



**RODOLFO GUIMARÃES ALEXANDRE VASQUES
PEDROSO**

**FITOEXTRAÇÃO, FITOESTABILIZAÇÃO
E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE
Gomphrena claussenii Moq. EXPOSTA A Cu E Pb**

**LAVRAS - MG
2014**

RODOLFO GUIMARÃES ALEXANDRE VASQUES PEDROSO

**FITOEXTRAÇÃO, FITOESTABILIZAÇÃO E ANÁLISE
ULTRAESTRUTURAL DE *Gomphrena claussenii* Moq. EXPOSTA A Cu E
Pb**

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

Orientador
Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme

**LAVRAS-MG
2014**

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

Pedroso, Rodolfo Guimarães Alexandre Vasques.

Fitoextração, fitoestabilização e análise ultraestrutural de
Gomphrena claussenii Moq. exposta a Cu e Pb / Rodolfo Guimarães
Alexandre Vasques Pedroso. – Lavras : UFLA, 2014.

56 p. : il.

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

Orientador: Luiz Roberto Guimarães Guilherme.

Bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Elementos-traço. 3. Microscopia. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 628.55

RODOLFO GUIMARÃES ALEXANDRE VASQUES PEDROSO

**FITOEXTRAÇÃO, FITOESTABILIZAÇÃO E ANÁLISE
ULTRAESTRUTURAL DE *Gomphrena claussenii* Moq. EXPOSTA A Cu E
Pb**

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

APROVADA em 25 de setembro de 2013.

Dr.^a. Cláudia Regina Gontijo Labory

UFLA

Dr.^a. Cynthia de Oliveira

UFLA

Dr. Luiz Roberto Guimarães Guilherme
Orientador

**LAVRAS – MG
2014**

"Viver é acalentar sonhos e esperanças, fazendo da fé a nossa inspiração maior. É buscar nas pequenas coisas, um grande motivo para ser feliz!"

Mario Quintan

AGRADECIMENTOS

Tenho tanta gente para agradecer que tenho muito medo de ser injusto com algum dos 'meus'. De todo modo, fica aqui a tentativa de agradecer a alguns, e que estes representem todos os outros.

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

Sou grato a minha família e aos meus pais, José Luiz e Mariza, que sempre me guiaram no melhor caminho. Aos meus irmãos Stênio e Olívia, pelo carinho e companheirismo. A minha tia Lineia e a todos meus familiares, pelo carinho e torcida.

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

Às pesquisadoras Cláudia, Ana Rosa, Geila, Marcelle, Suame, Cynthia e Veridiana, o meu reconhecimento. As suas ideias e conhecimentos, junto à disponibilidade, permitiram que cada detalhe fosse pensado e executado de maneira tranquila e eficiente.

Quero agradecer à Ana Luiza, que me permitiu acompanhar seu trabalho de tese e me incentivou na vida acadêmica. Sua amizade foi muito importante.

Quero agradecer, em especial, à Janice por sua amizade, dentro e fora dos estudos. Ao concluir essa etapa, tive a convicção de que Deus me presenteou com uma grande amiga.

Meus sinceros agradecimentos aos professores do DCS e de outros departamentos da UFLA, como os professores José Eduardo Brasil e Eduardo Alves que contribuíram para a realização deste trabalho.

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

Gostaria de mencionar a importância da amizade e convívio com pessoas que me ajudaram durante todo esse tempo, em especial aos amigos Cristine, Elda, Dani, Nilma, Gabriela, Guilherme Lopes, Vanessa, Ana Paula, Viviane, Douglas, Ingrid, Gabriel, Manuel, Paula Caruana e todos que de alguma forma me auxiliaram.

Às alunas de Iniciação Científica, Talieisse, Fernanda, Camila e Evanise por toda a ajuda na condução do trabalho.

Aos meus amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

À Capes, CNPq e a Fapemig, o órgão financiador da pesquisa, pela concessão da bolsa de estudo.

A todos muito obrigado!

RESUMO

A preocupação com o ambiente evoluiu ao longo dos anos e parte disso deve-se a contaminação dos diferentes ecossistemas por elementos os mais diversos, dentre os quais estão os elementos-traço, os quais, que por vezes, são denominados metais pesados. As atividades mineradoras foram, são e serão sempre importantes para o desenvolvimento da humanidade, porém, podem resultar em contaminação do solo por esses elementos, o que requer o uso de práticas as mais diversas para mitigar os eventuais efeitos negativos dessa contaminação. Diante disso, esse assunto tem sido debatido mundialmente. Uma técnica emergente é a fitorremediação, que tem baixo custo e faz o uso de plantas que têm a habilidade em concentrar ou tolerar altas concentrações de elementos-traço, podendo ser utilizadas para remediar áreas contaminadas. Nas áreas de mineração onde ocorrem impactos negativos oriundos da atividade podem ser encontradas espécies apropriadas para a fitorremediação. O presente estudo objetivou-se avaliar o potencial fitoextrator de Cu e Pb, bem como o acúmulo, teor, translocação e tolerância desses elementos em *Gomphrena claussenii* e a identificação das alterações celulares da planta por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET). O estudo foi conduzido em casa de vegetação, na Universidade de Lavras, em Lavras, MG, Brasil. As plantas foram cultivadas em vasos com solução de Clark com concentrações crescentes de Cu (0,5; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 75 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Pb (0; 50; 100; 200; 400; 600 e 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Após 35 dias de cultivo, raízes e parte aérea foram coletadas determinando-se a matéria seca e a concentração de Cu e Pb. Os resultados demonstram que as plantas de *Gomphrena claussenii* mostraram-se sensíveis às doses crescentes de Cu e Pb em solução nutritiva, mostrando sintomas de fitotoxidez. As plantas de *Gomphrena claussenii* mostraram-se sensíveis às doses crescentes de Cu e Pb em solução nutritiva, mostrando sintomas de fitotoxidez e redução na produção de matéria seca. Mesmo em altas concentrações de doses de Cu e Pb, as plantas sobreviveram, podendo ser usadas para programas de fitorremediação, pois com o primeiro elemento-traço apresentou características de planta fitoextratora, e o segundo de fitoesbilização.

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

ABSTRACT

Environmental issues have increased concern throughout the years and part of this can be related to heavy metals contamination. Mining activities are, and will always be, important for the outcome of the country and for the community. However, these activities can create huge amounts of soil contaminants and it has been debated worldwide recently. Phytoremediation techniques, which use plants with high capacities of uptaking and tolerate trace metals, are important, low costs tools that can be used to remedy a contaminated area. In the vicinities of mining areas it can be found some plant species that are appropriate for remediation. This study aims at investigating the phytoextracting potential of Cu and Pb, as well as its accumulation, the total contents, the translocation indexes and Cu and Pb tolerance capacity in *Gomphrena claussenii*. Cellular changes were investigated using transmission electron microscopy (TEM). The study was conducted in the greenhouse at the Federal University of Lavas, MG, Brazil. The plants were cultivated in buckets with Clark solution with Cu concentrations ranging from 0,5; 2,5; 5,0;10; 25; 50; 75 to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and Pb from 50; 100; 200; 400; 600 to 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$. After 35 days of cultivation, roots and shoots system were collected and dried and the contents of Cu and Pb were evaluated. The plants of *Gomphrena claussenii* were sensitive to increasing doses of Cu and Pb in nutrient solution, showing phytotoxicity symptoms and reduction in dry matter production. Even at high concentrations of Cu and Pb doses, the plants survived and can be used for phytoremediation programs, because with the first trace element characteristics presented fitoextratora plant, and the second fitoesbilização.

Keywords: Phytoremediation, Trace elements and microscopy.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Fitorremediação	10
2.2	Contaminação por elementos-traço	13
2.3	Cobre (Cu)	14
2.4	Chumbo (Pb)	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Caracterização do local de obtenção das plantas coleta do material vegetal	20
3.2	Propagação	23
3.3	Condução Experimental	24
3.4	Análise do Cu e Pb na planta	25
3.5	Cálculo do Índice de Translocação	26
3.6	Análises estatísticas	26
3.7	Microscopia eletrônica de transmissão	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Sintomas de fitotoxidez das plantas	27
4.2	Produção de matéria seca das plantas expostas ao Cu	30
4.3	Teor e acúmulo de Cu	31
4.4	Produção de matéria seca das plantas expostas ao Pb	33
4.5	Teor e acúmulo de Pb	35
4.6	Índice de translocação de Cu e Pb	37
4.7	Análise ultraestrutural de <i>Gomphrena claussenii</i> exposta a Cu e Pb através da microscopia eletrônica de transmissão	40
5	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com o meio ambiente evoluiu ao longo dos anos e parte disso deve-se ao uso e manejo inadequado do solo nos agroecossistemas, o que, eventualmente, pode levar à contaminação dos solos, cursos de água e lençol freático por substâncias as mais diversas, dentre as quais, estão os elementos-traço (GUILHERME et al., 2005; HOODA, 2010; WEI; ZHOU, 2008).

Os elementos-traço ocorrem naturalmente no solo, sendo que, alguns deles são essenciais às funções fisiológicas dos seres vivos (Fe, Mn, Cu, Zn, etc.). Outros, como Pb e Cd podem ser deletérios aos processos metabólicos e, quando ocorrem em elevadas concentrações, podem causar danos ao ambiente e à cadeia alimentar (HADJILIADISS, 1997).

O estado de Minas Gerais detém 92% das reservas brasileiras de Zn, sendo responsável por praticamente 100% da produção (BIGARELLI; ALVES, 1998). Uma das empresas produtoras é a Votorantim Metais (VM), com atividades de mineração localizadas em Vazante e Paracatu (MG). O processamento do minério é realizado em Três Marias (MG), sendo os rejeitos depositados em uma área de 18 ha. No geral, esses rejeitos contêm diversos elementos-traço, além dos de interesse. Nas áreas adjacentes à indústria de processamento do minério, o solo apresenta teores elevados e potencialmente tóxicos de vários metais, destacando-se: Zn = 18.600 mg kg⁻¹, Cd = 135 mg kg⁻¹, Cu = 596 mg kg⁻¹ e Pb = 600 mg kg⁻¹. Em áreas de deposição de rejeito industrial há a predominância de formas trocáveis de Zn e Cd, os quais oferecem maior risco ambiental, enquanto Cu e Pb encontram-se preferencialmente em forma residual (RIBEIRO FILHO et al., 2001).

Portanto, os teores elevados desses elementos no solo são responsáveis pelo avançado estado de degradação da área e pela dificuldade de revegetação espontânea. Situações como estas podem gerar efeitos secundários, como o aumento de erosão do solo e o transporte de solo contaminado para os mananciais

hídricos próximos à área, comprometendo a qualidade da água e a saúde humana (SOARES et al., 2002).

A seleção de tecnologia remediadora a ser aplicada no local depende da forma do contaminante e suas características, buscando assim manter o desenvolvimento de uma cobertura vegetal que leve à diminuição dos efeitos deletérios desses elementos ao ambiente. Para isto são desenvolvidas estratégias com o intuito de remediar áreas degradadas a partir de tratamentos químicos, físicos e biológicos, culminando, futuramente, na recuperação desses locais. Dentre essas técnicas, há, atualmente, grande ênfase na fitorremediação visto que é uma técnica barata em relação as demais (MEMON; SCHRODER, 2009). O termo fitorremediação tem sido aplicado a uma extensão de processos envolvidos no uso de plantas para estabilizar, extrair ou promover a degradação de poluentes no solo (SCULLION, 2006).

Importante fonte potencial de espécies apropriadas para a fitorremediação é a vegetação encontrada naturalmente em áreas contaminadas (WATANABE, 1997). Um exemplo desta situação é a que envolve a espécie *Gomphrena claussenii* (primeiramente identificada como *Pfaffia* sp.), encontrada em área de mineração de calamina (minério de Zn), conhecida vulgarmente por *calaminaceae*, a qual se mostrou bem adaptada às condições de multicontaminação por Zn, Cu, Cd e Pb, em relação à outras espécies estudadas (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002; CARVALHO et al., 2013).

A biologia das células e suas moléculas são consideradas o ponto de partida para o conhecimento do organismo vivo, por este constituir um conjunto de células em interação. Em virtude disso, saber como a célula realiza e regula suas atividades é fundamental para se conhecerem os mecanismos biológicos que operam em condições normais e que os desencadeiam mecanismos de tolerância a condições adversas do ambiente, pois a célula é a unidade geradora das respostas biológicas do organismo.

A microscopia eletrônica de transmissão é uma ferramenta que possibilita a identificação das alterações celulares de plantas de *Gomphrena claussenii* ocorridas em detrimento das diferentes concentrações dos metais Cu e Pb adicionadas à solução nutritiva

Ante às premissas acima expostas, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial fitoextrator de Cu e Pb, bem como AS modificações ultraestruturais, acúmulo, teor, translocação e tolerância a Cu e Pb em *Gomphrena claussenii* Moq cultivada em solução nutritiva de Clarck submetida à diferentes concentrações desses elementos.

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fitorremediação

A fitorremediação é uma técnica emergente para descontaminação ambiental, onde se utilizam plantas e sua respectiva microbiota associada para extrair, sequestrar e, ou, remediar vários tipos de ambientes poluídos com substâncias orgânicas e inorgânicas (LIAO; XIE, 2007; MEMON; SCHODER, 2009).

Comparada aos tratamentos químico e físico para remediação do solo, tais como, a remoção, lavagem do solo e estabilização física, a fitorremediação destaca-se pelo seu baixo custo e por gerar o mínimo de perturbação ao ambiente quando comparada com as outras técnicas (HENRY, 2000). Além disso, é uma técnica permanente, sendo a reabilitação feita *in situ*, em vez de simplesmente mover o material contaminado para um local diferente (SALT; SMITH; RASKIN, 1998). Outras vantagens que se pode citar são: a proteção contra a erosão eólica e hídrica, as melhorias na estrutura do solo, o aumento da fertilidade do solo e a recuperação da estética das áreas contaminadas (MEMON; SCHODER, 2009).

Para o processo de fitorremediação de componentes inorgânicos, são utilizadas espécies de plantas que possuem a capacidade de tolerar e, ou, absorver elementos em altas concentrações. Em relação à absorção de metais, Baver (1981) classifica as plantas em: i) excludentes: cuja concentração é mantida em nível constante até que se atinja um valor crítico no solo, no qual esse mecanismo é quebrado, resultando na não restrição ao transporte do metal; ii) indicadoras: onde a absorção e o transporte de metais são regulados, sendo que a concentração interna reflete o nível externo; e, iii) acumuladoras: onde há acumulação de metais nas partes da planta em baixo ou alto nível de metais no solo.

Na literatura, vários autores (ARTHUR et al., 2000; BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; CLEMENS, 2006; GRATÃO et al., 2005; MCGRATH; ZHAO, 2003) obtiveram resultados positivos do uso da fitorremediação em solos contaminados por pesticidas. Segundo Assis et al. (2010), tais resultados são ainda incipientes para confirmação segura quanto à utilização dessa técnica na remediação de solos com histórico de manejo incorreto de herbicidas.

A fitorremediação é praticada em vários países, sendo que dezenas de empresas já atuam na indústria mundial desenvolvendo e aplicando essa técnica. Um exemplo desse crescimento é o investimento dos Estados Unidos na remediação, da ordem de 7 a 8 bilhões de dólares ao ano, sendo que 35% desse valor estão envolvidos na remediação de contaminação de ambientes por metais (MEMON; SCHRODER, 2009).

Entretanto, no Brasil esta técnica ainda não é muito explorada por falta de informações adequadas, capacitação técnica (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000) e pelo fato das espécies de plantas hiperacumuladoras conhecidas, em sua maioria, serem de clima temperado (BAKER; BROOKS, 1989). As plantas tolerantes são endêmicas de solos poluídos, o que sugere significativa adaptação ecofisiológica, manifestando tolerância à contaminação do solo com elementos-traço (RASKIN et

al., 1994). Em solos contaminados com diferentes elementos-traço, tem-se comprovado que as plantas podem apresentar uma tolerância múltipla e ainda pode-se observar co-tolerância (tolerância a um elemento induzida pela presença de outro). Estudos sobre os mecanismos de resistência utilizados por *Pfaffia* sp. na tolerância à contaminação com elementos-traço são incipientes e necessitam ser avaliados (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002). Recentes estudos avaliando o potencial fitoextrator de Cd e Zn pela *Gomphrena claussenii* (anteriormente classificada com *Gomphrena elegans*), tanto em sistemas isolados como formando uma multicontaminação com esses dois elementos, constataram, em ambas as situações, que a espécie *Gomphrena claussenii* é hiperacumuladora dos elementos Cd e Zn (BORIN, 2010; CARVALHO, 2010), possuindo, então, uma alta taxa de translocação desses contaminantes para a parte aérea, local onde os elementos são acumulados em elevadas concentrações.

A hiperacumulação de metais é um raro fenômeno em plantas superiores terrestres. Aproximadamente 400 espécies de plantas são identificadas como hiperacumuladoras de metais, representando menos de 0,2% de todas as angiospermas (BAKER; BROOKS, 1989; BAKER et al., 2000; GUTIÉRREZ-GINES; PASTOR; HERNÁNDEZ, 2012). Para ser hiperacumuladora, a planta deve ter habilidade para absorver e reter na parte aérea (caule e folhas) no mínimo as seguintes concentrações: 10 mg kg⁻¹ para Hg, 100 mg kg⁻¹ para Cd e As, 1000 mg kg⁻¹ para Co, Cr, Cu e Pb e 10.000 mg kg⁻¹ para Zn e Ni (BAKER et al., 2000). De acordo com McGrath e Zhao (2003), hiperacumuladora é a planta que tem um fator de acumulação (a razão entre a concentração de metal pesado da parte aérea e do solo) e um fator de translocação (razão entre a concentração do metal na parte aérea e na raiz), ambos superiores à unidade (1,0).

Um questionamento que é levantado como limitação para o uso das hiperacumuladoras é o destino que será dado à biomassa dessas plantas após estas terem sido utilizadas para fins de fitorremediação. Contudo, de acordo com

Schoder et al. (2008), as hiperacumuladoras serão utilizadas em um futuro próximo para solucionar problemas específicos na remoção da contaminação, sob uma regulamentação segura e a biomassa dessas plantas poderá ser utilizada como combustível para a geração de energia.

A primeira espécie nativa do Brasil hiperacumuladora citada na literatura pertence ao gênero *Alternanthera* sp., a qual sobreviveu em uma condição de multicontaminação com Cd, Zn, Cu e Pb e acumulou concentrações elevadas de Cd na parte aérea (CARNEIRO; SIQUEIRA; MOREIRA, 2002). Santos (2009) também identificou uma planta nativa do cerrado brasileiro que absorve o Cd e que se mostrou promissora para absorção de outros tipos de elementos-traço. Trata-se da *Galianthe grandifolia* - *Rubiaceae*, uma herbácea da família do café, encontrada de forma abundante em áreas de cerrado do Estado de São Paulo, mais precisamente na cidade de Itirapina. Sua importância reside, justamente, na descoberta de uma planta com potencial para fitorremediação naturalmente presente em solo brasileiro.

2.2 Contaminação por elementos-traço

As atividades mineradoras foram, e continuam sendo importantes para o desenvolvimento da humanidade. Porém, podem ocasionar a deposição de elementos contaminantes no solo, tais como Cd, Cu, Pb e Zn, os quais são importantes poluentes ambientais, sendo que alguns podem ser potencialmente tóxicos mesmo em pequenas concentrações (MEMON; SCHRODER, 2009). Nessa condição, há um risco de contaminação de todo o ecossistema, inclusive do homem. Nas últimas décadas, estima-se que as atividades antrópicas tenham provocado o lançamento de 22.000 t de Cd, 939.000 t de Cu, 783.000 t de Pb e 1,35 milhões t de Zn no ambiente, em escala mundial (SINGH et al., 2011).

Esses elementos contaminantes de solos que possuem densidade relativamente alta, ou seja, densidade específica acima de 5 g cm^{-3} e massa atômica

maior que 40 são denominados “metais pesados” (SEREGIN; IVANOV, 2001). Também são conhecidos como elementos-traço, por serem encontrados naturalmente em baixas concentrações na crosta terrestre (de 10 mg kg^{-1} a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$) (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Como dito anteriormente, “metal pesado” refere-se a qualquer elemento metálico com densidade relativamente alta e tóxico aos organismos, sendo muitos deles nocivos até em baixas concentrações. Por isso, frequentemente designa elementos classificados como poluentes do ar, água, solo, plantas e alimentos, uma vez que não são degradados ou modificados, como ocorre com os contaminantes orgânicos. Assim, se for mantida a fonte contaminante, poderá ocorrer a acumulação progressiva e persistente do metal pesado no solo.

São exemplos de possíveis fontes de contaminação tanto a aplicação de lodo de esgoto quanto certos fertilizantes industriais fosfatados, corretivos de acidez, pesticidas, resíduos industriais e urbanos, além da própria contaminação proveniente da lavra e do beneficiamento de metais (ALLOWAY, 1995; KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001; PAIM et al., 2006; VALADARES et al., 1983).

A adição de elementos-traço ao solo provenientes da mineração e industrialização de metais fazem dessas atividades potenciais fontes poluidoras do ambiente. Os resíduos gerados por tais atividades muitas vezes são ricos em elementos-traço, os quais, ao serem expostos aos processos de drenagem natural, lixiviação e erosão, podem promover a solubilização de metais e desencadear um processo progressivo de contaminação das áreas adjacentes (SILVA et al., 2004).

Alguns elementos-traço não possuem, em plantas, função nutricional conhecida, como é o caso de Cd, Hg e Pb, porém, outros são micronutrientes, como por exemplo Fe, Cu e Zn. Esta essencialidade é justificada por suas propriedades químicas e funções fisiológicas na planta, tornando-os elementos indispensáveis ao metabolismo das mesmas. No entanto, todos causam toxidez às plantas quando

disponíveis em concentrações elevadas na solução do solo (SUDO et al., 2008; WARNE et al., 2008).

2.3 Cobre

É um nutriente exigido em pequenas quantidades, sendo, portanto, um micronutriente. É absorvido como Cu^{2+} e, ou, Cu-quelato. Atua como componente essencial para plantas e animais porque participa dos processos fisiológicos de várias enzimas e coenzimas, além da fotossíntese, respiração e do metabolismo de nitrogênio e carboidratos (SCHEINBERG, 1991; YRUELA, 2009). Entretanto, a presença em altas concentrações no solo geralmente causa toxidez às plantas e afeta negativamente o crescimento e a produtividade das plantas (SONMEZ et al., 2006). Teores encontrados no solo e na matéria seca das plantas são muito baixos e variam de 2 a 20 mg kg^{-1} (FERREIRA; CRUZ, 1991). A sua absorção parece ocorrer por processo ativo e existem evidências de que este elemento inibe fortemente a absorção de zinco (DECHEN; FURLANI; FURLANI, 1999; DECHEN; NACHTIGALL, 2007).

A toxicidade de Cu parece estar relacionada em parte com a habilidade do mesmo em substituir outros metais, em particular o Fe, de importantes centros fisiológicos. A toxidez de Cu nas plantas causa primeiramente clorose nas folhas jovens, devido ao seu efeito tóxico nas raízes. Este efeito indireto ocorre principalmente pela peroxidação de lipídios, causando, assim, danos às membranas celulares (BUENO; PIQUERAS, 2002), redução dos espaços intercelulares e alterações nos cloroplastos (CHARTTERJEE; CHARTTERJEE, 2000), e por consequência diminuição na fotossíntese líquida (LANARAS et al., 1993) e, ainda, alteração nos processos de absorção e assimilação de nutrientes. Os sintomas visuais de toxidez são um dos últimos a ocorrer (DEVRIESE et al., 2001; LLORENS et al., 2000).

Um dos principais fatores relacionados ao aumento do teor de Cu em solos agrícolas e dos níveis fitotóxicos é a utilização intensiva de fungicidas cúpricos (MIRLEAN; ROISENBERG; CHIES, 2007; PIETRZAK; MCPHAIL, 2004). Este cenário cria a necessidade de que sejam disponibilizadas estratégias para a recuperação desses locais, ou a minimização dos impactos ambientais oriundos da contaminação.

Na crosta terrestre a concentração de cobre varia de 50 – 90 mg kg⁻¹ em rochas ígneas e, no solo, de 20 – 30 mg kg⁻¹, variando entre 2 a 100 mg kg⁻¹ em solos agrícolas. O cobre liga-se fortemente à matéria orgânica e aos minerais de argila, o que diminui sua mobilidade no solo. A matéria orgânica, no entanto, pode ser degradada pela microbiota do solo e assim o cobre liberado poderá ficar disponível (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001). O cobre ocorre no solos quase que exclusivamente na forma divalente e usualmente nas grades de cristais primários e secundários em adição (MENGEL; KIRKBY, 1987).

O Cu pode causar efeitos os mais diversos na saúde humana e as principais vias de exposição são por meio dos produtos alimentares, água potável e no ar. Devido a isso, o homem absorve quantidades consideráveis de cobre a cada dia. Embora os seres humanos possam lidar proporcionalmente com grandes concentrações de Cu, seu excesso pode causar problemas de saúde eminentes. O cobre afeta várias regiões do organismo como sistema gastrointestinal, hematológico e hepático (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE CONTROLB - ATSDR, 2013).

Segundo a Agência para Substâncias Tóxicas e Controle de Doenças (ATSDR), na lista prioritária de substâncias perigosas, a qual se baseia na combinação de sua frequência, toxicidade e potencial de exposição humana, o Cu ocupa o 125º lugar (ATSDR, 2013). No Estado de Minas Gerais, os valores estabelecidos para Cu no solo, em mg kg⁻¹, são classificados em cinco categorias que são o valor de referência de qualidade (VRQ) igual a 49; valor de prevenção

(VP), 60; valor de investigação (VI) agrícola igual a 200; residencial, 400 e industrial, 600 (MINAS GERAIS, 2010).

A Organização Mundial de Saúde estabelece que o limite inferior do intervalo aceitável de ingestão de cobre é de $12,5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, considerando as necessidades dos indivíduos adultos e as variações na absorção, retenção e armazenamento. Para crianças este valor é de $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ dia}^{-1}$ (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE - OMS, 2008). Estima-se que 20-70 g de cobre são suficientes para causar toxicidade severa no ser humano podendo levar a morte em casos de ingestão cerca de 1000x superior à da ingestão diária normal (BREMNER, 1998).

2.4 Chumbo

O Pb ocorre naturalmente em valores variáveis na maioria dos solos, tendo a concentração natural no solo variando de 10 a 20 mg kg^{-1} . As fontes naturais do metal são as emissões vulcânicas e o intemperismo geoquímico (ALLOWAY, 1990). A quantidade deste metal no solo, sem interferência antropogênica, depende do seu teor na rocha de origem e do grau de intemperização que esse material sofreu. Também é encontrado em corretivos e fertilizantes e em outros materiais empregados na correção do solo, podendo essa prática elevar a concentração do elemento na área em que houve emprego desses materiais (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

O Pb é um dos metais mais persistentes no solo, estimando-se que a sua retenção no solo pode variar de 150 a 5.000 anos (KUMAR et al., 1995). Mesmo não sendo um elemento essencial, ele é facilmente absorvido e acumulado em diferentes partes das plantas, sendo a absorção regulada pelo tamanho de partículas, pH, e capacidade de troca de cátions dos solos (CTC), assim como pela exsudação e outras características físico-químicas (LANE; MARTIN, 1977; ROMEIRO et al., 2007).

A concentração total de Pb tem, geralmente, pouca associação com a quantidade biodisponível. Portanto, faz-se necessária a determinação de Pb na fração disponível ou fitodisponível e, ainda, na solução do solo. A concentração do Pb na solução do solo é inversamente proporcional ao valor de pH (TILLS; ALLOWAY, 1983).

Ao ser absorvido pelas plantas, o Pb pode levar à diminuição do rendimento das culturas e alterar diretamente o crescimento e desenvolvimento das mesmas, ou indiretamente, por influenciar a atividade microbiana do solo (ANDRADE et al., 2004) além de alterar o crescimento das raízes e das plantas, e esse aspecto tem sido utilizado para avaliar a tolerância de diferentes espécies vegetais ao Pb (DI SALVATORE; CARAFA; GARRATÙ, 2008). As raízes são capazes de acumular quantidades significativas desse metal pesado e, simultaneamente, restringir sua translocação para a parte aérea (LANE; MARTIN, 1977).

Sua translocação das raízes para a parte aérea é limitada, sendo que somente 3% do Pb das raízes é translocado para a parte aérea. Somente 0,003 a 0,005% do Pb total do solo pode ser absorvido pelas plantas. As maiores bioacumulações de Pb ocorrem em plantas folhosas, como a alface, que pode acumular até 0,15% de Pb na massa seca (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2001).

Conforme a Agência para Substâncias Tóxicas e Controle de Doenças (ATSDR), em uma lista de 275 substâncias orgânicas e inorgânicas prioritárias nos EUA, baseando-se na combinação de sua frequência, toxicidade e potencial de exposição humana, o Pb ocupa o segundo lugar nesta classificação (ATSDR, 2013). Os valores estabelecidos para Pb no solo, em mg kg^{-1} , no Estado de Minas Gerais são classificados em cinco categorias: valor de referência de qualidade (VRQ) igual a 19,5; valor de prevenção (VP), 72; valor de investigação (VI) agrícola igual a 180; residencial, 300 e industrial, 900 (MINAS GERAIS, 2010).

A capacidade de remoção do Pb do solo é dependente da espécie vegetal. Em solo de região tropical, Zeitouni (2003) obteve um incremento de 290% na extração de Pb pelas culturas de tabaco, girassol, mamona e pimenta, após aplicar 1 mmol kg⁻¹ de EDTA no solo.

Existem vários trabalhos que analisam o crescimento de diferentes espécies na presença de Pb (COSTA et al., 2012; ROMEIRO et al., 2007). Horng et al. (2002), ao trabalharem com a planta *Brassica albograba* crescida na presença de Pb, verificaram que a maior parte desse metal estava nas raízes, e à medida que aumentou a concentração de Pb nas raízes, caiu o conteúdo relativo de água nas folhas. Em plantas de beterraba (*Beta vulgaris* [B. vulgaris varsaccharifera] hybrid Monohil) crescidas em condições hidropônicas na presença de Pb, verificou-se aumento na massa seca das raízes e nenhuma mudança na parte aérea, porém houve aumento na razão raiz: parte aérea (LARBI et al., 2002).

Em plantas de *Carex rostrata*, *Eriophorum angustifolium* e *Phragmites australis*, crescidas em condições hidropônicas, não ocorreram modificações no crescimento quando na presença de Pb e, como em outros casos já descritos, o Pb absorvido concentrou-se nas raízes (STOLTZ; GREGER, 2002). Boonyapookana et al. (2005), estudando o potencial hiperacumulador de Pb em plantas de girassol, tabaco e vetiver concluíram que as três plantas acumulam Pb nas folhas e nos caules, sendo a primeira a mais eficiente. Espécies de *Elsholtzia haichowensis* e *Commelina communis*, crescidas em solução hidropônica cujas concentrações variaram de 66 a 224 mg kg⁻¹ de Pb acumularam Pb em maior concentração nas raízes que na parte aérea das plantas (TANG et al., 2001).

Como dito anteriormente, alguns elementos-traço possuem grande potencial de contaminação de ambientes e também podem causar efeitos nocivos aos animais e ao homem. O chumbo se destaca neste contexto. Compostos de chumbo são absorvidos por via respiratória e cutânea. Os de chumbos tetraetila e

tetrametila, já proibidos na gasolina, também são absorvidos através da pele intacta, por serem lipossolúveis.

O Pb pode afetar sobremaneira o sistema nervoso, a medula óssea e os rins. A relação chumbo - síndrome associada ao sistema nervoso central depende do tempo de exposição e absorção e da especificidade das manifestações. Destaca-se a síndrome encéfalo-polineurítica (alterações sensoriais, perceptuais, e psicomotoras), síndrome astênica (fadiga, dor de cabeça, insônia, distúrbios durante o sono e dores musculares), síndrome hematológica (anemia hipocrômica moderada e aumento de pontuações basófilas nos eritrócitos), síndrome renal (nefropatia não específica, proteinúria, aminoacidúria, uricacidúria, diminuição da depuração da uréia e do ácido úrico), síndrome do trato gastrointestinal (cólicas, anorexia, desconforto gástrico, constipação ou diarreia), síndrome cardiovascular (miocardite crônica, alterações no eletrocardiograma, hipotonia ou hipertonia, palidez facial ou retinal, arteriosclerose precoce com alterações cerebrovasculares e hipertensão) e síndrome hepática (interferência de biotransformação) (SALGADO, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização do local de obtenção das plantas coleta do material vegetal

As plantas utilizadas neste estudo pertencem à espécie *Gomphrena claussenii* e foram coletadas em área localizada nas serras do Poço Verde e do Sucuri, entorno de uma região de mineração de zinco na cidade de Vazante, no noroeste de Minas Gerais (Figuras 1 e 2). O clima da região é considerado tropical semiúmido e a média de temperatura anual varia de 21° a 24°C, sendo, nos meses mais quentes, de 21° a 26°C e, nos meses mais frios, de 17° a 22°C. A umidade relativa, no verão, oscila entre 75% e 80% e, no inverno, entre 50% e 60%

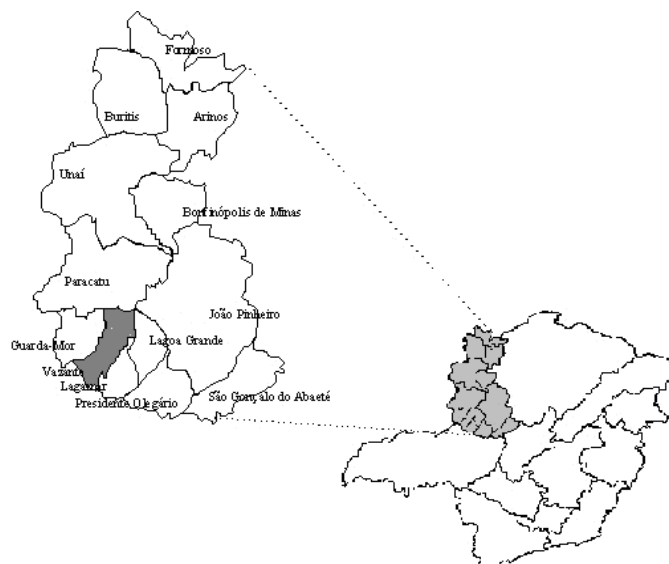


Figura 1 Mapa de Minas Gerais, com destaque para a região noroeste do estado, onde se encontra o município de Vazante



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

Essas plantas foram escolhidas, pois se encontravam estabelecidas e adaptadas às condições edafoclimáticas locais, principalmente no que diz respeito aos altos teores de elementos-traço comumente encontrados em áreas de mineração. As plantas e as amostras de solo foram coletadas em dezembro de 2007, em cinco locais diferentes, conforme se observa na Figura 3. Oito plantas foram coletadas e identificadas como 1A, 1B, 2A, 2B, 3A, 4A, 5A e 5B, conforme a posição do local de coleta. As plantas foram coletadas com o auxílio de enxadão, tomando-se o cuidado de manter o torrão de solo, visando à manutenção do sistema radicular (Figura 4). Imediatamente após a coleta, as plantas foram acondicionadas em sacos plásticos, transportadas e transplantadas para vasos mantidos em casa de vegetação.



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

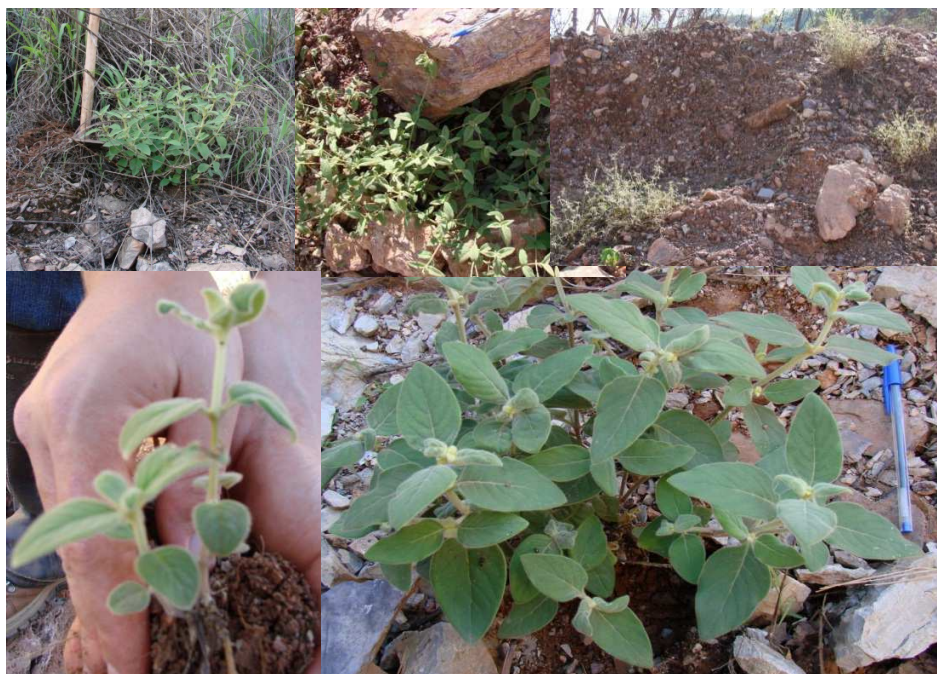


Figura 4 Detalhes das coletas de plantas em diferentes locais em área de mineração de zinco, em Vazante, MG

Carvalho (2010) avaliou os mesmos sete ecótipos de *Gomphrena clausenii* (anteriormente classificada por *Gomphrena elegans*), concluindo que o 5B foi o que produziu mais matéria seca e acumulou maior teor de Zn e Cd, razão pela qual optou-se, neste estudo, por trabalhar apenas com tal ecótipo.

3.2 Propagação

Visando à manutenção das características genéticas, a multiplicação do ecótipo 5B foi realizada, por meio da técnica de micropropagação, no Laboratório de Cultura de Tecidos, Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras. Após a coleta, as plantas matrizes foram mantidas em casa de vegetação, tendo sobrevivido sete das oito plantas coletadas. Para a propagação, foram utilizadas como explantes gemas vegetativas novas apicais e laterais. O processo de

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

3.3 Condução experimental

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

Os experimentos foram instalados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). No experimento de Cu, utilizaram-se quatro repetições e oito concentrações do elemento (0,5; 2,5; 5,0; 10; 25; 50; 75 e $100 \mu\text{mol L}^{-1}$) ao passo que para o de Pb foram utilizadas três repetições e sete concentrações (0; 50; 100;

200; 400; 600 e 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$), perfazendo um total de 32 unidades experimentais para o experimento com Cu e 21 para Pb. As fontes usadas para adicionar os metais foram sulfato de cobre ($\text{Cu}_2\text{SO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) e nitrato de chumbo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Utilizaram-se vasos com 2,0 L de capacidade, contendo uma única planta.

As plantas foram mantidas, por um período de 35 dias, em exposição às doses de Cu e de Pb, período no qual foi observada a ocorrência de eventuais sintomas de toxidez, bem como os efeitos no crescimento das plantas. Ao final do experimento, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea (folha e caule) e raiz. A parte aérea e as raízes foram lavadas em água deionizada. A seguir, ambas as partes foram secas em estufa com circulação de ar forçada em temperatura entre 65° e 75°C, até atingir massa constante. O peso da matéria seca foi determinado em balança de precisão (0,01 g) e, em seguida, a matéria seca foi moída em moinho tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm, para posterior digestão visando a análise dos metais.

3.4 Análise do cobre e chumbo na planta

O material moído foi digerido segundo o método 3051 da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos - *United States Environmental Protection Agency* – (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA, 1995), utilizando-se 0,5 g de material em 5 mL de HNO_3 concentrado, em forno de micro-ondas, com tubos de Teflon® PTFE, à pressão 0,76 MPa, por dez minutos. A temperatura alcançada à pressão de 0,76 MPa foi de, aproximadamente, 175°C. Após a digestão, o extrato foi filtrado e seu volume completado até 10 mL com água destilada. A partir dos extratos, foram determinados os teores de Cu e Pb por espectrofotometria de absorção atômica, usando equipamento Perkin Elmer AAnalyst 800® com atomizador tipo forno de grafite.

O controle e a garantia da qualidade dos resultados da análise de Cu e Pb foram assegurados pelo uso de material de referência BCR Lichen proveniente do

Institute for Reference Material and Measurements - European Commission (IRMM) em cada bateria de análise, bem como de uma amostra em branco. Os resultados obtidos foram satisfatórios, com recuperações variando entre 90% a 91% para Cu e entre 80% a 119% para Pb.

O acúmulo de Cu e de Pb foi calculado por meio da multiplicação da matéria seca produzida pela respectiva concentração do elemento na parte aérea ou na raiz.

3.5 Cálculo do índice de translocação (IT)

As habilidades de translocação de Cu e Pb pelas plantas foram mensuradas por meio do índice de translocação (IT), que é definido como a quantidade do elemento na parte aérea em relação à quantidade total do elemento na planta, em porcentagem (BAKER; BROOKS, 1989; WANG et al., 2007).

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

3.6 Análises estatísticas

Os resultados da produção de matéria seca e das concentrações de Cu e Pb na parte aérea e nas raízes foram submetidos à análise de variância, por meio do uso do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2010).

3.7 Microscopia eletrônica de transmissão

Na ocasião da coleta das plantas para determinação da matéria seca bem como das concentrações dos metais, coletaram-se também amostras frescas de folhas e raízes das plantas submetidas aos tratamentos para estudos através da técnica de microscopia eletrônica de transmissão. A amostra coletada foi fixada em Karnovsky e mantida em câmara fria (4°C), por um período mínimo de 24 horas.

O preparo das amostras foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), Departamento de Fitopatologia (DFP),

da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, segundo o protocolo do LME, para posterior análise no Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET).

As amostras pré-fixadas foram cortadas em pedaços de 1 mm², os quais foram lavados em tampão fosfato por três vezes durante 10 minutos, pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 2 horas, lavados por três vezes em água destilada e transferidos para solução a 0,5% de acetato de uranila durante 12h a 4°C. Após este período foram novamente lavadas em água destilada por três vezes e desidratadas em gradiente de acetona 25, 30, 40, 50, 70, 80, 85, 90 e 95% por 30 minutos cada e 100% por três vezes de 30 minutos cada. Em seguida, o material foi incluído em gradiente crescente da resina Spurr: Acetona nas seguintes concentrações, 1:3 por 12 horas, 1:2 por 24 horas, 1:1 por 24 horas, 2:1 por 24 horas e duas vezes com resina pura (100%) por 24 horas cada, sendo os espécimes, posteriormente montados em moldes de silicone e colocados para polimerizar em estufa a 70°C por 8 horas. Após o período de polimerização os blocos de resina contendo a amostra passaram por um processo de desbaste para retirar o excesso de resina e, em seguida, foram cortados em aparelho ultramicrotomo modelo Leica MT-Ultracut.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sintomas de fitotoxidez das plantas

Os resultados deste experimento mostraram que as plantas de *Gomphrena claussenii* submetidas às doses de Cu e Pb apresentaram sintomas de toxidez na parte aérea e nas raízes mesmo com baixas concentrações adicionadas dos elementos. Os sintomas visuais de toxidez em *Gomphrena claussenii* foram observados em todos os tratamentos com exposição aos metais após a terceira semana de cultivo. O crescimento das plantas nesse período já havia sido significativamente afetado e houve nas folhas presença de clorose internerval e

avermelhamento, sendo esses sintomas intensificados até o final do experimento (Figura 5B, C e E).

O sintoma de clorose interneval observado pode ter ocorrido devido à competição existente entre o Fe, Cu e o Pb na absorção, visto que esses elementos competem pelos mesmos sítios de absorção. A clorose em folhas sob toxidez de Pb possivelmente foi resultado de interferências causadas pelos íons Pb^{2+} na síntese de clorofila e no transporte de Fe para o simplasto foliar (MALAVOLTA, 2006). Além disso, a clorose e necrose em tecidos vegetais estão relacionadas com a deficiência múltipla de vários elementos que participam da formação, multiplicação e funcionamento de cloroplastos, ou na síntese de clorofila (BRECKLE; KAHLE, 1992; MALAVOLTA, 2006; MARQUES; MOREIRA; SIQUEIRA, 2000; SOARES et al., 2000).

Os sintomas observados nas raízes foram: coloração enegrecidas para o Cu (Figura 5D) e amarronzada para o Pb (Figura 5F). Também foi observada maior fragilidade e redução do volume de raiz para ambos elementos. Sintomas semelhantes foram relatados para Eucalipto sob estresse de Zn, Cu, Cd e Pb, atribuindo-se essa resposta típica a danos nas extremidades das raízes (SOARES, 1999). A ação dos elementos-traço nas raízes logo na fase inicial de desenvolvimento pode reduzir a capacidade da planta em se fixar no substrato e absorver nutrientes adequadamente (KABATA-PENDIAS, 2011; MALAVOLTA, 2006).



Figura 5 Aspecto visual de plantas de *Gomphrena claussenii* expostas a Cu e Pb. (A) uma semana de exposição aos metais; (B) cinco semanas de exposição aos metais; (C) parte aérea, tratamento com $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu; (D) raízes dos tratamentos controle e com $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu; (E) parte aérea, tratamento com $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb e, (F) raízes dos tratamentos controle e com $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb.

4.2 Produção de matéria seca das plantas expostas ao cobre (Cu)

A produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR) das plantas de *Gomphrena claussenii* foi influenciada pelas doses de cobre (Figura 6). Notam-se, para ambas as partes vegetais (parte aérea e raiz), decréscimos acentuados na produção de matéria seca em função das doses de Cu em solução. Nesse contexto, observa-se que tanto a MSPA quanto a MSR foram drasticamente reduzidas já na dose de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo registradas, em comparação ao controle, reduções de 65 e 61% na MSPA e na MSR, respectivamente.

Soares et al. (2000), estudando doses de Cu em *Eucalyptus urophylla*, observaram que, a partir da dose $32 \mu\text{mol L}^{-1}$ houve redução drástica na produção de MSPA, enquanto para a produção de MSR houve essa redução a partir da dose $64 \mu\text{mol L}^{-1}$. Zancheta et al. (2011) observaram quedas significativas na produção de MSPA e MSR de milho a partir da dose de $19,7 \mu\text{mol L}^{-1}$. Entretanto, em outro estudo, em concentrações de 25 e $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu, as plantas de *Lupinus luteus* apresentaram aumento da massa seca de raízes e aérea (MOURATO; MARTINS; CAMPOS-ANDRADA, 2009). Dessa forma, e tendo em vista a drástica redução da matéria seca das plantas de *Gomphrena claussenii* na dose de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu, pode-se inferir que possivelmente essa espécie de planta possui baixa tolerância ao elemento em questão.

A redução do crescimento radicular na presença de Cu tem sido associada à ocorrência de raízes com coloração escurecida, o que tem sido descrito como sintoma típico de toxicidade de Cu. Em adição, o efeito prejudicial de altas concentrações de Cu no ambiente radicular sobre o crescimento das plantas também tem sido relacionado ao comportamento na absorção e metabolismo de nutrientes (ZANCHETA et al., 2011).

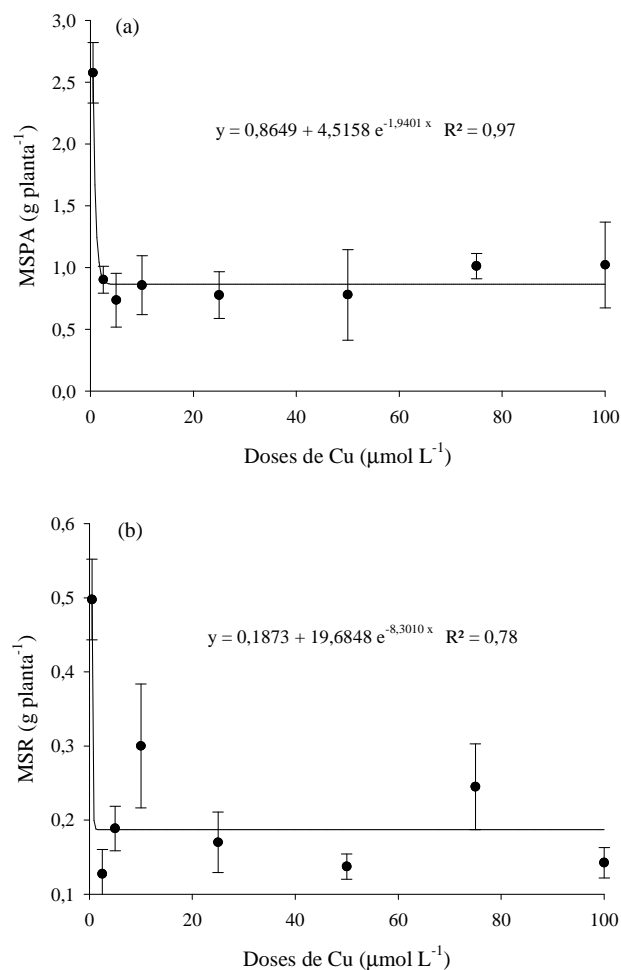


Figura 6 Matéria seca da parte aérea (a) e da raiz (b) de *Gomphrena claussenii* em resposta ao aumento de concentrações de cobre em solução nutritiva.

4.3 Teor e acúmulo de Cu

O teor de Cu (Figura 7) na MSPA das plantas de *Gomphrena claussenii* apresentou resposta linear positiva à medida que se elevou a concentração do mesmo em solução nutritiva. O teor de Cu aumentou $0,77 \text{ mg kg}^{-1}$ para cada

unidade (em μM) de acréscimo de Cu na solução nutritiva. Os teores de Cu nas raízes de *Gomphrena claussenii* não apresentaram uma tendência nítida de variação no teor em função das concentrações de Cu em solução nutritiva (Figura 7). Assim, o maior valor médio foi de $146,445 \text{ mg kg}^{-1}$, sendo encontrado na concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. De qualquer maneira, o acúmulo de Cu no sistema radicular pode ser considerado uma estratégia da planta para aumentar a tolerância ao metal.

Zancheta et al. (2011), estudando a aplicação de Cu em sorgo, milho, crotalária e feijão de porco, constataram incrementos dos teores de Cu na parte aérea e nas raízes com o aumento do mesmo em solução de cultivo para todas as espécies de plantas avaliadas, o que corrobora com os resultados verificados para a parte aérea no presente estudo. Já, Soares et al. (2000), estudando doses de Cu em *Eucalyptus urophylla* e *E. maculata*, verificaram que os teores encontrados na parte aérea e no sistema radicular apresentaram respostas diferenciadas.

A parte aérea das plantas avaliadas apresentou acréscimo no acúmulo de Cu à medida em que se aumentou a concentração desse elemento em solução nutritiva (Figura 7), o que está de acordo com resultados obtidos por Zancheta et al. (2011). Como apresentado na Figura 7, o maior valor de acúmulo de Cu nas raízes foi encontrado no tratamento controle ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu), em detrimento do fornecimento adequado de nutriente às plantas, o que possibilita crescimento normal das mesmas, além do alto teor de matéria seca das plantas desse tratamento (Figura 7). O segundo maior valor exibido foi para a concentração de $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ Cu ($18,26 \text{ mg planta}^{-1}$), onde as plantas apresentaram maiores teores médios de Cu e menores valores de MSR (Figura de MS de raiz) (Figura 7).

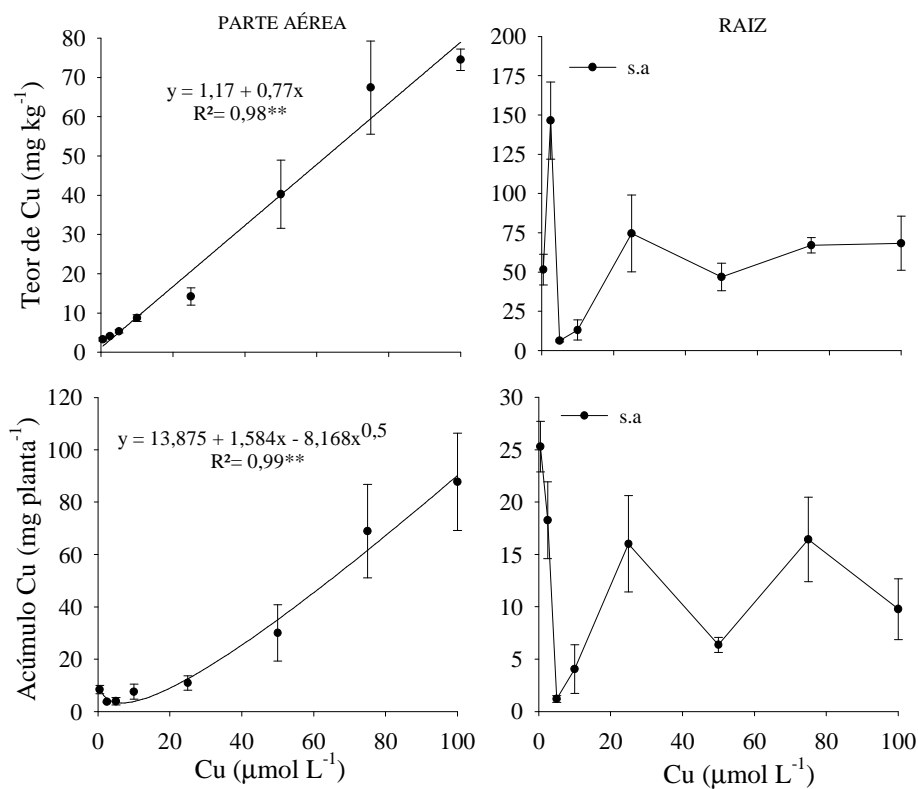


Figura 7 Teor e Acúmulo de Cu na parte aérea e raiz de plantas de *Gomphrena claussenii* em resposta a diferentes concentrações de cobre em solução nutritiva. s.a.= sem ajuste.

4.4 Produção de matéria seca das plantas expostas ao chumbo (Pb)

Houve diminuição do crescimento e, conseqüentemente, da produção de MSPA e de MSR das plantas de *Gomphrena claussenii* com o aumento das concentrações de Pb aplicadas na solução nutritiva (Figura 8). Essas reduções foram mais significativas até a dose de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb, não sendo verificado, a partir dessa concentração, grande alteração quanto à produção de MSPA e MSR.

Resultados semelhantes aos observados no presente estudo foram relatados por Marques, Moreira e Siqueira (2000). Esses autores trabalharam com espécies arbóreas em solo contaminado por vários elementos-traço e constataram reduções nas alturas das espécies devido à contaminação do solo. De acordo com o trabalho de Kosobrukhov, Knyazeva e Mudrik (2004), o Pb aplicado provoca considerável decréscimo na massa seca de plantas. Em *Vetiver zizanioides* e *V. nemoralis*, a biomassa das plantas diminuiu com o aumento da concentração de Pb aplicada (CHANTACHON et al., 2004). Paiva, Carvalho e Siqueira (2002), em experimento com aplicações de 0, 49, 96, 192 e 288 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de acetato de chumbo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$), verificaram que a menor dose aplicada (49 $\mu\text{mol L}^{-1}$) reduziu 32% a matéria seca da parte aérea das mudas de cedro e 24% das mudas de ipê-roxo. Já, a maior dose aplicada (288 $\mu\text{mol L}^{-1}$) reduziu 77% a matéria seca das mudas de cedro e 79% das mudas de ipê-roxo. A redução no crescimento e na produção de massa de matéria seca da planta sob elevada concentração de metal pesado tem sido associado a fitotoxidez e ao comprometimento na absorção e metabolismo de nutrientes (ZANCHETA et al., 2011).

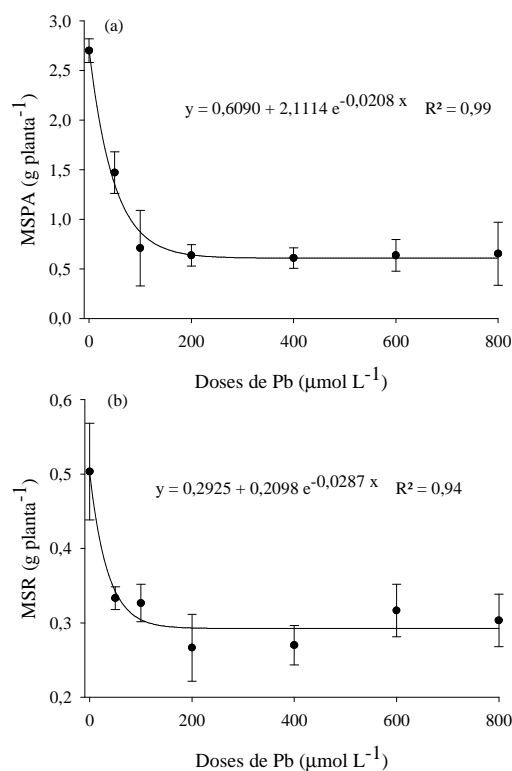


Figura 8 Matéria seca da parte aérea (a) e da raiz (b) de *Gomphrena claussenii* em resposta ao aumento de concentrações de chumbo em solução nutritiva.

4.5 Teor e acúmulo de Pb

Os teores e acúmulos de Pb na parte aérea e raiz apresentaram comportamentos quadráticos em função do aumento na concentração de Pb na solução (Figuras 9). Nota-se que as concentrações de Pb nas raízes foram significativamente maiores do que na parte aérea, o que demonstra o acúmulo desse contaminante na raiz, o que pode ser considerado uma estratégia da planta para aumentar a tolerância ao metal.

Verkleij e Prast (1989) afirmam que as espécies tolerantes ao Pb acumulam maiores concentrações nas raízes, mostrando que essas plantas não evitam a absorção do metal, mas limitam sua translocação para a parte aérea. Em experimento com *Brassica albograta* cultivada em presença de Pb, a maior parte desse metal também foi detectada nas raízes (HORNG et al., 2002).

Embora espécies com elevada eficiência de translocação e acúmulo de elementos-traço na parte aérea, e assim de fitoextração em áreas contaminadas, sejam consideradas ideais para o uso em programas de fitorremediação, espécies como a *Gomphrena claussenii*, com grande habilidade de acumular elementos-traço, como Pb, nas raízes, podem ser utilizadas para a fitoestabilização de áreas contaminadas. A fitoestabilização, assim como a fitoextração, constitui mecanismo de fitorremediação e visa reduzir o potencial de dano ao ambiente pela redução na mobilidade e disponibilidade do contaminante no solo sendo as plantas, neste caso, escolhidas por tolerar as condições da aérea, controlar a erosão e lixiviação e evita a translocação de a parte aérea, evitando possíveis contaminação ao homem e ao meio ambiente (ZHAO; MCGRANTH, 2009).

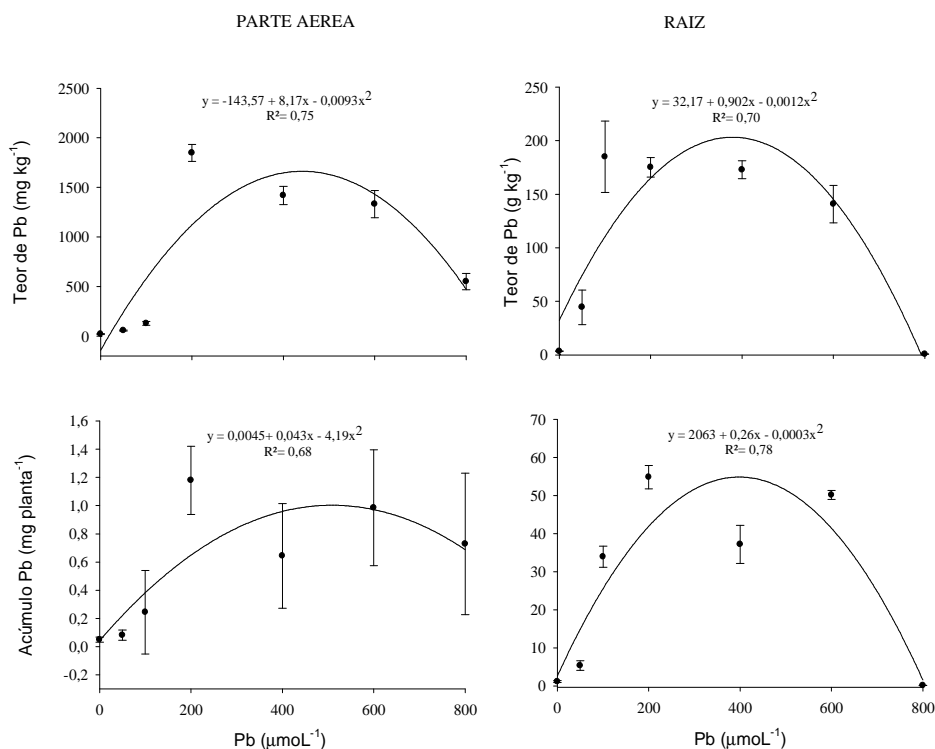


Figura 9 Teor e Acúmulo de Pb na parte aérea e raiz de plantas de *Gomphrena claussenii* em resposta a diferentes concentrações de chumbo em solução nutritiva.

4.6 Índice de Translocação de Cu e Pb

O índice de translocação de Cu nas plantas de *Gomphrena claussenii* variou com o aumento das doses, tendo maior translocação na dose 10 μmol L⁻¹, sendo que esta dose foi responsável por uma translocação de 70% do Cu da raiz para a parte aérea (Figura 10). Estes resultados evidenciam o potencial da espécie para uso em programas de fitorremediação, os quais demandam em geral plantas que sejam capazes de retirar contaminantes do solo e com alta eficiência de

translocação, possibilitando a limpeza da área pela remoção dos contaminantes na parte aérea (ROMEIRO et al., 2007).

Para Kabata-Pendias (2011), existem vários processos envolvidos nos transporte de elementos-traço nos tecidos vegetais, os quais são afetados por fatores como o pH, estado de oxidação, competição, hidrólise, precipitação, complexação com ácidos orgânicos dentre outros. Esta mesma autora ainda agrupa os elementos em facilmente, moderadamente translocados e os que se ligam fortemente as raízes, dentre eles Co, Cu, Cr, Pb, Hg e Fe. Em adição, quando os teores de Cu nos tecidos vegetais atingem níveis entre 15-20 mg kg⁻¹, há um decréscimo considerável no desenvolvimento da planta. A capacidade de translocação esta relacionada com os tecidos vasculares e a capacidade de respiração.

O Pb teve uma baixa translocação em quase todas as doses, exceto na maior concentração, 800 µmol L⁻¹, na qual foi translocado em mais de 80% (Figura 11), fato que pode ser atribuído aos danos celulares devido a alta concentração do elemento na solução, como pode ser observada pelos resultados dos estudos com microscopia (MET), através da deformação da membrana plasmática (resultados a serem apresentados a seguir). Assim, o aumento da translocação sob 800 µmol L⁻¹ pode ser atribuído ao efeito fitotóxico do Pb na perda da seletividade da membrana, causando influxo passivo deste metal para parte aérea (KABATA-PENDIAS, 2011).

A absorção do Pb preferencialmente se dá via simplasto e, em geral, sua translocação é reduzida dada a capacidade das raízes em acumulá-lo (SHARMA; DUBEY, 2005). Em baixas concentrações, sua absorção ocorre predominantemente via apoplasto, e este é acumulado perto da endoderme, a qual atua como uma das barreiras a translocação do Pb, justificando o acúmulo de Pb nas raízes (VERMA; DUBEY, 2003). Este fato corrobora com os estudos de Kabata-Pendias e Pendias (2001), que mostram que deposição radicular é um dos

mecanismos de exclusão do Pb, podendo limitar a 3% o translocamento do Pb das raízes para a parte aérea.

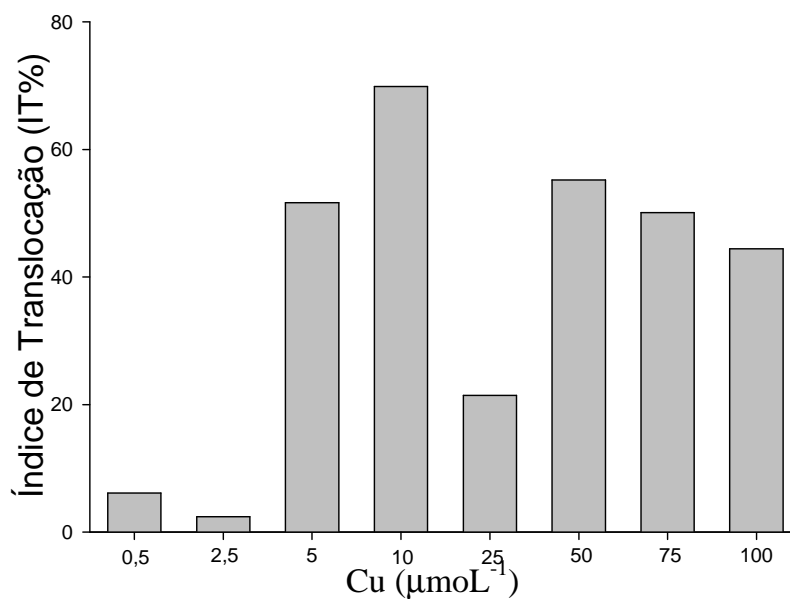


Figura 10 Índice médio de translocação (%) de Cu em *Gomphrena claussenii* expostas a concentrações crescentes de Cu em solução nutritiva.

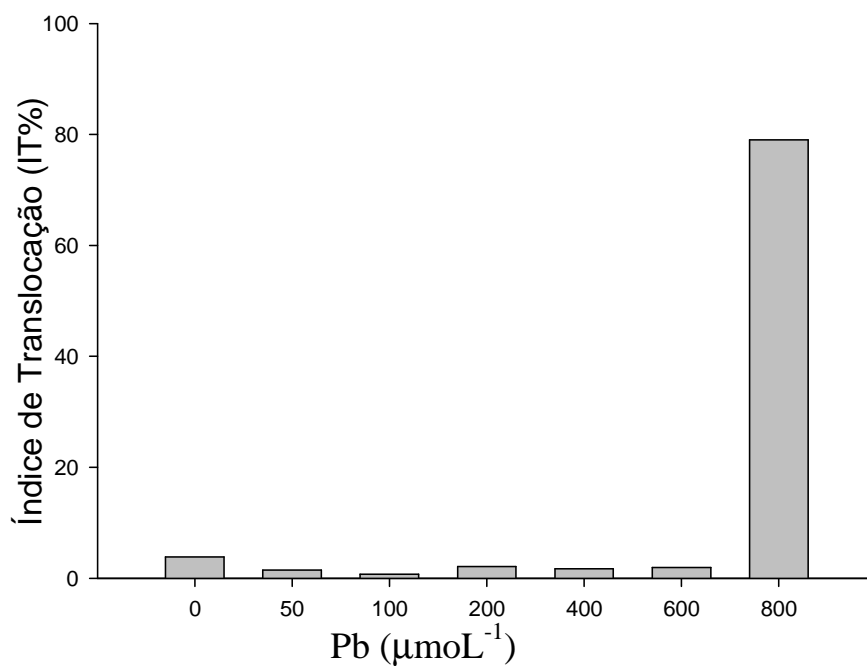


Figura 11 Índice médio de translocação (%) de Pb em *Gomphrena claussenii* expostas a concentrações crescentes de Pb em solução nutritiva.

4.7 Análise ultraestrutural de *Gomphrena claussenii* exposta a Cu e Pb através da microscopia eletrônica de transmissão

As Figuras (12A e B; 13A e B) tratam-se de eletromicrografia de mesofilo e de raiz de plantas de *Gomphrena claussenii* que receberam $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cu e $0,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb (tratamento controle). Nota-se que as estruturas celulares estão

íntegras, tais como parede celular, membrana plasmática, cloroplasto, mitocôndria, retículo endoplasmático e núcleo.

Sintomas de toxicidade ocorreram nas células da raiz após exposição das mesmas à diferentes concentrações de Cu. As modificações celulares observadas na presença de Cu (Figura 12) foram: aumento do número de grãos de amido e diferenciação do formato dos mesmos, maior tamanho de vacúolo e de vesículas e núcleo, e ainda, foram observados acúmulo de material eletro-denso (possíveis elementos tóxicos), tanto no vacúolo quanto nos espaços intercelulares.

Com o incremento das doses de Cu, houve um aumento no número de grânulos eletro-densos (Figuras 12D e F), principalmente no vacúolo, o qual tem como uma de suas principais funções na célula a remoção de metabólitos secundários tóxicos e a digestão celular. Também foi observado um maior número de grânulos de amido com tamanho e formas variadas nas folhas (Figuras 12C, E e G). Esses grânulos possuem função de reserva, e o seu incremento pode ter sido causado pelo aumento das doses de Cu como uma resposta da planta em relação ao estresse que está sofrendo. Azzarello et al. (2012) e Najeeb et al. (2009) relataram que o acúmulo de amido foi baixo em células que continham material eletro-denso, assim como relatado em outras espécies expostas a elevados teores de elementos-traço. Este fato não foi o encontrado nas plantas de *Gomphrena claussenii*, pois estas, como resposta ao aumento das concentrações de Cu, apresentaram aumento no número dos grânulos de amido, não tendo sido visualizado, porém, material eletro-denso nas folhas. Liu e Kotteke (2004), trabalhando com *Allium sayivum* em solução nutritiva com doses de Cu 1, 10 e 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, observaram em **Electron energy loss spectroscopy** (ELLS) que o excesso de Cu induz mudanças estruturais da célula, tal como vasta vacuolização. Esses autores observaram que o acúmulo de material eletro-denso ocorreu predominantemente nos vacúolos da células da ponta das raízes. Foram localizadas pequenas quantidades de Cu também em vesícula

citoplasmática ou na parede celular do córtex, o que corrobora os resultados vistos neste trabalho.

Modificações celulares ocorridas na presença de Pb foram observadas ultraestruturalmente, tais como o aumento do número de grãos de amido nas folhas (Figura 13C, E e G), diferenciação do formato e uma redução do mesmo, maior tamanho de vacúolo, vesículas e núcleo, e, ainda, acúmulo de material eletro-denso (possíveis deposição de Pb) no vacúolo e no tratamento contendo $800 \mu\text{mol L}^{-1}$ na raiz.

Malecka, Piechalak e Morkunas (2008), em seu trabalho com doses de Pb em solução hidropônica com plantas de *Pisum sativum*, observaram que a acumulação de material eletro-denso nas raízes ocorreu principalmente na intersecção celular, parede celular, vacúolo, mitocôndrias e peroxissomos. Em estudos com as espécies *Corchorus olitorius* e *Malva parviflora*, expostas a diferentes concentrações de Cd, Cu, Pb e Zn em solução nutritiva, foram observadas modificações celulares em células especializadas no acúmulo de elementos-traço, tais como núcleo alargado, plastídios com poucos grãos de amido, citoplasma rico em organelas, membranas e vesículas (FAHEED; MAZEN; ELMOHSEN, 2012). Através de MET associada ao EDS, outro estudo relatou um acúmulo de Pb nos vacúolos das raízes da espécie *Sorghum bicolor* L. Moench, com aspecto semelhante aos materiais eletro-densos encontrados nos vacúolos de *Gomphrena claussenii* (LAPERCHE et al., 1997).

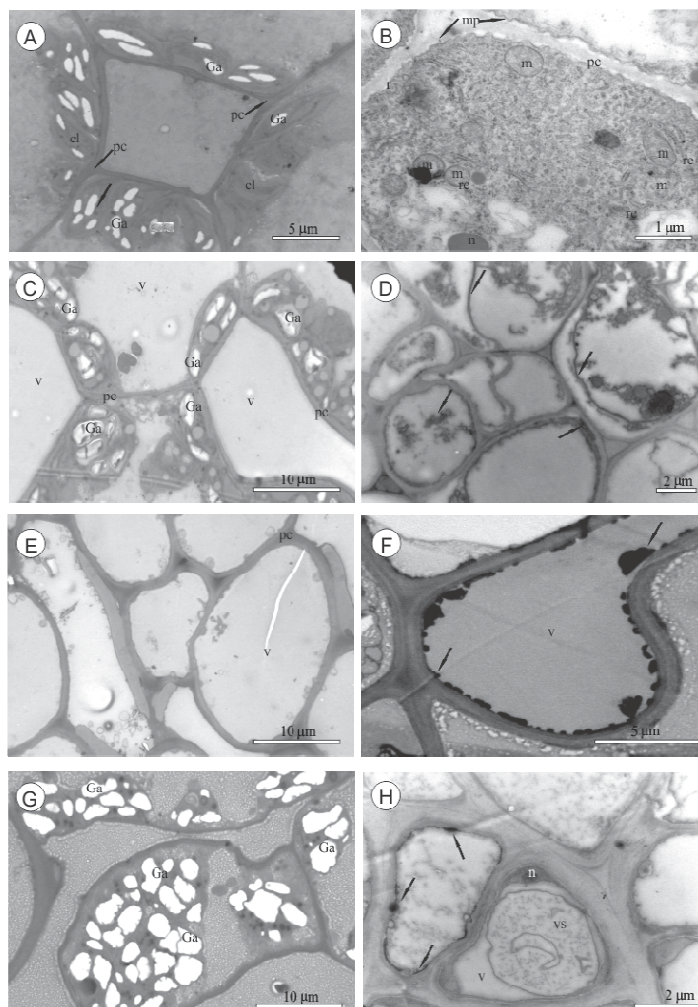


Figura 12 Eletromicrografia de transmissão em células do mesofilo foliar e em células de raiz de *Gomphrena claussenii* exibindo alterações celulares em resposta às diferentes concentrações de Cu em solução nutritiva. (A) controle, (C) $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (E) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (G) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, mesofilo foliar (B) controle, (D) $2,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (F) $5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (H) $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, raiz. cl= cloroplasto, Ga= grão de amido, mp= membrana plasmática, n= núcleo, pc= parede celular, re= reticulo endoplasmático, v= vacúolo, vs= vesícula, setas= material eletro-denso.

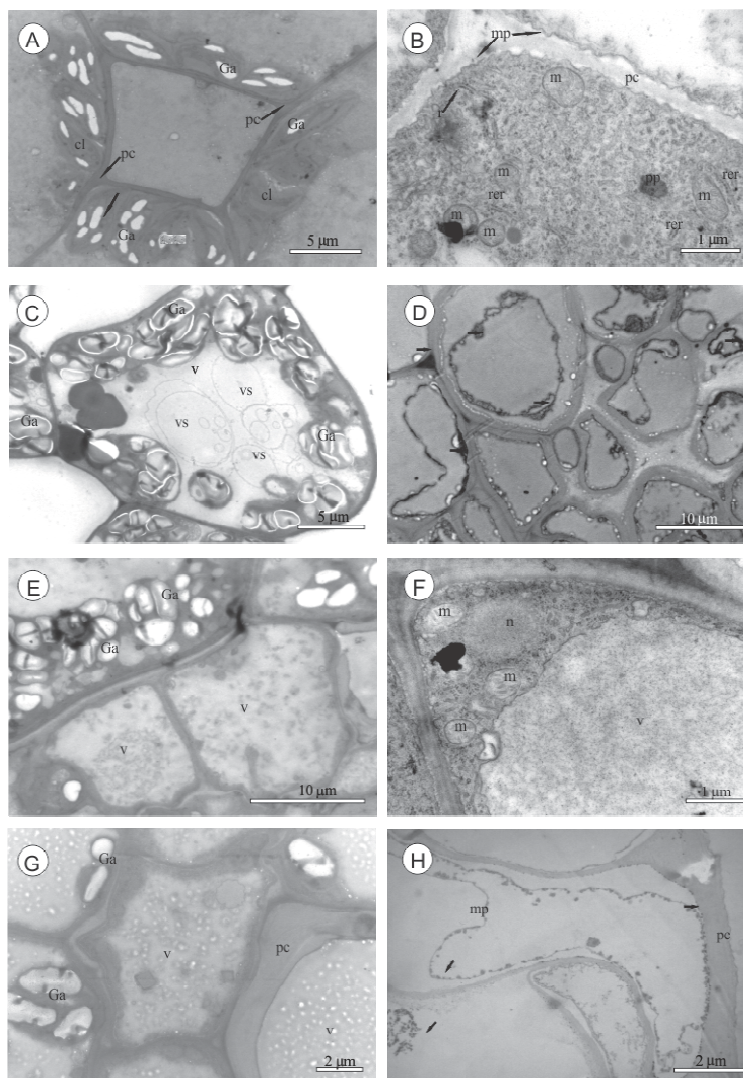


Figura 13 Eletromicrografia de transmissão em células do mesofilo foliar e em células de raiz de *Gomphrena claussenii* mostrando alterações celulares em resposta às diferentes concentrações de Pb em solução nutritiva. (A) controle, (C) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, (E) $400 \mu\text{mol L}^{-1}$, (G) $800 \mu\text{mol L}^{-1}$, mesofilo (B) controle, (D) $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, (F) $400 \mu\text{mol L}^{-1}$, (H) $800 \mu\text{mol L}^{-1}$, raiz. Ga= grão de amido, n= núcleo, pc= parede celular, v= vacúolo, vs= vesícula, setas= material eletro-denso.

5 CONCLUSÕES

As plantas de *Gomphrena claussenii* mostraram-se sensíveis às doses crescentes de Cu e Pb em solução nutritiva, mostrando sintomas de fitotoxidez e redução na produção de matéria seca.

Mesmo em altas concentrações de doses de Cu, as plantas sobreviveram, translocando o metal para a parte aérea, o que faz que essa espécie tenha um potencial para o uso em programas de fitorremediação, pois tem características de planta fitoextratora.

Apesar da baixa translocação de Pb para a parte aérea e maior acúmulo do metal no sistema radicular da planta, a espécie pode ser considerada tolerante, podendo assim ser usada para a fitoestabilização do Pb.

REFERÊNCIAS

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

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE CONTROLB. **Priority list of hazardous substances**. Disponível em:

<<http://www.atsdr.cdc.gov/clist.html>>. Acesso em: 10 maio 2013.

ALLOWAY, B. J. Cadmium. In: _____. **Heavy metals in soils**. New York: J. Willey, 1990. p. 100-121.

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

ANDRADE, S. A. L. et al. Influence of lead additions on arbuscular mycorrhiza and *Rhizobium* symbioses under soybean plants. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 123-131, June 2004.

ARTHUR, E. L. et al. Degradation of an atrazine and metolachlor herbicide mixture in pesticide-contaminated soils from two agrochemical dealerships in Iowa. **Water, Air, and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 119, n. 1/4, p. 75-90, Apr. 2000.

ASSIS, R. L. et al. Fitorremediação de solo contaminado com o herbicida picloram por plantas de capim pé de galinha gigante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 11, p. 1131-1135, 2010.

AZZARELLO, E. et al. Ultramorphological and physiological modifications induced by high zinc levels in *Paulownia tomentosa*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 81, p. 11-17, Sept. 2012.

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

BAKER, A. M. J. et al. Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biochemical resource for phytoremediation of metal polluted soils. In: TERRY, N.; BAÑUELOS, G. (Ed.). **Phytoremediation of contaminated soil and water**. Boca Raton: Lewis, 2000. p. 85-107.

BAVER, A. J. M. Accumulators and excluders: strategies in the response of plants to heavy metals. **Journal of plant nutrition**, Yorkshire, v. 3, n. 1/4, p. 643-654, 1981.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Campos dos Goytacases, v. 17, n. 1, p. 21-34, 2005.

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

BOONYAPOOKANA, B. et al. Phytoaccumulation of lead by sunflower (*Helianthus annuus*), tobacco (*Nicotiana tabacum*), and vetiver (*Vetiveria zizanioides*): part A, toxic/hazardous substances & environmental engineering. **Journal of Environmental Science and Health**, Phatumthani, v. 40, n. 1, p. 117-137, 2005.

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

BRECKLE, S. W.; KAHLE, H. Effects of toxic heavy metals (Cd, Pb) on growth and mineral nutrition of beech (*Fagus Sylvatica* L.). **Vegetatio**, The Hague, v. 101, n. 1, p. 43-53, July 1992.

BREMNER, I. Manifestations of copper excess. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 67, p. 1069S-1073S, 1998. Supplement.

BUENO, P.; PIQUERAS, A. Effect of transition metals on stress, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in tobacco cell cultures. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 36, n. 2, p. 161-167, Feb. 2002.

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

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

CARVALHO, M. T. V. et al. *Comphrena clausenii*, the first South American metallophyte species with indicator-like Zn and Cd accumulation and extreme metal tolerance. **Frontiers in Plant Science**, Minglin Lang, v. 4, 2013. Disponível em: <<http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fpls.2013.00180/abstract>>. Acesso em: 10 set. 2013.

CHANTACHON, S. et al. Phytoextraction and accumulation of lead from contaminated soil by vetiver grass: laboratory and simulated field study. **Water Air and Soil Pollution**, Dordrecht, v. 154, n. 1/4, p. 37-55, May 2004.

CHARTTERJEE, J.; CHARTTERJEE, C. Phytotoxicity of cobalt, chromium and copper in cauliflower. **Environmental Pollution**, Barking, v. 109, n. 1, p. 69-74, July 2000.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase in intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 23, n. 3/4, p. 458-460, 1975.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, n. 11, p. 1707-1719, Nov. 2006.

COSTA, E. T. de S. et al. Assessing the tolerance of Castor Bean to Cd and Pb for phytoremediation purposes. **Biological Trace Element Research**, Clifton, v. 145, n. 1, p. 93-100, 2012.

DECHEN, A. R.; FURLANI, A. M. C.; FURLANI, P. R. Tolerância de plantas aos estresses nutricionais. In: SIQUEIRA, J. O. et al. (Ed.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1999. p. 183-204.

DECHEN, A. R.; NACHTIGALL, G. R. Elementos requeridos à nutrição de plantas. In: NOVAIS, R. F. et al. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: SBCS/UFV, 2007. p. 92-132.

DEVRIESE, M. et al. Effect of heavy metals on nitrate assimilation in the eukaryotic microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 39, n. 5, p. 443-448, May 2001.

DI SALVATORE, M.; CARAFA, A. M.; GARRATÙ, G. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: a comparison of two growth substrates. **Chemosphere**, Oxford, v. 73, n. 9, p. 1461-1464, Nov. 2008.

FAHEED, F.; MAZEN, A.; ELMOHSEN, S. A. B. D. Physiological and ultrastructural studies on calcium oxalate crystal formation in some plants. **Turkish Journal of Botany**, Sohag, v. 37, n. 1, p. 139-152, 2013.

FERREIRA, D. F. **SISVAR - Sistema de Análise de Variância**. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010. Software.

FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: POTAFOS/CNPq, 1991. 734 p.

GRATÃO, P. L. et al. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 53-64, 2005.

GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos-traço em solos e sistemas aquáticos. **Tópicos em Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 3, p. 345-390, 2005.

GUTIÉRREZ-GINES, M. J.; PASTOR, J.; HERNÁNDEZ, A. J. Integrated approach to assessing the effects of soils polluted with heavy metals on a plant population. **Ecotoxicology**, London, v. 21, n. 7, p. 1965-1978, Oct. 2012.

HADJILIADIS, N. D. **Cytotoxicity, mutagenic and carcinogenic potential of heavy metals related to human environment**. Dordrecht: Kluwer, 1997. 629 p.

HENRY, J. R. **An overview of the phytoremediation of lead and mercury**. Washington: USEPA, 2000. 51 p. Disponível em: <<http://www.clu-in.gov>>. Acesso em: 12 jun. 2012.

HOODA, S. P. **Trace elements in soils**. London: Wiley, 2010. 618 p.

HORNG, T. et al. Heavy metals absorption of hydroponic Chinese kale. **Journal of Agriculture and Forestry**, Taipei, v. 51, n. 1, p. 73-83, 2002.

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

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soil and plants**. 3rd ed. Boca Raton: CRC, 2001. 331 p.

KOSOBROUKHOV, A.; KNYAZEVA, I.; MUDRIK, V. Plantago major plants responses to increase content of lead in soil: growth and photosynthesis. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 42, n. 2, p. 145-151, Feb. 2004.

KUMAR, P. B. A. N. et al. Phytoextraction: the use of plants to remove heavy metals from soils. **Environmental Science and Technology**, New York, v. 29, n. 5, p. 1232-1238, May 1995.

LANARAS, T. et al. Plant metal content, growth responses and some photosynthetic measurements on field-cultivated wheat growing on ore bodies enriched in Cu. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, n. 2, p. 307-314, 1993.

LANE, S. D.; MARTIN, E. S. A histochemical investigation of lead uptake in *Raphanus sativus*. **New Phytologist**, London, v. 79, p. 281-286, 1977.

LAPERCHE, V. et al. Effect of apatite amendments on plant uptake of lead from contaminated soil. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 31, n. 10, p. 2745-2753, 1997.

LARBI, A. et al. Effects of Cd and Pb in sugar beet plants grown in nutrient solution: induced Fe deficiency and growth inhibition. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 29, n. 12, p. 1453-1464, 2002.

LIAO, M.; XIE, X. M. Effect of heavy metals on substrate utilization pattern, biomass, and activity of microbial communities in a reclaimed mining wasteland of red soil area. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 66, n. 2, p. 217-223, Feb. 2007.

LIU, D.; KOTTKE, I. Subcellular localization of copper in the root cells of *Allium sativum* by electron energy loss spectroscopy (EELS). **Bioresource Technology**, Essex, v. 94, n. 2, p. 153-158, Sept. 2004.

LLORENS, N. et al. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Plant Science**, Shannon, v. 160, n. 1, p. 159-163, Dec. 2000.

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

MALECKA, A.; PIECHALAK, A.; MORKUNAS, I. Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 30, n. 5, p. 629-637, Sept. 2008.

MARQUES, T. C. L. S. M.; MOREIRA, A. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Crescimento e teor de metais de mudas de espécies arbóreas cultivadas em solo contaminado com metais pesados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 121-132, jan. 2000.

MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Phytoextraction of metals and metalloids from contaminated soils. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 14, n. 3, p. 277-282, June 2003.

MEMON, A. R.; SCHODER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research International**, Landsberg, v. 16, n. 2, p. 162-175, Mar. 2009.

MENGEL, K.; KIRKBY, E. A. **Principles of plant nutrition**. 4th ed. Bern: International Potash Institute, 1987. 687 p.

MINAS GERAIS. Conselho Estadual de Política Ambiental. **Deliberação Normativa COPAM nº 166**, de 29 de junho de 2011. Altera o Anexo I da Deliberação Normativa Conjunta COPAM CERH nº 2 de 6 de setembro de 2010, estabelecendo os Valores de Referência de Qualidade dos Solos. Belo Horizonte, 2011. Disponível em: <<http://ws.mp.mg.gov.br/biblio/informa/290716034.htm>>. Acesso em: 10 jun. 2013.

MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A.; CHIES, J. O. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics: southern Brazil. **Environmental Pollution**, Barking, v. 149, n. 1, p. 10-17, Sept. 2007.

MOURATO, M. P.; MARTINS, L. L.; CAMPOS-ANDRADA, M. P. Physiological responses of *Lupinus luteus* to different copper concentrations. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 53, n. 1, p. 105-111, Mar. 2009.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Remediation technologies for metal contaminated soils and groundwater: an evaluation. **Engineering Geology**, Amsterdam, v. 60, n. 1/4, p. 193-207, June 2001.

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

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

NAJEEB, U. et al. Citric acid enhances the phytoextraction of manganese and plant growth by alleviating the ultrastructural damages in *Juncus effusus* L. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 170, n. 2/3, p. 1156-1163, Oct. 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Elementos traço na nutrição e saúde humana**. Genebra, 1998. 452 p.

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

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O. Índice de translocação de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) e de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) submetidas a doses crescentes de cádmio, níquel e chumbo. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 26, n. 4, p. 467-473, jul./ago. 2002.

PIETRZAK, U.; MCPHAIL, D. C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. **Geoderma**, Amsterdam, v. 122, n. 2/4, p. 151-166, Oct. 2004.

RASKIN, I. et al. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion Biotechnology**, London, v. 5, n. 3, p. 285-290, June 1994.

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

ROMEIRO, S. et al. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes*. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 2, p. 327-334, 2007.

SALGADO, P. E. T. Toxicologia dos metais. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 154-172.

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

SANTOS, R. C. **Planta do cerrado absorve metal nocivo ao meio ambiente**. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/node/152>>. Acesso em: 5 set. 2009.

SCHEINBERG, H. Copper. In: MERIAN, E. (Ed.). **Metal and their compounds in the environment: occurrence, analysis, and biological relevance**. Weinheim: VCH, 1991. p. 893-908.

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

SCULLION, J. Remediating polluted soils. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 93, n. 2, p. 51-65, Feb. 2006.

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

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Toxic metals in: lead toxicity in plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, Taipei, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SILVA, S. R. et al. Caracterização de rejeito de mineração de ouro para avaliação de solubilização de metais pesados e arsênio e revegetação local. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 189-196, fev. 2004.

SINGH, R. et al. Heavy metals and living systems: an overview. **Indian Journal of Pharmacology**, New Delhi, v. 43, n. 3, p. 246-253, Mar. 2011.

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

SOARES, C. R. F. S. et al. Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, n. 2, p. 213-225, 2000.

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

SONMEZ, S. et al. High level of copper application to soil and leaves reduce the growth and yield of tomato plants. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 3, p. 213-218, May/June 2006.

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

SUDO, M. et al. Gene expression and sensitivity in response to copper stress in rice leaves. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 12, p. 3465-3474, Dec. 2008.

TANG, S. et al. Heavy metal uptake by metal tolerant *Elsholtzia haichowensis* and *Commelina communis* from China. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 32, n. 5/6, p. 895-905, 2001.

TILLS, A. R.; ALLOWAY, B. J. The speciation of lead in soil solution from very polluted soils. **Environmental Technology Letters**, London, v. 4, n. 12, p. 529-534, 1983.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **USEPA 3051a**: microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils. Washington, 1995. Disponível em:
<<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/pdfs/3051.pfd>>. Acesso em: 28 mar. 2013.

VALADARES, J. M. A. S. et al. Some heavy metals in soils treated with sewage sludge, their effects on yield, and their uptake by plants. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 12, n. 1, p. 49-57, Jan./Feb. 1983.

VERKLEIJ, J. A. C.; PRAST, J. E. Cadmium tolerance and co-tolerance in *Silene vulgaris* (Moench.) Garcke [= *S. cucubalus* (L.) wilb.]. **The New Phytologist**, London, v. 111, n. 4, p. 637-645, 1989.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, n. 4, p. 645-655, Apr. 2003.

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

WARNE, M. S. J. et al. Modeling the toxicity of copper and zinc salts to wheat in 14 soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 27, n. 4, p. 786-792, Apr. 2008.

WATANABE, M. E. Phytoremediation on the brink of commercialization. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 31, n. 4, p. 182A-186A, 1997.

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

YRUELA, I. Copper in plants: acquisition, transport and interactions. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 36, n. 5, p. 409-430, May 2009.

ZANCHETA, A. C. F. et al. A fitoextração de cobre por espécies de plantas cultivadas em solução nutritiva. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 737-744, 2011.

ZEITOUNI, C. F. **Eficiência de espécies vegetais como fitoextratoras de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco de um Latossolo Vermelho Amarelo distrófico**. 2003. 91 p. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais) - Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 2003.

ZHAO, F.; MCGRATH, S. P. Biofortification and phytoremediation. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 12, n. 3, p. 373-380, June 2009.