguma forma, contribuíram e fizeram parte dessa caminhada.

Muito maior que conseguir o título é sair uma pessoa muito melhor que entrei.

Muito obrigada!

“Eu posso, eu quero, com a ajuda de Deus eu consigo!”

RESUMO GERAL

As espécies agrícolas enfrentam uma variedade de estresses bióticos e abióticos que são os principais limitantes à produção das culturas. Neste contexto, a contaminação por elementos-traço caracteriza-se como um estresse abiótico, que representa um problema ambiental. O cádmio é um potente inibidor de enzimas e por ser um elemento não essencial, pode causar danos às células vegetais, mesmo quando presente em baixas concentrações. A exposição das plantas a este elemento-traço resulta em vários danos ao metabolismo fisiológico dos vegetais e danifica o aparelho fotossintético, causando a produção de espécies reativas de oxigênio em tecidos fotossinteticamente ativos. O zinco é cofator de muitas enzimas, estando envolvido tanto na regulação quanto na ativação dessas moléculas. Além disso, está envolvido nos processos de regulação da transcrição, tradução e transdução dos sinais. Devido a sua importância no metabolismo do vegetal, a concentração deste elemento deve ser mantida dentro de uma faixa relativamente estreita para evitar os efeitos de deficiência ou toxicidade. As semelhanças físicas e químicas entre cádmio e zinco permitem a interação desses elementos no ambiente, podendo causar efeitos antagônicos, em que o zinco atua neutralizando os danos causados pelo cádmio ao metabolismo, ou efeitos sinérgicos, em que o zinco potencializa os efeitos do cádmio sobre o metabolismo. Neste sentido, mecanismos fisiológicos para excluir, desintoxicar ou compartimentalizar o excesso de elementos-traço são cruciais para a sobrevivência dos vegetais quando expostos a elevadas concentrações destes elementos. A fim de compreender melhor as respostas das espécies submetidas ao estresse por Cd e Zn o presente estudo teve como objetivo avaliar plantas de *Zea mays L* (milho) sensíveis à contaminação por esses elementos (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2006), cultivadas em Latossolo e Cambissolo, através de análises bioquímicas, ecofisiológicas. As plantas foram expostas a doses de Cd e Zn (0,4 +14,89; 0,72+28,80; 1,29+48; 2,3 + 86,64; 4,1+152,64; 13,6+506,89; 24,4+908,61 mg kg⁻¹) durante 21 dias. Foram realizadas análises enzimáticas, ecofisiológicas, tais como, atividade das enzimas SOD, CAT, APX, peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, índice de clorofila, taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração. Os dados obtidos evidenciaram comportamento específico das plantas de milho para cada solo analisado. O Latossolo disponibilizou em maior quantidade o Cd aplicado às plantas, resultando em um maior dano oxidativo e outros efeitos prejudiciais. O Cambissolo, devido a seus atributos, principalmente aos maiores teores de argila e matéria orgânica, adsorveu o Cd e Zn em maiores proporções, o que resultou em um melhor desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: EROs. Elementos-traço. Enzimas antioxidantes. Fotossíntese.

GENERAL ABSTRACT

Agricultural species face several biotic and abiotic stresses that are the main limiting factors for crop production. In this context, contamination by trace-elements is characterized as an abiotic stress, representing an environmental issue. Cadmium is a powerful enzyme inhibitor and, given that it is a non-essential element, it can damage plant cells, even in low concentrations. Plant exposure to this trace-element results in many damages to plant physiological metabolism and injures the photosynthetic system, triggering the production of oxygen reactive species in photosynthetically active tissues. Zinc is a co-factor for several enzymes, and is involved in both regulation and activation of such molecules. In addition, it is also involved in the regulation processes of signal transcription, translation, and transduction. Because of its importance for plant metabolism, the concentration of this element must be kept within a relatively narrow range to avoid the effects of either deficiency or toxicity. Physical and chemical similarities between Cadmium and Zinc allow the interaction of these elements in the environment, possibly causing antagonist effects in which Zinc acts neutralizing the damages caused by Cadmium in the metabolism, or synergistic effects in which Zinc enhances the effects of Cadmium over the metabolism. In this sense, physiological mechanisms to delete, detoxify or compartmentalize the excess of trace-elements are essential for plant survival when exposed to high concentrations of such elements. In order to better understand the responses of the species subjected to Cd and Zn stress, the present study aimed to evaluate *Zea mays L* (maize) plants sensitive to the contamination by these elements (Organization for Economic Co-operation and Development – OECD, 2006), cultivated in Latosol and Cambisol, using biochemical and ecophysiological analyses. The plants were exposed to doses of Cd and Zn (0.4+14.89, 0.72+28.80, 1.29+48, 2.3+86.64, 4.1+152.64, 13.6+506.89, 24.4+908.61 mg kg⁻¹) during 21 days. We conducted enzymatic and ecophysiological analyses, such as the activity of enzymes SOD, CAT, APX, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, chlorophyll content, photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration. The data obtained showed a specific behavior of the maize plants for each analyzed soil. Latosol released higher amounts of Cd to plants, resulting in a greater oxidative damage and other adverse effects. Due to its attributes, especially the higher clay and organic matter content, Cambisol absorbed Cd and Zn in higher proportions, resulting in better plant development.

Keywords: ROS. Trace-elements. Antioxidant enzymes. Photosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

Figura 1	Índice relativo de clorofila de plantas de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn	57
Figura 2	Taxa de fotossíntese líquida submetida a diferentes concentrações de Cd/Zn	59
Figura 3	Taxa de transpiração submetida a diferentes concentrações de Cd/Zn	60
Figura 4	Taxa de condutância estomática submetida a diferentes concentrações de Cd/Zn	61
Figura 5	Atividade da dismutase do superóxido (SOD), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn	64
Figura 6	Atividade da enzima catalase (CAT), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn	65
Figura 7	Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn	67
Figura 8	Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn	68
Figura 9	Níveis de peroxidação lipídica expresso pelo conteúdo de malondialdeído (MDA), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn.....	69

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1	Lista de espécies sensíveis sugeridas em ensaios ecotoxicológicos.....	26
----------	--	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Análise química do latossolo e cambissolo.....	43
Tabela 2	Análise física do Latossolo e Cambissolo	44
Tabela 3	Recomendação de adubação para vaso.....	45
Tabela 4	Concentrações utilizadas de cádmio e zinco	45
Tabela 5	Concentrações de zinco e cádmio na parte aérea e raízes de plantas de milho cultivadas em Cambissolo e Latossolo sob doses crescentes de Zn e Cd.....	53
Tabela 6	Análise dos parâmetros de crescimento de plantas de milho cultivadas em Cambissolo e Latossolo em diferentes doses de Cd/Zn.....	55

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 Introdução Geral.....	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Elementos-traço e as respostas fisiológicas das plantas	15
2.2	Efeito da presença de cádmio em plantas	17
2.3	Efeitos da presença de Zn em plantas	20
2.4	Interação cádmio e zinco	22
	REFERÊNCIAS	28
	CAPÍTULO 2 Avaliações fisiológicas e ecofisiológicas de plantas de milho sensíveis à toxicidade por elementos-traço em latossolo e cambissolo.....	37
1	INTRODUÇÃO	40
2	MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1	Teor de cádmio e zinco nas plantas	46
2.2	Análise de crescimento	47
2.3	Enzimas antioxidantes	48
2.3.1	Dismutase do superóxido	48
2.3.2	Catalase	49
2.3.3	Peroxidase do ascorbato	49
2.4	Peróxido de hidrogênio	49
2.5	Peroxidação lipídica	50
2.6	Análises ecofisiológicas	50
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1	Teor de Cd e Zn	52
3.2	Análise de crescimento	54
3.3	Análises ecofisiológicas	56
3.4	Enzimas antioxidantes	63
4	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

CAPÍTULO 1 Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

A toxicidade por elementos-traço depende da sua concentração e biodisponibilidade no solo, do tempo de exposição ao elemento, do genótipo da planta, bem como das condições gerais da mesma. Além disso, a dose-resposta, ou seja, a concentração que causará um efeito específico (e.g., danos ao metabolismo vegetal) varia entre os elementos essenciais e não essenciais.

O cádmio é um potente inibidor de enzimas e, por ser um elemento não essencial, pode causar danos às células vegetais, mesmo quando presente em baixas concentrações. A exposição das plantas a esse elemento-traço resulta na degeneração das mitocôndrias, aberrações na mitose, conduzindo a uma inibição da proliferação e divisão celular. Além disso, ele danifica o aparelho fotossintético, causando a produção de espécies reativas de oxigênio em tecidos fotossinteticamente ativos.

O zinco é cofator de muitas enzimas, estando envolvido tanto na regulação quanto na ativação dessas moléculas. Além disso, ele está envolvido nos processos de regulação da transcrição, tradução e transdução dos sinais. Devido a sua importância no metabolismo do vegetal, a concentração desse elemento deve ser mantida dentro de uma faixa relativamente estreita para evitar os efeitos de deficiência ou toxicidade.

As semelhanças físicas e químicas entre cádmio e zinco permitem a interação desses elementos no ambiente, podendo causar efeitos antagônicos, em que o zinco atua neutralizando os danos causados pelo cádmio ao metabolismo, ou efeitos sinérgicos, em que o zinco potencializa os efeitos do cádmio sobre o metabolismo. Nesse sentido, mecanismos fisiológicos para excluir, desintoxicar ou compartimentalizar o excesso de elementos-traço são cruciais para

sobrevivência dos vegetais quando expostos a elevadas concentrações desses elementos.

A fim de compreender melhor as respostas das espécies submetidas ao estresse por Cd e Zn o presente estudo teve como objetivo avaliar plantas de *Zea mays* L (milho) sensíveis à contaminação por esses elementos (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2006), cultivadas em Latossolo e Cambissolo, através de análises bioquímicas e ecofisiológicas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Elementos-traço e as respostas fisiológicas das plantas

A toxicidade por elementos-traço induz à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singleto (1O_2). Tais moléculas são altamente reativas, podendo interagir com vários componentes celulares, desencadeando danos oxidativos a ácidos nucleicos, proteínas, açúcares e lipídeos (GADJEV; STONE; GECHEV, 2008). Como proteção contra os efeitos oxidativos causados pelo excesso de EROs, as células possuem um sistema antioxidante composto por enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (VÁSQUES et al., 2006).

A enzima antioxidante SOD é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 . Já as enzimas CAT e APX desempenham papéis cruciais na eliminação e desintoxicação do H_2O_2 (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER, 2002). Assim, a presença e a atividade dessas enzimas antioxidantes indicam o estado de defesa antioxidante da célula, uma vez que o acúmulo de EROs está relacionado à ruptura do equilíbrio entre a sua produção e a atividade do sistema antioxidante (TUTEJA et al., 2010).

Em espécies de plantas sensíveis à presença de elementos-traço, os níveis de EROs tendem a aumentar substancialmente se a atividade das enzimas antioxidantes não for suficiente para a sua remoção. Consequentemente, o dano celular causado pelas EROs reflete-se em prejuízos ao crescimento e desenvolvimento da planta, podendo levar à morte celular (SHARMA; DIETZ, 2009). A produção em excesso de H_2O_2 em resposta ao estresse por elementos-traço causa danos oxidativos, afetando diretamente as funções celulares. No entanto, essa molécula também é importante na sinalização celular, na regulação

do desenvolvimento vegetal, na sinalização hormonal, no processo de morte celular programada, bem como nos mecanismos de resposta e tolerância aos estresses bióticos e abióticos (MATILLA-VÁSQUEZ; MATILLA, 2010; SANDALIO et al., 2012). Diante disso, manter o controle da produção de EROs em células vegetais durante a exposição ao excesso de elementos-traço é importante na manutenção dos processos de desenvolvimento e respostas a essas condições de estresses.

Os elementos-traço entram na planta via simplasto, por meio de difusão simples, transporte passivo através de proteínas de canal, ou por transporte ativo através de proteínas transportadoras, sendo esse último o que oferece maior controle sobre a entrada desses elementos no tecido vegetal (LIM et al., 2013). Essas proteínas transportadoras geralmente apresentam afinidades por elementos diferentes, justificando assim a competição entre eles (KERKEB et al., 2008). Zinco (Zn) e cádmio (Cd) atravessam a membrana plasmática via transportadores da família ZIP, como a proteína ZRT-ITR (GUERINOT et al., 2000). Quando as plantas são expostas ao excesso desses elementos, ocorre a inibição do influxo excessivo de metal através da regulação dos transportadores a nível transcricional, pós-transcricional ou pós-traducional, além disso, quando o Zn encontra-se em níveis elevados no solo, este é capaz de entrar nas células das raízes através de outros transportadores, podendo desencadear deficiência de ferro (Fe), pois estes apresentam características químicas e físicas similares (BARBERO et al., 2011). O Cd assemelha-se quimicamente ao Zn e ao Fe, justificando assim, a competição e afinidade desse elemento pelos mesmos transportadores de Zn e Fe (PENCE et al., 2000).

2.2 Efeito da presença de cádmio em plantas

O Cádmio (Cd) é um elemento-traço presente em diversas concentrações nos solos e, devido a sua toxicidade, está na lista prioritária de substâncias tóxicas (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DESEASE REGISTRY - ATSDR, 2011).

Considerado um dos elementos mais tóxicos liberados no ambiente, o cádmio não apresenta funções biológicas conhecidas, sendo considerado um elemento não essencial (OK et al., 2011). Os solos de ambientes agrícolas podem apresentar acúmulo de Cd, devido à aplicação de fertilizantes fosfatados, adubos, resíduos de indústrias metalúrgicas e águas residuais não tratadas (AHMAD et al., 2012; LEE et al., 2013; OK et al., 2011). Devido a sua alta mobilidade no solo, seu acúmulo nas plantas cultivadas em solos que estejam contaminados pode representar uma séria ameaça para a saúde humana e animal (SARWAR et al., 2010).

O principal meio de entrada de Cd na cadeia alimentar são as plantas, uma vez que é absorvido pelas raízes preferencialmente em solos ácidos e tende a se acumular nos tecidos vegetais. Estudos realizados em diferentes espécies de plantas têm revelado que este acúmulo de Cd pode interferir em uma série de processos metabólicos, uma vez que este altera o estado redox da célula (GILL; TUTEJA, 2010). Dentre os principais impactos do Cd no metabolismo vegetal, podemos citar seu efeito no aparato fotossintético (QIAN et al., 2010) e as modificações na condutância estomática e na transpiração foliar (SOUZA et al., 2011), bem como na absorção de minerais e nas relações hídricas (HE et al., 2011). Dessa forma, o excesso de cádmio desencadeia o estresse oxidativo, culminando em perturbações na composição e funções das membranas celulares (AZEVEDO et al., 2012; CUYERS et al., 2011; GALLEGOS et al., 2012).

Um dos efeitos de fitotoxicidade ocasionados pela ação do Cd é a diminuição da absorção de água e nutrientes, o que resulta em sintomas visuais como clorose e necrose foliar, redução no crescimento e escurecimento das raízes (LI et al., 2008). A clorose observada é mais intensa em folhas novas, sugerindo que essas retenham mais Cd, ou seja, sejam mais vulneráveis à toxicidade causada por este metal (KUPPER et al., 2007). Uma das causas de ocorrência desses sintomas é devido à competição do Cd com o ferro (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001) ou com o magnésio (KURDZIEL; PRASAD; STRSALKA, 2004) por transportadores da membrana plasmática. Nesse caso, a estabilidade das clorofilas é afetada, uma vez que o Cd influencia a atividade das enzimas relacionadas à biossíntese desse pigmento, levando a uma redução no número de cloroplastos por células (KURDZIEL; PRASAD; STRSALKA, 2004). Além disso, a presença de Cd pode provocar deficiência de fósforo e de manganês, que está relacionada ao aparecimento de clorose (GODBOLD; HUTTERMAN, 1985).

O excesso de Cd pode causar deficiência de macro e micronutrientes no vegetal, uma vez que o Cd bloqueia transportadores específicos de íons da raiz reduzindo a absorção de cálcio (Ca^{2+}), zinco (Zn^{2+}), ferro (Fe^{2+}), manganês (Mn^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) pela planta (NAZAR et al., 2012). Além disso, o apoplasto é uma região de cargas negativas devido à presença de grupos carboxílicos de pectinas, possuindo, assim, alta capacidade de troca catiônica, o que facilita a retenção de cátions como o Cd (GUIMARÃES et al., 2008). O aumento da saturação de Cd reduz a capacidade de absorção de outros cátions.

A toxicidade por Cd pode causar a inibição da atividade fotossintética, devido à inibição da cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto (KURDZIEL; PRASAD; STRSALKA, 2004) e do Ciclo de Calvin, bem como pela redução na concentração de clorofila (KUPPER et al., 2007). O fotossistema II, nos tilacóides, tem sido identificado como o principal alvo da

ação do Cd. Altas concentrações de Cd estão associadas à má formação do cloroplasto devido ao empilhamento anormal dos grana, redução do número e do tamanho dos grana e dilatação da membrana do tilacóide (DEVI; PRASAD, 2004). A redução da taxa fotossintética pode também ser uma consequência da menor condutância estomática, uma vez que, além de alterar o status hídrico da planta (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002), o Cd pode induzir a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e do vacúolo, aumentando os níveis desse cátion no citosol, o que está relacionado com o fechamento estomático.

No que diz respeito à ação do cádmio na atividade enzimática, as enzimas antioxidantes têm sua atividade reduzida na presença deste elemento. Assim sendo, o aumento dos níveis de EROs, associado com a menor atividade das enzimas antioxidantes, desencadeia danos oxidativos aos componentes celulares (ROMERO-PUERTAS et al., 2006). Dentre os danos oxidativos desencadeados pelas EROs, podemos citar a peroxidação lipídica, que está diretamente relacionada a alterações na permeabilidade e fluidez da membrana celular (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001), bem como na conformação estrutural e na atividade das enzimas ligadas à membrana (DEVI; PRASAD, 2004).

Como proteção contra os efeitos oxidativos causados pelo excesso de EROs, as células possuem um sistema antioxidante composto por enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (VÁSQUES et al., 2012), bem como por antioxidantes não enzimáticos como ascorbato e glutatona. É justamente a ação dessas moléculas antioxidantes que permite um bom funcionamento dos mecanismos de remoção das EROs, mantendo a homeostase celular (MITTLER et al., 2002; ZENG et al., 2009). A capacidade de resposta e eficiência do sistema antioxidante governa o desempenho, a resistência e a capacidade de sobrevivência das plantas sob condições de estresse, tal como, a presença de Cd (MAHMOOD et al., 2009).

As dismutases do superóxido são outro grupo de enzimas antioxidantes que são afetadas pela ação do Cd. A atividade da Mn-SOD e da CuZn-SOD, bem como os níveis de proteínas dessas isoformas são reduzidos quando a planta é exposta ao Cd. Essa menor atividade está relacionada a modificações no estado redox da glutatona e, ou, à menor disponibilidade de manganês, cobre e zinco, o que determina a abundância dos transcritos dessas enzimas na presença de cádmio (ROMERO-PUERTAS et al., 2006).

A catalase, uma enzima presente principalmente nos peroxissomos, tem sua atividade reduzida, principalmente nas folhas. Estudos recentes mostram que a CAT é oxidativamente modificada pelo Cd, e as proteínas oxidadas podem ser alvo de proteases específicas do peroxissomo (ROMERO-PUERTAS et al., 2006).

A peroxidase do ascorbato (APX) apresenta maior afinidade por H_2O_2 quando comparada à CAT demonstrando maior importância no controle de EROs durante o estresse em plantas (GILL; TUTEJA, 2010). Tende a apresentar uma redução de sua atividade em presença de elevadas concentrações de elementos-traço, devido à oxidação do grupo sulfidril de suas enzimas (FILIPIC; HEI, 2004).

2.3 Efeitos da presença de Zn em plantas

O zinco (Zn) é um elemento essencial e está envolvido em diversos processos fisiológicos de crescimento e metabolismo vegetal, incluindo ativação enzimática, síntese de proteínas, metabolismo de carboidratos, lipídeos, hormônios e ácidos nucleicos (CAKMAK, 2000; CHANG; WIN LIN; HUANG, 2005; MENGEL; KIRKBY, 2000). Sua absorção pelo vegetal é mediada pelos transportadores da família ZIP localizados na membrana plasmática dos tecidos vegetais (LEE et al., 2010).

O Zn é indispensável para a atividade de várias enzimas, sendo parte estrutural da anidrase carbônica, álcool desidrogenase, Cu/Zn SOD e da RNA polimerase. Além disso, atua como cofator das enzimas das classes das oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases (BROADLEY et al., 2007). O Zn apresenta ainda um efeito estabilizador e protetor sobre as biomembranas, mantendo sua integridade e permeabilidade (ARAVIND; PRASAD, 2005). Essa manutenção da integridade funcional das membranas biológicas (SADEGHZADEH; RENGEL, 2011) está relacionada principalmente às ligações sulfídricas estabelecidas entre o zinco e vários outros compostos.

Apesar de suas diversas funções no metabolismo vegetal, quando em concentrações elevadas, o zinco torna-se tóxico, com efeitos negativos no transporte de íons e em processos metabólicos tais como fotossíntese, transpiração e atividades de diferentes enzimas, podendo inibir o crescimento vegetal (VAILLANT et al., 2005). A toxicidade por Zn depende da espécie e do estágio de desenvolvimento do vegetal e, em geral, os seus sintomas estão relacionados com a inibição do crescimento, menor acúmulo de biomassa e aparecimento de clorose (CAMBROLLE et al., 2013). O excesso de Zn também pode comprometer a germinação de sementes e o desenvolvimento radicular (LINGUA et al., 2008). Em nível celular, altas concentrações de Zn podem alterar a integridade e a permeabilidade da membrana (STOYANOVA; DONCHEVA, 2002), levando à morte celular (CHANG; LIN; HUANG, 2005).

Elevadas concentrações de Zn podem causar inibição da atividade fotossintética, devido à redução da atividade da ribulose-1,5-bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), causada pela competição do zinco com o magnésio no sítio de ativação da Rubisco. Também podem reduzir a atividade do fotossistema II em função do deslocamento de manganês pelo excesso de Zn na membrana do tilacóide (FAGERIA, 2001).

No que se refere ao metabolismo redox das células, o Zn desempenha um papel duplo no estresse oxidativo: quando em excesso conduz à produção de EROs e em concentrações favoráveis é um cofator importante da SOD, a qual catalisa a remoção de O_2^- e assim protege as células contra danos induzidos por essa espécie reativa de oxigênio (CAKMAK, 2000). O Zn não é metal redox ativo, o que significa que não está diretamente envolvido nas reações de Haber-Weiss e Fenton. No entanto, o excesso desse elemento conduz à produção do radical OH, em paredes celulares e ao acúmulo de H_2O_2 no apoplasto das folhas (MORINA et al., 2010).

2.4 Interação cádmio e zinco

Plantas cultivadas em solos altamente poluídos podem sofrer com a toxicidade por elementos-traço, o acúmulo desses elementos em culturas tradicionais em concentrações tóxicas é de grande preocupação, uma vez que aumenta o risco de exposição aos consumidores. A absorção de cádmio e os seus efeitos sobre as plantas podem ser influenciados por uma série de fatores, tais como as espécies, a cultivar e as características do solo. As diferenças genéticas na absorção de minerais entre as espécies de plantas foram observadas décadas atrás e mesmo as cultivares da mesma espécie mostraram, muitas vezes, uma grande variação na tolerância ao Cd (KOLELI et al., 2004). O consumo de alimentos é a principal rota de exposição humana ao Cd (ATSDR, 2011), tendo em vista que os vegetais constituem a principal fonte desse elemento para os animais (DISSANAYAKE; CHANDRAJITH, 2009).

A entrada de Cd na cadeia alimentar deve ser minimizada devido aos inúmeros riscos associados à saúde e, por isso, estratégias estão sendo desenvolvidas para minimizar os danos causados pela fitotoxicidade desse elemento. A fitoextração vem sendo utilizada para remover o Cd do solo por

meio do uso de plantas hiperacumuladoras. No entanto, as plantas utilizadas nessa técnica apresentam crescimento lento, produzem pouca biomassa e requerem muito tempo para remediar os locais contaminados (SAIFULLAH et al., 2009). Outra medida que pode ser aplicada é a seleção e o melhoramento de plantas ou cultivares que acumulam relativamente pequenas quantidades de Cd em seus grãos ou em outras partes comestíveis, uma opção que demanda um longo período para desenvolver e testar novos cultivares (USMAN et al., 2012). Além dessas, outras medidas, como a rotação de culturas, calagem, dentre outras alterações do solo, estão sendo utilizadas para remediar solos contaminados por Cd, técnicas demoradas e que exigem recursos extras (GUO et al., 2011).

Diante disso, o uso de nutrientes é uma opção relativamente viável, rápida e eficaz para aliviar a toxicidade por Cd nas plantas (SAIFULLAH et al., 2012). Um suprimento adequado de nutrientes é essencial para o crescimento da planta sob excesso de Cd, uma vez que vários nutrientes têm efeitos diretos ou indiretos sobre a disponibilidade e toxicidade deste elemento. Os efeitos diretos incluem a solubilidade e diminuição do Cd disponível no solo, afetando assim a precipitação e adsorção do mesmo (MATUSIK; BAJDA; MANECKI, 2008; ZACCHEO; LAURA; VALERIA, 2006). Os nutrientes também podem reduzir a absorção de cádmio por competição pelos mesmos transportadores de membrana (QIU; GUAN; LONG, 2005; TLUSTOS et al., 2006), assim como auxiliar no sequestro de Cd nas partes vegetativas das plantas, evitando a translocação para os grãos ou partes comestíveis. Os efeitos indiretos incluem diluição do Cd, aumentando a biomassa vegetal e redução de estresse fisiológico (JALLOH et al., 2009; PANKOVIC et al., 2000).

Existe uma tendência de que Cd e Zn coexistam em um mesmo ambiente, devido as suas semelhanças químicas e físicas, sendo ambos cátions bivalentes (ASSUNÇÃO et al., 2010). Quando esses metais estão juntos, podem interagir produzindo efeitos sinérgicos ou antagônicos (WILDE et al., 2006).

Estudos revelam que a interação Cd/Zn ocorre principalmente de forma antagônica (BALEN et al., 2011), embora os efeitos sinérgicos também sejam relatados (NAN et al., 2002). A suplementação com Zn em baixas concentrações pode neutralizar os efeitos do cádmio sobre o metabolismo vegetal caracterizando assim o efeito antagônico. Por outro lado, elevadas concentrações de Zn combinado com o Cd podem potencializar os efeitos do Cd no metabolismo, caracterizando efeito sinérgico (CHERIF et al., 2011).

Devido às semelhanças físicas e químicas entre o Cd e o Zn, ambos atravessam a membrana plasmática sob auxílio das proteínas de membrana ZIP (GUERINOT, 2000). Dessa forma, é plausível sugerir que a suplementação com zinco pode minimizar a absorção, translocação e acúmulo de Cd em plantas além de proporcionar proteção contra os danos oxidativos pela maior atividade da enzima SOD. No entanto, devido a sua importância no metabolismo vegetal, é necessário que a concentração de Zn seja mantida dentro de uma faixa estreita para evitar sintomas de deficiência e toxicidade nas plantas (APPENROTH, 2010).

O efeito antagônico do zinco na contaminação por cádmio foi demonstrado em *Arabis paniculata*, em que o tratamento com zinco em baixas concentrações levou à maior síntese de proteínas envolvidas no metabolismo energético, permitindo o crescimento das plantas sob estresse. Além disso, ele também promoveu a atividade do sistema de defesa antioxidante, mantendo a homeostase redox da célula (ZENG et al., 2009). Da mesma forma, em plantas de *Noccaea caerulescens* expostas a elevadas concentrações de Cd, o zinco promoveu maior atividade da APX, enquanto o Zn foi incapaz de atenuar os efeitos do Cd sobre a atividade da SOD (WOJCIK; VANGRONSVELD; TUKIENDORF, 2006). A suplementação de Zn também aumenta a atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, APX em plantas de *Solanum lycopersicum*, *Sedum alfredii* e *Triticum aestivum* tratadas com cádmio

(CHERIF et al., 2011; SANAEIOSTOVAR et al., 2012). Assim como o Zn, o magnésio, em baixas concentrações, pode ter um efeito antagônico na toxicidade de Cd nos vegetais, provavelmente por manter a concentração de ferro, aumentando a capacidade antioxidante e protegendo o aparato fotossintético (HERMANS et al., 2011).

Ambos os elementos Cd e Zn, quando em excesso, podem afetar o metabolismo das plantas. Dessa maneira, os efeitos sinérgicos da interação entre Zn e Cd podem causar crescimento atrofiado, principalmente da raiz, desencadeando a redução da absorção de água e nutrientes, resultando em desequilíbrio nutricional e aparecimento de sintomas como a clorose (LEFEVRE et al., 2010; REMANS et al., 2012). Elevadas concentrações de Cd e Zn estão associadas à maior geração de EROs e quebra da homeostase celular, levando a um prejuízo na respiração, fotossíntese, estabilidade da clorofila, estrutura e atividade das enzimas e integridade da membrana (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010).

Devido às semelhanças entre os dois metais, a substituição de um pelo outro com carga e tamanho similares pode resultar na inibição da atividade enzimática. Como o Zn é constituinte de muitas metaloenzimas, ele pode substituir o Cd, resultando em alterações na atividade de diferentes enzimas (SHAW; SAHU; MISHRA, 2004). O efeito sinérgico de Zn e Cd ocorreu em *Noccaea caerulea* expostas ao excesso de Cd e Zn, em que houve uma menor atividade enzimática (WOJCIK; VANGRONVELD; TUKIENDORF, 2006) o mesmo foi observado em *Solanum lycopersicum* que apresentou menores atividades enzimáticas e alterações nos parâmetros de crescimento (BALEN et al., 2011).

Existe uma variação inter e intraespecífica na absorção de cádmio pelas plantas, além do fato de que as características do solo alteram a disponibilidade desse metal para o vegetal. Diante disso, para a realização do presente estudo,

foram selecionadas duas classes de solos do estado de Minas Gerais consideradas representativas por apresentarem ampla distribuição no Estado. O primeiro solo foi o Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico, com textura média a moderada e o outro solo foi o Cambissolo Háplico Tb distrófico típico, com textura média a moderada, ambos na fase floresta tropical subperenifólia. Esses solos são considerados limpos quanto à presença de Cd por apresentarem valores de referência de qualidade (VRQ) $< 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de peso seco para este elemento-traço (FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE - FEAM, 2011). Isso ocorreu por apresentarem baixo teor de matéria orgânica (conteúdo de carbono não excede 1,5%, ou seja, 3% conteúdo de matéria orgânica), além do pH adequado para minimizar os efeitos da adsorção de Cd no solo.

Tabela 1 Lista de espécies sensíveis sugeridas em ensaios ecotoxicológicos

Família	Espécie	Nome popular
Apiaceae	<i>Daucus carota</i>	Cenoura
Asteraceae	<i>Helianthus annuus</i>	Girassol
Asteraceae	<i>Lactuca sativa</i>	Alface
Brassicaceae	<i>Sinaps Alba</i>	Mostarda-branca
Brassicaceae	<i>Brassica napus</i>	Canola
Brassicaceae	<i>Brassica oleracea var. capitata</i>	Repolho
Brassicaceae	<i>Brassica rapa</i>	Nabo
Brassicaceae	<i>Lepidium sativum</i>	Agrião
Brassicaceae	<i>Raphanus sativus</i>	Rabanete
Chenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Beterraba
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Pepino
Fabaceae	<i>Glycine Max</i>	Soja
Fabaceae	<i>Phaseolus aureus</i>	Feijão Mungo
Fabaceae	<i>Phaseolus vulgares</i>	Feijão comum

“Tabela 1, conclusão”

Família	Espécie	Nome popular
Fabaceae	<i>Pisum sativum</i>	Ervilha
Fabaceae	<i>Vicia sativa</i>	Ervilhaca comum
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate
Liliaceae	<i>Allium cepa</i>	Cebola
Poaceae	<i>Avena sativa</i>	Aveia
Poaceae	<i>Hordeum vulgare</i>	Cevada
Poaceae	<i>Lolium perene</i>	Azevém perene
Poaceae	<i>Oryza sativa</i>	Arroz
Poaceae	<i>Secale cereal</i>	Centeio
Poaceae	<i>Sorghum bicolor</i>	Sorgo
Poaceae	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo
Poaceae	<i>Zea mayz</i>	Milho

REFERÊNCIAS

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY.

Toxicological profile for cadmium. Atlanta: U.S. Public Health Service, 2011. 487 p.

AHMAD, M. et al. Eggshell and coral wastes as low cost sorbents for the removal of Pb^{2+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} from aqueous solutions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, Washington, v. 18, n. 1, p. 198-204, Jan. 2012.

APPENROTH, K. J. Definition of “heavy metals” and their role in biological systems. **Soil Biology**, Elmsford, v. 19, n. 1, p. 19-29, 2010.

ARAVIND, P.; PRASAD, M. N. V. Cadmium-zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, n. 1, p. 3-20, Jan./Mar. 2005.

ASSUNÇÃO, A. G. L. et al. *Arabidopsis thaliana* transcription factors bZIP19 and bZIP23 regulate the adaptation to zinc deficiency. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Wageningen, v. 107, n. 22, p. 10296, 2010.

AZEVEDO, R. A. et al. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? **Food Energy Security**, New York, v. 1, n. 2, p. 133-140, Nov. 2012.

BALEN, B. et al. Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. **Ecotoxicology**, New York, v. 20, n. 4, p. 815-826, June 2011.

BARBERON, M. et al. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 32, p. E450-E458, May 2011.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 173, n. 4, p. 677-702, 2007.

CAKMAK, I. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. **New Phytologist**, Hoboken, v. 146, n. 2, p. 59-62, May 2000.

CAMBROLLE, J. et al. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marshshrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, Oxford, v. 86, p. 867-874, Mar. 2013.

CHANG, H. B.; WIN LIN, C.; HUANG, H. J. Zinc induced cell death in rice (*Oryza sativa* L.) Rootz. **Plant Growth**, Dordrecht, v. 46, n. 3, p. 261-266, July 2005.

CHERIF, J. et al. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 23, n. 5, p. 837-844, 2011.

CUYPERS, A. et al. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 4, p. 309-316, Mar. 2011.

DEVI, S. R.; PRASAD, M. N. V. Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. In: PRASAD, M. N. V. (Ed.). **Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems**. 2nd ed. New Delhi: Springer, 2004. p. 127-145.

DISSANAYAKE, C. B.; CHANDRAJIHT, R. Phosphate mineral fertilizers, trace metals and human health. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, Sri Lanka, v. 37, n. 3, p. 153-165, 2009.

FAGERIA, V. D. et al. Nutrient interactions in crop plants. **Journal of Plant Nutrition**, Monticello, v. 24, n. 8, p. 10-22, 2001.

FILIPIC, M.; HEI, T. Mutagenicity of cadmium in mammalian cells: implication of oxidative DNA damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 559, n. 1/2, p. 49-57, Feb. 2004.

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

GADJEV, I.; STONE, J. M.; GECHEV, T. S. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, New York, v. 270, p. 87-144, June 2008.

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

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.

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

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

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

GUO, X. F. et al. Cadmium and Zinc accumulation in maize grain as affected by cultivars and chemical fixation amendments. **Pedosphere**, Bethesda, v. 21, n. 5, p. 650-656, 2011.

HE, J. et al. Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus x canescens*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 143, n. 1, p. 50-63, Sept. 2011.

HERMANS, C. et al. Low magnesium status in plants enhances tolerance to cadmium exposure. **New Phytologist**, Cambridge, v. 192, n. 2, p. 428-436, 2011.

JALLOH, M. A. et al. Effect of different N fertilizer forms on anti-oxidant capacity and grain yield of rice growing under Cd stress. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 162, p. 1081-1085, 2009.

KABATA-PENDIA, A.; PENDIAS, H. P. **Trace elements in soils and plants**. Davis: CCR, 2001. 331 p.

KERKEB, L. et al. Iron-induced turnover of the Arabidopsis IRON-REGULATED TRANSPORTER1 metal transporter requires lysine residues. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 146, n. 4, p. 1964-1973, 2008.

KOLELI, N.; EKER, S.; CAKMAK, I. Effect of zinc fertilization on cadmium toxicity in durum and bread wheat grown in zinc-deficient soil. **Environmental Pollution**, Barking, v. 131, n. 3, p. 452-459, Oct. 2004.

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

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

LEE, S. S. et al. Heavy metal immobilization in soil near abandoned mines using eggshell waste and rapeseed residue. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 20, n. 3, p. 1719-1726, Mar. 2013.

LEE, Y. W. et al. Ammonia stripping for enhanced biomethanization of piggery wastewater. **Journal of Hazardous Material**, Amsterdam, v. 199/200, p. 36-42, Jan. 2010.

LEFÈVRE, I. et al. Cadmium has contrasting effects on polyethylene glycol Sensitive and resistant cell lines in the Mediterranean halophyte species *Atriplex halimus*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 5, p. 365-374, Mar. 2010.

LI, M. et al. Ecophysiological responses of *Jussiaea repens* to cadmium exposure. **Aquatic Botany**, Amsterdam, v. 88, n. 4, p. 347-352, May 2008.

LIM, J. E. et al. Effects of natural and calcined poultry waste on Cd, Pb and As mobility in contaminated soil. **Environmental Earth Sciences**, Heidelberg, v. 69, n. 1, p. 11-20, May 2013.

LINGUA, G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi differentially affect the response to high zinc concentrations of two registered poplar clones. **Environmental Pollution**, Barking, v. 153, n. 1, p. 137-147, May 2008.

MAHMOOD, M. et al. Carbon nanotubes are able to penetrate plant seed coat and dramatically affect seed germination and plant growth. **ACS Nano**, Washington, v. 22, p. 3221-3227, Sept. 2009.

MATILLA-VÁZQUEZ, M. A. Involvement of ethylene in seed dormancy. **Plant Science**, Shannon, v. 175, n. 1, p. 87-97, 2012.

MATILLA-VÁZQUEZ, M. A.; MATILLA, A. Role of H₂O₂ as signaling molecule in plants. In: _____. **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**. New York: Springer, 2010. p. 361-380.

MATUSIK, J.; BAJDA, T.; MANECKI, M. Immobilization of aqueous cadmium by addition of phosphates. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 152, p. 1332-1339, 2008.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. Principles of plant nutrition. **Soil Heavy Metals**, Dordrecht, v. 93, n. 4, p. 479-480, 2000.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Limerick, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MORINA, F. et al. Zinc-induced oxidative stress in *Verbascum thapsus* caused by an accumulation of reactive oxygen species and quinhydrone in the cell wall. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 140, n. 3, p. 209-224, 2010.

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

NAN, Z. et al. Cadmium and zinc interactions and their transfer in soil-crop system under actual field conditions. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 285, n. 1/3, p. 187-195, Sept. 2002.

NAZAR, F. et al. Sodium and sodium-ion energy storage batteries. **Emerging Opportunities in Energy Storage**, New York, v. 16, n. 4, p. 168-177, Aug. 2012.

OK, Y. S. et al. Ameliorants to immobilize Cd in rice paddy soils contaminated by abandoned metal mines in Korea. **Environmental Geochemistry and Health**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 23-30, Jan. 2011.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n° 208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org/dataoecd/11/31/33653757.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

PANKOVIC, D. et al. Effect of nitrogen nutrition on photosynthesis in Cd treated sunflower plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 86, n. 4, p. 841-847, June 2000.

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

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

QIAN, H. et al. Photoperiod and temperature influence cadmium's effects on photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 6, p. 1202-1206, Sept. 2010.

QIU, Z. Z.; GUAN, Z. Y.; LONG, C. Y. Effect of zinc on cadmium uptake by spring wheat (*Triticum aestivum* L.): long time hydroponic study and short time ¹⁰⁹Cd tracing study. **Journal of Zhejiang University Science**, Hangzhou, v. 6, n. 7, p. 643-648, July 2005.

REMANS, T. et al. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 84, p. 61-71, Dec. 2012.

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

SADEGHZADEH, B.; RENGEL, Z. Zinc in soils and crop nutrition. In: HAWKESFORD, M. J.; BARRACLOUGH, P. (Ed.). **The molecular basis of nutrient use efficiency in crops**. London: Wiley, 2011. p. 335-376.

SAIFULLAH, E. et al. EDTA-assisted Pb phytoextraction. **Chemosphere**, Oxford, v. 74, n. 4, p. 1279-1291, Aug. 2009.

SANAEIHOSTOVAR, A. et al. Combined effect of zinc and cadmium levels on root antioxidative responses in three different zinc-efficient wheat genotypes. **Journal of Agronomy and Crop Science**, Hoboken, v. 198, n. 4, p. 276-285, Aug. 2012.

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 634, p. 2115-2126, 2012.

SARWAR, N. et al. Role of plant nutrients in minimizing cadmium accumulation by plants. **Journal of the Science Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 6, p. 925-937, Apr. 2010.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K. J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 1, p. 43-50, 2009.

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

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

STOYANOVA, Z.; DONCHEVA, S. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 14, n. 2, p. 111-116, May/Aug. 2002.

TLUSTOS, P. et al. The effect of liming on cadmium, lead and zinc uptake reduction by spring wheat grown in contaminated soil. **Plant, Soil and Environment**, Beijing, v. 52, n. 1, p. 16-24, June 2013.

TUTEJA, A. N. D. et al. **Crop improvement under adverse condition**. New York: Springer, 2010. 410 p.

USMAN, A. R. A. et al. Soil pollution assessment and identification of hyperaccumulating plants in chromate copper arsenate (CCA) contaminated sites. **Chemosphere**, Oxford, v. 87, n. 8, p. 872-878, May 2012.

VAILLANT, A. et al. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. **Chemosphere**, Oxford, v. 59, n. 7, p. 1005-1013, May 2005.

VÁSQUEZ, F. et al. Role of microRNAs and other sRNAs of plants in their changing environments. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 169, n. 16, p. 1664-1672, Nov. 2012.

VAZQUEZ, S. et al. Use of white lupin plant for phytostabilization of Cd and As polluted acid soil. **Water Air Soil Pollut**, Montrouge, v. 177, n. 1/4, p. 349-365, Nov. 2006.

WILDE, K. L. et al. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 51, p. 174-185, Dec. 2006.

WOJCIK, M.; VANGRONVELD, J.; TUKIENDORF, A. Cadmium tolerance in *Thlaspi caerulescens* L. growth parameters, metal accumulation and phytochelatin synthesis in response to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 53, n. 2, p. 151-161, Apr. 2006.

ZACCHEO, P.; LAURA, C.; VALERIA, D. M. P. Ammonium nutrition as a strategy for cadmium metabolisation in the rhizosphere of sunflower. **Plant and Soil**, The Hague, v. 283, n. 1/2, p. 43-56, May 2006.

ZENG, M. et al. Effects of lead contamination on soil microbial activity and rice physiological indices in soilion in the *Oryza sativa* L. system. **Chemosphere**, Oxford, v. 65, n. 4, p. 567-574, Oct. 2009.

CAPÍTULO 2 Avaliações fisiológicas e ecofisiológicas de plantas de milho sensíveis à toxicidade por elementos-traço em latossolo e cambissolo

RESUMO

As espécies agrícolas enfrentam uma variedade de estresses bióticos e abióticos que são os principais limitantes à produção das culturas. Neste contexto, a contaminação por elementos-traço caracteriza-se como um estresse abiótico, que representa um problema ambiental. O cádmio é um potente inibidor de enzimas e por ser um elemento não essencial, pode causar danos às células vegetais, mesmo quando presente em baixas concentrações. A exposição das plantas a este elemento-traço resulta em vários danos ao metabolismo fisiológico dos vegetais e danifica o aparelho fotossintético, causando a produção de espécies reativas de oxigênio em tecidos fotossinteticamente ativos. O zinco é cofator de muitas enzimas, estando envolvido tanto na regulação quanto na ativação dessas moléculas. Além disso, está envolvido nos processos de regulação da transcrição, tradução e transdução dos sinais. Devido a sua importância no metabolismo do vegetal, a concentração deste elemento deve ser mantida dentro de uma faixa relativamente estreita para evitar os efeitos de deficiência ou toxicidade. As semelhanças físicas e químicas entre cádmio e zinco permitem a interação desses elementos no ambiente, podendo causar efeitos antagônicos, em que o zinco atua neutralizando os danos causados pelo cádmio ao metabolismo, ou efeitos sinérgicos, em que o zinco potencializa os efeitos do cádmio sobre o metabolismo. Neste sentido, mecanismos fisiológicos para excluir, desintoxicar ou compartimentalizar o excesso de elementos-traço são cruciais para sobrevivência dos vegetais quando expostos a elevadas concentrações destes elementos. A fim de compreender melhor as respostas das espécies submetidas ao estresse por Cd e Zn o presente estudo teve como objetivo avaliar plantas de *Zea mays L* (milho) sensíveis à contaminação por esses elementos (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD, 2006), cultivadas em Latossolo e Cambissolo, através de análises bioquímicas e ecofisiológicas. As plantas foram expostas a doses de Cd e Zn (0,4 +14,89; 0,72+28,80; 1,29+48; 2,3 + 86,64; 4,1+152,64; 13,6+506,89; 24,4+908,61 mg kg⁻¹) durante 21 dias. Foram realizadas análises enzimáticas, ecofisiológicas e índice toxicológico, tais como, atividade das enzimas SOD, CAT, APX, peróxido de hidrogênio, peroxidação lipídica, índice de clorofila, taxa fotossintética, condutância estomática, transpiração. Os dados obtidos evidenciaram comportamento específico das plantas de milho para cada solo analisado. O Latossolo disponibilizou em maior quantidade o Cd aplicado às plantas, resultando em um maior dano oxidativo e outros efeitos prejudiciais.

O Cambissolo, devido a seus atributos, principalmente aos maiores teores de argila e matéria orgânica, adsorveu o Cd e Zn em maiores proporções, o que resultou em um melhor desenvolvimento das plantas.

Palavras-chave: EROs. elementos-traço. Enzimas antioxidantes. Fotossíntese.

ABSTRACT

Agricultural species face several biotic and abiotic stresses that are the main limiting factors for crop production. In this context, contamination by trace-elements is characterized as an abiotic stress, representing an environmental issue. Cadmium is a powerful enzyme inhibitor and, given that it is a non-essential element, it can damage plant cells, even in low concentrations. Plant exposure to this trace-element results in many damages to plant physiological metabolism and injures the photosynthetic system, triggering the production of oxygen reactive species in photosynthetically active tissues. Zinc is a co-factor for several enzymes, and is involved in both regulation and activation of such molecules. In addition, it is also involved in the regulation processes of signal transcription, translation, and transduction. Because of its importance for plant metabolism, the concentration of this element must be kept within a relatively narrow range to avoid the effects of either deficiency or toxicity. Physical and chemical similarities between Cadmium and Zinc allow the interaction of these elements in the environment, possibly causing antagonist effects in which Zinc acts neutralizing the damages caused by Cadmium in the metabolism, or synergistic effects in which Zinc enhances the effects of Cadmium over the metabolism. In this sense, physiological mechanisms to delete, detoxify or compartmentalize the excess of trace-elements are essential for plant survival when exposed to high concentrations of such elements. In order to better understand the responses of the species subjected to Cd and Zn stress, the present study aimed to evaluate *Zea mays L* (maize) plants sensitive to the contamination by these elements (Organization for Economic Co-operation and Development – OECD, 2006), cultivated in Latosol and Cambisol, using biochemical and ecophysiological analyses. The plants were exposed to doses of Cd and Zn (0.4+14.89, 0.72+28.80, 1.29+48, 2.3+86.64, 4.1+152.64, 13.6+506.89, 24.4+908.61 mg kg⁻¹) during 21 days. We conducted enzymatic and ecophysiological analyses, such as the activity of enzymes SOD, CAT, APX, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, chlorophyll content, photosynthetic rate, stomatal conductance and transpiration. The data obtained showed a specific behavior of the maize plants for each analyzed soil. Latosol released higher amounts of Cd to plants, resulting in a greater oxidative damage and other adverse effects. Due to its attributes, especially the higher clay and organic matter content, Cambisol absorbed Cd and Zn in higher proportions, resulting in better plant development.

Keywords: ROS. Trace-elements. Antioxidant enzymes. Photosynthesis.

1 INTRODUÇÃO

As espécies agrícolas enfrentam uma variedade de estresses bióticos e abióticos que são os principais limitantes à produção das culturas. Nesse contexto, a contaminação por elementos-traço caracteriza-se como um estresse abiótico, que representa um problema ambiental (TKALEC et al., 2008).

O cádmio (Cd) é um elemento-traço não essencial que apresenta alta disponibilidade na cadeia alimentar e elevada toxicidade, mesmo em baixas concentrações (MAESTRE et al., 2012; MURTAZA et al., 2015). Esse elemento, quando liberado no ambiente, pode se tornar acessível às plantas, podendo alterar os mecanismos bioquímicos, estruturais e fisiológicos. Nesse contexto, o Cd está relacionado à redução no crescimento radicular (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997), bem como a modificações em processos como absorção de minerais (GILL; TUTEJA, 2010; HE et al., 2011), fotossíntese (QIAN et al., 2010), condutância estomática e transpiração foliar (SOUZA et al., 2011). Tais alterações desencadeiam estresse oxidativo, causando perturbações na composição e funções das membranas e organelas celulares (AZEVEDO et al., 2012; CUYPERS et al., 2011; GALLEGGO et al., 2012).

Dentre os elementos essenciais para os organismos, o zinco (Zn), funciona como um cofator de uma variedade de macromoléculas, incluindo enzimas, fatores de transcrição e proteínas de sinalização celular (MENDOZA-COZATL et al., 2005; PALMER; GUERINOT, 2009). Está envolvido na função catalítica de muitas enzimas e na estabilidade estrutural de várias proteínas celulares (VALLEE; FALCHUK, 1993). Além disso, ele apresenta um importante papel na estabilização e proteção das membranas biológicas contra o estresse oxidativo, mantendo a integridade e permeabilidade das mesmas (BROADLEY et al., 2007; PANDEY; GUPTA; PATHAK, 2012). No entanto, níveis elevados de zinco podem inibir muitos processos metabólicos, afetando

diretamente o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (PARLAK; YILMAZ, 2012; WANG et al., 2009).

A interação entre os elementos essenciais e não essenciais é comum na natureza (CVJETKO et al., 2010) e pode produzir efeitos sinérgicos ou antagônicos (WILDE et al., 2006). No que se refere ao Cd, sua presença nos solos é geralmente acompanhada pelo Zn e, devido as suas semelhanças químicas e físicas, ambos podem ser absorvidos pelas plantas como cátions bivalentes (ULLRICH; RAMSEY; HELIOS-RYBICKA, 1999; WILDE et al., 2006). A família de proteínas ZIP é a principal mediadora da absorção de Zn pelas plantas, sendo expressa tanto na parte aérea como na raiz (FILAVOLT, 2006; LEE et al., 2013). Além disso, esta mesma família de proteínas ZIP está também relacionada ao transporte de Cd (BARBERON et al., 2011).

Estudos realizados entre a interação de Cd/Zn demonstraram que, dependendo das concentrações desses elementos no solo, pode ocorrer a indução do estresse oxidativo, caracterizando assim, o efeito sinérgico. No entanto, quando ocorre a suplementação de Zn em baixas concentrações ocorre o efeito antagônico, em que a maior absorção de Zn em detrimento do Cd diminui os efeitos tóxicos desse último elemento (CHERIF et al., 2011). A presença do zinco em baixas concentrações pode suprimir o acúmulo de Cd, aumentando a biomassa da planta, permitindo a manutenção da transferência de energia pelo fotossistema II, além da menor produção de EROs e menos danos às proteínas e ao DNA (ARAVIND; PRASAD, 2009; BALEN et al., 2011).

Todos os elementos, quando presentes em concentrações elevadas, afetam os componentes celulares, interferindo em diversas funções metabólicas fundamentais para o desenvolvimento da planta (TKALEC et al., 2014). Nesse sentido, há alteração na homeostase celular pelo acúmulo de EROs, que em elevadas concentrações podem desencadear o estresse oxidativo, causando danos às proteínas, membranas e pigmentos fotossintetizantes, como a clorofila

(ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002; MITHOFER; SCHULTZE; BOLAND, 2004). Para evitar os efeitos nocivos das EROs, as plantas ativam sistemas de defesa antioxidantes, compostos por enzimas como, dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), bem como antioxidantes não enzimáticos (MITHOFER; SCHULTZE; BOLAND, 2004; MITLLER, 2002).

Diante do exposto e visando a um melhor entendimento do comportamento fisiológico de espécies expostas a Cd e Zn, o presente estudo teve como objetivo avaliar plantas de *Zea mays* (milho), sensíveis à contaminação por esses elementos (OECD, 2006), cultivadas em Latossolo e Cambissolo, por meio de análises bioquímicas e ecofisiológicas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras/UFLA, em Lavras-MG (44°55' W; 21° 05'S), segundo as recomendações da ISO 11.269-2 e OECD-208 (INTERNATIONAL STANDARD ORGANIZATION - ISO, 2013). Foram selecionadas duas classes de solo do Estado de Minas Gerais consideradas representativas, classificadas como Latossolo Vermelho Amarelo distrófico típico, textura média a moderada, e Cambissolo Háplico Tb distrófico típico a moderado, ambos na fase floresta tropical subperenifólia. Estes solos são considerados limpos quanto a Cd, ou seja, VRQ < 0,4 mg kg⁻¹ de peso seco para Cd (FUNDAÇÃO ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE - FEAM, 2011).

Os solos foram devidamente coletados e peneirados, sendo retirada uma amostra para a caracterização química (Tabela 1) e física (Tabela 2) dos mesmos.

Tabela 1 Análise química do latossolo e cambissolo

Solos	pH	K	P	Ca	Mg	Al	CTCef	V	MO
		mg dm ⁻³		----- cmol dm ⁻³ -----				----- % -----	
Latossolo	4,8	32	1,13	0,3	0,1	0,6	1,08	9,64	1,64
Cambissolo	5,3	34	2,60	1,6	0,4	0,5	2,59	34,05	2,87

pH em água relação 1:25; P, K: Extrator Mehlich 1; S: Extrator fosfato monicálcico em ácido acético; Ca⁺², Mg⁺² e Al⁺³: Extrator KCl 1 mol L⁻¹, H + Al: Extrator acetato de cálcio 0,5 mol L⁻¹, pH = 7,0; MO: Oxidação Na₂CrO₇ 4N + H₂SO₄ 10N; SB: Soma de Bases; CTCef.: Capacidade de troca catiônica efetiva; V: Índice de saturação de bases; MO: Matéria orgânica.

Tabela 2 Análise física do Latossolo e Cambissolo

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

Após a adubação, realizada segundo Malavolta (1981) (tabela 3), 500g de solo foram pesados e acondicionados em vasos plásticos. Procedeu-se à irrigação por uma semana visando à manutenção de 70% da capacidade de campo. Após esse período, foram adicionadas diferentes doses de Cd e Zn, utilizando-se soluções de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4(\text{H}_2\text{O})$ e $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ como fontes desses elementos (Tabela 4). As doses foram determinadas utilizando-se como parâmetros os valores orientadores já estabelecidos pela resolução 420 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 2009). Os valores estabelecidos para esse experimento são múltiplos de 1,8 conforme sugestão da normativa da OECD (2006). As doses adicionadas respeitaram uma relação molar Zn/Cd próxima de 64/1, tendo em vista que essa é uma relação aproximada encontrada para a concentração desses dois elementos em áreas de mineração de Minas Gerais (CARVALHO et al., 2013).

Tabela 3 Recomendação de adubação para vaso

Nutriente	Dose (mg / kg)
Nitrogênio	300
Fósforo	200
Potássio	150
Cálcio	75
Magnésio	15
Enxofre	50
Boro	0,5
Cobre	1,5
Ferro	5
Molibdênio	0,1
Zinco	5

Fonte: (MALAVOLTA, 1981).

Nota: As doses de N e K foram aplicadas parceladas de 2-3 vezes, isto é, a quantidade total dividida por 2 ou 3 aplicando-se a primeira parcela no plantio e as demais em cobertura durante o desenvolvimento das plantas.

Tabela 4 Concentrações utilizadas de cádmio e zinco

Tratamentos	Composição (mg kg ⁻¹)	
	Cd	Zn
D0	0,0	
D1	0,4	14,89
D2	0,72	28,80
D3	1,29	48,00
D4	2,30	86,64
D5	4,10	152,64
D6	13,6	506,89
D7	24,4	908,61

Após a adição das soluções contendo Cd e Zn, realizou-se a semeadura de 20 sementes por vaso. Após a emergência de 50% das plântulas do tratamento D0, o número de plantas por repetição foi reduzido para 10. O experimento teve duração de vinte e um dias, após esta emergência, de acordo com as recomendações da OECD-208.

O ensaio foi conduzido em delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 8x2, sendo 8 tratamentos (sete doses crescentes de Cd/Zn e um controle), dois solos (Cambissolo e Latossolo), totalizando 16 tratamentos com três repetições. Cada unidade experimental constou de um vaso contendo 500 g de solo e com 10 plantas. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados) (FERREIRA, 1999). As médias entre os tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 0,05 de probabilidade ($p \leq 0,05$).

2.1 Teor de cádmio e zinco nas plantas

Os teores de Cd e Zn foram determinados na massa seca de raízes e parte aérea em extratos obtidos por digestão ácida em forno de micro-ondas, conforme o método USEPA 3051A da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 1998), sendo a leitura feita por espectrofotometria de absorção atômica com atomização por chama ou forno de grafite, conforme as concentrações encontradas nos extratos.

Para o controle de qualidade das análises, foi utilizado o material de referência BCR-482 – Lichen do Institute for Reference Materials and Measurements (Geel, Belgium), com teores certificados para Zn ($100,6 \text{ mg kg}^{-1}$)

e para Cd ($0,56 \text{ mg kg}^{-1}$). A recuperação dos teores foi de 120 e 65% para Zn e Cd, respectivamente.

O limite de detecção (LD) foi calculado com base no desvio-padrão e na média de sete leituras da amostra branco, considerando-se o valor t de Student para $n=7$ e empregando-se a seguinte fórmula (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION - APHA, 1998):

$$\text{LDM} = (x + t \times s) \times d$$

em que: x = teor médio da substância de interesse em sete amostras em branco;

t = valor de Student a 0,01 de probabilidade e $n-1$ graus de liberdade (para $n = 7$ e $\alpha = 0,01$, $t = 3,14$);

s = desvio padrão das sete amostras em branco;

d = fator de diluição empregado no método de digestão da amostra.

Após os cálculos, os limites de detecção do método obtidos para Zn e Cd foram de $1,22 \text{ mg kg}^{-1}$ e $1,66 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ para Zn e Cd, respectivamente.

2.2 Análise de crescimento

A análise de crescimento foi realizada pela contagem do número de folhas, bem como pela obtenção dos comprimentos da raiz e parte aérea, e do diâmetro do caule, obtidos com auxílio de uma régua e de um paquímetro digital, respectivamente. Avaliou-se uma planta por repetição.

Para a determinação da massa seca de raiz e parte aérea, o material vegetal coletado foi seco a 70°C em estufa de circulação forçada até peso constante.

2.3 Enzimas antioxidantes

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 200 mg de folhas, os quais foram macerados em N₂ líquido com 50% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) e homogeneizado com 1500 µL de tampão de extração contendo tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,8), EDTA 0,1 mmol L⁻¹, ácido ascórbico 10 mmol L⁻¹ e água (BIEMELT et al., 1998). O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises da atividade das enzimas SOD, CAT e APX.

2.3.1 Dismutase do superóxido

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977). Alíquotas do extrato enzimático foram adicionadas ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,8), metionina 14 mmol L⁻¹, EDTA 0,1 µmol L⁻¹, água, NBT 75 µmol L⁻¹ e riboflavina 2 µmol L⁻¹. Os tubos com o meio de reação e a amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação sem a amostra foi iluminado. O branco foi mantido no escuro. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da atividade da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = (A560 amostra com extrato enzimático – A560 controle sem enzima) / (A560 controle sem enzima). Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

2.3.2 Catalase

A CAT foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), onde alíquotas do extrato enzimático foram adicionadas ao meio de incubação contendo fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,0), água e peróxido de hidrogênio $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$ M. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm , a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.3.3 Peroxidase do ascorbato

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm , a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota do extrato enzimático foi adicionada ao meio de incubação composto por fosfato de potássio 100 mmol L^{-1} (pH 7,0), ácido ascórbico $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, água e peróxido de hidrogênio $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4 Peróxido de hidrogênio

Foram macerados 100 mg de massa fresca em nitrogênio líquido, homogeneizados em $1500 \text{ }\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético (TCA) $0,1\%$ e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C . A reação foi iniciada pela adição de uma alíquota da amostra ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 10 mmol L^{-1} (pH 7,0) e iodeto de potássio 1 mol L^{-1} . O H_2O_2 foi determinado medindo-se a absorbância a 390 nm e com base em uma curva

padrão com concentrações conhecidas de H₂O₂ (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

2.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Cem miligramas de massa fresca foram macerados em N₂ líquido e homogeneizados em 1500 µL de TCA 0,1%. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, por 15 minutos e alíquotas do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,5% de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% de TCA, incubando-se, em seguida, a 95°C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600})/(\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA g⁻¹ de matéria fresca.

2.6 Análises ecofisiológicas

As medições de trocas gasosas [taxas de fotossíntese (A), transpiração (E) e condutância estomática (gs)] foram realizadas com o auxílio do analisador portátil de CO₂ a infravermelho (IRGA) da ADC Bioscientific Ltda, modelo LCPro +, entre os horários de 8 h às 12 h, de maior demanda fotossintética para a cultura, sendo realizadas leituras nas folhas mais expandidas. Foi determinado

o Índice de clorofila (IC) pelo clorofilômetro (Chlorophyll Meter, SPAD-501, da Minolta Co., Japão), sendo realizadas 4 leituras por repetição para cada tratamento no período da manhã. As leituras também foram feitas nas folhas completamente expandidas (MINOLTA CAMERA LTDA, 1989).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teor de Cd e Zn

De maneira geral, os teores de zinco e cádmio aumentaram na parte aérea e nas raízes conforme o aumento das doses de Zn/Cd a que as plantas foram submetidas (Tabela 5), sendo os maiores valores de zinco encontrados na parte aérea e raízes de plantas cultivadas no Latossolo. A presença de cádmio foi mais expressiva na parte aérea em Latossolo e raízes de plantas cultivadas em Cambissolo. A presença de zinco em plantas do tratamento D0 ocorreu devido à adubação realizada segundo Malavolta (1981).

Tabela 5 Concentrações de zinco e cádmio na parte aérea e raízes de plantas de milho cultivadas em Cambissolo e Latossolo sob doses crescentes de Zn e Cd

Tratamentos	Zinco (mg kg ⁻¹)				Cádmio (µg kg ⁻¹)			
	Parte aérea		Raiz		Parte aérea		Raiz	
	Cambissolo	Latossolo	Cambissolo	Latossolo	Cambissolo	Latossolo	Cambissolo	Latossolo
D0	132,06 B h*	181,16 A g	100,53 A g	109,76 A h	<LDM	<LDM	<LDM	<LDM
D1	222,90 B g	325,13 A f	97,66 B g	225,30 A g	10,00 B d	15,63 A f	5,33 A c	2,43 A c
D2	472,53 B f	554,26 A e	223,60 B f	444,30 A f	12,80 A d	13,76 A f	6,00 B c	11,66 A b
D3	672,46 B e	845,60 A d	303,86 B e	643,86 A e	17,73 A c	18,23 A e	1,36 A d	2,06 A c
D4	801,93 B c	834,40 A d	359,19 B d	808,56 A d	26,06 A b	21,60 B d	1,23 A d	3,46 A c
D5	723,60 B d	1061,26 A c	594,86 B c	3003,63 A c	32,90 A a	33,06 A c	9,63 B b	23,70 A a
D6	1138,80 B b	1629,73 A b	4147,90 B a	4434,60 A b	32,96 B a	54,43 A b	13,60 B b	21,03 A a
D7	1185,36 B a	1700,76 A a	3559,96 B b	4889,30 A a	36,03 B a	61,20 A a	38,40 A a	25,63 B a

LDM (Cd) = 1,66 µg kg⁻¹

*Letras maiúsculas - diferença entre solos na linha e letras minúsculas - diferença entre doses na coluna, segundo teste Scott-Knott.

As plantas, quando submetidas ao estresse por elementos-traço, desenvolvem diversas estratégias para sobreviver (VERBRUGGEN et al., 2001). O maior acúmulo de Zn na parte aérea é um desses mecanismos de respostas da planta ao estresse (EHSAN et al., 2015). Já o cádmio pode tanto ser armazenado na raiz quanto ser translocado para a parte aérea (WANG et al., 2010).

3.2 Análise de crescimento

Visto que *Zea mays* L. é uma espécie sensível e não fitorremediadora de elementos-traço (CARVALHO et al., 2013), a exposição dessa espécie a doses crescentes de cádmio e zinco levou a uma redução em todos os parâmetros de crescimento avaliados (Tabela 6). Além disso, plantas de milho cultivadas em Cambissolo apresentaram, de maneira geral, maiores valores de altura e massa seca de parte aérea, bem como de comprimento e massa seca de raízes, quando comparadas àquelas plantas cultivadas em Latossolo.

Tabela 6 Análise dos parâmetros de crescimento de plantas de milho cultivadas em Cambissolo e Latossolo em diferentes doses de Cd/Zn

Tratamentos	Crescimento das plantas									
	Altura da parte aérea (cm)		MS da parte aérea (g)		Número de folhas		Comprimento da raiz (cm)		MS da raiz (g)	
	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L
D0	83,0 Aa	77,0 Ba	0,85Aa	0,72Ba	6,0 Aa	6,0 Aa	55,3 Aa	55,5 Ba	0,28 Ab	0,28Aa
D1	60,0 Be	70,0 Ab	0,81Aa	0,67Ba	5,0 Ab	5,0 Ab	49,8 Ab	49,3 Ab	0,38 Aa	0,22Bb
D2	65,6 Ad	66,0 Ac	0,61Ab	0,42Bb	4,0 Ac	4,0 Ab	43,3 Ac	35,0 Ac	0,28 Ab	0,16Bc
D3	71,0 Ab	62,3 Bd	0,52Ac	0,43 Bb	5,0 Ab	5,0 Ab	33,6 Ad	32,3 Bd	0,25 Ab	0,16Bc
D4	68,0 Ac	60,3 Be	0,47Ac	0,38 Bb	5,0 Ab	5,0 Ab	34,0 Ad	28,3 Be	0,20Ac	0,16Bc
D5	65,6 Ad	57,0 Bf	0,38Ad	0,31 Bc	5,0 Ab	4,0 Bc	29,0 Ae	20,6 Bf	0,17Ac	0,15 Ac
D6	58,0 Af	51,0 Bg	0,29Ae	0,29Ac	4,0 Ac	3,0 Ac	19,3 Bf	21,6 Af	0,12Ad	0,11Ad
D7	54,0 Ag	46,0 Bh	0,22Af	0,26Ac	3,0 Ad	2,0 Bd	14,3 Bg	19,0 Ag	0,09 Ae	0,08Ae

Análise dos parâmetros de crescimento, as letras maiúsculas comparam os solos, enquanto as letras minúsculas comparam as doses, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). C = cambissolo; L = Latossolo.

A análise de crescimento demonstrou ser um parâmetro sensível ao aumento das doses de Cd e Zn no solo. No que se refere à diferença de crescimento das plantas de *Zea mays* L. entre os solos, é necessário ressaltar que o Latossolo apresenta pH mais ácido (4,8), menores valores de CTC ($1,08 \text{ cmol dm}^{-3}$), argila (24%) e matéria orgânica (1,64%) quando comparado ao Cambissolo que possui pH de 5,3, CTC de $2,59 \text{ cmol dm}^{-3}$, 31% de argila e 2,87% de matéria orgânica. Essas características químicas e físicas fornecem condições que garantem ao Cambissolo maior adsorção de Cd, disponibilizando menores teores desse elemento para o vegetal (PIERANGELI et al., 2003). Com menores teores de Cd disponíveis, plantas de *Zea mays* L. cultivadas em Cambissolo apresentaram menores valores de Cd em seus tecidos quando comparadas com aquelas cultivadas em Latossolo na maioria das doses. Menores teores internos de Cd permitiram com que essas plantas tivessem um menor impacto desse elemento-traço sobre o seu metabolismo e, dessa forma, apresentaram uma redução no crescimento menos acentuada que aquela observada em plantas cultivadas em Latossolo.

Similarmente aos resultados apresentados no presente estudo, vários outros estudos também demonstraram comportamento semelhante entre espécies após a exposição a doses de Cd/Zn. Plantas de *Solanum lycopersicum* (CHERIF et al., 2011), *Triticum vulgares* (HART et al., 2002) sofreram reduções dos parâmetros de crescimento quando expostas a esses metais. Provavelmente, esses resultados podem estar relacionados aos efeitos sinérgicos de ambos os elementos quando expostos a elevadas concentrações.

3.3 Análises ecofisiológicas

Avaliando-se o índice de clorofila das plantas de milho, de modo geral, maiores valores foram encontrados para plantas no Cambissolo que no Latossolo

(Figura 1). Para ambos os solos, maior índice de clorofila foi observado no tratamento D0, seguido de uma queda com o aumento das doses de Zn/Cd, sendo os menores valores encontrados nas D5, D6 e D7 para Cambissolo e D7 em Latossolo.

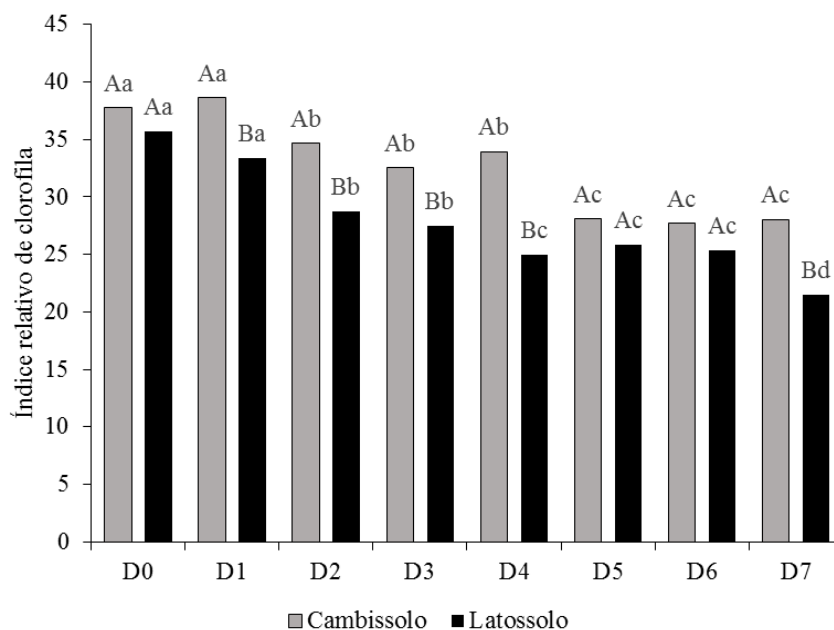


Figura 1 Índice relativo de clorofila de plantas de milho submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos dentro de uma mesma dose, enquanto as letras minúsculas comparam as doses para cada solo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Essa influência na redução da quantidade de pigmentos fotossintetizantes pode ser atribuída ao aumento da produção de EROs, que podem reduzir o conteúdo de clorofila e carotenóides além da possibilidade de menor absorção de potássio (K) pelas raízes das plantas (CHEN; MA; HARRIS, 1999). Além desses fatores, a redução do teor de clorofila pode ser devido à

redução do número de cloroplastos, uma vez que o Cd interfere diretamente na replicação dessas organelas. Ocorre uma competição do Cd com o Fe e Mg pelos sítios de absorção, gerando assim, instabilidade nas moléculas de clorofilas, levando a sua degradação (STRZALKA et al., 2004). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos realizados com plantas de milho, em que houve uma diminuição na quantidade de pigmentos fotossintetizantes pela exposição das plantas a elevadas doses de Cd (HASSAN et al., 2005). Essa diminuição dos níveis de clorofila em elevadas doses de Cd/Zn também pode ser devido à interação sinérgica entre os elementos, onde o excesso de Zn induz à clorose e à perda de clorofila total (SAGARDOY et al., 2009). Em contraste, a suplementação com Zn em concentrações moderadas permite uma estabilidade dos níveis de clorofila, provavelmente, a presença do Zn em baixas concentrações mantém a síntese de clorofila por meio da proteção do grupo sulfidríla, função associada ao Zn (CAKMAK, 2000). O Zn também desempenha um papel na ativação do ALA desidratase mantendo-se assim, a síntese de clorofila (LEDEDEV; TIMKO, 1998), estes resultados não foram observados no presente estudo.

O menor índice de clorofila nas maiores doses está relacionado ao alto teor de Cd e Zn encontrados na parte aérea (Tabela 5), sendo que, maiores concentrações de ambos os elementos e os menores índices de clorofila foram encontrados em Latossolo, além dessas avaliações os parâmetros de crescimento relacionados ao acúmulo de massa seca na planta, condiz com os resultados encontrados, pois esse mesmo solo apresentou reduzidos valores de matéria seca. Essa alta concentração de Cd/Zn afeta diretamente a planta, colocando-a em condições de estresse, que poderá levar à degradação da clorofila. O decréscimo no índice de clorofila com o aumento das doses de Zn/Cd pode afetar a atividade fotossintética da planta, refletindo na menor produção de massa seca (ALI et al., 2013; HUSSAIN et al., 2013).

Assim como ocorreu para o índice de clorofila, a taxa fotossintética das plantas foi impactada negativamente com o aumento das doses de Cd e Zn utilizadas (Figura 2). As plantas de *Zea mays* L. cultivadas em Cambissolo, independentemente da dose a que foram submetidas, apresentaram maiores taxas fotossintéticas líquida quando comparada àquelas plantas do Latossolo. No Cambissolo, a menor taxa fotossintética foi observada na D7, enquanto no Latossolo, a partir da D4, observa-se que essa redução manteve-se constante.

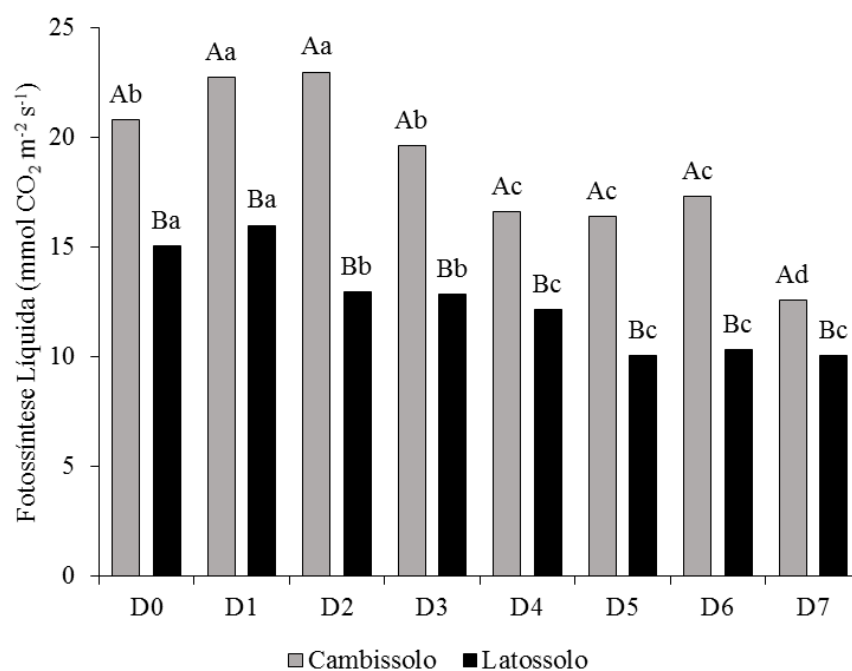


Figura 2 Taxa de fotossíntese líquida submetida a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos dentro de cada dose, enquanto as letras minúsculas comparam as doses para cada solo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

No que diz respeito à transpiração, houve um decréscimo de seus valores com o aumento das concentrações de Cd e Zn utilizadas (Figura 3). Além disso,

plantas de milho cultivadas em Cambissolo apresentaram maiores valores de transpiração que aquelas cultivadas em Latossolo nas primeiras doses utilizadas. Já nas demais doses plantas de *Zea mays* L. cultivadas em ambos os solos apresentaram taxas transpiratórias similares.

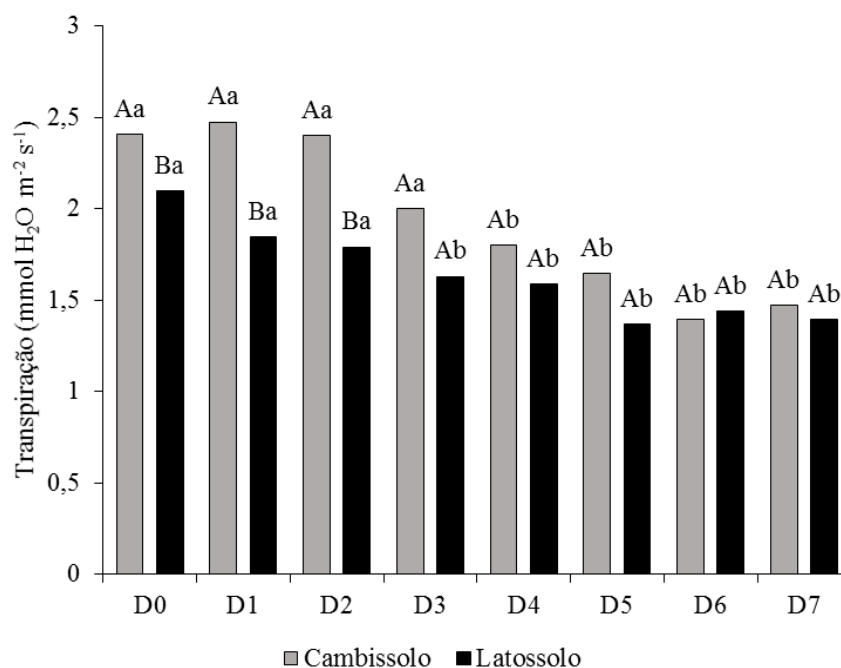


Figura 3 Taxa de transpiração submetida a diferentes concentrações de Cd/Zn
 Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos dentro de cada dose, enquanto as letras minúsculas comparam as doses para cada solo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Avaliando-se a condutância estomática, de maneira geral, houve uma redução nos seus valores com o aumento das doses de Cd e Zn aplicadas (Figura 4). Os maiores valores foram observados em plantas cultivadas no Cambissolo quando comparadas àquelas cultivadas em Latossolo, exceto nas D6 e D7, onde não houve diferenças entre os dois tipos de solos. Em relação às doses,

observou-se no Latossolo menor condutância estomática a partir da D4 e em Cambissolo a partir das doses D6 e D7.

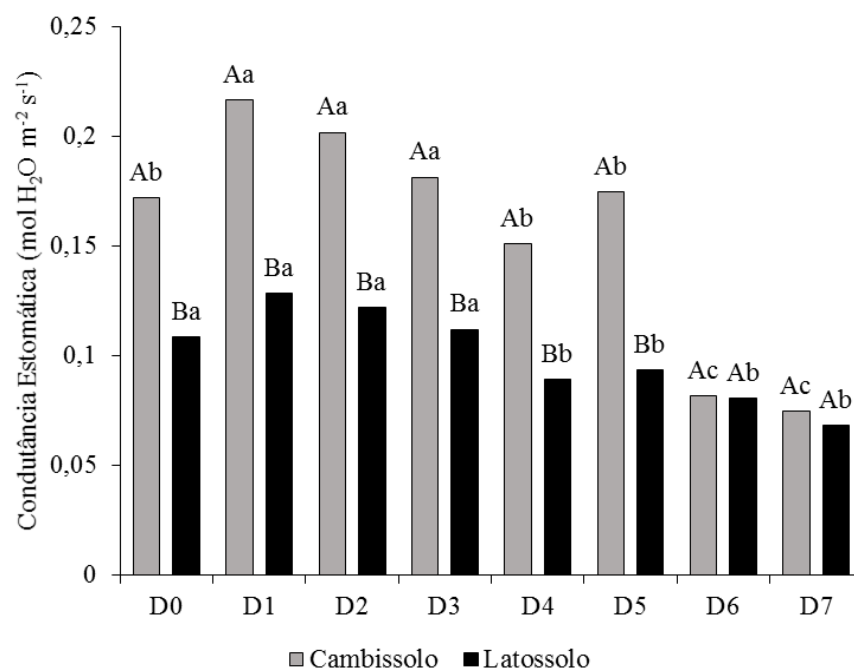


Figura 4 Taxa de condutância estomática submetida a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos dentro de cada dose, enquanto as letras minúsculas comparam as doses para cada solo, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A inibição da biossíntese de clorofila (Figura 1) devido ao aumento nas doses de Cd e Zn teve efeito direto no processo fotossintético, uma vez que a redução nos níveis desse pigmento está intimamente relacionada com a redução na captação da energia luminosa que será utilizada na etapa bioquímica da fotossíntese. Além disso, a redução na taxa fotossintética pode ter ocorrido devido aos efeitos do cádmio na inibição da fotossíntese pela dissipação da

energia na forma de calor, impedindo assim, que a energia seja absorvida nos centros de reação do fotossistema II (FAGIONI et al., 2008; PARMAR et al., 2013). Já na etapa bioquímica da fotossíntese, as enzimas carboxilase/oxigenase da ribulose-1,5-bifosfato e carboxilase do fosfoenolpituavato tem sua atividade fortemente afetada pela atuação do Cd (WANG et al., 2009). Apesar de o zinco ser um elemento essencial para muitos processos bioquímicos, a exposição a altas concentrações, ocasiona danos ao fotossistema II (PSII), ao interagir com grupo tiol (-SH) de proteínas. Além disso, em excesso inibe a absorção de Mg, diminuindo a taxa fotossintética (SPIJKERMAN et al., 2007). Outro fato importante é que, nas doses mais altas de Cd e Zn foi observado o efeito combinado do estresse por esses dois elementos, atingindo os menores valores de fotossíntese.

No que se refere ao tipo de solo utilizado para o cultivo de *Zea mays* L., plantas cultivadas no Cambissolo apresentaram maiores valores de fotossíntese líquida que aquelas de Latossolo. Esses resultados condizem com os valores de clorofila observados, sendo a redução nos valores desse pigmento um dos fatores responsáveis por essa queda na fotossíntese. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de trigo expostas ao excesso de Zn e Cd (YING et al., 2010).

Devido à redução nos valores de fotossíntese líquida com o aumento das doses de Cd e Zn utilizadas, a fotossíntese pode ser considerada como um parâmetro sensível para quantificar o estresse e a fitotoxicidade causada por esses elementos-traço em plantas de *Zea mays* L. (MENDELSSOHN; MCKEE; KONG, 2001).

A redução da condutância estomática pode estar relacionada com os efeitos na inibição da incorporação de nitrato e do potássio, que estão associados à abertura e fechamento dos estômatos (GOMES et al., 1998). O Cd pode induzir a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e do vacúolo,

umentando, assim, sua concentração no citosol (GUIMARÃES et al., 2008), o que seria a principal causa da redução da condutância estomática. Essa menor abertura estomática afeta diretamente a entrada de CO₂, que seria então assimilado através do processo fotossintético, justificando assim o menor crescimento da planta (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002).

As menores taxas fotossintéticas, condutância estomática assim como a transpiração são influências pelo aumento das doses em ambos os solos e o acúmulo de ambos os elementos na parte aérea e diminuição da massa seca.

3.4 Enzimas antioxidantes

Analisando a atividade da enzima SOD em plantas de milho cultivadas em Cambissolo, foi possível perceber um aumento desta atividade a partir do tratamento D1 mantendo-se constante até a D4 (Figura 5), sendo este crescimento acompanhado de um decréscimo a partir da dose 5. Estes resultados foram significativos apenas para a folha, uma vez que, nas raízes observou-se uma elevada atividade desta enzima a partir do tratamento D1 ao tratamento D6, sendo acompanhada de uma redução no tratamento D7. Já para o Latossolo, a atividade da SOD nessa espécie apresentou resultados semelhantes em folha e raízes na D0 à D6 (exceto D3), apresentando um aumento desta atividade. Os demais tratamentos apresentaram maiores atividades na folha quando comparados à raiz. Ao comparar os resultados obtidos em ambos os solos, observou-se uma maior atividade nas primeiras doses, nas folhas de plantas cultivadas em Cambissolo (D1 à D5), sendo que, na D0, D6 e D7 este solo apresentou menores atividades em relação ao Latossolo. O mesmo foi observado em relação às raízes, diferindo apenas para D4 que foi semelhante em ambos os solos. Sendo esta enzima a primeira via de defesa enzimática do metabolismo das plantas, fica evidente que as mesmas estão sob influência de estresse.

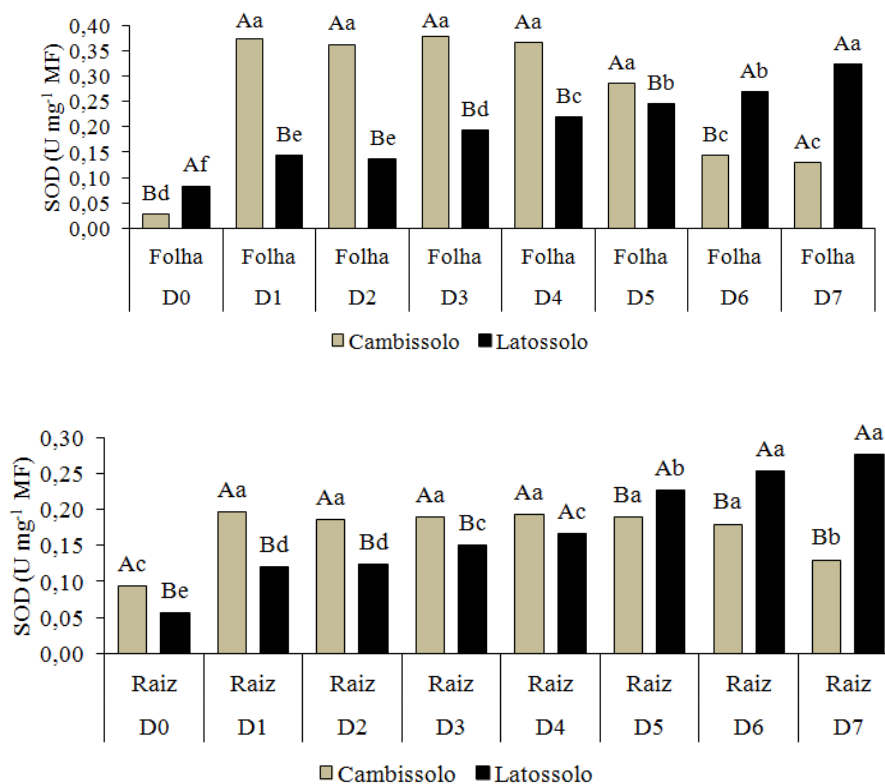


Figura 5 Atividade da dismutase do superóxido (SOD), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos, enquanto as letras minúsculas comparam as doses, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Como pode ser observado na figura 6, a atividade da CAT foi expressivamente influenciada pelos tratamentos, demonstrando maiores atividades nas folhas quando comparada às raízes (exceto na D6) quando cultivadas em Cambissolo. Em contrapartida, ao analisar os resultados obtidos em Latossolo, atividades da catalase em folhas expostas a D0 à D7 (exceto D1 e D2), foram significativamente maiores ao serem comparados às raízes. A CAT apresentou maior atividade nas primeiras doses das folhas de plantas cultivadas

em Cambissolo e menores atividades nas maiores doses ao ser comparada ao Latossolo, sendo também observada em relação às raízes.

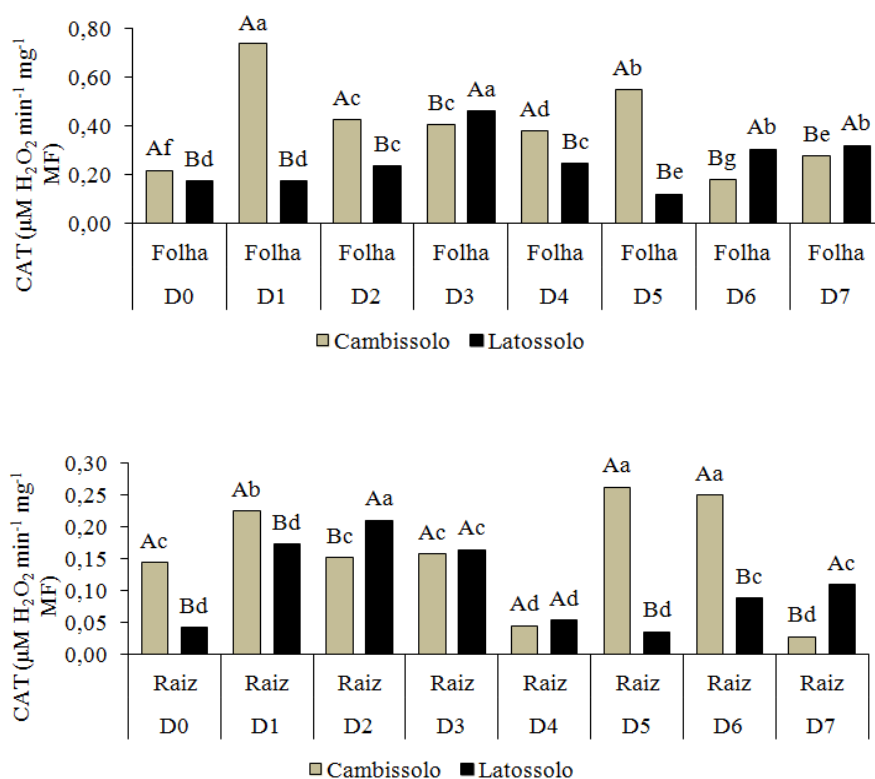


Figura 6 Atividade da enzima catalase (CAT), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos, enquanto as letras minúsculas comparam as doses, de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A análise da APX (Figura 7) demonstrou que a atividade da enzima apresentou um comportamento diferenciado em relação às diferentes doses. Em Cambissolo, a partir da D1, percebeu-se um aumento da atividade da enzima, de maneira que maiores valores foram destacados para a D5. Houve uma tendência

desta enzima em exibir menores atividades nas doses com maiores concentrações de Cd e Zn (D6 e D7). Os resultados obtidos para as raízes assemelharam-se aos encontrados nas folhas, porém, menos significativos.

Para as plantas de milho cultivadas no Latossolo, houve um crescimento significativo da atividade da APX até a dose 3, observando-se uma queda a partir dessa dose. Esses resultados foram tanto nas folhas, quanto nas raízes. A APX apresentou uma elevada atividade nas folhas doses D4 a D7 de plantas cultivadas em Cambissolo quando comparada às cultivadas em Latossolo, em relação ao tecido radicular o mesmo foi observado com exceção da D0.

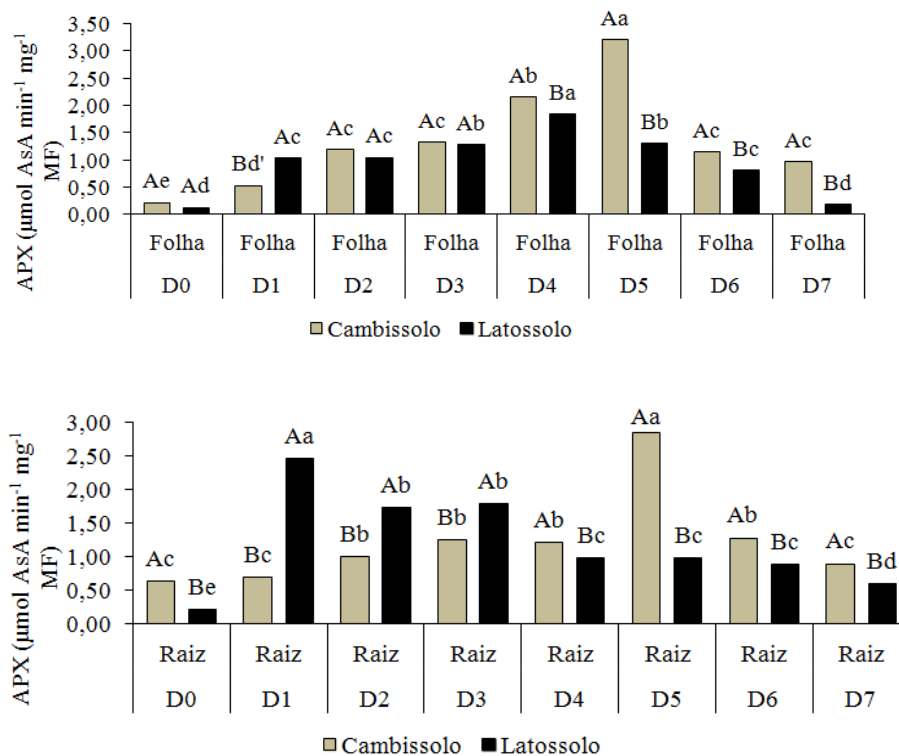


Figura 7 Atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos, enquanto as letras minúsculas comparam as doses de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os níveis de peróxido de hidrogênio foram maiores em folhas de plantas cultivadas no Latossolo submetidas a todas as doses, enquanto nas cultivadas no Cambissolo as maiores concentrações foram observadas nas raízes, em todas as doses (Figura 8). Houve um aumento na geração de H_2O_2 com o aumento das doses de Zn/Cd, sendo os maiores níveis de H_2O_2 encontrados nas doses D6 e D7 para folhas e raízes de ambos os solos.

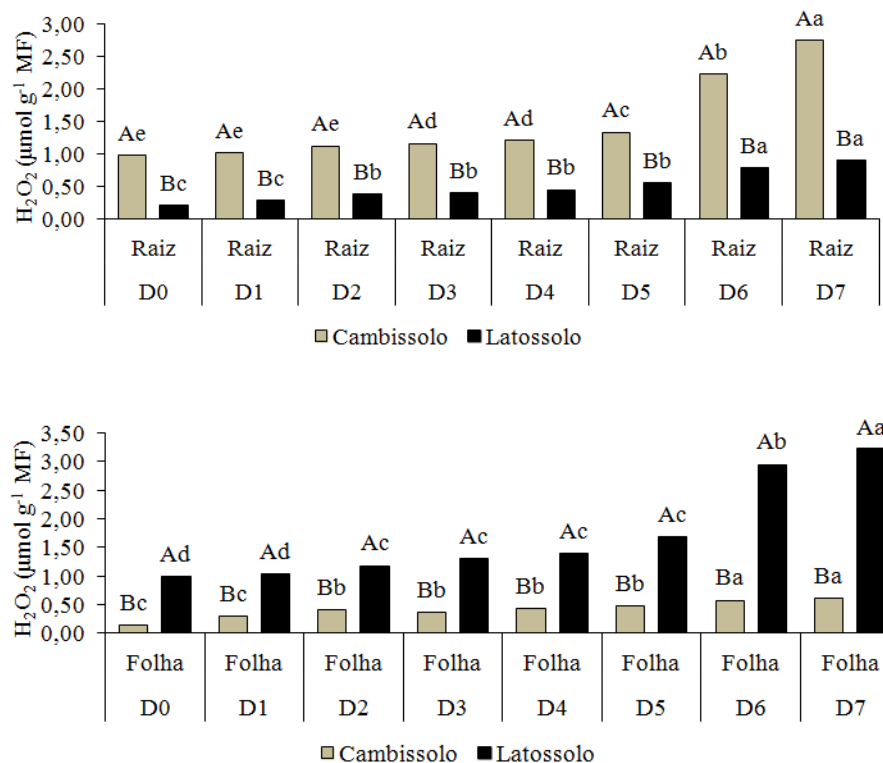


Figura 8 Concentração de peróxido de hidrogênio em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos, enquanto as letras minúsculas comparam as doses de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

Os níveis de peroxidação lipídica foram expressos em conteúdo de malonaldeído (MDA). A peroxidação lipídica foi semelhante, de modo geral, entre os solos, apresentando, com exceção, maiores níveis nas raízes e folhas de plantas de milho cultivadas no Cambissolo na dose 7 (Figura 9).

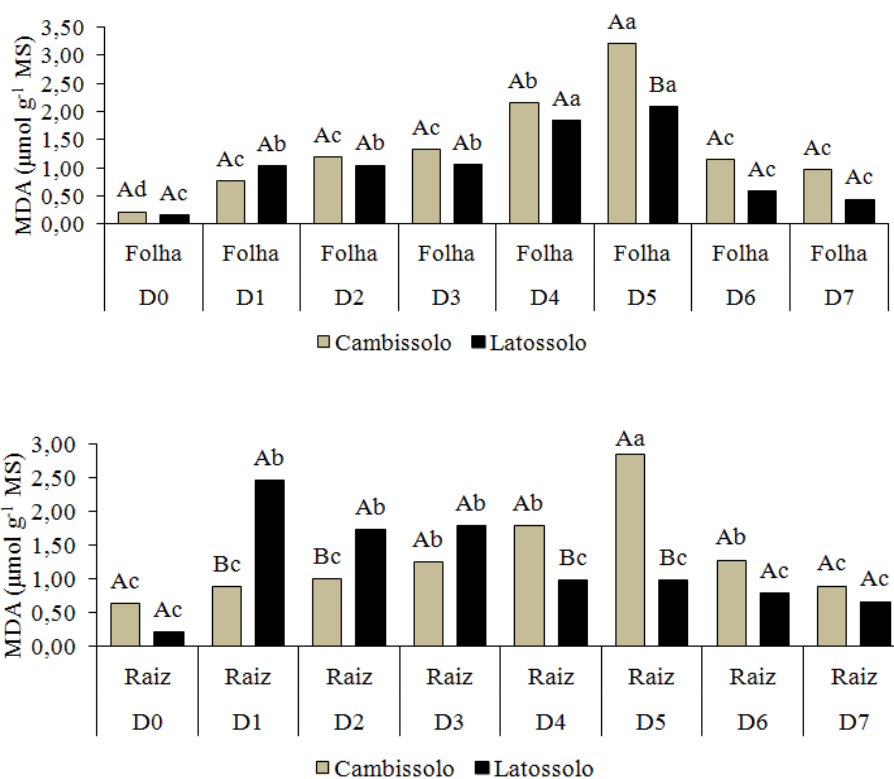


Figura 9 Níveis de peroxidação lipídica expresso pelo conteúdo de malondialdeído (MDA), em folhas e raízes em plantas de milho, submetidas a diferentes concentrações de Cd/Zn

Legenda: As letras maiúsculas comparam os solos, enquanto as letras minúsculas comparam as doses de acordo com o teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$).

A enzima antioxidante SOD é uma metaloproteína que catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e tem sua atividade reduzida em plantas expostas a elevadas concentrações de Cd/Zn. Essa menor atividade tem sido atribuída a uma inativação da enzima pelo H_2O_2 que é formado em diferentes compartimentos celulares, onde a SOD catalisa a eliminação de radicais superóxidos (DIXIT; PANDEY; SHYAM, 2001). Quando o Zn é adicionado em combinação com o Cd pode ocorrer uma alta atividade da SOD.

Possivelmente, nessas concentrações, o Zn atua protegendo as plantas dos efeitos de toxicidade causados pelo Cd, através de um aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Nessas concentrações, o Zn compete com o Cd pela ligação do grupo –SH das proteínas de membrana, sendo que o H₂O₂ produzido pela atividade da SOD está sendo quebrado em H₂O e O₂ pela CAT e pelo ciclo ascorbato-glutationa (DRAZKIEWICZ; SKORZYNSKA-POLI; KRUPA, 2003). Essas respostas variáveis dessas enzimas já foram relatadas em plantas submetidas a diferentes concentrações de elementos-traço, cujos efeitos são dependentes da concentração aplicada, o período de exposição e o tipo de tecido (OKAMOTO et al., 1996). Durante o presente estudo a atividade das enzimas CAT e SOD nas folhas estavam reduzidas nas menores doses, enquanto que a atividade da APX estava elevada. Resultados semelhantes foram encontrados em plantas de tomate quando submetidas às mesmas condições (CHERIF et al., 2011). Nas maiores doses, pode ocorrer um acúmulo de H₂O₂, responsável pela peroxidação lipídica e diminuição da atividade da clorofila (LASPINA et al., 2005). A atividade da SOD é dependente da intensidade do estresse oxidativo nas células vegetais. As enzimas CAT e APX desempenham um papel crucial na eliminação e desintoxicação do H₂O₂ (GILL; TUTEJA, 2010; MITTLER et al., 2004). Contrapondo aos resultados obtidos por Cherif et al. (2011), a adição de Zn nas menores doses não influenciou a atividade da APX e CAT, indicando assim que não foi observada a eficiência destas enzimas na presença da suplementação com Zn. Os resultados desse trabalho indicam que em altas concentrações de Cd/Zn ocorre um efeito sinérgico, ou seja, na presença de altas concentrações de Cd/Zn os níveis das enzimas antioxidantes não são eficientes contra a ação das EROs. Diversos estudos têm demonstrado a ação sinérgica de ambos os elementos (POWELL, 2000). O Cd é conhecido por provocar a oxidação do NADPH, levando à produção de O₂⁻. A suplementação de Cd com Zn inibe a oxidação do NADPH e, conseqüentemente, inibe a formação do

radical O_2^- , impedindo a formação das EROs (ARAVIND; PRASAD, 2009). Diante disso, o Zn protege vários componentes vitais, tais como clorofila, além de inibir a oxidação lipídica da membrana, sendo que, no presente estudo essa proteção do Zn contra os danos oxidativos ocasionados pela presença de Cd não foi observada. A toxicidade por elementos-traço em plantas pode resultar em ligações nos grupos sulfidrilas das proteínas, levando a uma inibição da atividade das enzimas, alterando a estrutura das proteínas (CHERIF et al., 2011). A proteção contra a oxidação dos grupos $-SH$ pelo Zn em tratamentos com Cd tem reforçado a função do Zn na interação com a metaloproteína (CAKMAK, 2000; POWELL, 2000). Na maioria das doses mais elevadas observou-se uma baixa atividade da SOD, CAT e APX, principalmente na raiz, sugerindo assim, que em altas concentrações de Cd/Zn, o Zn atua como efeito sinérgico com a toxicidade de Cd, ou seja, causa danos irreversíveis ao desenvolvimento e funções fisiológicas das plantas. Esse resultado contradiz o observado por Aravind e Prasad (2003), uma vez que eles relataram que a suplementação com altas concentrações Zn melhora a atividade das enzimas antioxidantes, mesmo quando em presença de cádmio. No entanto, outros trabalhos realizados demonstram que a suplementação com Zn em excesso leva a uma produção de EROs, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido (O_2^-), levando a uma redução da atividade das enzimas antioxidantes (JIN et al., 2008). Assim, a atividade dessas enzimas antioxidantes indica o estado de defesa antioxidante em células vegetais, uma vez que o acúmulo de EROs está relacionado à ruptura do equilíbrio entre a produção e a atividade do sistema antioxidante (TUTEJA et al., 2010). A desestabilização da membrana é geralmente atribuída à peroxidação lipídica, devido ao aumento da produção de EROs (SMEETS et al., 2005). Observaram-se elevados níveis de peroxidação lipídica, em todas as doses, diferindo dos resultados obtidos por Aravid e Prasad (2003), que

mostraram que a suplementação de Zn reduz esses níveis, através da estabilização e proteção da integridade da biomembrana e fosfolipídios.

Em Cambissolo, as atividades de SOD, CAT e APX foram maiores nas folhas, apresentando menor presença de H_2O_2 e valores de peroxidação lipídica expressivos. Esses resultados podem estar relacionados à menor degradação do teor de clorofila e maior taxa fotossintética, menores teores de Cd/Zn na parte aérea quando comparados ao Latossolo. As plantas cultivadas em Latossolo apresentaram maiores atividades das enzimas SOD, CAT nas maiores doses (D6 e D7) e nas mesmas doses uma redução da atividade da APX e uma grande presença de H_2O_2 e peroxidação lipídica. Também neste solo foi observada maior degradação do índice de clorofila, seguida de menores taxas fotossintéticas, condutância estomática e transpiração, além de maior presença de Cd na parte aérea. Provavelmente esses resultados indicam que a atividade das enzimas não foi suficiente para evitar os danos causados pelo estresse a que as plantas foram submetidas, culminando em menores parâmetros de crescimento. Além disso, observa-se que plantas de milho, quando submetidas a elevadas concentrações de Cd/Zn, cultivadas no Cambissolo, apresentam uma menor sensibilidade que quando cultivadas em Latossolo. Provavelmente as características de ambos os solos influenciam significativamente os resultados obtidos.

4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, os dados obtidos evidenciaram comportamento específico das plantas de milho para cada solo analisado. O Latossolo disponibilizou em maior quantidade o Cd aplicado às plantas, resultando em um maior dano oxidativo, o que culminou em menores parâmetros de crescimento, afetando diretamente os índices ecofisiológicos e atividade das enzimas antioxidantes. O Cambissolo, devido a seus atributos, principalmente aos maiores teores de argila e matéria orgânica em relação ao Latossolo, adsorveu o Cd e Zn em maiores proporções, o que resultou em um melhor desenvolvimento das plantas, maiores índices ecofisiológicos e maior atividade enzimática.

REFERÊNCIAS

ALI, B. et al. Zhou 5-Aminolevulinic acid ameliorates cadmium-induced morphological, biochemical, and ultrastructural changes in seedlings of oilseed rape. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 20, n. 10, p. 7256-7267, 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20th ed. Washington, 1998. Disponível em: <<https://www.standardmethods.org/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ARAVIND, P.; PRASAD, M. N. V. Cadmium-zinc interactions in a hydroponic system using *Ceratophyllum demersum* L.: adaptive ecophysiology, biochemistry and molecular toxicology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 1, p. 3-20, Mar. 2005.

ARAVIND, P.; PRASAD, M. N. V. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 41, n. 3, p. 391-397, Apr. 2003.

ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, Columbus, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.

AZEVEDO, R. A. et al. What is new in the research on cadmium-induced stress in plants? **Food Energy Security**, New York, v. 1, n. 2, p. 133-140, Nov. 2012.

BALEN, B. et al. Biochemical responses of *Lemna minor* experimentally exposed to cadmium and zinc. **Ecotoxicology**, New York, v. 20, n. 10, p. 815-826, Mar. 2011.

BARBERON, M. et al. Monoubiquitin-dependent endocytosis of the IRON-REGULATED TRANSPORTER 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 32, p. E450-E458, May 2011.

BIEMELT, S. et al. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 651-658, 1998.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 249, p. 81-84, 30 dez. 2009.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, Cambridge, v. 173, n. 4, p. 677-702, Mar. 2007.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAKMAK, I. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. **New Phytologist**, Hoboken, v. 146, n. 2, p. 59-62, May 2000.

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

CHEN, M.; MA, L. Q.; HARRIS, W. G. Baseline concentrations of 15 trace elements in Florida surface soils. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 28, p. 1173-1181, July/Aug. 1999.

CHERIF, J. et al. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 23, p. 837-844, Sept. 2011.

CUYPERS, A. et al. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 168, n. 4, p. 309-316, Mar. 2011.

CVJETKO, P. et al. Effect of copper on the toxicity and genotoxicity of cadmium in duckweed (*Lemna minor* L.). **Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju**, Zagreb, v. 61, n. 3, p. 287-296, Sept. 2010.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Barking, v. 98, n. 1, p. 29-36, 1997.

DIXIT, V.; PANDEY, V.; SHYAM, R. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, n. 358, p. 1101-1109, May 2001.

DRAZKIEWICZ, M.; SKORZYNSKA-POLIT, E.; KRUPA, Z. Response of ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). **Plant Science**, Shannon, v. 164, n. 2, p. 195-202, Feb. 2003.

EHSAN, I.U. et al. Study on accumulation of heavy metals in vegetables receiving sewage water. **Journal of Chemical Society of Pakistan**, Lahore, v. 33, n. 2, p. 220-226, May 2015.

FAGIONI, M. et al. Proteomic analysis of multiprotein complexes in the thylakoid membrane upon cadmium treatment. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 8, n. 1, p. 310-326, Nov. 2008.

FERREIRA, D. F. **Sistema para análise de variância para dados balanceados (SISVAR)**. Lavras: UFLA, 1999. 92 p.

FILAVOLT, N. K. Screening method of lowland rice genotypes for zinc uptake efficiency. **Scientia Agricola**, Campina Grande, v. 58, n. 3, p. 623-636, jul. 2006.

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

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

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

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 48, n. 12, p. 909-930, Dec. 2010.

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

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

HART, J. J. et al. Transport interactions between Cd and Zn in roots of bread and durum wheat seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 116, n. 1, p. 73-78, Sept. 2002.

HASSAN, M. J. et al. Zinc alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium in rice. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 168, n. 2, p. 255-261, Apr. 2005.

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

HE, J. et al. Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus x canescens*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 143, n. 1, p. 50-63, Sept. 2011.

HUSSAIN, D. et al. P-type ATPase heavy metal transporters with roles in essential zinc homeostasis in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 1327-1339, 2013.

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

JIN, X. F. et al. Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 46, n. 11, p. 997-1006, Nov. 2008.

LASPINA, N. V. et al. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Science**, Shannon, v. 169, n. 2, p. 323-330, Aug. 2005.

LEBEDEV, N.; TIMKO, M. P. Protochlorophyllide photoreduction. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 58, n. 1, p. 5-12, Oct. 1998.

LEE, S. S. et al. Heavy metal immobilization in soil near abandoned mines using eggshell waste and rapeseed residue. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 20, n. 3, p. 1719-1726, Mar. 2013.

MAESTRE, F. T. et al. Plant species richness and ecosystem multifunctionality in global dryland. **Science**, New York, v. 335, n. 6065, p. 214-218, Jan. 2012.

MALAVOLTA, E. **Manual de química agrícola: adubos e adubação**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1981. 596 p.

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

MENDONZA-COZATL, D. et al. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. **FEMS Microbiology Review**, Haren, v. 29, p. 653-671, Oct. 2005.

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

MITHOFER, A. et al. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. **Febs Letters**, Amsterdam, v. 566, n. 1/3, p. 1-5, May 2004.

MITHÖFER, A.; SCHULTZE, B.; BOLAND, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 566, n. 1/3, p. 1-5, May 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Limerick, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2004.

MURTAZA, G. et al. Metal uptake via phosphate fertilizer and city sewage in cereal and legume crops in Pakistan. **Environmental Science and Pollution Research**, London, v. 55, p. 1035-1047, Jan. 2015.

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

OKAMOTO, O. K. et al. Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracilis* (Prasinophyceae). **Journal of Phycology**, Lawrence, v. 32, n. 1, p. 74-79, Feb. 1996.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidelines for testing of chemicals n° 208**: terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. Paris, 2006. Disponível em: <<http://www.oecd.org>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

PALMER, C. M.; GUERINOT, M. L. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, p. 333-340, Apr. 2009.

PANDEY, N.; GUPTA, B.; PATHAK, G. C. Antioxidant responses of pea genotypes to zinc deficiency. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 59, n. 2, p. 198-205, Mar. 2012.

PARLAK, U. K.; YILMAZ, D. D. Response of antioxidant defences to Zn stress in three duckweed species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 85, p. 52-58, Nov. 2012.

PARMAR, C. et al. Zinc exposure has differential effects on uptake and metabolism of sulfur and nitrogen in Chinese cabbage. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Tharandt, v. 177, n. 5, p. 748-757, Oct. 2014.

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

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

POWELL, S. R. The antioxidant properties of zinc. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 5, p. 1447-1454, May 2000.

QIAN, H. et al. Photoperiod and temperature influence cadmium's effects on photosynthesis-related gene transcription in *Chlorella vulgaris*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 73, n. 6, p. 1202-1206, Sept. 2010.

SAGARDOY, R. et al. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, New York, v. 11, n. 3, p. 339-450, 2009.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.

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

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

SPIJKERMAN, E. et al. Stress responses and metal tolerance of *Chlamydomonas acidophila* in metal-enriched lake water and artificial medium. **Extremophiles**, New York, v. 11, n. 4, p. 551-562, July 2007.

STRZALKA, I. et al. The xanthophyll cycle: molecular mechanism and physiological significance Tansley review n. 111: possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 26, n. 2, p. 197-212, 2004.

TKALEC, M. et al. Cadmium induced responses in duckweed *Lemna minor* L. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 881-890, Nov. 2008.

TKALEC, M. et al. The effects of cadmium-zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, p. 10-22, Jan. 2014.

TUTEJA, A. N. D. et al. **Crop improvement under adverse condition**. New York: Springer, 2010. 222 p.

ULLRICH, S. M.; RAMSEY, M. H.; HELIOS-RYBICKA, E. Total and exchangeable concentrations of heavy metal in soils near Bytom, an area of Pb/Zn mining and smelting in upper Silesia, Poland. **Applied Geochemistry**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 187-196, Mar. 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Trimmed Spearman-Kärber estimation of LC50 Values Users' manual**, U.S. EPA. Athens, 1998. 60 p.

VALLEE, B. L.; FALCHUK, K. H. The biochemical basis of zinc physiology. **Physiological Reviews**, Baltimore, v. 73, p. 79-118, Jan. 1993.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Shannon, v. 151, n. 1, p. 59-66, 2000.

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

WANG, C. et al. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, Oxford, v. 75, n. 11, p. 1468-1476, 2009.

WANG, J. et al. Physiological responses and detoxification mechanisms to Pb, Zn, Cu and Cd in young seedlings of *Paulownia fortune*. **Journal of Environmental Sciences**, Los Angeles, v. 22, n. 1, p. 1916-1922, Jan. 2010.

WILDE, K. L. et al. The effect of pH on the uptake and toxicity of copper and zinc in a tropical freshwater alga (*Chlorella* sp.). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 51, n. 23, p. 174-185, June 2006.

YING, R. R. et al. Cadmium tolerance of carbon assimilation enzymes and chloroplast in Zn/Cd hyperaccumulator *Picris divaricata*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, n. 2, p. 81-87, Jan. 2010.