

**RESPOSTAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS
DE *Pfaffia glomerata* E *Eucalyptus camaldulensis*
AO CÁDMIO**

**TERESA CRISTINA LARA LANZA DE SÁ E MELO
MARQUES**

2007

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

Marques, Teresa Cristina Lara Lanza de Sá e Melo.

Respostas anatômicas e fisiológicas de *Pfaffia glomerata* e
Eucalyptus camaldulensis ao cádmio / Teresa Cristina Lara Lanza
de Sá e Melo Marques. – Lavras : UFLA, 2007.

103 p. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2007.

Orientador: Ângela Maria Soares.

Bibliografia.

1. Solução nutritiva. 2. Mecanismos de tolerância. 3.
Fitorremediação. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 634.9734

TERESA CRISTINA LARA LANZA DE SÁ E MELO MARQUES

**RESPOSTAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE
Pfaffia glomerata E *Eucalyptus camaldulensis* AO
CÁDMIO**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do curso
de doutorado em Agronomia, área de
concentração Fisiologia Vegetal, para a
obtenção do título de Doutor**

Orientadora:

Profa. Dra. Ângela Maria Soares

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2007**

TERESA CRISTINA LARA LANZA DE SÁ E MELO MARQUES

**RESPOSTAS ANATÔMICAS E FISIOLÓGICAS DE
Pfaffia glomerata E *Eucalyptus camaldulensis* AO
CÁDMIO**

**Tese apresentada à Universidade Federal de
Lavras como parte das exigências do curso
de doutorado em Agronomia, área de
concentração em Fisiologia Vegetal, para a
obtenção do título de Doutor**

APROVADA em 7 de março de 2007

Prof. Dr. Luiz Edson Mota de Oliveira

DBI

Prof. Dr. Nelson Delú Filho

**Faculdade de Filosofia,
Ciência e Letras de Boa
Esperança**

Prof. Dr. Evaristo Mauro de Castro

UFLA

Profa. Dra. Janice Guedes de Carvalho

UFLA

Profa. Dra. Ângela Maria Soares

UFLA

(Orientador)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade de realização do doutorado e pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Pesquisa, Ensino e Extensão de Minas Gerais (Fapemig), pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

À professora Angela Maria Soares, pelos ensinamentos transmitidos, estímulo, entusiasmo na orientação e amizade.

Aos professores Luiz Edson Mota de Oliveira, Evaristo Mauro de Castro, Janice Guedes de Carvalho e Nelson Delú Filho, pelas críticas e sugestões ao texto da tese.

A Daniela Deitos Fries, pela orientação e colaboração na parte bioquímica deste trabalho; a Marcelo Pedrosa Gomes e Giordane Martins, pelo auxílio na parte anatômica.

Aos professores do Setor de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos funcionários do Setor de Fisiologia Vegetal, pela grande colaboração para a execução deste trabalho e convivência.

Aos colegas de curso, especialmente Andrea Shan, pelo companheirismo.

Aos meus pais, Maurício e Maria do Carmo, pelo carinho e apoio constante.

A minha querida avó, Marta Lara (*in memoriam*), pela alegria e pelas orações.

Ao meu marido, João José Marques, pelo amor e dedicação e aos meus filhos, Maria Augusta, Antônio, Nuno e Fernando, que encheram nossa casa de muita luz.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao Nosso Senhor Jesus Cristo e a Nossa Mãe e Senhora, pelas graças recebidas para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Metais pesados: toxicidade para os vegetais.....	3
2.2 A toxicidade de Cd no vegetal.....	4
2.3 Sistema antioxidante de resposta das plantas ao estresse como mecanismo de tolerância a exposição ao Cd.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Considerações gerais.....	17
3.2 Características avaliadas.....	20
3.2.1 Matéria seca.....	20
3.2.2 Teor de clorofila.....	20
3.2.3 Teor de carotenóide.....	21
3.2.4 Potencial hídrico.....	21
3.2.5 Teores de Cd e dos nutrientes.....	22
3.2.6 Peroxidação de lipídeos.....	22
3.2.7 Atividade de enzimas antioxidantes.....	23
3.2.7.1 Extração protéica.....	23
3.2.7.2 Teor protéico.....	23
3.2.7.3 Atividade da catalase.....	23
3.2.7.4 Atividade da ascorbato peroxidase.....	24
3.2.7.5 Atividade da guaiacol peroxidase.....	24
3.2.7.6 Atividade da glutathione redutase.....	25
3.2.7.7 Atividade da superóxido dismutase.....	25
3.2.8 Avaliações anatômicas.....	26
3.2.9 Eficiência fotoquímica do fotossistema II.....	26
3.3 Análise de dados.....	27
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1 Experimento I: Respostas anatômicas e fisiológicas de <i>P. glomerata</i> submetida a doses crescentes de Cd em solução nutritiva.....	28
4.1.1 Matéria seca e sintomas visuais.....	28
4.1.2 Teores de pigmentos.....	30

4.1.3	Potencial hídrico.....	34
4.1.4	Teores de Cd e o estado nutricional.....	35
4.1.5	Estresse oxidativo induzido pelo Cd.....	45
4.1.6	Respostas anatômicas.....	57
4.2	Experimento II: Respostas morfofisiológicas do <i>E. camaldulensis</i> submetido a doses crescentes de Cd em solução nutritiva.....	60
4.2.1	Matéria seca e sintomas visuais.....	60
4.2.2	Teores de pigmentos.....	63
4.2.3	Eficiência fotoquímica do fotossistema II.....	66
4.2.4	Potencial hídrico.....	68
4.2.5	Teores de Cd e o estado nutricional.....	69
4.2.6	Peroxidação de lipídios.....	78
4.2.4	Respostas anatômicas.....	80
5	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1	Produção de matéria seca de raízes e parte aérea de <i>P. glomerata</i> submetida a doses de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	29
FIGURA 2	Sistema radicular de <i>P. glomerata</i> aos 16 dias após indução do tratamento (DAT), na presença de doses de Cd, em solução nutritiva.....	29
FIGURA 3	Parte aérea de <i>P. glomerata</i> aos 16 dias após indução do tratamento (DAT), na presença de doses de Cd, em solução nutritiva.....	30
FIGURA 4	Relação de clorofila <i>a/b</i> e teores de clorofila total em plantas de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva...	32
FIGURA 5	Teores de carotenóides (mg g ⁻¹ MF) em folhas de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	33
FIGURA 6	Potencial hídrico total (MPa) de plantas de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	35
FIGURA 7	Teores de Cd (mg kg ⁻¹) nas raízes e parte aérea de <i>P. glomerata</i> submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	37
FIGURA 8	Teores de macronutrientes (g kg ⁻¹) nas raízes e parte aérea de <i>P. glomerata</i> submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	39
FIGURA 9	Teores de micronutrientes (mg kg ⁻¹) na raízes e parte aérea de <i>P. glomerata</i> submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	42
FIGURA 10	Peroxidação de lipídeos (nmol MDA g ⁻¹ MF) em folhas e raízes de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	46
FIGURA 11	Atividade da SOD (U mg ⁻¹ proteína) em folhas e raízes de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT,	

	submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	48
FIGURA 12	Atividade da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$) em folhas e raízes de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	50
FIGURA 13	Atividade da APX ($\mu\text{mol ascorbato mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$) em folhas e raízes de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	52
FIGURA 14	Atividade da GPX ($\mu\text{mol guaiacol mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$) em folhas e raízes de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	54
FIGURA 15	Atividade da GR ($\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$) em folhas e raízes de <i>P. glomerata</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	56
FIGURA 16	Seção paradérmica da folha de <i>P. glomerata</i> submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	59
FIGURA 17	Produção de matéria seca de raízes e parte aérea de <i>E. camaldulensis</i> submetido a doses de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	61
FIGURA 18	Sistema radicular de <i>E. camaldulensis</i> aos 16 dias após indução do tratamento (DAT), na presença de doses crescentes de Cd, em solução nutritiva.....	62
FIGURA 19	Parte aérea de <i>E. camaldulensis</i> aos 16 dias após indução do tratamento (DAT) na presença de doses crescentes de Cd, em solução nutritiva.....	63
FIGURA 20	Relação de clorofila <i>a/b</i> e teor de clorofila total em plantas jovens de <i>E. camaldulensis</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	64
FIGURA 21	Teores de carotenóides ($\text{mg g}^{-1} \text{ MF}$) em folhas de <i>E. camaldulensis</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetido a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	66
FIGURA 22	Eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) em plantas jovens de <i>E. camaldulensis</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	67

FIGURA 23	Potencial hídrico total (MPa) de plantas jovens de <i>E.camaldulensis</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	68
FIGURA 24	Teores de Cd (mg kg^{-1}) nas raízes e parte aérea de <i>E. camaldulensis</i> submetido a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	70
FIGURA 25	Teores de macronutrientes (g kg^{-1}) nas raízes e parte aérea de <i>E. camaldulensis</i> submetido a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	72
FIGURA 26	Teores de micronutrientes (mg kg^{-1}) nas raízes e parte aérea de <i>E.camaldulensis</i> submetido a doses crescentes de Cd em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	76
FIGURA 27	Peroxidação de lipídeos (nmol MDA g^{-1} MF) em folhas e raízes de plantas de <i>E. camaldulensis</i> , no 1º, 12º e 20º DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva.....	79
FIGURA 28	Seção transversal do limbo foliar das folhas de <i>E. camaldulensis</i> submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante um período de 20 dias.....	81
FIGURA 29	Seção paradérmica de folhas de <i>E. camaldulensis</i> submetidas a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante um período de 20 dias.....	85

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 Fontes, solução estoque e composição final das soluções nutritivas utilizadas para o crescimento de <i>P. glomerata</i> e <i>E. camaldulensis</i> em concentrações crescentes de Cd.....	19
TABELA 2 Médias das variáveis respostas analisadas nas seções paradérmicas da superfície abaxial folhas de <i>P. glomerata</i> submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias.....	58
TABELA 3 Densidade estomática e espessura de células e tecidos de plantas jovens de <i>E. camaldulensis</i> submetidas a doses crescentes de Cd em solução nutritiva.....	84

RESUMO

MARQUES, Teresa Cristina Lara Lanza de Sá e Melo. **Respostas anatômicas e fisiológicas de *Pfaffia glomerata* e *Eucalyptus camaldulensis* ao cádmio.** 2007. 103 Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras- MG.

Com o objetivo de caracterizar aspectos fisiológicos e anatômicos de espécies com potencial para fitorremediação, foram realizadas avaliações de crescimento, teores de pigmentos, potencial hídrico, estado nutricional da planta, peroxidação de lipídios, atividade de enzimas antioxidantes e estudos anatômicos. Foram conduzidos experimentos com *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen e *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., em solução nutritiva de Clark, contendo doses crescentes de Cd (0, 15, 25, 45 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Durante um período experimental de 20 dias, foram feitas coletas (1, 12 e 20 DAT) para avaliações de pigmentos, estado hídrico, peroxidação de lipídeos e atividade enzimática, nos tratamentos de 0, 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Para o estudo de produção de matéria seca, teores de nutrientes e de Cd e anatomia foram feitas coletas, no final do experimento, em todos os tratamentos. Constatou-se que a adição de Cd no meio de solução reduziu a produção de matéria seca das raízes e parte aérea, diminuiu os teores de clorofila com o aumento do tempo de exposição e alterou o estado nutricional das duas espécies estudadas. Em *P. glomerata*, os teores de carotenóides foram reduzidos, enquanto em *E. camaldulensis*, estes teores foram aumentados com o tempo de exposição. O potencial hídrico de *P. glomerata* foi reduzido com o aumento do tempo de exposição ao Cd e foi maior no final do período experimental em *E. camaldulensis*, aos 12 e 20 DAT. Ocorreram alterações no metabolismo do oxigênio ativado, evidenciadas pelo aumento da peroxidação de lipídeos nas doses maiores de Cd nas raízes e parte aérea de *P. glomerata* e na parte aérea de *E. camaldulensis*. Em *P. glomerata*, as enzimas do sistema antioxidativo tiveram suas atividades afetadas com a adição de Cd. No estudo anatômico, constatou-se aumento dos números de estômatos e alterações em seus diâmetros com o aumento das doses de Cd. O Cd na solução também reduziu a espessura do limbo foliar de *E. camaldulensis*. Apesar do efeito do enriquecimento de Cd acumulado nos tecidos das plantas estudadas ter resultado na redução do crescimento das plantas, o conhecimento de estratégias metabólicas de sobrevivência destas espécies poderá contribuir para o estudo de melhoramento genético, objetivando a recuperação de áreas degradadas.

Palavras chave: solução nutritiva; mecanismos de tolerância; fitorremediação.

ABSTRACT

MARQUES, Teresa Cristina Lara Lanza de Sá e Melo. **Anatomical and physiological responses of *Pfaffia glomerata* and *Eucalyptus camaldulensis* to cadmium.** 2007. 103 Thesis (Doctorate in Plant Physiology) - Federal University of Lavras, Lavras-MG.*

Plant growth, photosynthetic pigment contents, water potential, mineral nutrition, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and anatomical changes of *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen and *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh were investigated aiming to characterize their physiological and anatomical features regarding their phytoremediation potential. An experiment was carried out in Clark solutions containing increase Cd concentration (0, 15, 25, 45 and 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$) with plantlets of those species. During 20 days, plant sample material was collected to evaluate pigment contents, water potential, lipid peroxidation, and enzyme activity in treatments of 0, 45, and 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Cd. After 20 days, the plants were collected to investigate dry matter production, nutrient and Cd contents, and anatomical changes. It was verified that Cd addition decreased root and shoot dry matter production. Chlorophyll contents were also reduced by increasing the time plants were exposed to metals. In *P. glomerata* carotenoid contents were increased with Cd exposition time. Water potential of *P. glomerata* was reduced with exposition to Cd. As for *E. camaldulensis*, it was higher at the end of the experiment. The verified changes in reactive oxygen metabolism were demonstrated by an increase in the lipid peroxidation and highest levels of Cd in *P. glomerata* and in the shoot of *E. camaldulensis*. In *P. glomerata*, antioxidation system enzymes had their activities affected by Cd exposition. It was also verified an increase in the number of stomata and alterations in their diameters with Cd level increased. Cadmium also decreased the thickness of leave limbo in *E. camaldulensis*. Although Cd has had an overall negative effect, the understanding of the survival strategies adopted by those species in Cd-rich environments will

* Guidance Committee: Ângela Maria Soares - UFLA (Major Professor),
Evaristo Mauro de Castro - DBI/UFLA.

contribute to plant breeding programs aiming at the revegetation of a contaminated area.

Key words: nutrient solution; tolerance mechanisms; phytoremediation.

1 INTRODUÇÃO

Metais pesados são importantes poluentes ambientais, particularmente em áreas onde há grande atividade antropogênica. A presença deles na atmosfera, no solo e na água, mesmo em concentrações traços, pode causar sérios problemas a todos os organismos e a bioacumulação do metal pesado na cadeia alimentar pode ser altamente perigosa. O Cd é um metal de vasta ocorrência, liberado para o ambiente por meio de estações de energia, sistemas de aquecimento, indústrias que trabalham com metais, incineradoras de lixo, tráfego urbano, fábricas de cimento e também como um produto secundário de fertilizantes fosfatados.

Dentre inúmeras estratégias de remediação, a fitorremediação é um tipo bastante promissor, destacando-se a implantação de florestas em áreas contaminadas. Pela técnica da fitorremediação, as plantas tolerantes aos metais absorvem os elementos metálicos através de suas células, o que é facilitado por mecanismos próprios de transporte e acumulação. No entanto, vários metais pesados são necessários como micronutrientes, não podendo a planta evitar a entrada de elementos tóxicos pelos mesmos mecanismos. Em particular, a absorção do íon Cd parece competir pelo mesmo carreador transmembrana com alguns nutrientes, tais como K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn, Ni.

Um dos requisitos básicos para o sucesso de qualquer técnica de revegetação de áreas contaminadas por metais pesados é encontrar plantas tolerantes aos contaminantes. No contexto sobre fitorremediação, estudos sobre a viabilidade de espécies arbóreas para a reabilitação de áreas contaminadas por metais pesados têm merecido destaque, por causa da maior imobilização destes metais na biomassa vegetal por períodos mais longos (Eltrop et al., 1991). No

entanto, existem evidências de que as plantas herbáceas possuem maior tolerância ao excesso de metais no solo do que as arbóreas (Baker, 1987).

Muitas espécies herbáceas têm sido estudadas. Entre elas, destaca-se a mostarda (*Brassica spp.*), capaz de retirar até 9% do metal presente no solo (Carneiro *et al.*, 2001). A maior tolerância da mostarda aos metais pesados está relacionada à sua capacidade de absorver grandes quantidades de P e Fe.

O efeito tóxico dos metais na planta altera os processos metabólicos, como fotossíntese, respiração e atividade de enzimas. Esses efeitos causam a redução do nível energético da planta, levando à diminuição da absorção dos micronutrientes minerais e do crescimento. Nesta perspectiva, o presente estudo foi realizado com o objetivo de conhecer os efeitos do Cd em espécies com tolerância potencial ao metal (*P. glomerata* e *E. camaldulensis*). Foram estudados efeitos na distribuição de matéria seca, anatomia foliar, nutrição mineral, assim como mecanismos de tolerância por meio de estudos das atividades de enzimas do sistema antioxidativo. Espera-se, assim, contribuir para estudos que buscam genótipos tanto fitorremediadores quanto bioindicadores e, conseqüentemente, gerar informações que possam auxiliar a definir estratégias de melhoramento diretamente relacionadas ao programa de fitorremediação de solos contaminados e de monitoramento ambiental.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados: toxicidade para os vegetais

Em um solo contaminado por metais pesados, as raízes são os primeiros órgãos a entrar em contato com altas concentrações dos elementos tóxicos e, de modo geral, esses elementos ficam mais acumulados nas raízes do que na parte aérea (Barceló & Poschenreider, 1990). Mesmo que a planta seja exposta, por um longo tempo, a metais pesados de alta mobilidade, como o Pb, Cr, Cu ou Ba ou, ainda, a elementos de baixa mobilidade como o Cd, o crescimento radicular será mais intensamente reduzido do que a parte aérea, reduzindo assim a razão raiz/parte aérea. Porém, a quantidade do metal pesado absorvido e a intensidade de inibição do crescimento radicular vão depender da espécie e das condições de crescimento da planta (Barceló & Poschenreider, 1990).

O grau pelo qual a planta é capaz de absorver o metal vai depender de sua concentração na solução do solo e de sua biodisponibilidade, que é controlada pela presença de matéria orgânica, pH do solo, potencial redox, temperatura e concentração de outros elementos (Toppi & Gabbrielli, 1999). Em particular a absorção do íon Cd parece competir pelo mesmo carreador transmembrana com os nutrientes K, Ca, Mg, Fe, Mn, Cu, Zn e Ni (Marschner, 1995).

Os sintomas de toxidez observados nas plantas na presença de quantidades excessivas do metal pesado podem ser devido a grandes interações, em âmbito celular, causando alterações visuais, como, por exemplo, reduções no crescimento, cloroses, necroses e murchas. A redução no crescimento como resposta ao aumento dos níveis fitotóxicos indica claramente um impacto dos metais pesados às plantas (Monni et al., 2001). Muitos estudos têm mostrado que os teores de clorofila, ácido abscísico (ABA) e ácidos orgânicos e o potencial de água da planta têm sido utilizados para indicar a resposta do vegetal

a elevados níveis de metais pesados (Monni et al., 2001, Angelov et al., 1993, Stobart et al., 1985). A taxa de fotossíntese e os teores de clorofila em geral são reduzidos na presença de Cu, Ni, Cd e Pb, como observado por Chugh & Sawhney, 1999, Angelov et al., 1993 e Stobart et al., 1985. O efeito de Ni, Cu e Cd nas relações hídricas da planta são discutidos por Monni et al. (2001) e Barceló & Poschenreider (1986).

Outros efeitos dos metais pesados podem estar relacionados com a incorporação do metal ao grupamento sulfidrila de uma proteína, provocando a inibição da atividade ou a quebra de sua estrutura (Assche & Clijsters, 1990) e, assim, as enzimas são um dos principais alvos dos metais. Portanto, a sua exposição a níveis tóxicos pode levar à inibição da atividade, alterando sua função como catalizadora ou, ainda, desnaturando a proteína (Benavides et al., 2005). Além disso, podem-se encontrar metais pesados estimulando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando na célula danos diversos (Sandalo et al., 2001; Gallego et al., 1996).

Alterações anatômicas são também observadas em plantas expostas aos metais pesados. Muitas vezes, as plantas são capazes de desenvolver estratégias de sobrevivência promovendo alterações morfológicas e anatômicas para suportarem níveis fitotóxicos de metais pesados em seus tecidos. Outras vezes, as plantas, quando expostas aos metais, sofrem danos em suas estruturas que comprometem o metabolismo da planta. Altos níveis de Cd e Zn causaram redução no tamanho das células da epiderme e dos parênquimas paliçádico e esponjoso, além da redução no teor de amido e no teor relativo de água da folha (Sridhar et al., 2005).

2.2 A toxicidade de Cd no vegetal

Cádmio (densidade = $8,6 \text{ g cm}^{-3}$) é um metal pesado muito comum, liberado ao ambiente por processos industriais, posto de combustíveis, resíduos

urbanos, tráfego urbano, agricultura, mineração e sistemas de aquecimento, entre outros (Toppi & Gabrielli, 1999). Em área com pouca atividade antropogênica, o Cd pode ser liberado pelo processo de mineralização de rochas.

Uma estimativa da faixa de níveis não tóxicos de Cd para a solução do solo varia entre 0,04 a 0,32 μM (Wagner, 1993). Uma solução de solo que contém entre 0,32 a 1 μM Cd pode ser considerada como um nível moderado de poluição, pois o Cd é tido como um elemento móvel no solo e encontrado, principalmente, em sua forma iônica (Toppi & Gabrielli, 1999). Sendo assim, de acordo com suas características químicas, o Cd apresenta elevada capacidade de ser absorvido pela planta e perdido por lixiviação no perfil do solo.

Na maioria das condições ambientais, o Cd é absorvido pelo sistema radicular e, como consequência, espera-se encontrar efeitos desse metal nos processos de absorção, transporte e uso de vários elementos nutrientes (Ca, Mg, P, e K) e também na absorção de água (Benavides et al., 2005). De acordo Seregin & Ivanov (2001), há dois mecanismos que explicam melhor a redução na absorção dos macro e micronutrientes afetados pelo Cd. Um dos mecanismos seria um físico-químico que depende do tamanho do raio iônico do Cd em relação aos outros elementos. Logo, o Cd (1,03 Å) reduziria a absorção do Zn (0,83 Å) e do Ca (1,06 Å). Outro mecanismo seria a alteração no metabolismo celular por interferir na estrutura das membranas, na atividade de enzimas de membrana e provocar inibição no crescimento radicular. Estes efeitos causam outros novos, como alterações no balanço hormonal, deficiência de nutrientes essenciais, inibição da fotossíntese, variações na translocação de fotoassimilados, alterações nas relações de água, alterações na estrutura e ultra-estrutura, entre outros (Barceló & Poschenreider, 1990).

Entretanto, em estudos de toxidez, torna-se difícil distinguir se realmente existe alguma diferença na ordem de surgimento entre os danos. Efeito de Cd nas propriedades da membrana plasmática foi observado por

Hernández & Cooke (1997), que relataram modificações na composição de lipídio da membrana plasmática radicular de *Pisum sativum* tratados com Cd. Este efeito pode ter provocado a variação da seletividade da membrana e redução na atividade da ATPase. No geral, o Cd inibe o crescimento do sistema radicular, provocando supressão na taxa de alongamento celular de maneira irreversível, atuando no sistema de bomba de próton (Toppi & Gabrielli, 1999). Em raízes de abóbora (*Cucumis sativus* L.), Cd induziu a inibição da redutase do Fe III, levando à deficiência do Fe II, o qual afetou seriamente a fotossíntese (Alcantara et al., 1994). O Cd também reduz a absorção de nitrato pelas raízes e seu transporte para a parte aérea, inibindo, indiretamente, a atividade da redutase do nitrato na parte aérea (Hernández et al., 1996).

A toxicidade do metal afetando a permeabilidade da membrana pode causar redução na absorção de água, interferindo, assim, no balanço de água da planta (Barceló & Poschenreider, 1986). Segundo Seregin & Ivanov (2001), vários mecanismos explicam o efeito do Cd no teor de água e na taxa de transpiração, como redução na área foliar e extensibilidade celular; alteração na quantidade e tamanho dos estômatos; alteração no teor dos compostos que mantêm o turgor celular e a plasticidade de parede celular; redução no teor de ABA, induzindo o fechamento dos estômatos e variações na respiração e na fosforilação oxidativa que podem causar também alterações no regime de água da planta.

Em experimentos com feijão, a expansão celular foi inibida, a área foliar e o teor relativo de água foram reduzidos após 48 horas de exposição a 3 μ M Cd, enquanto o turgor foliar não foi afetado neste tempo, sugerindo que o Cd induziu a redução na extensibilidade celular (Poschenreider et al., 1989). Em *Arabidopsis thaliana*, o efeito do Cd na relação água-planta foi verificado por meio da redução na condutância foliar induzida pela ação direta do Cd no fechamento dos estômatos (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Uma possível

explicação para o fechamento dos estômatos induzido pelo Cd seria a modificação na regulação de canais de K nas células guardas. Entretanto, Perfus-Barbeoch et al. (2002) verificaram que o Cd atravessa a membrana das células guardas através dos canais de Ca dependente do potencial de membrana, perturbando assim a concentração de Ca intracelular.

O Cd pode interferir no metabolismo das plantas por diferentes maneiras, atuando, por exemplo, nas reações fotossintéticas por interferir na estrutura e na biossíntese dos cloroplastos (Somashekaraiah et al., 1992; Stobart et al., 1985), no PS II (Di Cagno et al., 1999) e em diferentes reações do ciclo de Calvin (Siedlecka & Krupta, 1996). Em *Helianthus annuus*, as plantas tratadas com 10 e 20 μM Cd apresentaram redução no teor de clorofila e na taxa de assimilação de CO_2 , não afetando a eficiência do fotossistema II (PS II). Entretanto, variações foram observadas na produção do *quantum* do transporte de elétrons do PS II, no *quenching* fotoquímico (q_N) e não-fotoquímico (q_{NP}) e na eficiência de captura da excitação do PS II (Φ_{exc}) (Di Cagno et al., 1999).

A toxidez de Cd na planta pode também induzir o estresse oxidativo, por estar o metal envolvido em vários mecanismos que geram as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Benavides et al., 2005; Vitória et al., 2001). Estes radicais ocorrem em organismos aeróbicos, sob condições normais, sendo gerados também em células de planta durante os processos de fotossíntese e respiração (Asada, 1999). Porém, estas EROs são capazes de gerar danos oxidando proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, que têm como consequência alterações na estrutura celular e na formação de mutagêneses (Benavides et al., 2005). Gallego et al. (1996) mostraram que o Cd causou aumento na peroxidação do lipídio e na atividade da lipoxigenase em plantas de girassol. A abundância de O_2 e as reações de transferência de elétrons altamente energética associada com as membranas do tilacóide fazem dos cloroplastos a principal fonte de oxigênio ativo intermediário nos tecidos fotossintéticos das plantas (Prasad, 1995).

As plantas, quando expostas ao Cd, sofrem alterações de natureza morfológica e anatômica. Os vasos do xilema, responsáveis pelo transporte dos elementos nutricionais para a parte aérea, podem sofrer modificações quando plantas são expostas ao Cd. A presença do Cd em *Salix viminalis* aumentou a concentração de materiais fenólicos na parede celular e no lúmen do xilema (Vollenweider et al., 2006). Foi também observado, neste mesmo estudo, acúmulo de Cd nos tubos crivados, dificultando o movimento via simplasto, com o floema tendendo a reduzir sua eficiência no transporte dos fotoassimilados. Em *Brassica juncea*, espécie acumuladora de Cd, a presença de 10 mM Cd não resultou em variações nas células da epiderme e do mesofilo, quando comparada com o controle (Sridhar et al., 2005).

A presença de metais pesados nos tecidos das plantas em quantidades tóxicas causa variações anatômicas que podem vir a alterar os processos metabólicos destas. Em trigo, Quartacci et al. (2000) observaram que o crescimento da planta na presença de 10 μM Cu não afetou a ultra-estrutura do cloroplasto, permanecendo com a estrutura similar ao tratamento controle. Entretanto, as folhas das plantas crescidas em 50 μM Cu tiveram a estrutura dos cloroplastos alterada. O estroma e a grana dos tilacóides aumentaram de volume, sem que as membranas fossem destruídas. A quantidade de amido nas raízes foi reduzida em consequência da redução da quantidade de fotoassimilados translocados para este órgão ou, ainda, acredita-se que, devido à ausência de amido na parte aérea, o Cd pode ter interferido muito mais na fotossíntese do que no transporte dos fotoassimilados (Barceló et al., 1988).

A capacidade da planta de tolerar o metal pesado em suas células depende de uma rede interligada de mecanismos fisiológicos e moleculares que incluem desde a sua absorção e acumulação em exsudatos extracelulares e na parede celular como também a complexação do metal dentro da célula por substâncias como ácidos orgânicos, aminoácidos, ferritinas, fitoquelatinas e

metalotioneínas (Benavides et al., 2005). De modo geral, a resposta de defesa ao estresse bioquímico, como, por exemplo, a indução do sistema de enzimas antioxidativas e a ativação ou a modificação do metabolismo da planta, permite uma resposta rápida de adequação ao funcionamento das rotas metabólicas, em consequência dos danos ocorridos na estrutura celular (Hall, 2002; Toppi & Gabbrielli, 1999; Prasad, 1999).

O Cd, ao penetrar pelas raízes através dos tecidos do córtex, alcança o xilema via apoplasto e ou simplasto, podendo estar complexado a vários ligantes como os ácidos orgânicos e as fitoquelatinas (Salt et al., 1995). As plantas retêm maiores teores de Cd nas raízes, translocando pouco para a parte aérea como estratégia desta de tolerar o metal em seus tecidos (Baker, 1981). Deve-se considerar também que a folha é de grande importância no estudo de descontaminação de solos, pois a extração de elementos do solo está bastante relacionada com a taxa de transpiração foliar, sendo os metais translocados e acumulados no órgão aéreo. A existência de estruturas especiais de cada espécie além da natureza dos tecidos, muitas vezes, funciona como uma estratégia a mais para a planta defender-se contra a toxidez por metais. A natureza da epiderme foliar e a existência de tricomas na superfície da folha ou glândulas e hidatódios podem detoxificar mais Cd do que as células do mesófilo (Vollenweider et al., 2006). Na epiderme e no mesófilo de folhas de *Arabidopsis thaliana* foram encontradas apenas quantidades traços de Cd, enquanto nos tricomas foi o local de maior acúmulo do metal (Isaure et al., 2006). Segundo os autores, o seqüestro do Cd nos tricomas pode servir como um caminho para proteger a atividade metabólica da toxidez do Cd. Muitas vezes, uma simples adaptação poder ser tudo o que a planta necessita para tolerar locais altamente contaminados por metais (Macnair, 1993), porém, mecanismos de tolerância adaptativa são dependentes de mecanismos constitutivos (Meharg, 1994).

2.3 Sistema antioxidante de resposta das plantas ao estresse como mecanismo de tolerância a exposição ao Cd

O estresse oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como radicais superóxidos (O_2^-), oxigênio “singlet” (1O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH^\cdot), é um dos principais causadores de injúria depois da planta exposta a condições de estresse, como seca, queimada, geadas, alta intensidade de luz, radiação UV, metais pesados, vários químicos orgânicos e poluentes do ar como O_3 e SO_2 (Benavides et al., 2005; Toppi & Gabbrielli, 1999; Foyer et al., 1994). Estas espécies de oxigênio são altamente reativas e danificam os lipídeos de membrana, as proteínas, os pigmentos e os ácidos nucleicos, resultando na redução drástica do crescimento e da produtividade, podendo levar à morte das plantas (Foyer et al., 1994).

As EROs são produzidas tanto sob condições de estresse quanto em condições adequadas para o desenvolvimento dos vegetais. Por muito tempo, consideravam-se as EROs como moléculas causadoras de danos, as quais precisava ser mantidas em níveis baixos. Entretanto, sabe-se, hoje, da sua importância no sistema de defesa contra patógenos (Resende et al., 2003), no processo de morte programada de células (Fath et al., 2002) e como moléculas sinalizadoras para regular a expressão gênica (Vranová et al., 2002). Dessa forma, devido às suas múltiplas funções, é importante que as células controlem os níveis EROs, sem, contudo, eliminá-los completamente (Schützendübel & Polle, 2002).

Plantas que apresentam um sistema de defesa bem desenvolvido de produção de ERO limitando sua formação são capazes de tolerar maiores condições adversas do meio (Alscher et al., 2002). Sob condições não estressantes, a formação e a remoção do O_2^- estão balanceadas (Benavides et al., 2005). Porém, se a produção dos radicais não for controlada, pode-se alterar a atividade das enzimas responsáveis pela proteção antioxidante, bem como a

alteração da integridade da membrana, levando à destruição de células e de tecidos (Scandalios, 1993).

O controle dos níveis dos agentes oxidantes é mantido pelos componentes antioxidativos. Estes sistemas de defesa são mantidos por compostos metabólicos, tais como o ascorbato, a glutathione, o tocoferol, etc. e por enzimas eliminadoras de oxigênio ativo, como as superóxidos dismutases (SOD), peroxidases (POD), catalases (CAT) e enzimas do ciclo ascorbato-glutathione, como a glutathione redutase (GR) (Noctor & Foyer, 1998), agindo em sincronia. A presença de Cd no meio de solução nutritiva pode inibir ou estimular a produção destas enzimas do sistema antioxidativo (Wójcik et al., 2006; Benavides et al., 2005).

Dentro da célula, a superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra as ERO. O O_2^- é produzido onde a cadeia de transporte de elétrons está presente, podendo sua ativação ocorrer em qualquer compartimento da célula (Noctor & Foyer, 1998) incluindo mitocôndria, cloroplastos, glioxissomos, peroxissomos e citoplasma, que são rapidamente convertidos a H_2O_2 pela ação da SOD (Alscher et al., 2002). Embora em todo o compartimento celular seja possível a formação do O_2^- , acredita-se que, nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos são os principais locais de maior produção das EROs (Benavides et al., 2005; Toppi & Gabbrielli, 1999). As SODs são as únicas enzimas que interferem nas concentrações de H_2O_2 e O_2^- , os dois substratos da reação Haber-Weiss que originam os radicais OH. Provavelmente, por isso constitui o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (Alscher et al, 2002).

Dependendo do co-fator utilizado pela enzima, as SODs são classificadas em três grupos diferentes: Fe-SOD, Mn-SOD e Cu/Zn-SOD, estando também localizadas em compartimentos diferentes, variando de planta para planta em número e em tipo (Scandalios, 1993). As Fe-SODs estão

localizadas no cloroplasto, as Mn-SODs estão localizadas na mitocôndria e peroxissomos e as Cu/Zn no cloroplasto, no citoplasma e, possivelmente, em espaços extracelulares (apoplastos), sendo consideradas as mais abundantes em vegetais (Winglase et al., 1991).

Quantidades padrões de SOD são requeridas a todo o tempo para promover adequada proteção em âmbito celular, pois formação de O_2^- e de produtos da peroxidação de lipídios é altamente e imediatamente tóxica para as plantas (Scandalios, 1993). Muitos estudos têm verificado o efeito do estresse por Cd na atividade da SOD, porém, estes têm apresentado resultados contraditórios. O aumento na atividade da SOD em plantas exposta aos metais pesados tem sido observado em vários estudos (Vitória et al., 2001; Mishra et al., 2006, Gwozdz et al., 1997), enquanto outros trabalhos têm resultado no decréscimo da atividade da SOD ou, ainda, apresentado pouca alteração na atividade da enzima (Benavides et al., 2005). Em girassol, baixas concentrações de Cd provocaram aumento na atividade da enzima e, sob altas doses, o metal teve pouco efeito na atividade da enzima (Gallego et al., 1999). Em *Thlaspi caerulescens*, espécie hiperacumuladora de Cd e Zn, a atividade da SOD reduziu com o aumento das doses de Cd (Wójcik et al., 2006). Enquanto foi reduzida em *Alyssum maritimum* e *Alyssum argenteum*, a SOD teve sua atividade elevada com o aumento das doses de Cd (Schickler & Caspi, 1999).

A catalase (CAT) é uma enzima importante no processo da fotorrespiração, pois o H_2O_2 formado durante este processo durante a conversão do glicolato a glioxilato é decomposto em H_2O e O_2 no peroxissomo, realizado em plantas C3 (Foyer et al., 1994). Em plantas C4, nas quais a fotorrespiração é reduzida, existe redução na atividade da CAT. De acordo com Willekens et al. (1995), a ausência da atividade da CAT em plantas as torna mais sensíveis a muitos estresse. A CAT, assim como a SOD, é a mais eficiente enzima no

sistema antioxidante, pois suas ações combinadas reduzem a ação tóxica e altamente reativa dos radicais hidróxil (OH^\cdot) (Scandalios, 1993).

Existem três tipos de isoenzimas da CAT encontradas em plantas (Willekens et al., 1997). O primeiro tipo presente nos glioxissomos de tecidos que armazenam lipídios parece fazer parte da quebra do H_2O_2 formado durante a β -oxidação dos ácidos graxos (Holtman et al., 1994). Um segundo tipo está presente nos peroxissomos de folhas verdes, sendo responsável pela dismutase do H_2O_2 produzido durante a fotorrespiração na conversão do glicolato a glioxilato (Willekens et al., 1997). Uma terceira classe de CAT está presente nos tecidos vasculares e pode estar envolvida na proteção contra o estresse ambiental (Willekens et al., 1997).

Na literatura encontram-se trabalhos com resultados contraditórios, estudando o efeito do Cd em plantas, podendo ocorrer ativação da CAT (Pereira et al., 2002) ou inibição (Singh et al., 2006). No entanto, Hegedüs et al. (2001) verificaram que o Cd não induziu variações na atividade da CAT em folhas de plântulas de cevada, suportando a conclusão de que a maioria dos metais pesados não afeta a atividade da CAT localizada no peroxissomo. Em *Thlaspi caerulescens*, a atividade da CAT foi crescente com o aumento dos níveis de Cd, porém, foi menor do que o tratamento controle (Wójcik et al., 2006).

A glutathiona reduzida (GSH) é um importante metabólito no combate às EROs, especialmente o O_2^\cdot e H_2O_2 , via ciclo Halliwell-Asada (Noctor e Foyer, 1998). Para a regeneração de GSH a partir de sua forma oxidada (GSSG), a enzima chave é a glutathiona redutase (GR), que necessita do NADPH como poder redutor (Israr et al., 2006). A GR é de grande ocorrência na natureza, podendo ser encontrada desde bactérias heterotróficas e fotossintetizantes até em plantas e animais superiores (Gallego et al., 1996). Esta reação é importante na manutenção do *pool* da glutathiona, pois mantém alta a relação GSH/GSSG, crucial para proteger as células contra os danos oxidativos (Mishra et al., 2006).

O alto valor da relação GSH/GSSG é necessário para sustentar a função da glutatona como um agente oxidante-redutor (Foyer et al., 1997), além de servir como substrato para a produção de fitoquelatinas, um agente quelante de metais, deixando-os indisponíveis no ciclo metabólico da planta (Cobbett, 2000).

Vários trabalhos têm verificado alterações na atividade da GR quando as plantas são submetidas ao estresse por metais pesados. Um aumento na atividade foi verificado em *callus* de *Sesbania drummondii* exposta a diferentes concentrações de Cd (Israr et al., 2006). Em *Brassica juncea* exposta ao Cd e ao Zn, Prasad et al. (1999) também encontraram aumento na atividade da GR. Entretanto, uma redução na atividade da enzima foi verificada em plântulas de cevada (Patra & Panda, 1998) e em plantas de tomate expostas ao excesso de Cu (Mazhoudi et al., 1997), enquanto nenhuma diferença significativa foi verificada na atividade da GR em *Pisum sativum* com o aumento dos níveis de Cd (Sandalió et al., 2001). Em *Alyssum argenteum*, considerada uma espécie hiperacumuladora de metal, a atividade da GR aumentou em baixos níveis de Cd e foi reduzida nos níveis maiores de Cd (Schickler & Caspi, 1999). A baixa atividade da GR em altos níveis de Cd pode ser devido à ação direta do metal nos grupos sulfidril da proteína, interferindo no ciclo da glutatona (Schickler & Caspi, 1999). Segundo os mesmos autores, maiores atividades da SOD e da GR sugerem maiores tolerâncias à exposição da planta a níveis tóxicos dos metais.

A indução da atividade das peroxidases é uma resposta geral das plantas superiores à diversidade de condições de estresses ambientais, incluindo o estresse por metais pesados (MacFarlane, 2002). As peroxidases catalisam reações “quenching” de dehidroxigenação, por meio da transferência de hidrogênio de um doador antioxidante ao H₂O₂ (Mocquot et al., 1996). Em consequência, o aumento na atividade das peroxidases, quando a planta é exposta ao metal, pode exercer uma função importante no mecanismo de defesa celular contra a toxidez do metal (Assche & Clijsters, 1990).

O aumento da produção de peroxidases em decorrência da exposição da planta a metais pesados pode ser considerado, devido à fração tóxica do metal ou a não incorporação do metal livre à parede celular ou, ainda, ao acúmulo deste no vacúolo (Assche & Clijsters, 1990). As atividades das peroxidases apresentam correlação próxima com as variações nos processos fisiológicos, tais como respiração, fotossíntese, fixação de CO₂, transpiração e trocas gasosas tendo, então, consequências diretas no crescimento e no desenvolvimento da planta (Benavides et al., 2005). Dessa forma, as peroxidases apresentam potencial para servir como um indicador das atividades metabólicas (Verkleij & Schat, 1990).

Nas espécies vegetais, a guaiacol peroxidase (GPX) apresenta isoformas ácidas e básicas. A isoforma ácida está envolvida numa variedade de processos relacionados com a biossíntese da parede celular, incluindo a formação da lignina, enquanto a isoforma básica participa da degradação do AIA (ácido indol-acético) e da síntese do etileno (Fieldes & Gerhardt, 1998).

As isoformas da GPX atuando como agente de detoxificação são uma função conhecida, entretanto, para a maioria dos organismos vivos, a função principal desta enzima ainda não foi bem esclarecida (Fieldes & Gerhardt, 1998). Supõe-se que o estudo das alterações provocadas pela indução de estresses fisiológicos poderia contribuir para a melhor compreensão da ação específica das isoformas (Gratão, 2003).

Em plantas, o mais importante substrato redutor para a detoxificação do H₂O₂ é o ascorbato (Noctor & Foyer, 1998). A enzima ascorbato peroxidase (APX) utiliza duas moléculas de ascorbato para reduzir o H₂O₂ a H₂O, gerando duas moléculas de mono-hidroascorbato. A APX está localizada no cloroplasto e no citoplasma das células vegetais (Noctor & Foyer, 1998). Das muitas funções atribuídas ao ascorbato, relativamente poucas são bem caracterizadas. Porém, está claro que o ascorbato é o principal antioxidante primário reagindo

diretamente com os OH, H₂O₂ e O₂⁻, assumindo importante função na fotoproteção e na regulação da fotossíntese (Noctor & Foyer, 1998).

De acordo com Noctor & Foyer (1998), a via das peroxidases para a oxidação do H₂O₂ é um modo alternativo e as peroxidases têm uma afinidade muito maior por H₂O₂ do que a CAT. Esta última enzima destrói o H₂O₂ produzido pela glicolato peroxidase, principalmente nos peroxissomos (Scandalios, 1993), enquanto o H₂O₂ produzido nos cloroplastos é degradado pela APX ligada à membrana dos tilacóides (Noctor & Foyer, 1998). Segundo estes autores, as moléculas de O₂⁻ e H₂O₂, que escapam da oxidação nos tilacóides, serão oxidadas no estroma pela SOD e APX, respectivamente.

A atividade da APX em *Alyssum maritimum* e *Alyssum argenteum* não foi induzida pela elevação da concentração de Cd nos meios de cultivo (Schickler & Caspi, 1999), podendo esta atividade da enzima ter sido compensada por alguma outra peroxidase. Em níveis mais baixos de Cd em solução nutritiva, a atividade da APX foi crescente em raízes de *Populus canescens*, sendo reduzida a níveis mais elevados do metal, como consequência do aumento das concentrações de H₂O₂ (Schützendübel & Polle, 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais

O experimento foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras (UFLA), no município de Lavras, na região sul do estado de Minas Gerais, a 918 m de altitude, latitude 21°14'S e longitude 45°00'W GRW.

As espécies estudadas neste trabalho foram selecionadas em função de sua capacidade de tolerância aos metais pesados, a partir de estudos com solo multicontaminado desenvolvidos no Departamento de Ciência do Solo. As espécies *Eucalyptus camaldulensis* (Accioly, 2004) e *Pfaffia* sp. (Carneiro *et al.*, 2002) apresentam potencial para a revegetação de locais contaminados por metais pesados. Entretanto, a *Pfaffia* sp. é uma espécie que ocorre naturalmente em áreas de mineração e, de acordo com Watanabe (1997), a vegetação encontrada em áreas contaminadas representa importante fonte potencial de ecótipos tolerantes à poluição, apresentando adaptada ao ambiente estressante.

Foram realizados dois experimentos, sendo cada um com uma espécie diferente e em diferentes épocas. No primeiro experimento (**Experimento I**), a espécie estudada foi a *Pfaffia glomerata* (Sprengel) Pedersen, cujas sementes foram obtidas do Horto de Plantas Medicinais (HPM) do Núcleo Experimental de Ciências Agrárias (NCA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). As sementes foram colocadas para germinar em bandejas de isopor com 60 células, contendo Plantmax, fazendo-se o desbaste sempre que necessário, a fim de deixar apenas uma planta por célula da bandeja, onde permaneceram por 50 dias.

No segundo experimento (**Experimento II**), foram avaliadas as respostas fisiológicas e anatômicas de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh.

submetida a diferentes níveis de Cd em solução nutritiva. Para a obtenção de mudas de *Eucalyptus camaldulensis*, sementes foram fornecidas pelo Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Ciências Florestais da UFPA. As mudas foram produzidas a partir de sementes, colocadas para germinar em bandejas contendo vermiculita (Plantmax), onde permaneceram por 45 dias. No final deste período, as mudas de *E. camaldulensis* foram transplantadas para tubetes individuais, permanecendo até os 100 dias.

Após o período de obtenção de mudas de *P. glomerata* e *E. camaldulensis*, estas foram selecionadas quanto à altura e ao vigor, para que cada tratamento ficasse com o mesmo padrão de desenvolvimento. Em seguida, as plantas foram transferidas para bandejas de 30 L contendo solução nutritiva de Clark (Clark, 1975) (Tabela 1) com $\frac{1}{4}$ da força iônica, com aeração constante. Após uma semana, estas plantas receberam solução nutritiva com $\frac{1}{2}$ da força iônica, permanecendo por mais uma semana antes de receberem a solução nutritiva definitiva com a força iônica total, para, então, serem aplicados os tratamentos. Estes tratamentos consistiram da aplicação de doses crescentes de Cd (0, 15, 25, 45 e 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$), utilizando o CdSO_4 como fonte de Cd. As plantas foram mantidas em exposição aos metais durante 20 dias. Diariamente, foi completado o volume da solução com água destilada, correspondente ao perdido por evapotranspiração. Semanalmente, a solução dos vasos foi trocada e o pH ajustado em 5,5, pela adição de NaOH ou HCl 0,1N.

TABELA 1 Fontes, solução estoque e composição final das soluções nutritivas utilizadas para o crescimento de *P. glomerata* e *E. camaldulensis* em concentrações crescentes de Cd.

Fonte/solução estoque	mL L⁻¹	Concentração
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O 1 mol.L ⁻¹	2,53	2,53 mmol Ca L ⁻¹ 5,06 mmol N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹
NH ₄ NO ₃ 1 mol.L ⁻¹	0,90	0,90 mmol N-NH ₄ ⁺ L ⁻¹ 0,90 mmol N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹
KNO ₃ 1 mol.L ⁻¹	1,30	1,30 mmol N-NO ₃ ⁻ L ⁻¹ 1,30 mmol K L ⁻¹
KCL 1 mol.L ⁻¹	0,50	0,50 mmol. K L ⁻¹ 0,50 mmol Cl L ⁻¹
Ca(H ₂ PO ₄) ₂ .H ₂ O 23 mmol.L ⁻¹	1,50	0,03 mmol Ca L ⁻¹ 0,07 mmol P L ⁻¹
MgSO ₄ .7H ₂ O 1 mol.L ⁻¹	0,50	0,50 mmol Mg L ⁻¹ 0,50 Mmol S L ⁻¹
MgCl ₂ 0,1 mol.L ⁻¹	1,00	0,10 mmol Mg L ⁻¹ 0,20 mmol Cl L ⁻¹
MnCl ₂ .4H ₂ O 7 mmol.L ⁻¹		7,00 μ mol Mn L ⁻¹
H ₃ BO ₃ 19 mmol.L ⁻¹		19,0 μ mol B L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O 2 mmol.L ⁻¹	1,00	2,00 μ mol Zn L ⁻¹
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O 0,086 mmol.L ⁻¹		0,60 μ mol Mo L ⁻¹
CuSO ₄ .5H ₂ O 0,5 mmol.L ⁻¹		0,50 μ mol Cu L ⁻¹
FeCl ₃ 38 mmol.L ⁻¹ + EDTA	1,00	38,0 μ mol Fe L ⁻¹

A duração do experimento foi de 20 dias após indução dos tratamentos (DAT), sendo realizadas 3 avaliações nas datas 1, 12 e 20 DAT. Nestas datas foram determinados os teores de clorofila e carotenóides, o potencial hídrico e a

peroxidação dos lipídios nos dois experimentos. Os teores de Cd e nutrientes, distribuição de matéria seca e as avaliações anatômicas foram determinados ao final do experimento, também para as duas espécies. Além das determinações já citadas, para a *P. Glomerata*, avaliou-se também a atividade das enzimas do sistema antioxidativo e, para o *E.camaldulensis*, foi determinada a eficiência do fotossistema II e realizados estudos anatômicos em cortes transversais e paradérmicos de folhas. Foram observados, em ambos os experimentos, ao 16º DAT, sintomas visuais que foram registrandos em fotografias. Num total de 96 vasos por experimento, sendo quatro repetições por tratamento, foram montados vasos de 1 L contendo solução nutritiva de Clark, sendo uma planta por vaso como a unidade experimental.

3.2 Características avaliadas

3.2.1 Matéria seca

Apenas ao final do experimento (20 DAT) determinou-se a produção de matéria seca para ambas as espécies, coletando-se três repetições de cada tratamento e separando-se as plantas em raízes e parte aérea, que foram, então, colocadas em sacos de papel e levadas à estufa com circulação constante de ar, a 70°C, até massa constante para a determinação da matéria seca.

3.2.2 Teor de clorofila

Os níveis de Cd estudados para as avaliações dos pigmentos nas duas espécies foram: controle, 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Para cada data de coleta do experimento (1, 12 e 20 DAT) foi coletada uma folha completamente expandida por vaso, sendo três repetições, localizadas entre o ápice e o meio da planta, sendo imediatamente acondicionadas em papel de alumínio e colocadas em caixa de isopor com gelo, para a quantificação dos pigmentos e da atividade de

enzimas. A quantificação das clorofilas *a*, *b* e total foi realizada segundo Arnon (1949).

3.2.3 Teor de carotenóide

As coletas das folhas e determinação dos níveis de Cd para a definição dos teores de carotenóides foram feitas como para a determinação dos teores de clorofila, nas duas espécies. A extração e a quantificação foram realizadas de acordo com Duke & Kenyon (1986), com algumas modificações.

Uma amostra de 400 mg de folhas foi macerada em 10 mL de KOH em metanol (6% w/v) e, em seguida, centrifugada, a 5.000 g. por 5 minutos, sendo o sobrenadante depositado num funil de separação. Foram adicionados também ao funil de separação 3mL de éter de petróleo, com agitação vigorosa. A epifase foi coletada (após ± 15 minutos) com o auxílio de uma pipeta automática e ao extrato foi adicionado, por mais duas vezes, o éter de petróleo. Após completar o volume final da fase etária, procedeu-se à leitura espectrofotométrica do β -caroteno a 445 nm.

Os teores do β -caroteno foram quantificados utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar 2500 (Sandmann & Börger, 1983).

3.2.4 Potencial hídrico

O estado hídrico das duas espécies estudadas foi avaliado por meio de medidas do potencial hídrico de base (Ψ_w máximo), realizados com auxílio de uma câmara de pressão (Soil Moisture – Modelo 3005), em folhas completamente expandidas do 3º ou 4º nó. As avaliações foram realizadas em uma folha de cada repetição, sendo quatro repetições por tratamento. As avaliações foram realizadas de acordo com as épocas de coleta e as doses de Cd já citadas para os pigmentos, sempre antes do amanhecer.

3.2.5 Teores de Cd e o dos nutrientes

Após a determinação da matéria seca de ambas as espécies, estas foram moídas em moinho tipo Wiley equipado com peneira com malha de 0,38 mm para a digestão nitroperclórica e posterior análise dos teores de P, K, Ca, Mg, S, Cu, Fe, Mn, Zn e Cd (Silva, 1999). Nitrogênio foi extraído por digestão pelo método de Kjeldahl.

O N oriundo da digestão Kjeldahl do material vegetal foi dosado por titulação. Os elementos Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn e Cd da digestão nitroperclórica do material vegetal foram determinados por espectrometria de absorção atômica; o P foi determinado por colorimetria pelo método do fosfo-molibdato; o K por fotometria de chama e o S da digestão nitroperclórica do material vegetal foi mensurado por turbidimetria (Malavolta et al., 1989).

3.2.6 Peroxidação de lipídeos

Folhas completamente expandidas do 3º ou 4º nó e pontas de raízes das duas espécies estudadas foram colhidas de três repetições de cada tratamento e imediatamente envolvidas em papel alumínio e acondicionadas no gelo, para a determinação da peroxidação de lipídeos. As datas de coletas (1, 12 e 20 DAT) e níveis de Cd (0, 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$) são aquelas já mencionadas anteriormente.

A peroxidação de lipídeos foi avaliada a partir da produção de metabólitos reativos a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), principalmente malondialdeído (MDA), baseado nos trabalhos de Heath & Packer (1968) e Buege & Aust (1978). Amostras de 200 mg de tecido foliar e radicular foram maceradas com 5 mL de TCA (0,1%). Após completa homogeneização, 1,4 mL do homogeneizado foi transferido para o tubo de Eppendorf para ser centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos.

Do sobrenadante foi retirada uma alíquota de 0,5 mL, à qual foram adicionados 2 mL de TCA 20 % contendo 0,5 % de TBA. A mistura foi deixada

em banho-maria, a 95°C, por 30 minutos e resfriada em gelo logo em seguida, por 10 minutos. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade do MDA foi expressa em nmol g⁻¹ de tecido fresco.

3.2.7 Atividade de enzimas antioxidantes

As coletas para a determinação das atividades enzimáticas foram realizadas em *P. glomerata* no 1, 12 e 20 DAT e nos níveis de contaminação por Cd de 0, 45 e 90 µmol L⁻¹.

3.2.7.1 Extração protéica

Para o desenvolvimento da pesquisa foi necessário utilizar métodos que otimizassem a atividade das enzimas antioxidantes em *P. glomerata* submetidas ao estresse ao Cd. Para isso, a extração do material vegetal foi feita com 200 mg de tecido fresco das raízes e folhas maceradas, adicionando-se 800 µL de tampão de extração contendo: tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8; EDTA 100 mM e L-ácido ascórbico 1 mM. De cada tratamento, foram coletadas três plantas para a determinação da extração protéica, sendo utilizadas folhas completamente expandidas, coletadas do 3° ou 4° nó e ponta de raízes (± 3 cm a partir do ápice), que foram envolvidas em papel alumínio e colocadas no gelo, sendo coletadas no 1°, 12° e 20° DAT.

3.2.7.2 Teor protéico

O teor protéico foi analisado pelo método de Bradford (1976).

3.2.7.3 Atividade da catalase

A atividade da catalase (CAT) (EC 1.11.1.6) foi determinada de acordo com o método descrito por Kraus et al. (1995), com algumas modificações, conforme Azevedo et al. (1998). A CAT foi determinada por espectrofotometria

a 28°C, em uma mistura de reação final de 2 mL, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 12,5 mM e água. A reação foi iniciada pela adição de 30 µL do extrato e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de H₂O₂, por 1,5 minutos em intervalos de 10 segundos, por meio das alterações na absorbância a 240 nm, com um coeficiente de extinção molar de 0,0394 mM⁻¹ cm⁻¹. Os resultados foram expressos em µmol de H₂O₂ consumido por minuto e por mg proteína.

3.2.7.4 Atividade da ascorbato peroxidase

Para a atividade da ascorbato peroxidase (APX) (EC 1.11.1.11), a metodologia empregada foi de acordo com Nakano &

Asada (1981), estimando-se a taxa de oxidação do ascorbato (coeficiente de extinção de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹). O meio de reação foi incubado a 28°C, contendo o composto de tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,1 mM, L-ácido ascórbico 0,5 mM, água destilada e 30 µL do extrato protéico, com o volume final de tampão de incubação de 2 mL. A taxa de oxidação do ascorbato foi monitorada a 290 nm, durante 3 minutos, a cada 15 segundos e a atividade da enzima expressa em µmol de ascorbato oxidado mg proteína⁻¹ min⁻¹.

3.2.7.5 Atividade da guaiacol peroxidase

A atividade da guaiacol peroxidase (GPX) (EC 1.11.1.7) foi determinada segundo Souza & MacAdam (1998), observando-se a formação de tetraguaiacol à temperatura de 28°C. O meio de reação tendo como volume final 2 mL foi composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), guaiacol 3,5 mM, água destilada e 10 µL do extrato protéico. O aumento da absorbância devido à oxidação do guaiacol (coeficiente de extinção de 26,6 mM⁻¹ cm⁻¹) foi monitorado a 470 nm, durante 1 minuto e a cada

10 segundos. A atividade da enzima foi expressa em μmol de H_2O_2 degradado por minuto e por mg de proteína.

3.2.7.6 Atividade da glutathione redutase

A atividade da glutathione redutase (GR) (EC 1.6.4.2) foi determinada como descrito por Cakmak et al. (1991), monitorando-se a taxa de oxidação do NADPH com decréscimo na absorbância a 340 nm. O meio de reação foi incubado a 28°C, contendo o composto de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), glutathione oxidada (GSSG) 1 mM, NADPH 0,075 mM, água destilada e 30 μL do extrato protéico. Para o cálculo da atividade da GR, foi utilizado o coeficiente de extinção $6,2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, monitorado a 340 nm, durante 3 minutos e a cada 15 segundos. A atividade da enzima foi expressa em μmol de GSSG reduzido por minuto e por mg de proteína.

3.2.7.7 Atividade da superóxido dismutase

A atividade da superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1) foi determinada segundo sua capacidade de inibir a redução fotoquímica do nitrobluetetrazolium (NBT), de acordo com a metodologia descrita por Beauchamp & Fridovich (1971). O meio de reação tendo 2 mL como volume final continha o tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1 μM , NBT 1 mM, riboflavina 2 μM e 50 μL do extrato protéico. A riboflavina foi adicionada no final. Os tubos de ensaio contendo as amostras e os tubos controle (sem amostras) foram colocados sob uma fonte de luz fluorescente de 20 W. A reação foi iniciada quando se ligou a luz, que permaneceu acesa por 10 minutos, finalizando a reação quando se desligou a fonte de luz. O tubo de ensaio para o branco foi mantido no escuro. A leitura da absorbância da solução foi feita a 560 nm. A atividade da SOD é a medida da redução do NBT na luz, sem a proteína menos a redução do NBT com a

proteína. Uma unidade da atividade é a quantidade de proteína requerida para inibir 50% da redução inicial do NBT sob a luz.

3.2.8 Avaliações anatômicas

A estrutura anatômica das folhas foi estudada no final do período experimental para as duas espécies e nos 5 níveis de Cd, em folhas totalmente expandidas (3° e 4° pares) e conservadas em álcool 70° GL. Os cortes transversais das seções foliares foram realizados com auxílio do micrótomo de mesa. As seções transversais foram clarificadas em solução a 1% de hipoclorito de sódio e, em seguida, lavadas em água destilada e coradas com o corante azul de astra-safranina. As lâminas foram montadas em água glicerinada 50% (Kraus & Arduin, 1997). As lâminas das seções transversais foram fotografadas com câmera digital, utilizando-se microscopia de luz.

Para as avaliações de caracterização dos estômatos, foram efetuados cortes paradérmicos nas superfícies abaxial e adaxial na região mediana das folhas, de acordo com Labouriau et al. (1961). As seções paradérmicas foram montadas entre lâmina e lamínula, diretamente com a solução corante (safranina 1% em água glicerinada 50%). Para a determinação das características dos estômatos (densidade estomática por mm² e diâmetro polar e equatorial, tanto para a superfície adaxial quanto para a superfície abaxial), os cortes paradérmicos foram fotografados com câmera digital ao microscópio. A partir das fotos, com auxílio do software Sigma Scan, foram realizadas as contagens de estômatos, das células epidérmicas por mm² e as medições dos diâmetros equatoriais e polares.

3.2.9 Eficiência fotoquímica do fotossistema II

A eficiência fotoquímica do FSII (Fv/Fm) foi avaliada em folhas expandidas de mudas de *E. Camaldulensis*, utilizando, para isso, o fluorômetro

portátil (Plant Efficiency Analyser – PEA) (Hansatech Instruments Ltd.). A razão F_v/F_m foi determinada após as folhas serem pré-condicionadas no escuro por 30 minutos, por meio da medição da fluorescência rápida *in vivo* ($F_v = F_m - F_o$, em que F_m =fluorescência máxima; F_v =fluorescência variável e F_o =fluorescência mínima). As medições foram feitas por vaso, contendo uma planta casa e em uma folha por planta, em cada data de coleta (1, 12 e 20 DAT) e nas doses de Cd de 0, 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$.

3.3 Análise dos dados

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, determinando-se também o coeficiente de variação (CV), pelo programa estatístico Sigma Plot. O erro padrão da média (EPM) foi também determinado para cada média estudada. Os dados de produção de matéria seca, dos teores dos nutrientes e do Cd na parte aérea e raízes foram analisados por meio de equações de regressão, podendo ser os ajustes lineares ou quadráticos, enquanto as médias das características anatômicas foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5%. Empregou-se Sigma Plot para as determinações das equações de regressão e o programa Sisvar para a comparação das médias anatômicas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento I: Respostas anatômicas e fisiológicas de *Pfaffia glomerata* submetida a doses crescentes de Cd em solução nutritiva

4.1.1 Matéria seca e sintomas visuais

O efeito das doses de Cd na produção de matéria seca pode ser observado na Figura 1. Verificou-se uma tendência na inibição do crescimento por meio de um decréscimo na produção de matéria seca da parte aérea em 28% e, na matéria seca das raízes, em 54%, no tratamento de maior dose do metal (90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$) em relação ao controle.

O efeito do Cd na razão da matéria seca entre as raízes e a parte aérea (R/PA) foi de 0,84 para o tratamento controle e de 0,49 para o tratamento de maior dose de Cd. O Cd é um elemento tóxico, capaz de reduzir a R/PA como resposta do efeito de fitotoxidez (Barceló & Poschenrieder, 1990).

O decréscimo na produção da matéria seca das raízes de *P. glomerata* pode ser confirmado por meio de observações visuais de toxidez, observando-se redução no comprimento e no volume radicular (Figura 2). Na parte aérea, as folhas apresentaram, como sintoma visual, redução no tamanho do limbo foliar, murcha e algum amarelecimento, com o aumento das doses de Cd (Figura 3).

Em plantas de ervilha, as raízes foram menos afetadas pela toxidez de Cd do que a parte aérea (Sandalo et al., 2001). De acordo com Barceló et al. (1988), a menor sensibilidade das raízes ao Cd poderia ser explicada pela capacidade desse órgão de acumular o metal em sua forma não ativa. A maioria das espécies acumula o Cd nas raízes, não o transportando para a parte aérea. O desequilíbrio nutricional causado pelo Cd causou sintomas visuais de toxidez similares à clorose férrica em plantas de trigo (Ouzounidou et al., 1997).

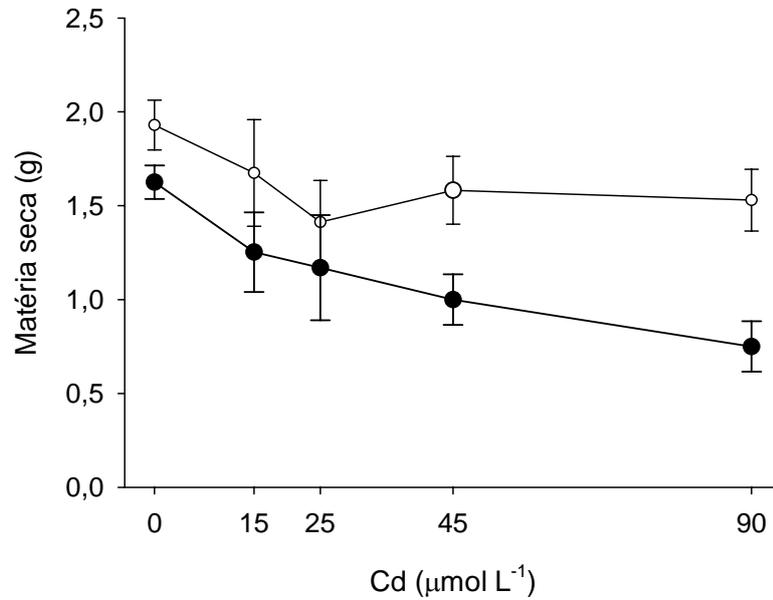


FIGURA 1 Produção de matéria seca de raízes (●) e parte aérea (○) de *P. glomerata* submetida a doses de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três repetições.

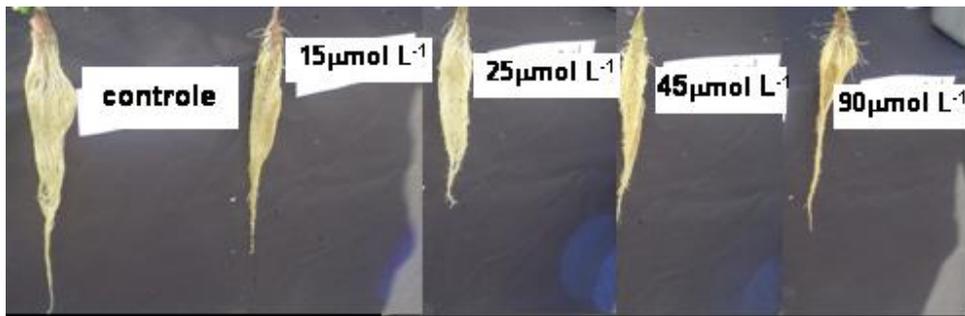


FIGURA 2 Sistema radicular de *P. glomerata* aos 16 dias após indução do tratamento (DAT), na presença de doses de Cd, em solução nutritiva.



FIGURA 3 Parte aérea de *P. glomerata* aos 16 dias após indução do tratamento (DAT), na presença de doses de Cd, em solução nutritiva.

4.1.2 Teores de pigmentos

O tempo de exposição ao metal e o aumento dos níveis de Cd em solução nutritiva afetaram a razão clorofila a/b e o teor de clorofila total (Figura 4A e B). Nas doses de 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, o efeito do Cd na razão clorofila a/b (Figura 4A) foi verificado no 1º e 20º DAT, por afetar mais a clorofila *a* do que a *b* e, aos 12 DAT, foi verificado maior efeito do Cd na clorofila *b*. As maiores variações na razão clorofila a/b foram verificadas aos 12 DAT e na dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e também aos 20 DAT e na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, com aumento de 56% e redução de 84%, respectivamente, em relação ao seu controle. No maior tempo de exposição ao Cd e na dose mais elevada do metal, a clorofila *a* mostrou-se mais sensível do que a clorofila *b*. De acordo com estes resultados, pode-se ressaltar que há um comprometimento da eficiência da captação de

energia do fotossistema II e redução do transporte de elétrons (Küpper et al., 2002), comprometendo o bom funcionamento do aparato fotossintético.

O efeito das doses de Cd nos teores de clorofila total pode ser verificado na Figura 4B. Na dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, verificou-se elevada redução no teor total de clorofila aos 12 DAT e ligeiro aumento nas outras datas. Na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, verificou-se que, no 1º DAT, o teor total de clorofila aumentou pouco em relação ao seu controle, enquanto, nas datas seguintes, houve redução da clorofila total. Na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, quando os sintomas de toxidez foram mais severos, o teor total de clorofila foi reduzido em 56% aos 12 DAT e em 23% aos 20 DAT, em relação ao controle. A redução do teor de clorofila na presença do Cd tem sido explicada pelo fato de este interferir na biossíntese do pigmento, inibindo a formação do ácido δ -aminolevulínico (ALA) e também por meio da inibição da redutase do protoclorofilídio, a enzima chave da fototransformação do protoclorofilídio-clorofilídio (Stobart et al., 1985).

O efeito do Cd nos pigmentos pode também causar variações na permeabilidade da membrana e na ultra-estrutura do cloroplasto, levando à peroxidação dos lipídeos e, conseqüentemente, alterando as atividades das peroxidases e, até mesmo, causando redução de outros antioxidantes, como, por exemplo, os carotenóides, responsáveis por ajudar na diminuição dos danos oxidativos (Somashekaraiah et al., 1992).

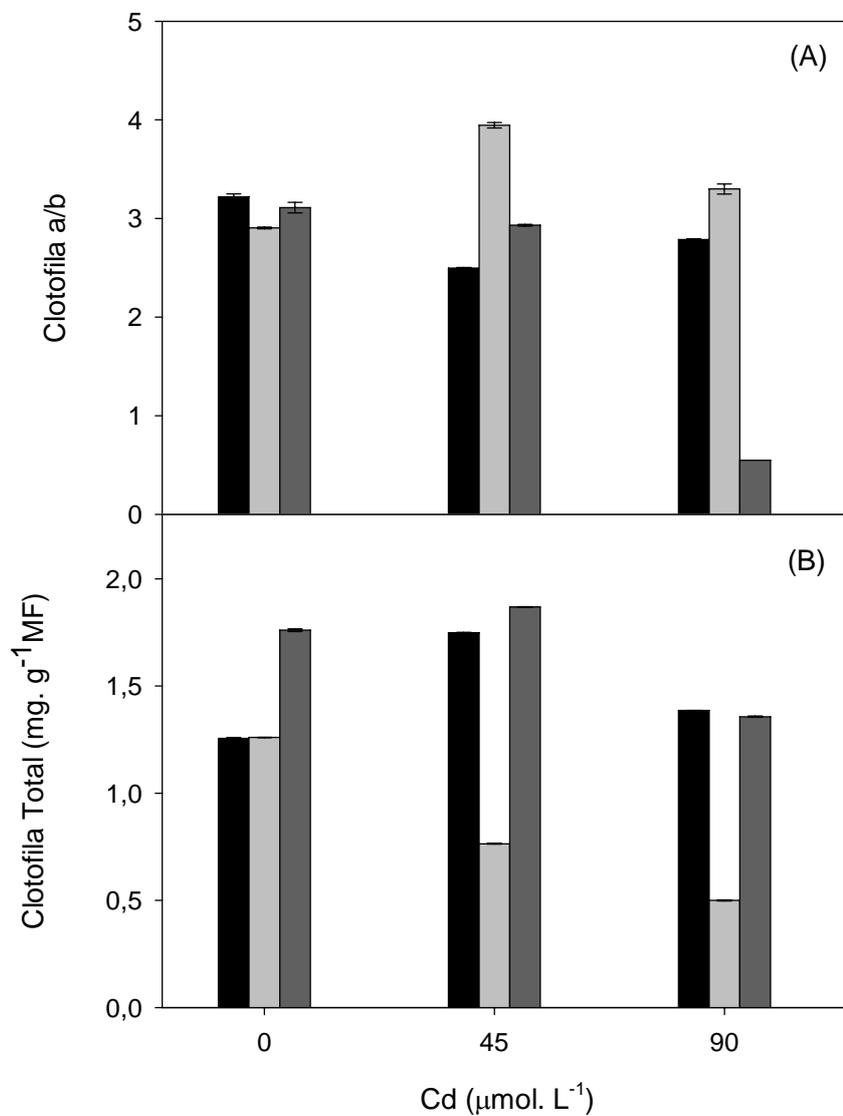


FIGURA 4 Relação de clorofila *a/b* (A) e teores de clorofila total (B) em plantas de *P. glomerata*, no 1° (■), 12° (◻) e 20° (◼) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias \pm erro padrão de três repetições.

No presente estudo, as doses de Cd causaram redução nos teores de carotenóides com o decorrer do tempo de exposição, em relação ao seu controle (Figura 5). Na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, observou-se ligeiro aumento nos teores de carotenóides aos 12 e 20 DAT, em relação à dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Como os carotenóides são considerados agentes de defesa antioxidativa da planta, esta parece ter aumentado o teor do pigmento, a fim de aumentar a sua tolerância ao metal.

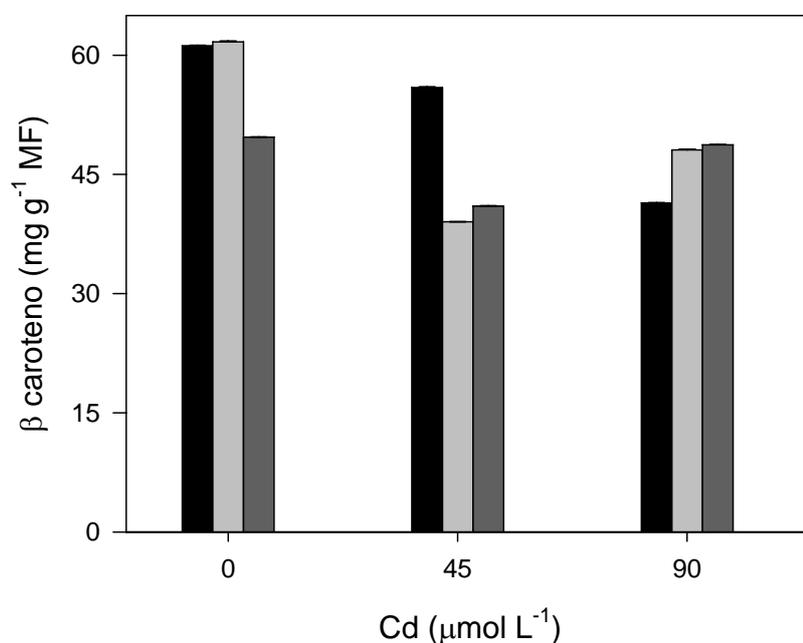


FIGURA 5 Teores de carotenóides (mg g^{-1} MF) em folhas de *P. glomerata*, no 1º (■), 12º (◻) e 20º (◼) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias \pm erro padrão de três repetições.

Em *Bacopa monnieri*, a presença de 100 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ reduziu ligeiramente o teor de carotenóides com o tempo de exposição ao metal (Mishra et al., 2006). Segundo estes autores, os carotenóides servem como proteção da

planta contra radicais livres que causam danos fotossintéticos. Logo, um menor aumento nos teores de carotenóides pode implicar numa suposta função destes contra o estresse oxidativo.

4.1.3 Potencial hídrico

O potencial hídrico da *P. glomerata* nas diferentes doses e datas de coleta do material é apresentado na Figura 6. Os valores de potencial hídrico encontrados para os tratamentos que receberam o Cd foram menores do que no tratamento controle, para todas as datas estudadas. Segundo Barceló & Poschenrieder (1986), a exposição das plantas aos metais pesados, especialmente ao Cd, é conhecida por deteriorar a condição hídrica da plantas. Aos 12 e 20 DAT, o potencial hídrico foi menor na concentração de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, tendo, no 1º DAT, a pressão da água na planta sido igual nas doses de 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Ainda no 1º DAT, foi possível observar que as plantas apresentaram-se mais túrgidas, mesmo aquelas do tratamento controle. O menor potencial hídrico observado com o aumento da concentração do metal e com o tempo de exposição pode ser verificado também por meio dos sintomas visuais, como a murcha, o encurvamento do pecíolo e queda de folhas (Figura 3).

Em diferentes populações de *Silene cucubalus*, o efeito de doses elevadas de Cu causou redução no teor de água naquelas plantas mais sensíveis ao metal, enquanto na população mais tolerante ao Cu nenhum efeito foi verificado no teor de água na planta, com o decorrer do tempo (Lolkema & Voojs, 1986). Outras espécies também têm mostrado alguma alteração no balanço hídrico, na presença de metal pesado. Em folhas de crisântemo, o potencial hídrico respondeu com pouca variação a presença do Cd, após dois dias de exposição. Porém, no final do experimento (49 dias), o tratamento com o metal apresentou valor de potencial hídrico 300% menor do que o controle e as plantas tiveram também a pressão de turgor e a taxa de transpiração reduzidas e

a resistência estomática aumentada, tudo isso fazendo com que a planta murchasse (Kirkham, 1978). Redução na taxa de transpiração e no uso eficiente de água com o aumento das doses de Cd foi observada em plantas de ervilha (Sandalo et al., 2001) crescidas durante 28 dias em solução nutritiva. De acordo com estes autores, o metal pesado pode afetar o movimento de água na planta, reduzindo o tamanho e o número de vasos de xilema e, ainda, alterando o balanço de hormônios.

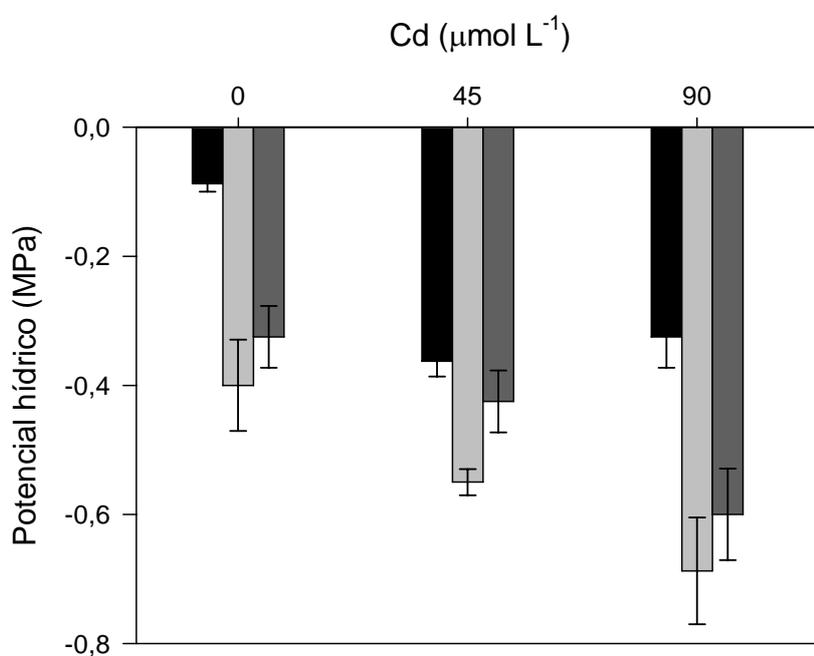


FIGURA 6 Potencial hídrico total (MPa) de plantas de *P. glomerata*, no 1^o (■), 12^o (▨) e 20^o (■) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias±erro padrão de três repetições.

4.1.4 Teores de Cd e o estado nutricional

As concentrações do metal nos tecidos da planta foram crescentes com o aumento das doses do Cd em solução nutritiva (Figura 7). A quantidade máxima

de metal acumulado na planta ficou distribuída com, aproximadamente, 84% para as raízes e apenas 16% para a parte aérea. Entretanto, vale a pena ressaltar que a quantidade de Cd encontrada na parte aérea de *P. glomerata* após a dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ sob condições hidropônicas, está de acordo com a faixa encontrada em *Brassica napus* crescida em um solo contaminado reconstituído (100 mg Cd kg^{-1} MS).

As espécies *Brassica napus* e *Thlaspi caerulescens* são conhecidas por seus potenciais de hiperacumuladora de Cd, acumulando em seus tecidos foliares concentrações superiores a 100 mg Cd kg^{-1} MS. Tal concentração foi também encontrada em *P. glomerata* nos tratamentos de 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (186 e 238 mg kg^{-1}), respectivamente, sem que maiores danos visuais fossem observados, principalmente na dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$.

Segundo Baker (1981), uma das maneiras da planta tolerar algum metal tóxico em seus tecidos é evitar a translocação deste para a parte aérea. De acordo com a literatura, pouco se sabe a respeito da translocação diferencial de um metal pesado pela planta e também dos diferentes transportadores que estão envolvidos na passagem deste metal para o interior do xilema e, finalmente, sua distribuição para a parte aérea (Sandalio et al., 2001). O Cd pode acumular no apoplasto das raízes por meio das interações iônicas com os grupos carboxil e ou sulfidril, a partir de componentes de parede celular ou, ainda, parte do metal pode ser complexada pelas fitoquelatinas e, posteriormente, ser seqüestrada no vacúolo (Cobbett, 2000; Prasad, 1995).

Nas raízes, a quantidade máxima acumulada de Cd foi de 1.223 mg. kg^{-1} no tratamento de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, depois de 20 dias de exposição, indicando ser este o órgão acumulador do Cd. De acordo com Hall (2002), o maior acúmulo de Cd nos tecidos radiculares pode servir como estratégia da planta para tolerar o metal, imobilizando-o nas paredes celulares ou adsorvendo-o pelos carboidratos extracelulares.

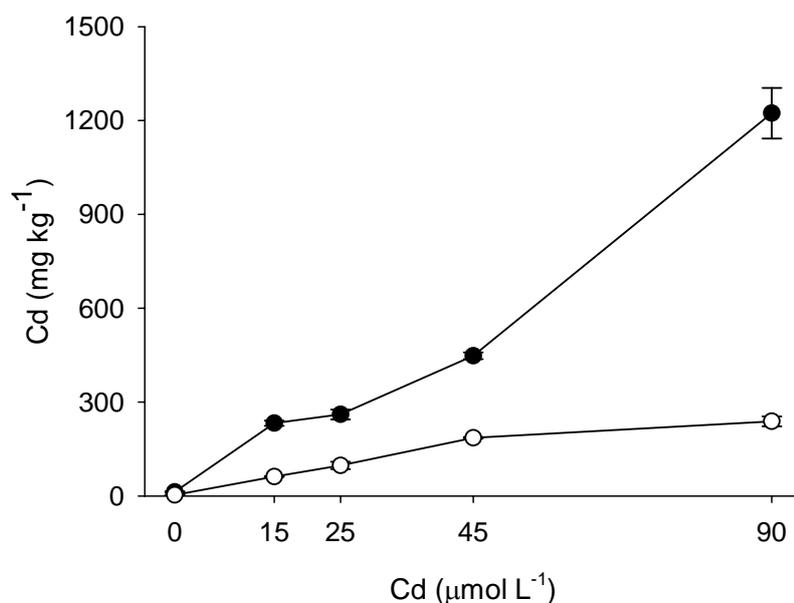


FIGURA 7 Teores de Cd (mg kg^{-1}) nas raízes (●) e parte aérea (○) de *P. glomerata* submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três repetições.

O estado nutricional das raízes e da parte aérea foi alterado pela presença do Cd em solução nutritiva, sendo os macronutrientes afetados principalmente nas doses mais elevadas do metal, 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Figura 8). No geral, Cd tem mostrado interferir na absorção, no transporte e no metabolismo de vários nutrientes (Ca, Mg, P e K) e também no transporte da água nas plantas (Das et al., 1997). Para a espécie estudada, o teor de N nas raízes reduziu a partir da dose de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. O teor de N na parte aérea teve o seu ponto máximo (49 g kg^{-1}) no tratamento de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, tendo, no tratamento de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, o teor de N sido inferior (34 g kg^{-1}) ao tratamento controle (41 g kg^{-1}). Em plantas de arroz tratadas com Cd, o teor de N, tanto nas

raízes quanto na parte aérea, foi também reduzido (Hasson et al., 2005), como verificado em *P. glomerata*. Neste trabalho, também se verificou que a toxidez de Cd foi mais severa em plantas que utilizaram o NO_3^- como fonte de N do que naquelas tratadas com NH_4^+ . A fonte utilizada para o N foi o NH_4NO_3 , sugerindo, de acordo com Hassan et al. (2005), que o efeito do Cd poderia ter sido menor se o suprimento do N fosse feito apenas com o NH_4^+ , indicando a ocorrência de um efeito antagônico entre o Cd e o N- NH_4^+ e um efeito sinérgico entre o Cd e o N- NO_3^- . Cádmio reduziu também a absorção de nitrato e seu transporte das raízes para a parte aérea, o que pode também ser atribuído à inibição da atividade da nitrato redutase na parte aérea, como verificado por Hernández et al. (1996).

O teor de P na parte aérea resultou o valor máximo no tratamento de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (4 g kg^{-1}), enquanto, para as raízes, o máximo foi observado no tratamento com 15 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (2,3 g kg^{-1}), sem muita alteração nos valores para os demais tratamentos (Figura 8). Em uma espécie hiperacumuladora do metal Zn, os teores de P em todas as partes da planta foram aumentados até a dose de 400 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Yang et al., 2004), dose esta bem superior à do presente estudo. Em espécies mais sensíveis ao Cd, como os girassóis, por exemplo, o teor de P foi reduzido na presença de Al, Cd e Zn (Saber et al., 1999). Possivelmente, esta redução pode estar relacionada à interação destes íons com PO_4^- nas raízes ou, ainda, como resultado da redução da taxa transpiratória, provocando a queda na energia requerida para a absorção ativa do P (Saber et al., 1999).

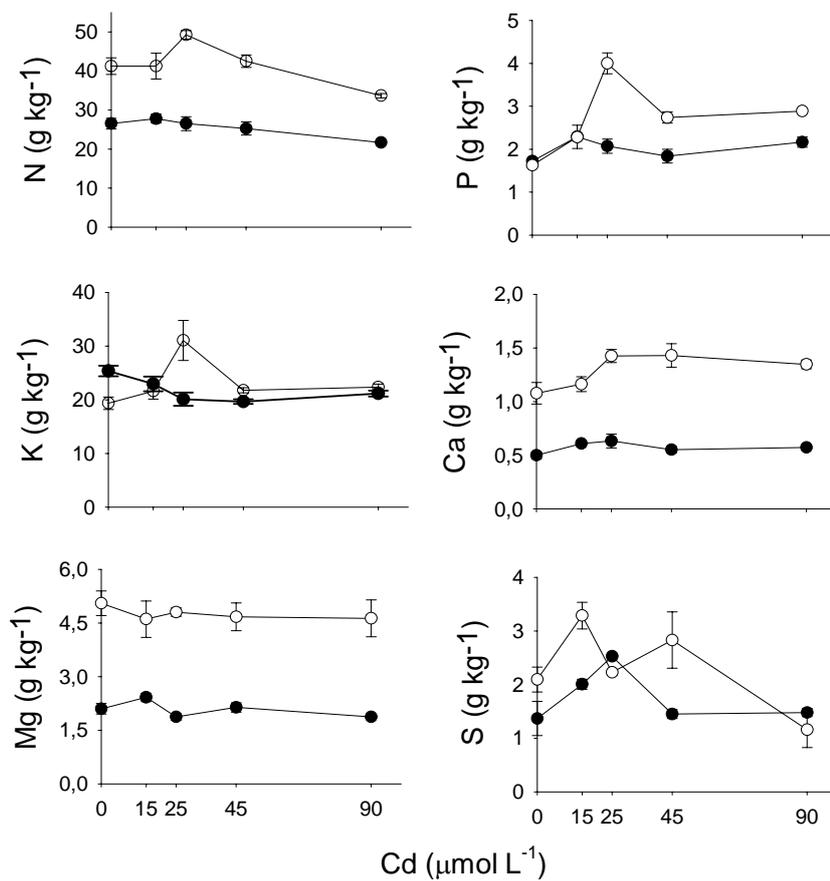


FIGURA 8 Teores de macronutrientes (g kg⁻¹) nas raízes (●) e parte aérea (○) de *P. glomerata* submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média±erro padrão de três repetições.

A concentração do K nos tecidos radiculares foi decrescente até a dose de 45 μmol Cd L⁻¹, com ligeiro aumento no tratamento de maior dose do metal. Este aumento pode indicar um efeito de concentração do K em consequência da redução acentuada na produção da matéria seca da raiz com o aumento da dose do Cd. O efeito do Cd nos teores de K da parte aérea apresentou aumento apenas

na dose de $25 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Para os demais tratamentos, os teores de K foram iguais aos do controle. A toxidez de Cd também afetou os teores de P e K em plantas de ervilha (Sandalio et al., 2001). Estes autores encontraram redução na concentração dos nutrientes na parte aérea com o aumento do Cd em solução nutritiva, enquanto os teores desses elementos nas raízes foram reduzidos apenas nas doses mais elevadas do metal. Redução nos teores de K com a adição de Cd foi também verificada por Gussarsson et al. (1996). Segundo os autores, a redução do K pode ser devido à redução na atividade da ATPase, responsável pelo gradiente de próton necessário para a absorção do K^+ .

O efeito do Cd nos teores de Ca da parte aérea resultou num ligeiro aumento enquanto nas raízes os teores de Ca foram praticamente iguais ao controle em todos os tratamentos (Figura 8). Quanto aos teores de Mg, estes tiveram comportamento bastante semelhante ao do Ca. Ainda assim, observou-se que, no tratamento com $15 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, o teor de Mg nas raízes aumentou, seguido de uma queda e de posterior aumento na dose de $45 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Já na parte aérea, o Mg comportou-se de forma contrária ao observado para as raízes.

Isto sugere que o Mg tem grande influência do íon Cd^{2+} quanto à sua mobilidade na planta. Segundo Marschner (1995), a absorção de cátions polivalentes, como o Ca^{2+} e o Mg^{2+} , é bastante influenciada pela presença de outros cátions polivalentes. Metais pesados, como o Cd e Pb, competem com o Ca pelos canais de Ca, interferindo na absorção do Ca (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Resultados semelhantes ao do presente estudo, para as concentrações de Ca e Mg na planta, foram verificados por Sandalio et al. (2001) em plantas de ervilha. Como o Mg faz parte da molécula de clorofila, uma redução nos teores deste nutriente resultaria na deficiência da molécula na planta, causando a clorose nas folhas (Figura 4).

Nas raízes, os teores de S foram reduzidos a partir da dose de $45 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, permanecendo igual na dose superior do metal (Figura 8). Para a parte

aérea, observou-se maior redução nos teores de S apenas na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. A homeostase e a detoxificação dos metais Ag, Cd, Cu e Hg e do As estão relacionadas à capacidade de peptídeos e de proteínas quelarem tais elementos, que apresentam alta afinidade pelo grupo tiol (Ernst et al., 2008). O S possui efeito indireto na capacidade da espécie em tolerar certos metais como o Cd, pois este nutriente faz parte da composição química do aminoácido cisteína. Este aminoácido é o primeiro produto orgânico estável encontrado na rota da redução do SO_4^{2-} das plantas (Mengel & Kirkby, 1987), sendo requerida em grande quantidade para a síntese de fitoquelatinas, que são um dos compostos produzidos pelas plantas, responsáveis pela tolerância aos metais pesados (Steffens, 1990). A indução da síntese das fitoquelatinas, que são peptídeos de baixo peso molecular ricos em cisteínas, pelo Cd, foi observada em feijão (Oven et al., 2001), trigo (Stolt et al., 2003) e milho (Chassaing et al., 2001), entre outros.

Efeito do Cd em micronutrientes foram também observados (Figura 9). Os teores dos micronutrientes Cu, Fe e Zn foram maiores nos tecidos radiculares do que nos tecidos da parte aérea. Apenas para o Mn houve maior translocação do elemento para a parte aérea.

Os teores de Cu na parte aérea não variaram muito em relação ao seu controle, quando foram aumentando as doses de Cd em solução nutritiva (Figura 9). Nas raízes de *P. glomerata*, os teores de Cu foram crescentes até a dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, seguindo-se uma queda, para a dose de maior concentração de Cd estudada. Apesar da redução no teor de Cu no tratamento de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, este ainda foi superior ao teor de Cu do tratamento controle. Porém, pode-se observar, neste caso, um efeito de concentração do elemento nos tecidos da planta, pois a matéria seca produzida neste tratamento foi reduzida em relação ao seu controle. Como o Cu é um elemento que apresenta alta afinidade por peptídeos e pelo grupo sulfidril, em particular por proteínas ricas em cisteína

(Marschner, 1995), este elemento estaria relacionado ao metabolismo de tolerância das plantas aos metais pesados. Logo, a redução do Cu nas doses mais elevadas do Cd provocou redução na tolerância da *P. glomerata* ao estresse abiótico.

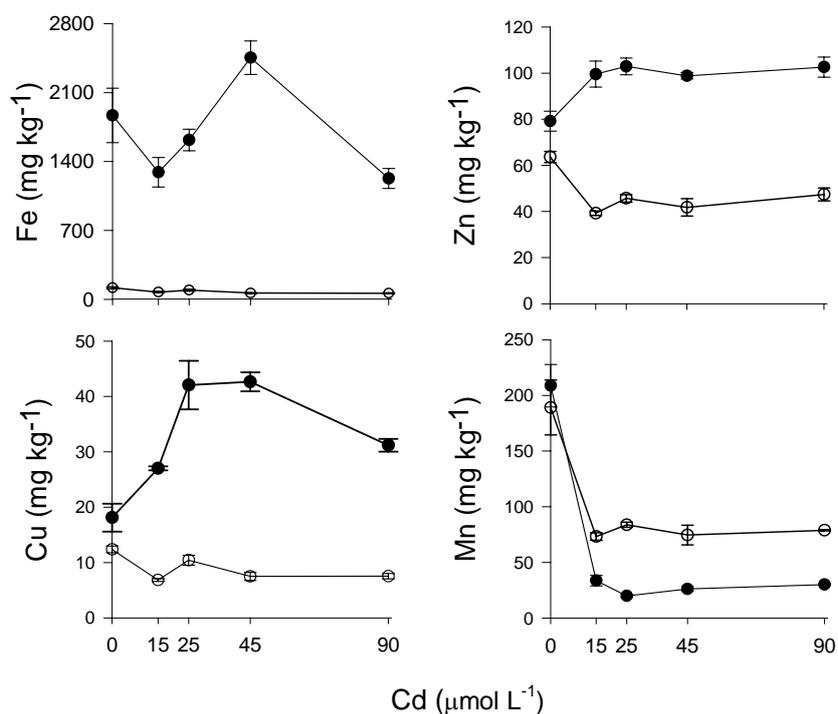


FIGURA 9 Teores de micronutrientes (mg kg^{-1}) na raízes (●) e parte aérea (○) de *P. glomerata* submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três repetições.

Nas raízes de *P. glomerata*, os teores de Fe foram bem maiores do que na parte aérea, sendo crescentes a partir de 15 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, tendo uma queda apenas no tratamento de maior dose do metal. Na parte aérea, estes teores pouco variaram, sugerindo que o Cd pode ter interferido na translocação do Fe para a parte aérea. O efeito do Cd nos teores de Fe tem mostrado resultados diferentes,

dependendo da espécie de planta e da condição experimental. A absorção e a translocação do Fe podem ser modificadas pela presença do Cd, pois há competição pelo mesmo transportador de Fe^{2+} da família IRT1, principalmente em condições de baixas concentrações de Fe em solução (Nakanishi et al., 2006). A deficiência de Fe induzida pelo Cd foi encontrada em *B. pendula* (Gussarsson et al., 1996) e ervilha (Sandalio et al., 2001), enquanto resultado oposto foi verificado por Chaoui et al. (1997), em plantas de feijão.

Hernández et al. (1998) também observaram o efeito do Cd na absorção do Fe em plantas de ervilha crescendo sob $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ do metal, resultando em um teor do micronutriente pouco afetado aos 10 dias após indução do experimento e um teor sendo reduzido após poucas horas de exposição, sugerindo alguma adaptação da espécie ou, ainda, um efeito de concentração. A deficiência do Fe induzida pela presença do Cd é responsável pelo sintoma visual de clorose observado no tratamento de $90 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Figura 4). O Fe tem importante função como componente de enzima presente na transferência de elétrons, tal como o citocromo, envolvidos na fotossíntese (Marschner, 1995), por isso causa a clorose como sintoma de deficiência.

A presença de Cd reduziu acentuadamente os teores de Mn nas raízes e na parte aérea, evidenciando o antagonismo entre Mn e Cd, porém, não impedindo a translocação do Mn para a parte aérea (Figura 9). No tratamento de $15 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, houve redução nos teores de Mn encontrados nas raízes e na parte aérea de, aproximadamente, 80% e 60%, respectivamente, em relação ao tratamento não contaminado. Para os demais tratamentos, os teores de Mn alteraram pouco. Redução no teor de Mn foi também observada na parte aérea de plantas de ervilha (Sandalio et al., 2001) e de *B. pendula* (Gussarsson et al., 1996), enquanto nas raízes de ervilha o Mn foi pouco afetado na presença de $50 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Sandalio et al., 2001) e não sofreu nenhuma alteração significativa em raízes de *B. pendula* (Gussarsson et al., 1996).

A toxidez por Cd afetou os teores de Zn, tanto na parte aérea quanto nas raízes (Figura 10). Nas raízes, houve aumento tanto nos teores de Zn quanto na presença do metal. Este aumento foi observado na dose de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd, mantendo-se sem grandes alterações até a dose maior do Cd. Na parte aérea, o efeito foi oposto ao das raízes, observando-se redução nos teores de Zn no tratamento de $15 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd, os quais se mantiveram sem grandes alterações até o tratamento de maior dose de Cd. Dessa forma, observa-se que a presença do Cd não limitou a absorção do Zn, porém, limitou sua translocação para a parte aérea. Em *B. pendula*, Gussarsson et al. (1996) observaram que a presença do Cd pouco alterou os teores de Zn, tanto nas raízes quanto na parte aérea.

De modo geral, o Cd interferiu na translocação dos micronutrientes das raízes para a parte aérea, com exceção do Mn, que teve o maior teor do elemento retido na parte aérea. Variações na atividade da H^+ - ATPase e na seletividade do transportador IRT1 são alguns dos fatores que podem interferir na translocação de um nutriente para a parte aérea, quanto o vegetal for submetido ao Cd (Fodor et al., 1995). A atividade da H^+ - ATPase em raízes de girassol e de trigo foi reduzida na presença de Cd, possivelmente devido a modificações nos constituintes de membrana (Fodor et al., 1995). Porém, em plantas de ervilha que apresentavam deficiência em Fe, a atividade da H^+ - ATPase não foi associada com o aumento do Cd acumulado nas raízes (Cohen et al., 1998).

O IRT1 é outro fator que interfere na translocação do Cd, sendo primeiramente identificado como um transportador de Fe (II), que também pode transportar Mn, Zn e Cd, estando sua seletividade ao íon dependente do pH da solução nutritiva (Korshunova et al., 1999). Em *Arabidopsis thaliana*, os nutrientes Fe e Zn (Rogers et al., 2000) e Mn (Korshunova et al., 1999) tiveram sua absorção reduzida devido ao excesso de Cd em solução, sugerindo que o IRT1 pode também transportar o Cd.

4.1.5 Estresse oxidativo induzido pelo Cd

Verificou-se aumento na peroxidação de lipídeos em folhas de *P. glomerata* na dose 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, a partir do 12º DAT, sendo este aumento bastante acentuado aos 20 DAT na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Figura 10A). Enquanto, nas raízes, desde o 1ºDAT, pôde-se observar um aumento nos teores de MDA produzidos, de maneira que, no tratamento de maior nível de Cd, a peroxidação de lipídeos alterou-se pouco entre as três datas estudadas (Figura 10B). Para o presente estudo, o dano de maior incidência foi verificado na membrana celular de folhas do tratamento de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e aos 20 de exposição ao Cd, sendo este cerca de 110% superior ao seu controle. Para as raízes, neste mesmo tratamento, o aumento foi de 86% em relação ao seu controle. Em *Bacopa monnieri*, uma espécie aquática, o aumento máximo de peroxidação de lipídeos de 183% foi verificado nas raízes na concentração de 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Singh et al., 2006).

As membranas celulares de plantas são, geralmente, consideradas como locais de injúria dos metais (Singh et al., 2006), causando peroxidação dos lipídeos. A peroxidação da membrana celular afeta severamente a funcionalidade e a integridade da membrana, podendo causar danos irreversíveis ao funcionamento da célula (Edreva, 2005). A peroxidação de lipídeos pode ser iniciada por meio da ativação de espécies de oxigênio, tais como o O_2^- , OH ou $^1\text{O}_2$, ou, ainda, pela ativação da lipogênase (Edreva, 2005). O Cd atua bloqueando o fluxo de elétrons do fotossistema II, levando à formação de clorofila excitada, causando a produção destes oxirradicais (Edreva, 2005). Um aumento nos teores de MDA das folhas e das raízes de *P. glomerata* expostas ao Cd no presente estudo indicou que o metal causou danos oxidativos à planta. De acordo com os resultados encontrados, a toxidez de Cd também induziu o estresse oxidativo em *P. glomerata*, assim como em *B. monnieri* (Mishra et al., 2006; Singh et al., 2006) e em cevada (Hegedüs et al., 2001).

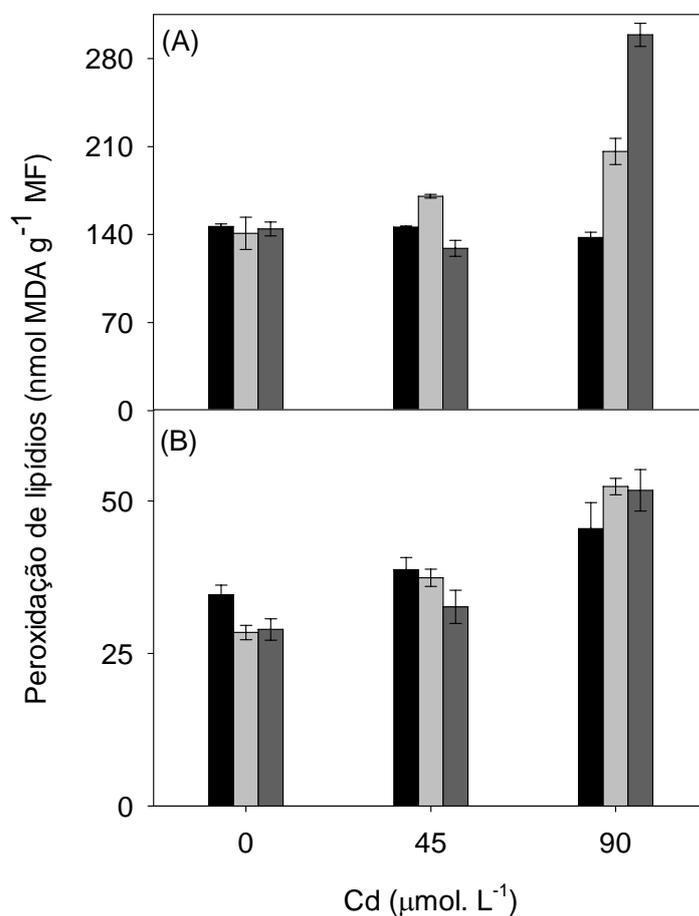


FIGURA 10 Peroxidação de lipídeos (nmol MDA g⁻¹ MF) em folhas (A) e raízes (B) de *P. glomerata*, no 1° (■), 12° (□) e 20° (■) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias±erro padrão de três repetições.

Vários mecanismos são utilizados pelas plantas para a detoxificação de EROs, sendo importante estabelecer se a exposição das plantas ao Cd está causando efeito prejudicial ou estimulatório às enzimas envolvidas nos processos de detoxificação. A presença de baixos níveis de EROs pode sugerir

respostas adaptativas, enquanto, em altas concentrações de Eros, danos mais severos são observados, iniciando a morte celular (Benavides et al., 2005).

Em experimentos envolvendo tolerância de plantas a estresse com Cd em solução nutritiva, tem-se observado aumento nas atividades de enzimas do sistema antioxidativo, relacionados aos aumentos nas concentrações de EROs (Vitória et al., 2001; Israr et al., 2006; Singh et al., 2006). A SOD é uma enzima que faz parte de um grupo responsável pela eliminação destes radicais livres formados. No presente trabalho, a atividade da SOD foi maior nas folhas do que nas raízes (Figura 11). Nas folhas, observou-se redução na atividade da SOD, no tratamento de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, para os tempos de exposição ao Cd de 12 e 20 DAT, em relação ao seu controle. Nas raízes, onde foram encontrados maiores teores de Cd, a atividade da SOD aumentou no tratamento de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ para todas as datas observadas, em relação ao seu controle. Porém, maiores atividades da SOD aos 20 DAT foram encontradas na dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. A redução ou o aumento da produção de H_2O_2 pela SOD, de acordo com os níveis de Cd e do tempo de exposição a este, relacionam-se bem com a peroxidação de lipídeos observada em *P. glomerata*, ou seja, a atividade das enzimas que eliminam o H_2O_2 produzido não foi suficiente para evitar a peroxidação no maior nível e tempo de exposição ao Cd.

Vários trabalhos na literatura examinando o efeito do Cd na atividade da SOD em plantas têm apresentado resultados contraditórios, embora em muitos deles tenha sido observada redução ou pouca variação na atividade da enzima (Benavides et al., 2005). Em plantas de *B. monnieri* cultivadas em solução nutritiva, a atividade da SOD foi maior nas raízes do que nas folhas, porém, houve redução na atividade da SOD em maiores concentrações de Cd, provavelmente devido ao aumento do nível do H_2O_2 e das EROs derivadas do estresse (Singh et al., 2006).

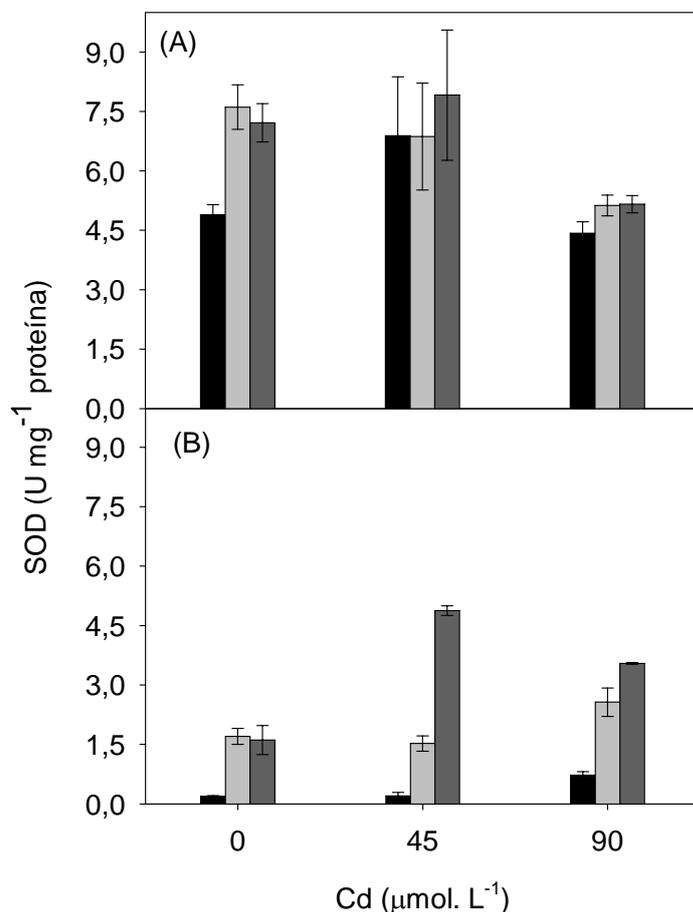


FIGURA 11 Atividade da SOD (U mg^{-1} proteína) em folhas (A) e raízes (B) de *P. glomerata*, no 1° (■), 12° (□) e 20° (▣) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias \pm erro padrão de três repetições.

A CAT, uma das enzimas responsáveis pela eliminação do H_2O_2 produzido, apresentou maior atividade nas folhas do que nas raízes (Figura 12). Para as folhas, observou-se pouco aumento na atividade da CAT na dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ em relação ao controle. Entretanto, o estresse ao Cd na dose de 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ do metal foi observado por aumentar a atividade da CAT no 1° DAT e

reduzi-la aos 12 e 20 DAT. O maior valor encontrado para a atividade da enzima foi observado no 1º DAT para o tratamento com de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, sendo este aumento de 64%.

Observou-se redução na atividade da CAT nas raízes com o aumento das doses de Cd, no 1º DAT (Figura 12B). Aos 12 e 20 DAT, a atividade da CAT diminuiu na dose de 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e aumentou na dose 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ comparada aos seus controles. Para as raízes, o tempo de exposição ao Cd induziu a atividade da CAT, diminuindo a quantidade de H_2O_2 produzida, podendo, assim, aumentar a tolerância da espécie à dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. No tratamento de maior dose do metal e aos 20 DAT, houve acréscimo na atividade da CAT de 35% em relação ao seu controle.

Em células de *P. glomerata*, o aumento da atividade da CAT nas folhas, em todas as concentrações do Cd, durante o período inicial de exposição ao metal (1º DAT), contradiz a alguns resultados obtidos em feijão (Chaoui, 1997), girassol (Gallego et al., 1999), ervilha (Sandalio et al., 2001) e tabaco (Gratão 2003), porém, está de acordo com os resultados em *Bacopa monnieri* (Singh et al., 2006; Mishra et al., 2006). Considerando que a CAT é diretamente regulada pelos níveis de H_2O_2 (Polidoros & Scandalio, 1999), a atividade aumentada no período inicial, em todas as concentrações, sugere que esta enzima atuou mais no início da exposição da planta ao Cd nas folhas, enquanto nas raízes os tratamentos de maiores estresses promoveram aumento na atividade da CAT.

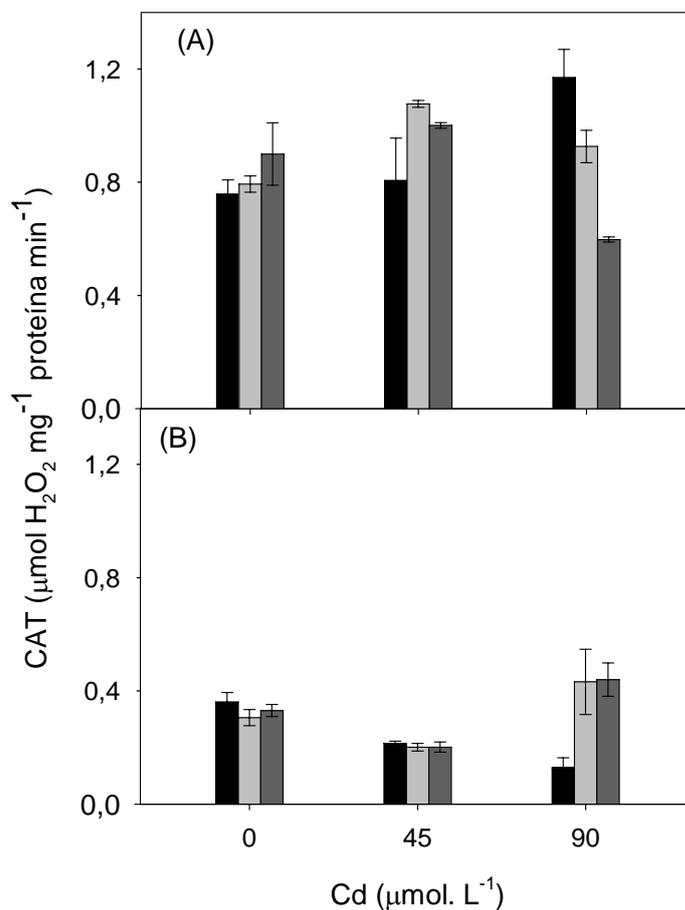


FIGURA 12 Atividade da CAT ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ mg}^{-1} \text{ prote\u00edna min}^{-1}$) em folhas (A) e ra\u00edzes (B) de *P. glomerata*, no 1^o (■), 12^o (◻) e 20^o (◼) DAT, submetidas a tr\u00eas doses de Cd, em solu\u00e7\u00e3o nutritiva. Todas as barras s\u00e3o m\u00e9dias \pm erro padr\u00e3o de tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es.

Ao contr\u00e1rio da CAT, a atividade da APX foi maior nas ra\u00edzes do que nas folhas (Figura 13). Embora, no controle, tenha sido observada alta atividade em rela\u00e7\u00e3o a muitas avalia\u00e7\u00f5es realizadas, tem-se que levar em considera\u00e7\u00e3o a atua\u00e7\u00e3o do Cd nos tratamentos contaminados, que pode vir a perturbar diversos processos metab\u00f3licos, induzindo o estresse oxidativo, al\u00e9m de ativar o sistema

de defesa da planta que levou à participação da CAT, por exemplo, reduzindo os níveis do H₂O₂.

Nas folhas, a atividade da APX foi maior aos 12 DAT para os tratamentos que receberam Cd e foi menor, no 1º DAT, permanecendo sem muita alteração aos 20 DAT, em relação ao seu controle (Figura 13A). Isto sugere que a enzima foi inibida pelo estresse nas primeiras horas de exposição ao Cd, sendo, em seguida, estimulada pela presença do metal, mantendo em seguida sua atividade. Já para as raízes, as maiores atividades foram observadas no 1º DAT, em todos os tratamentos (Figura 13B), porém, não diferiram muito do controle. Na dose de 45 µmol Cd L⁻¹, houve redução expressiva na atividade da APX, quando aumentou o tempo de exposição ao metal. Quando se adicionou mais Cd em solução nutritiva (90 µmol L⁻¹), a APX mostrou atuar em condição elevada de estresse, pois foi capaz de manter sua atividade comparada ao controle.

Mesmo havendo maiores valores de Cd concentrado nos tecidos radiculares, maiores valores percentuais da atividade da APX foram observados em folhas de *P. glomerata*, em relação ao controle, ou seja, as raízes apresentaram pouco aumento percentual na atividade da enzima. Segundo Vitória et al. (2001), há evidência da existência de um sinal de estresse oxidativo transportado das raízes para as folhas, tendo tal mecanismo de sinalização sido reportado por Karpinski et al. (1999), aumentando a transcrição da APX em folhas. Resultados semelhantes para a atividade da APX nas raízes e folhas de *P. glomerata* foram encontrados em *Bacopa monnieri* (Singh et al., 2006).

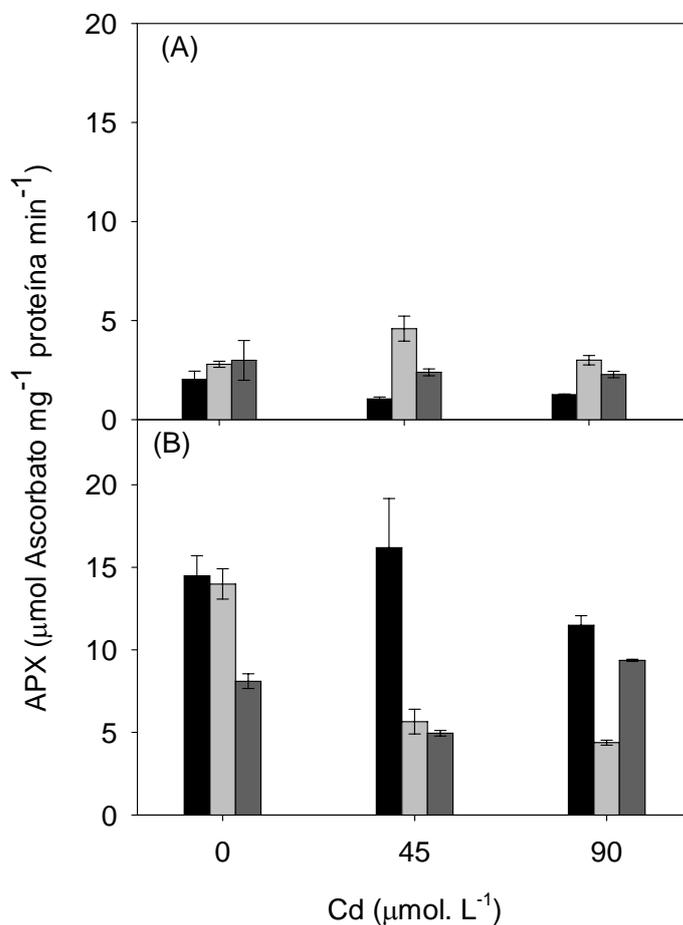


FIGURA 13 Atividade da APX ($\mu\text{mol ascorbato mg}^{-1}$ proteína min^{-1}) em folhas (A) e raízes (B) de *P. glomerata*, no 1° (■), 12° (◻) e 20° (◼) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias \pm erro padrão de três repetições.

A enzima GPX também atua na eliminação do H_2O_2 produzido, porém, não faz parte do ciclo do ascorbato-glutationa, como o fazem a APX e CAT. Em *P. glomerata*, assim como para a APX, observou-se maior atividade da GPX em raízes do que em folhas (Figura 14). Nas folhas, a adição de Cd na solução nutritiva na dose de maior estresse estimulou a atividade da enzima, quando

aumentou o tempo de exposição ao metal em 12 e 20 DAT. Pode-se observar, nas folhas (Figura 14A), que a atividade da GPX foi reduzida em todas as doses de Cd no 1º DAT. O comportamento da atividade da GPX nas folhas foi bastante semelhante à atividade da APX e contrário ao comportamento da CAT, no mesmo órgão. Isso indica a importância da atuação das enzimas em conjunto, pois estas se mostram mais estimuladas ou inibidas em doses e tempos distintos.

Nas raízes, a atividade da GPX alterou-se pouco em relação ao controle aos 12 e 20 DAT. Porém, na fase inicial do experimento (1º DAT), o estresse induzido pelo Cd, reduziu a atividade da GPX. Neste caso, tivemos um comportamento da atividade da GPX nas raízes, contrário ao observado para a atividade da APX, que apresentou inibição na atividade com o aumento do tempo de exposição ao metal.

Em *Bacopa monnieri*, a atividade da GPX nas folhas foi estimulada com o tempo de exposição ao Cd e com o aumento da dose do metal (Singh et al., 2006). Entretanto, foi encontrada redução na atividade da enzima nas raízes com o aumento de exposição ao Cd na maior concentração (200 $\mu\text{mol. L}^{-1}$). Aumento na atividade da GPX foi também verificada em *Nicotiana tabacum* quandoo exposta ao Cd, devido à grande disponibilidade de H_2O_2 produzido pelo estresse, principalmente no período final do experimento (Gratão, 2003).

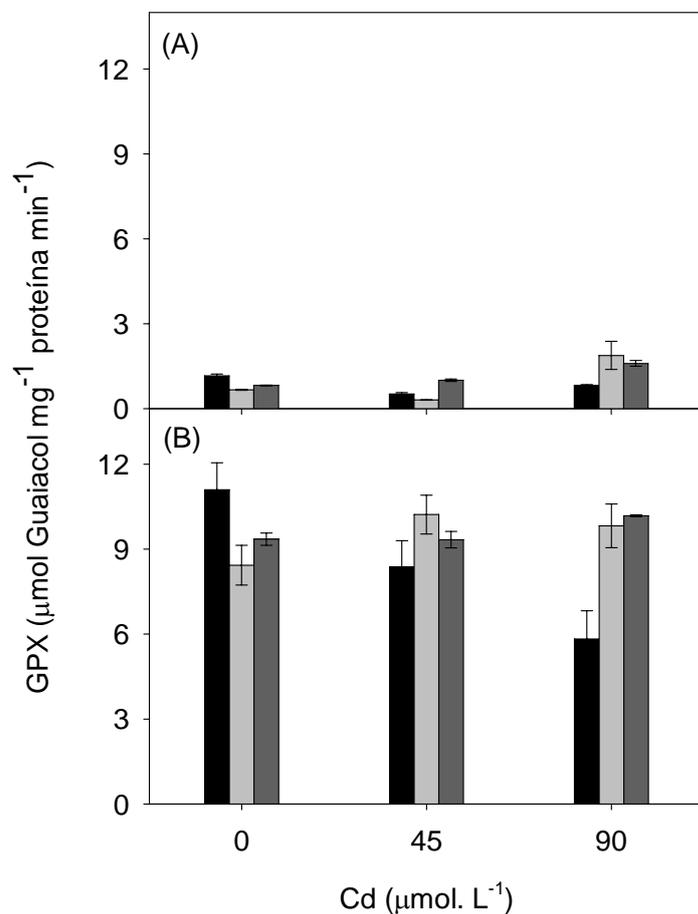


FIGURA 14 Atividade da GPX ($\mu\text{mol guaiacol mg}^{-1} \text{ prote\u00edna min}^{-1}$) em folhas e ra\u00edzes de *P. glomerata*, no 1^o (■), 12^o (□) e 20^o (▒) DAT, submetidas a tr\u00eas doses de Cd, em solu\u00e7\u00e3o nutritiva. Todas as barras s\u00e3o m\u00e9dias \pm erro padr\u00e3o de tr\u00eas repeti\u00e7\u00f5es.

A APX utiliza o ascorbato como doador espec\u00edfico de el\u00e9trons para reduzir o H_2O_2 \u00e0 \u00e1gua, gerando o monodehidroascorbato, que precisa ser regenerado novamente a ascorbato, a fim de manter o sistema antioxidante ativo. Para isso, outras rea\u00e7\u00f5es est\u00e3o envolvidas, intermediadas pela glutatona, a qual \u00e9 oxidada (Biemelt et al., 1998). A manuten\u00e7\u00e3o do *pool* da glutatona reduzida

para o processo depende da atividade da glutathione redutase (GR). No presente trabalho, o aumento do estresse ao Cd interferiu na atividade da GR, tanto nas folhas quanto nas raízes (Figura 15). Nas folhas de *P. glomerata*, o aumento das doses de Cd aumentou a atividade da GR, com exceção do período inicial de exposição ao Cd (1º DAT) que praticamente não alterou em relação ao controle (Figura 15A).

Nas raízes, a atividade da GR apresentou como tendência geral um decréscimo com o aumento do tempo de exposição ao Cd (Figura 15B). Porém, aos 12 DAT, observou-se expressivo aumento na atividade da enzima nas duas doses de Cd estudadas. Tanto nas folhas quanto nas raízes, os maiores aumentos na atividade da GR ocorreram aos 12 DAT, sendo de 104% nas raízes e 56% nas folhas, na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Isto sugere que, nestes tratamentos, a enzima respondeu bem ao Cd acumulado nos tecidos, como função de detoxificação das EROs induzidas pelo metal, por meio do ciclo da ascorbato-glutathione, enquanto naqueles tratamentos em que a atividade foi menor, a GR apenas manteve o nível da glutathione em sua forma reduzida para posterior síntese das fitoquelatinas (Cobbett, 2000).

Pequenas variações na atividade da GR com o decorrer do tempo de exposição ao Cd foram verificadas em folhas de ervilha (Sandalo et al., 2001). Assim como no presente estudo, a atividade da GR foi maior em raízes do que nas folhas de rabanete (Vitória et al., 2001). No entanto, em *Bacopa monnieri*, a atividade da GR foi maior nas folhas (Mishra et al., 2006) do que nas raízes de plantas exposta ao Cd. Em *Alyssum argenteum*, uma espécie hiperacumuladora de Cd, os baixos níveis do metal induziram a atividade da GR, sendo esta atividade reduzida em maiores níveis (Schickler & Caspi, 1999). Segundo os autores, esta redução pode ser resultado da ligação direta do Cd ao grupo sulfidril da enzima, interferindo no ciclo da glutathione. A atividade da GR é importante para manter alto o nível da relação GSH/GSSH, sendo crucial para o

funcionamento do ciclo ascorbato-glutationa, assim como para a síntese das fitoquelatinas (Cobbett, 2000), responsáveis pela tolerância da planta à contaminação por metais pesados, principalmente ao Cd (Benavides et al., 2005).

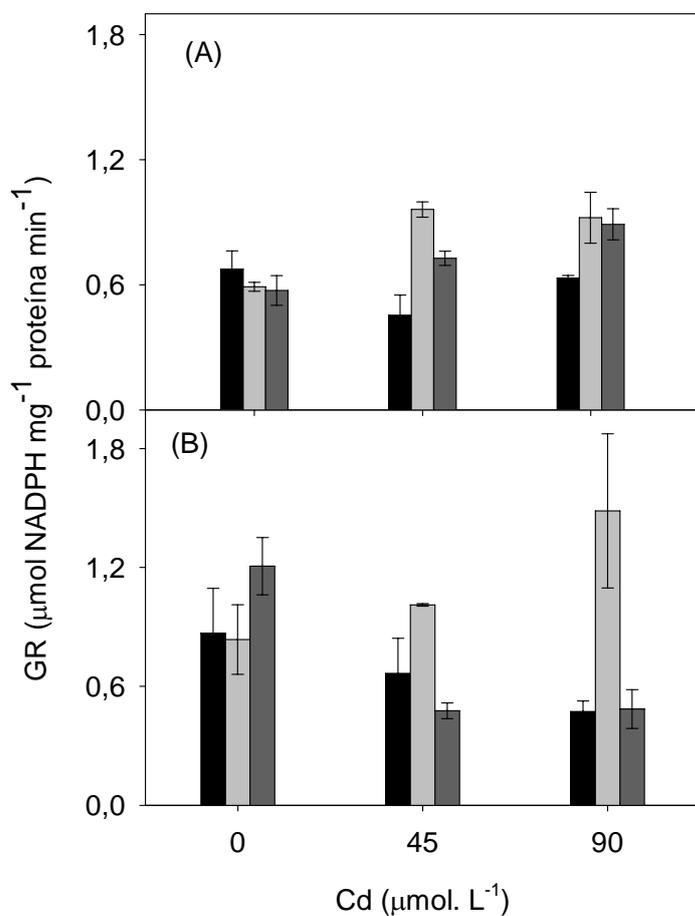


FIGURA 15 Atividade da GR ($\mu\text{mol NADPH mg}^{-1} \text{ proteína min}^{-1}$) em folhas e raízes de *P. glomerata*, no 1^o (■), 12^o (◻) e 20^o (◼) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias \pm erro padrão de três repetições.

O Cd tem sido bastante estudado por induzir o estresse oxidativo em plantas com respostas diferenciadas na atividade das enzimas do sistema antioxidativo, como SOD, CAT, APX, GPX e GR, dependendo da concentração do metal, do órgão, da idade, da espécie de planta e do tempo de exposição ao metal. Em raízes e folhas de *Phaseolous vulgaris* na dose de 5 mmol. L⁻¹, Cd aumentou a atividade das peroxidases GPX e APX (Chaoui et al., 1997). Em folhas de *Helianthus annuus*, o Cd diminuiu ou aumentou a atividade das enzimas antioxidativas SOD, CAT, APX e GR (Gallego et al., 1996). Em duas espécies de *Alyssum*, a atividade da GR aumentou no tratamento de 0,02 mmol Cd L⁻¹, mas diminuiu na dose de 0,05 mmol Cd L⁻¹ (Schickler & Caspi, 1999). A atividade da CAT, normalmente, é reduzida quando exposta a altos níveis de Cd (Singh et al., 2006; Mishra et al., 2006; Sandalio et al., 2001). Entretanto, Pereira et al. (2002) e Vitória et al. (2001) relataram que as atividades de CAT, GR e de isoenzimas de SOD aumentaram em folhas e raízes de *Crotalaria juncea* e rabanete, respectivamente.

4.1.6 Respostas anatômicas

O número de estômatos por mm² da epiderme da face abaxial foi maior nos tratamentos que receberam Cd, os quais não diferiram entre si estatisticamente (Tabela 2 e Figura 16). O aumento na densidade de estômatos de folhas em condições de estresse por Cd tem sido verificado em *Silene vulgaris* (Chardonens et al., 1998), *Brassica napus* (Baryla et al., 2001) e *Brassica juncea* (Salt et al., 1995). Em *E. camaldulensis*, outra espécie em estudo, a densidade estomática também aumentou com o estresse. Tanto para o diâmetro polar quanto para o equatorial, apenas o tratamento controle foi estatisticamente diferente dos demais. Os diâmetros polar e equatorial foram menores no controle do que nos tratamentos que receberam Cd (Tabela 2).

A redução no potencial hídrico dos tratamentos na presença de Cd fez com que as plantas ficassem com um aspecto de murchas, podendo a taxa de transpiração ter diminuído e a resistência estomática aumentado, segundo Kirkham (1978). Entretanto, o aumento no número de estômatos por mm² pode representar uma estratégia para compensar o aumento da resistência estomática. Este aumento na densidade estomática pode constituir uma estratégia adaptativa da espécie, visando à manutenção do suprimento adequado de CO₂, necessário à fotossíntese e um maior controle de perda de água por meio da transpiração. Melo et al. (2007) correlacionaram positivamente o aumento na densidade estomática com o suprimento de CO₂ em situações de baixa transpiração.

TABELA 2 Médias das variáveis respostas analisadas nas seções paradérmicas da superfície abaxial folhas de *P. glomerata* submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias

$\mu\text{mol Cd L}^{-1}$	Nº de estômatos (mm ²)	Diâmetro equatorial (DE) (μm)	Diâmetro polar (DP)(μm)
0	83,65 b	27,85 a	30,42 a
15	107,1 a	18,57 b	25,80 b
25	116,65 a	16,85 b	24,50 b
45	120,6 a	16,87 b	20,12 b
90	117,4 a	17,81 b	22,45 b

Médias seguidas pela mesma letra são estatisticamente iguais entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

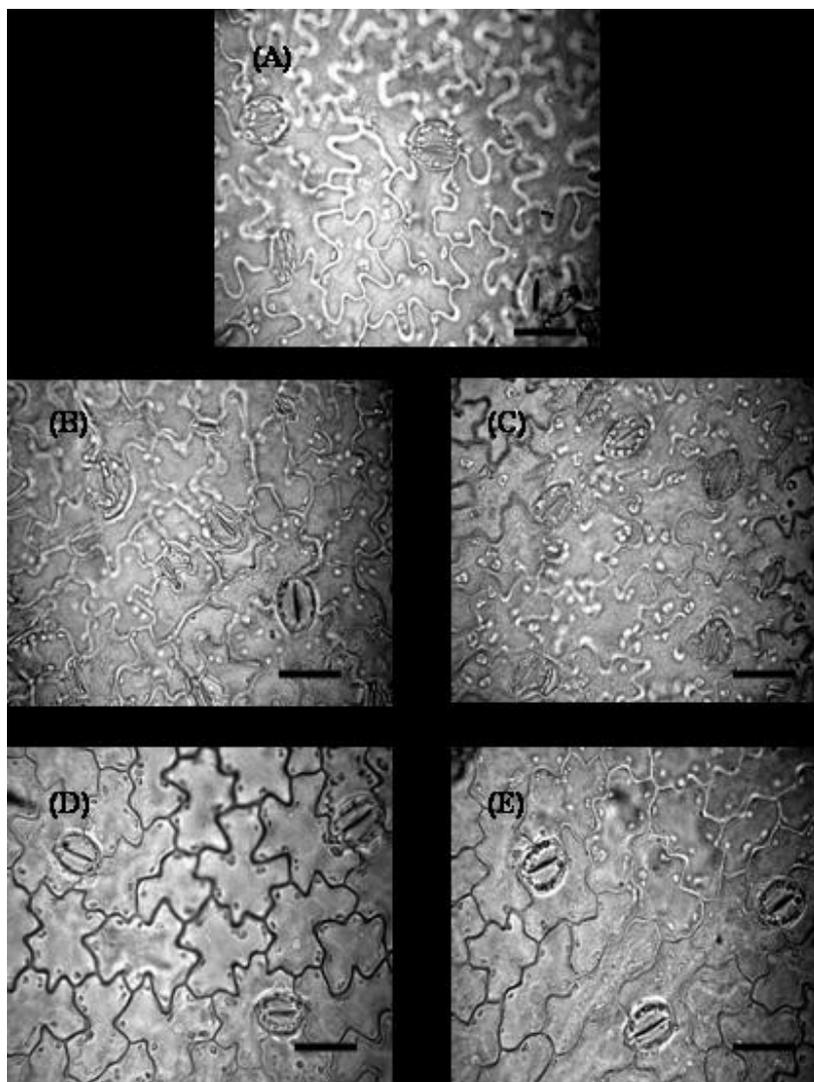


FIGURA 16 Seção paradérmica da folha de *P. glomerata* submetida a doses crescentes de Cd, (A) controle, (B) 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (C) 25 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (D) 45 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (E) 90 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. A barra horizontal em negrito corresponde a 100 μm .

4.2 Experimento II: Respostas anatômicas e fisiológicas de *Eucalyptus camaldulensis* submetido a doses crescentes de Cd em solução nutritiva

4.2.1 Matéria seca e sintomas visuais

O aumento das doses do Cd em solução nutritiva reduziu a produção de matéria seca das raízes e parte aérea em 55% e 56%, respectivamente, no nível mais elevado de Cd em relação ao seu controle (Figura 17). A razão entre a matéria seca das raízes e da parte aérea (R/PA) foi de 0,39 para o tratamento controle e de 0,37 para o tratamento de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Isso indica que as raízes e a parte aérea foram de maneira igual afetadas pelo excesso de Cd, não diferindo do seu controle. Em mudas de diferentes espécies arbóreas crescidas em solo multicontaminado, a razão R/PA também não foi influenciada pela excesso de metais (Marques et al., 2000).

Em mudas de *E. maculata* e *E. urophylla*, a razão R/PA foi crescente até 32 $\mu\text{mol Cu L}^{-1}$, decrescendo nas concentrações superiores de Cd (Soares et al., 2000), porém, para as mesmas espécies em solução nutritiva contendo Cd, a razão R/PA foi baixa, ficando entre 0,30-0,36 e sem sofrer influência do Cd (Soares et al., 2005), concordando com o resultado encontrado no presente estudo. No experimento com *Pfaffia glomerata*, a razão R/PA foi reduzida com o aumento dos níveis de Cd, indicando que o Cd interferiu de forma diferenciada na produção de raízes e parte aérea da espécie.

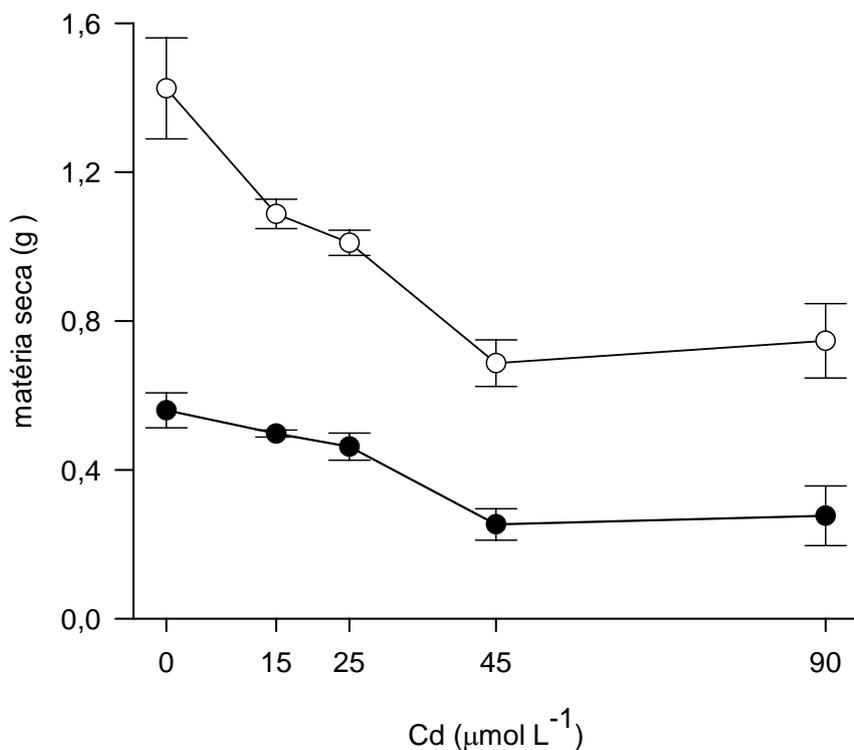


FIGURA 17 Produção de matéria seca de raízes (●) e parte aérea (○) de *E. camaldulensis* submetido a doses de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média±erro padrão de três repetições.

O sintoma visual da clorose induzida pelo excesso de Cd e também por outros metais pesados presentes na planta é consequência da redução da biossíntese de clorofila ou, ainda, dos danos ao sistema proteína-protoclorofilídeos, causados pelo metal (Horváth et al., 1996). Dessa forma, o teor de clorofila pode ser utilizado como indicador da toxidez pelo Cd (Oliveira et al., 1994). Embora o Cd tenha causado redução no crescimento tanto das raízes quanto da parte aérea (Figuras 18 e 19, respectivamente), nenhuma clorose foi observada nas folhas de *E. camaldulensis*. Talvez, doses maiores do Cd pudessem induzir tal sintoma, pois, em *E. urophylla* e *E. maculata*, doses de

Cd acima de $90 \mu\text{mol L}^{-1}$ induziram o aparecimento de pontuações avermelhadas, clorose internerval, necrose e murchamento das folhas (Soares et al., 2005).

Os sintomas visuais do sistema radicular de *E. camaldulensis* foram bastante marcantes, observando-se acentuada redução no crescimento, além do escurecimento das raízes desde a dose mais baixa de Cd (Figura 18). Outro sintoma de toxidez radicular observado foi a formação de algumas raízes laterais mais espessas, principalmente no tratamento de maior nível do metal. O efeito tóxico do Cd não somente afeta o comprimento radicular da raiz primária, mas também provoca variações na arquitetura de todo o sistema radicular, levando a algumas deformações (Figura 18). Conforme observado por Barceló & Poschenrieder (1990), a toxidez de Cd tem sido verificada por promover o aumento na formação de raízes laterais, resultando num sistema radicular mais denso e compacto, além de promover a redução dos pêlos radiculares, sugerindo a interferência do metal no balanço hormonal das raízes.



FIGURA 18 Sistema radicular de *E. camaldulensis* aos 16 dias após indução do tratamento (DAT), na presença de doses crescentes de Cd, em solução nutritiva.

Na parte aérea, os principais sintomas visuais de toxidez observados foram a redução no crescimento e o avermelhamento nas folhas, principalmente

na dose de $90 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Figura 19). Estes sintomas levam à redução na eficiência fotossintética, comprometendo o aparato fotossintético, em particular o sistema coletor de luz (LHC) (Krupa, 1988) e os fotossistemas I e II (Siedlecka & Krupa, 1996).

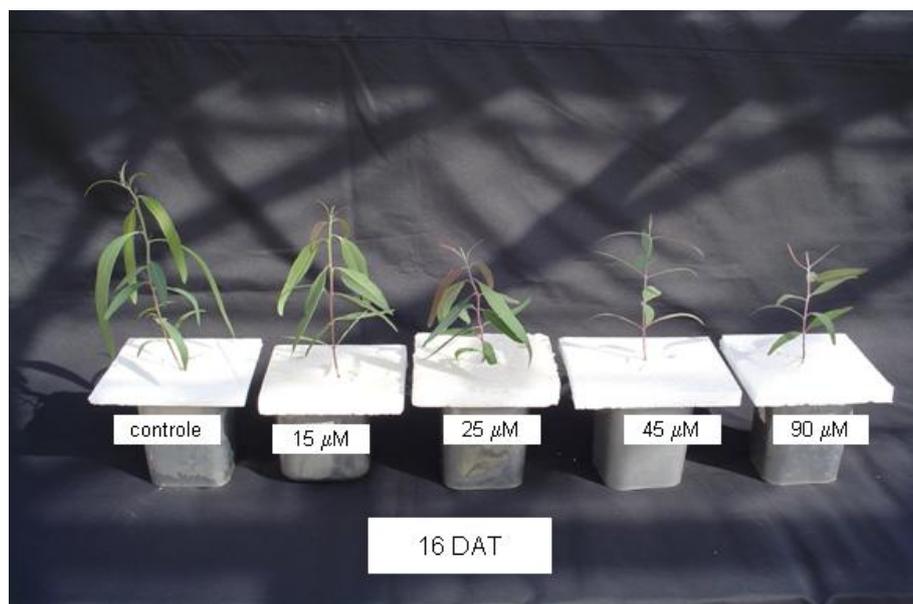


Figura 19 Parte aérea de *E. camaldulensis* aos 16 dias após indução do tratamento (DAT) na presença de doses crescentes de Cd, em solução nutritiva.

4.2.2 Teores de pigmentos

O efeito do Cd nos teores de clorofila está representado na Figura 20. A razão clorofila a/b foi crescente com o aumento de Cd em solução aos 12 DAT (Figura 20A). No 20° DAT, a razão clorofila a/b foi reduzida na presença do metal, enquanto, no 1° DAT, praticamente não houve diferença entre os tratamentos.

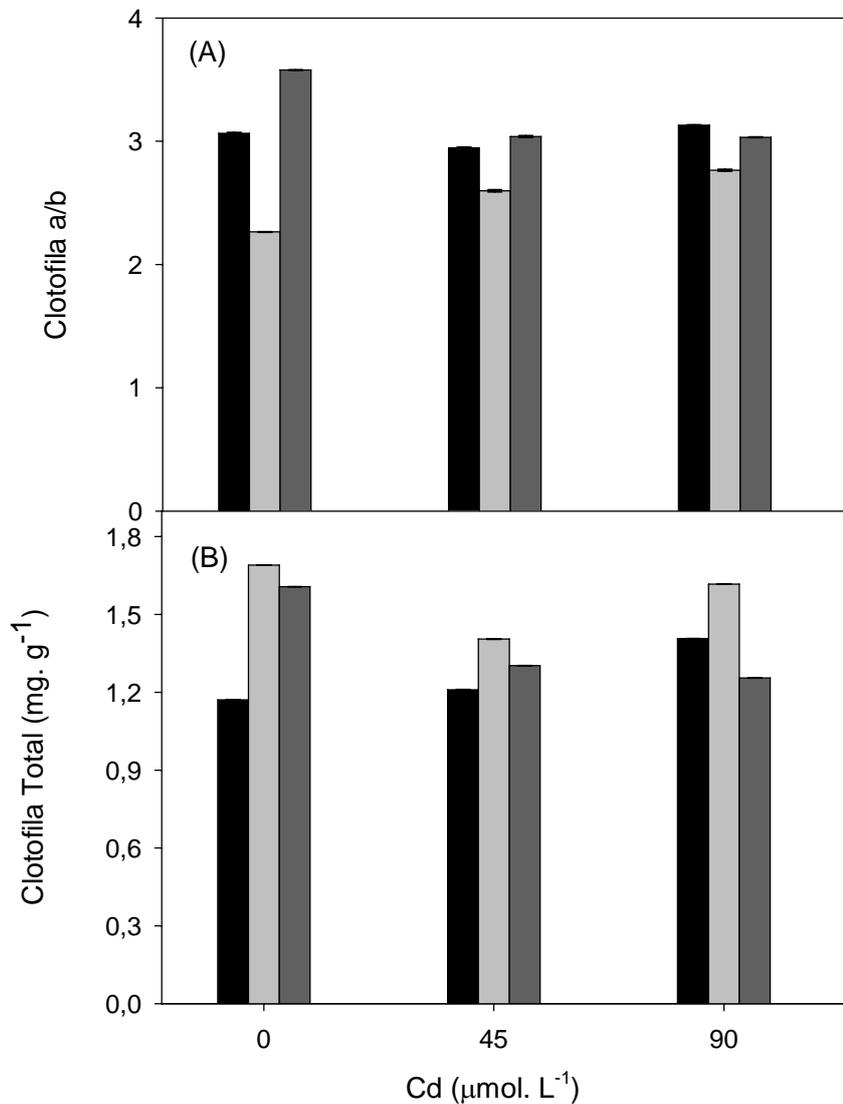


FIGURA 20 Relação de clorofila *a/b* (a) e teor de clorofila total (b) em plantas jovens de *E. camaldulensis*, no 1^o (■), 12^o (□) e 20^o (▒) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias \pm erro padrão de três repetições.

De acordo com o resultado apresentado acima, a biossíntese da clorofila *a* foi mais sensível do que a biossíntese da clorofila *b*, pois, na presença de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e aos 20 DAT, houve redução de 3,58 para, aproximadamente, 3 na razão clorofila *a/b*.

O efeito do aumento dos níveis de Cd em solução nutritiva e o tempo de exposição da planta ao metal afetaram o teor de clorofila total (Figura 20B). Maiores danos à síntese de clorofila foram observados com o aumento do tempo de exposição ao Cd. Aos 20 DAT, o aumento dos níveis do metal reduziu os teores de clorofila total produzida pela planta, indicando um dano oxidativo induzido pelo estresse. Provavelmente, este dano causou a inibição da redutase do protoclorofilídio, a enzima chave da fototransformação do protoclorofilídio-clorofilídio (Stobart et al., 1985). Em plântulas de *Helianthus annuus*, as folhas mais velhas tiveram os teores de clorofila *a* e clorofila total reduzidos, enquanto para a clorofila *b* e a razão clorofila *a/b* não foi observada nenhuma alteração (Di Cagno et al., 1999).

De modo geral, os teores de carotenóides aumentaram com o aumento do estresse (Figura 21). No extremo do estresse aplicado, verifica-se que houve um acréscimo na concentração do pigmento de 129% em relação ao controle. Embora a principal função reconhecida dos carotenóides seja atuar como um pigmento com antena fotoreceptiva para a fotossíntese, coletando comprimentos de luz que não são absorvidos pela clorofila, sua função protetora contra danos oxidativos tem sido reconhecida há décadas (Larsson, 1988). Aumentos nos teores de carotenóides estão relacionados com o aumento da tolerância ao estresse oxidativo (Somashekaraiah et al., 1992). Em *Bacopa monnieri*, os teores de carotenóides foram crescentes com o tempo de exposição em doses menores do Cd e foram decrescentes em doses maiores (Singh et al., 2006).

O aumento nos níveis de carotenóides com o aumento das doses de Cd está, provavelmente, relacionado à estratégia adotada pela planta para tolerar o

efeito tóxico dos radicais livres, gerado pelo estresse, o qual está de acordo com o resultado encontrado para as plantas aquáticas *Nasturtium officinale* e *Mentha aquatica* (Aslan et al., 2003).

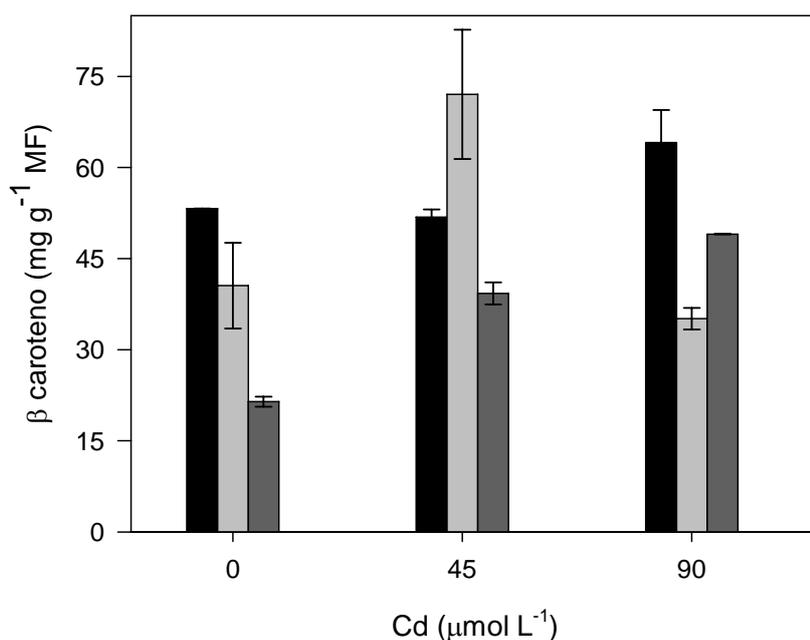


FIGURA 21 Teores de carotenóides (mg g⁻¹ MF) em folhas de *E. camaldulensis*, no 1^o (■), 12^o (▨) e 20^o (■) DAT, submetido a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias±erro padrão de três repetições.

4.2.3 Eficiência fotoquímica do fotossistema II

O aumento das doses de Cd não afetou a eficiência do fotossistema II. A razão Fv/Fm apresentou valores na faixa de 0,73-0,79, para o tratamento controle e valores de 0,69-0,82, para os tratamentos que receberam Cd (Figura 22). O Cd não inibiu os processos fotoquímicos de *L. minor*, por ter afetado apenas ligeiramente a relação Fv/Fm, assim como o teor de clorofila total submetida a pouca luminosidade, em relação ao controle (Artetxe, et al. 2002). Em *Chlorella*, a presença do Cd não afetou a produção fotoquímica (Fv/Fm),

enquanto houve redução no teor de clorofila *a* (Ilangovan et al., 1998). Também em folhas em *Helianthus annuus* expostas ao Cd em solução nutritiva, a eficiência quântica do PS II (Fv/Fm) não variou, apesar de haver redução na absorção do CO₂, na atividade da rubisco e não ter afetado a condutância estomática (Di Cagno et al., 1999). Entretanto, em *Brassica juncea* exposta a Cd em solução nutritiva, maiores valores da razão Fv/Fm foram observados na espécie transgênica, comparada com a espécie selvagem, indicando maior eficiência no funcionamento do aparato fotossintético da espécie transgênica que tolerou mais o metal (Pilon-Smits et al., 2000).

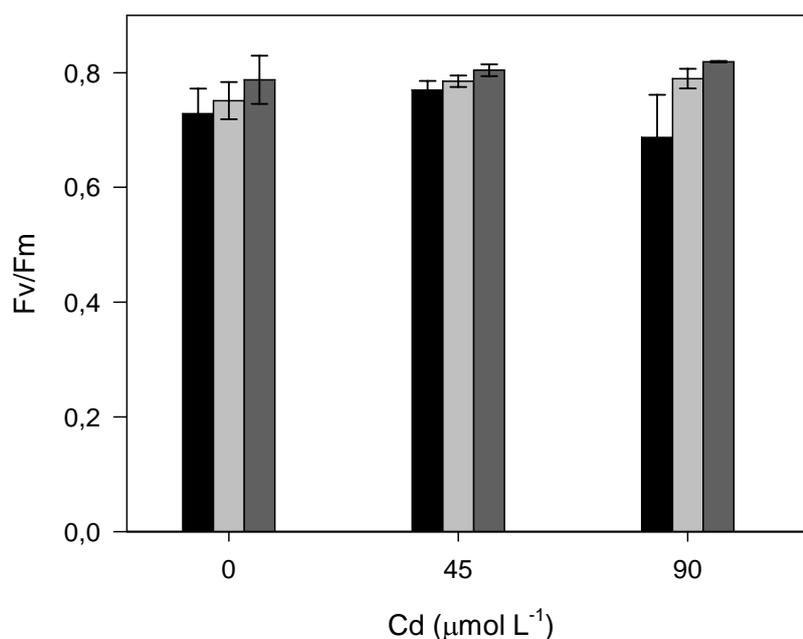


FIGURA 22 Eficiência fotoquímica do fotossistema II (Fv/Fm) em plantas jovens de *E. camaldulensis*, no 1º (■), 12º (◻) e 20º (◼) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias±erro padrão de três repetições.

4.2.4 Potencial hídrico

O efeito do aumento dos níveis de Cd e do tempo de exposição ao metal no potencial hídrico da planta pode ser verificado na Figura 23. No 1º DAT, verificou-se que houve redução no potencial hídrico das plantas, com o aumento dos níveis de Cd. Nas duas datas seguintes avaliadas, o potencial hídrico do eucalipto foi maior do que no controle, para os dois tratamentos que receberam metal.

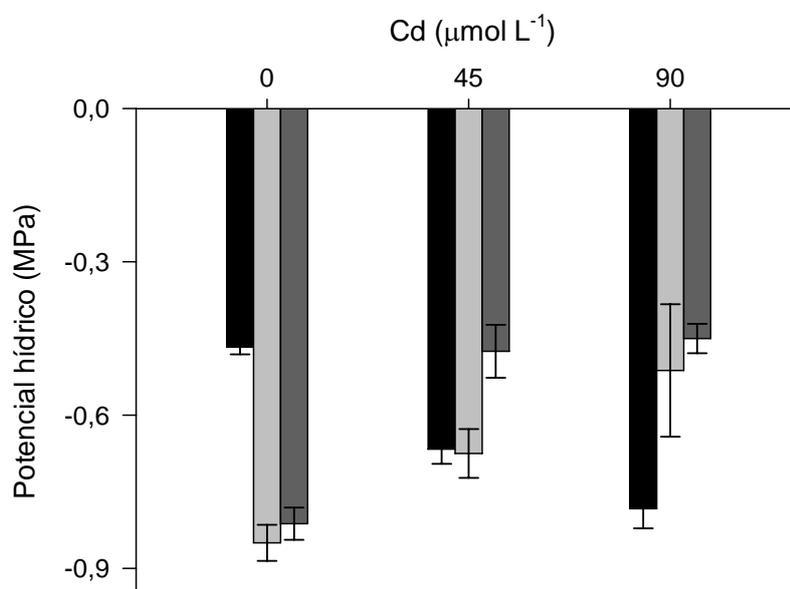


FIGURA 23 Potencial hídrico total (MPa) de plantas jovens de *E.camaldulensis*, no 1º (■), 12º (■) e 20º (■) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias±erro padrão de três repetições.

Entre muitos fatores que influenciam a entrada de água em plantas expostas a metais pesados, pode-se citar a redução na razão da matéria seca produzida entre as raízes e a parte aérea (R/PA) (Barceló & Poschenrieder,

1990). No presente estudo, observou-se que houve um aumento nesta razão com o aumento das doses de Cd, em relação ao tratamento controle, logo, a entrada de água na planta não ficou prejudicada pelo tamanho do sistema radicular em relação à parte aérea. Com o decorrer do período experimental, esperava-se que o potencial hídrico da planta diminuísse, por causa do aumento do tamanho das folhas. No entanto, encontramos aumento no potencial hídrico com a exposição da planta ao metal para os tratamentos de 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Como houve redução na produção de matéria seca de *E. camaldulensis* com a exposição ao metal, sugere-se que houve redução na taxa de transpiração durante este período, devido, principalmente, aos efeitos do Cd na resistência estomática. A redução na transpiração ou o aumento na resistência estomática têm sido observados em muitos estudos com plantas expostas ao Cd (Barceló & Poschenrieder, 1990). Em *Chrysanthemum morifolium* exposto à baixa concentração de Cd, o aumento na taxa de transpiração foi acompanhado pelo aumento do turgor da folha e pela redução no potencial osmótico e na resistência estomática (Kirkham, 1978).

4.2.5 Teores de Cd e o estado nutricional

O aumento dos teores de Cd nas folhas e raízes de *E. camaldulensis*, crescidas em solução nutritiva e enriquecidas com Cd, e o gradiente de concentração do metal encontrado entre as raízes e a parte aérea indicam claramente que o Cd foi absorvido pelas raízes e translocado para a parte aérea. O aumento das doses de Cd em solução promoveu incrementos nos teores desse elemento nos tecidos, atingindo valores de até 186,11 mg kg^{-1} , na parte aérea e de 1.885,5 mg kg^{-1} nas raízes de *E. camaldulensis*, expostas a 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ por 20 dias (Figura 24).

Estes valores são bem superiores à faixa de 5-30 mg kg^{-1} , considerada tóxica para a maioria das plantas (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Tanto os teores de Cd nas raízes quanto na parte aérea mostraram um aumento com

tendência linear ao aumento do Cd em solução nutritiva, com as raízes acumulando 10 vezes mais Cd do que a parte aérea. Dessa forma, a maioria do Cd acumulado pela planta ficou retida nas raízes e pouca quantidade foi translocada para a parte aérea. De acordo com Toppi & Gabbrielli (1999), a quantidade de Cd translocado das raízes para a parte aérea vai depender do nível do agente complexante de metal encontrado nas raízes e de sua compartimentalização e também da eficiência de transporte do metal através do xilema. Dessa forma, as raízes de plantas podem atuar como uma barreira contra a translocação de metais pesados e este pode ser um mecanismo potencial de tolerância utilizado pela planta (Baker, 1981).

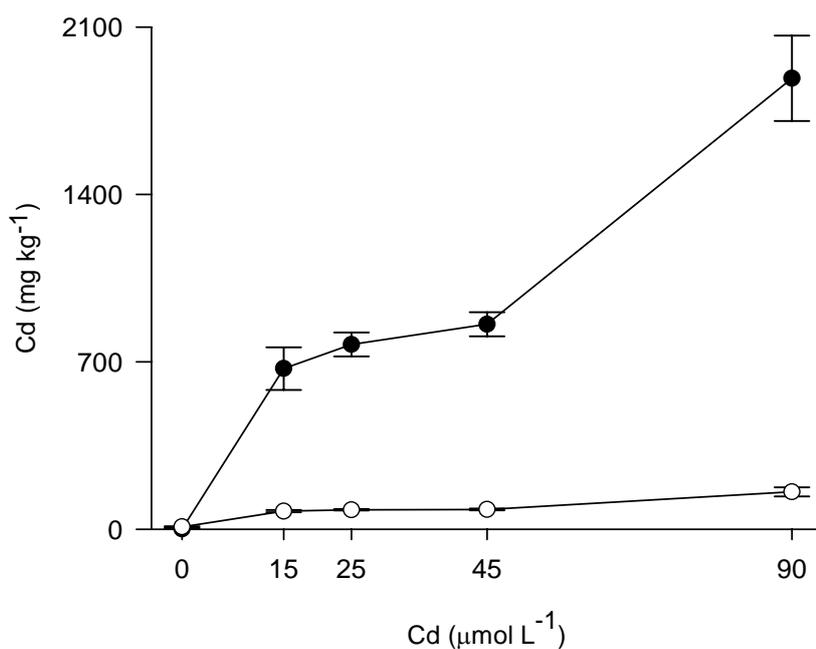


FIGURA 24 Teores de Cd (mg kg^{-1}) nas raízes (●) e parte aérea (○) de *E. camaldulensis* submetido a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três repetições.

O efeito do incremento do Cd em solução nutritiva afetou os teores dos macronutrientes das raízes e da parte aérea (Figura 25). A resposta dos teores de N na parte aérea foi decrescente com o aumento da contaminação por Cd, enquanto, nas raízes, o teor foi pouco alterado (Figura 25). A redução nos teores de N causa sintomas de deficiência, pois este nutriente é encontrado na planta na forma orgânica (NH_3), como componente estrutural de macromoléculas e constituinte de enzimas (Marschner, 1995). Em folhas de *Pisum sativum* crescidas em solução nutritiva com incrementos de Cd, os teores de N foram reduzidos linearmente e os teores de N das raízes tiveram maiores valores nos tratamentos com 20 e 30 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Sandalio et al., 2001).

Observou-se aumento nos teores de P nas raízes e redução nos teores do nutriente na parte aérea com o aumento das doses de Cd (Figura 25). Os valores de P na parte aérea foram encontrados entre 3-4,4 g kg^{-1} , sendo o valor máximo verificado no tratamento com 15 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Para as raízes, os valores encontrados ficaram na faixa de 1,9-4,5 g N kg^{-1} MS, verificando-se que houve aumento no teor do nutriente até a dose de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, seguido de pouca alteração nos tratamento seguintes.

O incremento de Cd na solução nutritiva reduziu a translocação de P para a parte aérea, a partir da dose de 15 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Devido aos papéis de P na planta participando da síntese e degradação de macromoléculas, principalmente do ATP, a sua carência reflete no menor crescimento da planta (Marschner, 1995). Este sintoma de deficiência foi observado no presente estudo, além da cor avermelhada das folhas, que é outro sintoma de deficiência de P. Em *Betula pendula*, uma espécie arbórea, os teores de P foram reduzidos na parte aérea e, nas raízes, não houve diferença estatística entre os tratamentos (Gussarsson et al., 1996). Porém, num experimento com *E. urophylla* e *E. maculata*, os teores de P foram crescentes em resposta ao aumento de Cd em solução nutritiva, provavelmente, devido ao efeito de concentração (Soares et al., 2005).

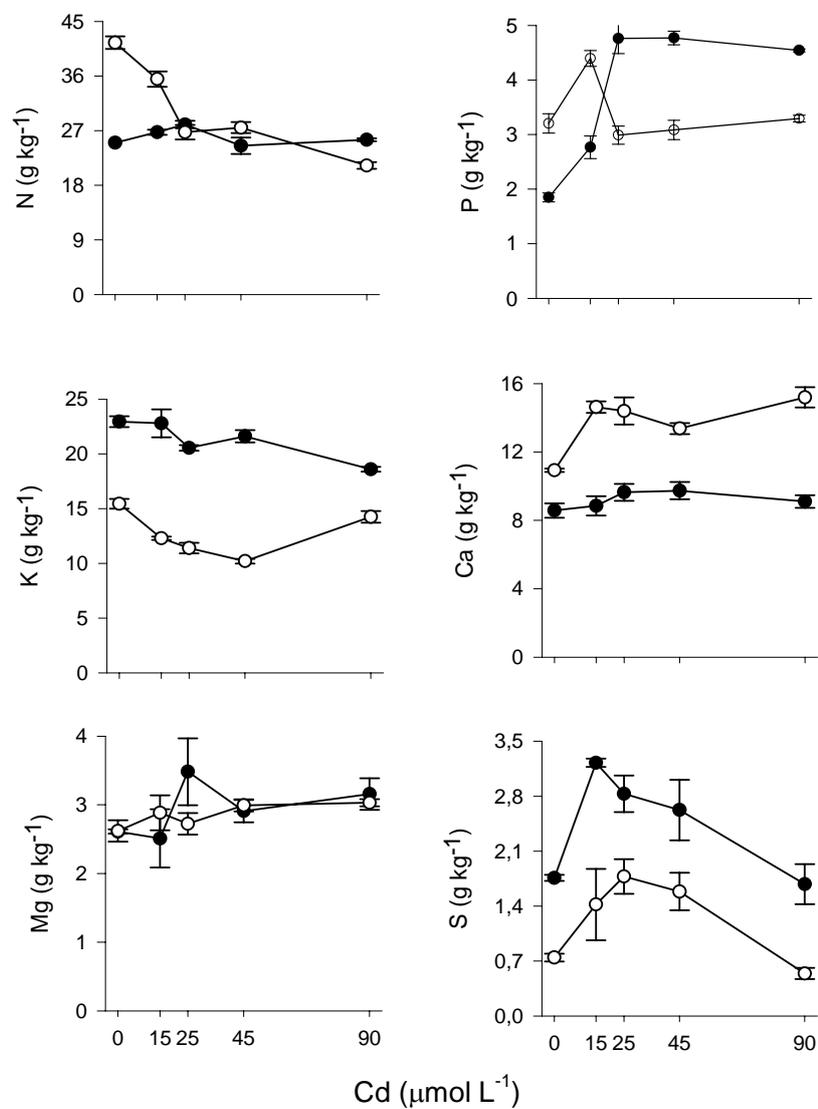


FIGURA 25 Teores de macronutrientes (g kg^{-1}) nas raízes (●) e parte aérea (○) de *E. camaldulensis* submetido a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três repetições.

O teor de K nas raízes reduziu com tendência linear, apresentando valores entre 23,0-18,6 g kg⁻¹. Em *Betula pendula* também houve redução nos teores de K nas raízes afetada pelo Cd em solução nutritiva (Gussarsson et al., 1996). Segundo o autor, esta redução na concentração de K pode estar diretamente relacionada ao efeito do metal na atividade da ATPase, enzima responsável pelo gradiente de próton necessário para a absorção ativa do K ou, ainda, o Cd pode estar atuando na atividade da redutase férrica (Gussarsson et al., 1996).

De modo geral, os níveis de Cd em solução nutritiva não afetaram os teores de Ca na matéria seca de *E. camaldulensis* (Figura 25). Seus valores variaram de 10,9-15,2 g kg⁻¹ na matéria seca da parte aérea, sendo o maior no tratamento de 90 µmol Cd L⁻¹. Como houve redução na matéria seca da planta, os maiores valores observados para os tratamentos de maior nível de Ca podem estar relacionados ao efeito de concentração do nutriente. Os teores de Cd nas raízes variaram menos do que na parte aérea (8,6-9,7 g kg⁻¹). De acordo com Marschner (1995), o Ca é um macronutriente de alta concentração na solução do solo, porém, sua absorção acaba por ser dificultada, pois esta acontece principalmente nas radículas radiculares, nas quais as paredes celulares da endoderme não foram ainda suberizadas. No presente estudo, observou-se que as extremidades das raízes encontravam-se escurecidas, mesmo nos níveis mais baixos de Cd. Provavelmente, este dano observado prejudicou a absorção do Ca pelas raízes de *E. camaldulensis*.

Assim como observado para os teores de Ca, a toxidez do Cd afetou pouco o teor de Mg na matéria seca da planta (Figura 25). O maior valor encontrado nas raízes, 3,5 g kg⁻¹ foi observado no tratamento de 25 µmol Cd L⁻¹. Em *E. urophylla* e *E. maculata*, os teores de Ca e Mg reduziram com o enriquecimento do meio de solução com Cd (Soares et al., 2005), tendo os teores de Mg atingido valores abaixo do nível mínimo considerado adequado (Dell et

al., 1993). A redução nos teores de Ca e Mg com o aumento dos níveis de Cd sugere efeito antagônico entre estes elementos, pois, sendo o Cd um cátion divalente, altas concentrações deste inibem a absorção de outros cátions de mesma valência (Marschner, 1995). A adição de $1 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ em hidroponia mostrou ligeiro estímulo ao crescimento de cevada, sendo também os teores dos nutrientes pouco afetados (Guo et al., 2007). Entretanto, no presente estudo, os níveis altos de Cd causaram redução no crescimento das plantas e deficiência nutricional.

A variação dos teores de S na matéria seca das raízes e da parte aérea mostrou o efeito do estresse ao metal pesado na absorção e na translocação do nutriente (Figura 25). Nas raízes, os teores variaram de $1,7\text{-}3,2 \text{ g kg}^{-1}$, sendo o maior valor observado no tratamento de $15 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e o menor no tratamento de $90 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Na parte aérea, estes valores estiveram na faixa de $0,7\text{-}1,8 \text{ g kg}^{-1}$, nos tratamentos de $90 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e $25 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, respectivamente. Pode-se observar que, no menor nível de Cd ($15 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$), o S pode ainda ser absorvido pelas raízes, porém, à medida que as concentrações de Cd foram aumentando, a absorção e a translocação do nutriente foram sendo afetadas. Em ipê roxo, a resposta ao Cd nas raízes foi quadrática, com o pico máximo de absorção em $83,5 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e sem ajuste significativo para a parte aérea (Paiva et al., 2004).

Uma importante função do S na planta, quando esta se encontra sob estresse por metais pesados, principalmente o Cd, é a produção de aminoácidos ricos em S (glutaciona) para a síntese de fitoquelatina. A fitoquelatina é responsável por complexar o metal na planta, deixando-o indisponível no metabolismo desta (Cobbett, 2000). Logo, a redução nos teores de S irá afetar a síntese de fitoquelatinas, causando, assim, maior detoxificação da planta.

Os teores dos micronutrientes na matéria seca das raízes e parte aérea em plantas de *E. camaldulensis* foram também afetados pelas doses do Cd em

solução nutritiva. A variação dos teores de Cu das raízes e parte aérea com os níveis de Cd encontra-se na Figura 26. Os teores de Cu nas raízes foram crescentes até a dose de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e, a partir daí, não se alterou. Para a parte aérea, observou-se um decréscimo até o nível de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, mantendo-se constante até o último nível. Observou-se, então, que o Cu ficou retido nas raízes até o nível de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, evitando sua translocação para a parte aérea. Para as raízes, os valores dos teores variaram de 27,3-74,4 mg kg^{-1} , enquanto, na parte aérea, a faixa dos teores de Cu foi de 2,8-12,1 mg kg^{-1} . O decréscimo nos teores de Cu na parte aérea até o nível de 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ pode ter reduzido a taxa fotossintética da planta, pois grande parte do Cu encontrado nos cloroplastos está ligada à plastocianina do Fotossistema I (Marschner, 1995).

O comportamento dos teores de Fe na matéria seca das raízes e parte aérea foi bastante semelhante aos teores de Cu (Figura 26). Os teores de Fe nas raízes foram crescentes até a dose de 45 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (4157 mg kg^{-1}), porém, para a parte aérea, estes teores foram reduzidos com a presença do Cd, sendo o maior valor para o tratamento controle (245 mg kg^{-1}). Estes resultados sugerem que o Cd não interfere na absorção do Cu e do Fe, em doses não muito altas de Cd e, sim, em sua translocação para a parte aérea. Resultados semelhantes de plantas crescendo em solução nutritiva na presença de Cd foram encontrados em *E. urophylla* e *E. maculata* (Soares et al., 2005) e *Tabebuia impetiginosa* (Paiva et al., 2004). Em *Betula pendula*, os teores de Fe nas raízes pouco se alteraram, enquanto, na parte aérea, houve redução significativa (Gussarsson et al., 1996). O tempo de exposição da planta ao Cd pode também estar interferindo na absorção do Fe, pois Hernández et al. (1998) verificaram que a absorção de Fe foi pouco afetada em *Pisum sativum* crescida em 50 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, em experimento de longo tempo de duração. Porém, em experimento de curta duração, os teores de Fe foram bastante reduzidos.

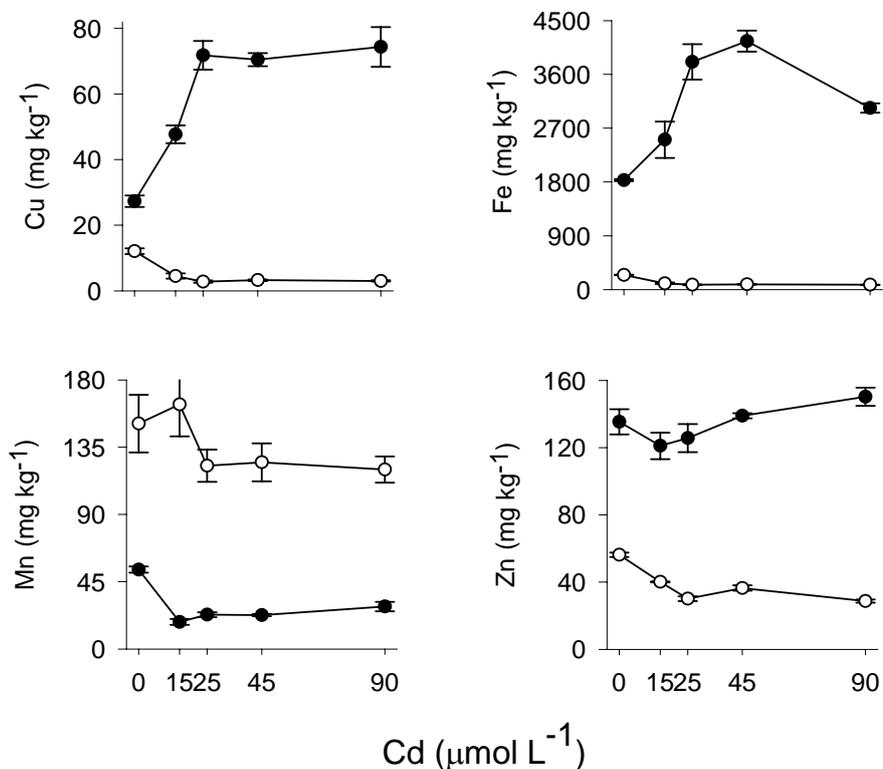


FIGURA 26 Teores de micronutrientes (mg kg^{-1}) nas raízes (●) e parte aérea (○) de *E.camaldulensis* submetido a doses crescentes de Cd em solução nutritiva, durante período de 20 dias. Cada ponto representa a média \pm erro padrão de três repetições.

Entre os micronutrientes avaliados, o Mn foi o único a apresentar maiores teores na parte aérea do que nas raízes (Figura 26). O menor valor de Mn no tecido radicular ($18,1 \text{ mg kg}^{-1}$) foi encontrado no tratamento de $15 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e o maior ($47,4 \text{ mg kg}^{-1}$), no tratamento controle. No nível mais baixo de Cd, pode-se observar que houve absorção do Mn, porém, sua translocação para a parte aérea foi reduzida. Com o aumento da dose de Cd, os teores de Mn foram reduzidos nas raízes, indicando que o excesso de Cd prejudicou a absorção do nutriente. Os teores de Mn na parte aérea de *Pisum sativum* reduziram

ligeiramente em $10 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, enquanto, na concentração de $50 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, o teor de Mn foi quatro vezes menor do que no controle (Hernández et al., 1998). Nas raízes de *P. sativum*, a redução foi drástica na dose de $50 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, com valores de um décimo a menos que o controle. No presente estudo, verificou-se que houve apenas ligeira redução dos teores de Mn com o aumento dos níveis de Cd. Também em *Betula pendula*, o efeito do Cd em solução nutritiva reduziu os teores de Mn na parte aérea e, nas raízes, apenas ligeiramente (Gussarsson, 1996).

Em doses menores de Cd, a absorção e a translocação do Zn foram reduzidos, enquanto, nas doses maiores de Cd, os teores de Zn na planta aumentaram (Figura 26). Nas raízes os teores de Zn apresentaram valores maiores do que da parte aérea, com o menor valor observado no tratamento de $25 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$. Os valores das concentrações de Zn na parte aérea alteraram-se pouco, sendo encontrados na faixa de $30,5-56,3 \text{ mg kg}^{-1}$, nos tratamentos de $25 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e controle, respectivamente. Menor valor encontrado no tratamento pode estar relacionado aos valores baixos de Zn também nas raízes. A inibição na absorção de Zn pelas raízes sugere competição por íons de mesma valência, limitando, assim, a absorção um do outro. O Cd tem grande afinidade por proteínas complexantes de baixo peso molecular que são também responsáveis pela absorção e transporte de Zn (Woolhouse, 1983). Em *E. urophylla*, os teores de Zn na parte aérea não foram influenciados pelas doses de Cd em solução, enquanto, em *E. maculata*, os teores de Zn foram reduzidos em 48% na dose de $45 \mu\text{mol Cd L}^{-1}$, em relação ao controle (Soares et al., 2005).

Metais pesados como o Cd apresentam a capacidade de diminuir a energia disponível para o funcionamento de transporte de membranas (Ghnaya, et al., 2005), influenciando na aquisição de nutrientes, como verificado para o Mn e Zn em níveis menores de Cd e para o Cu e Fe, nos níveis maiores do metal. Além disso, durante o processo de absorção, íons de mesma valência

podem competir por sítios de absorção, interferindo na absorção um do outro (Gussarsson et al., 1995). Apesar de ainda pouco compreender-se, acredita-se que íons divalentes, como Cd^{2+} , Cu^{2+} , F^{2+} , Zn^{2+} , utilizem os mesmos carreadores de membrana ou canais de cátions de Ca^{2+} e Mg^{2+} .

4.2.6 Peroxidação de lipídeos

A formação de MDA em plantas expostas às condições adversas do meio ambiente é um indicador da formação de radicais livres nos tecidos e pode ser utilizado como um índice da peroxidação de lipídeos em sistemas biológicos (Singh et al., 2006). De modo geral, os teores de MDA nas folhas foram crescentes com o aumento da concentração de Cd e com o tempo de exposição ao metal (Figura 27A). Os efeitos do Cd na peroxidação de lipídio das folhas aumentaram, em média, 22% e 43% em relação aos seus controles, nos tratamentos de 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, respectivamente. No primeiro dia de exposição do eucalipto ao metal, apenas no nível maior de Cd, houve dano de membrana. Já para as datas seguintes, a peroxidação de lipídeos das membranas ocorreu nos dois níveis de metais estudados. Logo, não apenas a dose elevada do metal provocou dano de membrana nas folhas, mas também o tempo de exposição da planta ao Cd.

A peroxidação de lipídeos nas raízes foi menor do que na parte aérea (Figura 27B), mesmo apresentando maiores teores de Cd em seus tecidos. O efeito do Cd nos tecidos radiculares afetou os teores de MDA de modo a reduzir seus valores com o aumento da concentração do metal, no 1º DAT. Nos tratamentos que receberam Cd, a peroxidação de lipídeos nas membranas de raízes foi, em média, bem próxima daquela ocorrida no tratamento controle. Isto sugere que, mesmo sendo as raízes o órgão acumulador de Cd, este foi capaz de desenvolver mecanismo de suportar altas concentrações do metal sem seus tecidos, sem verificar grandes danos.

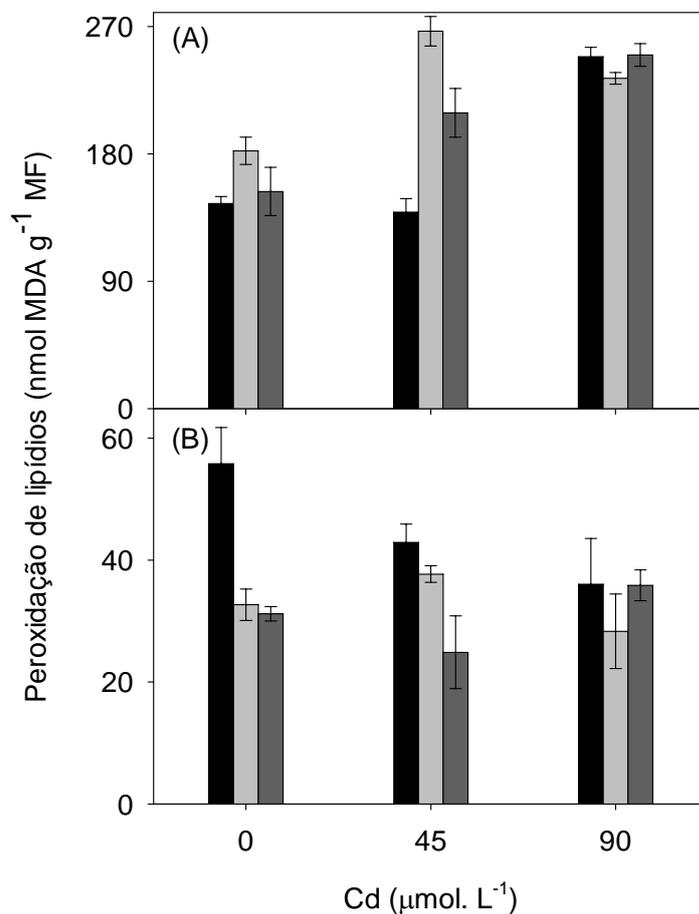


FIGURA 27 Peroxidação de lipídeos (nmol MDA g⁻¹ MF) em folhas (A) e raízes (B) de plantas de *E. camaldulensis*, no 1^o (■), 12^o (◻) e 20^o (◼) DAT, submetidas a três doses de Cd, em solução nutritiva. Todas as barras são médias±erro padrão de três repetições.

Em *Bacopa monnieri*, o Cd no meio gerou EROs nos cloroplastos e peroxissomos, induzindo a peroxidação de lipídeos que levou à distorção da bicamada lipídica e das proteínas de membranas (Mishra et al., 2006). Este aumento na oxidação da membrana causou aumento gradual nos teores de MDA e na condutividade elétrica, tanto de raízes quanto de folhas, os quais

correlacionaram-se positivamente com o aumento do Cd nos tecidos (Mishra et al., 2006). Em *F. glomerata*, outra espécie testada no presente estudo, a peroxidação de lipídeos aumentou com o aumento dos níveis de Cd nos tecidos radiculares e nas folhas, os teores de MDA foram maiores na dose de 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$.

4.2.7 Respostas anatômicas

A anatomia contribui com o estudo da tolerância vegetal ao estresse por metais pesados, por ajudar no esclarecimento de sintomas visuais, reconhecendo estruturas e alterações morfológicas que possam ser utilizadas como indicadoras da reação do vegetal a situação de estresse. Os estudos anatômicos realizados nos tecidos foliares revelaram alterações na organização e espessura dos tecidos, causadas pela contaminação por Cd (Figura 28). Verificou-se maior espessamento da epiderme e da endoderme radicular, proporcional ao aumento nas doses de Cd (Tabela 3). A principal função da epiderme é o revestimento, porém, importantes funções, como o controle da perda de água e as trocas gasosas, por meio dos estômatos e absorção de água e sais minerais através de pêlos radiculares, entre outras, são também controladas pela epiderme (Appezato-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2003). As células da epiderme são encontradas bem justapostas, podendo variar sua forma ou número. No presente trabalho, não foram encontradas variações no tipo de célula da epiderme, sendo seu formato tabular (Figura 28).

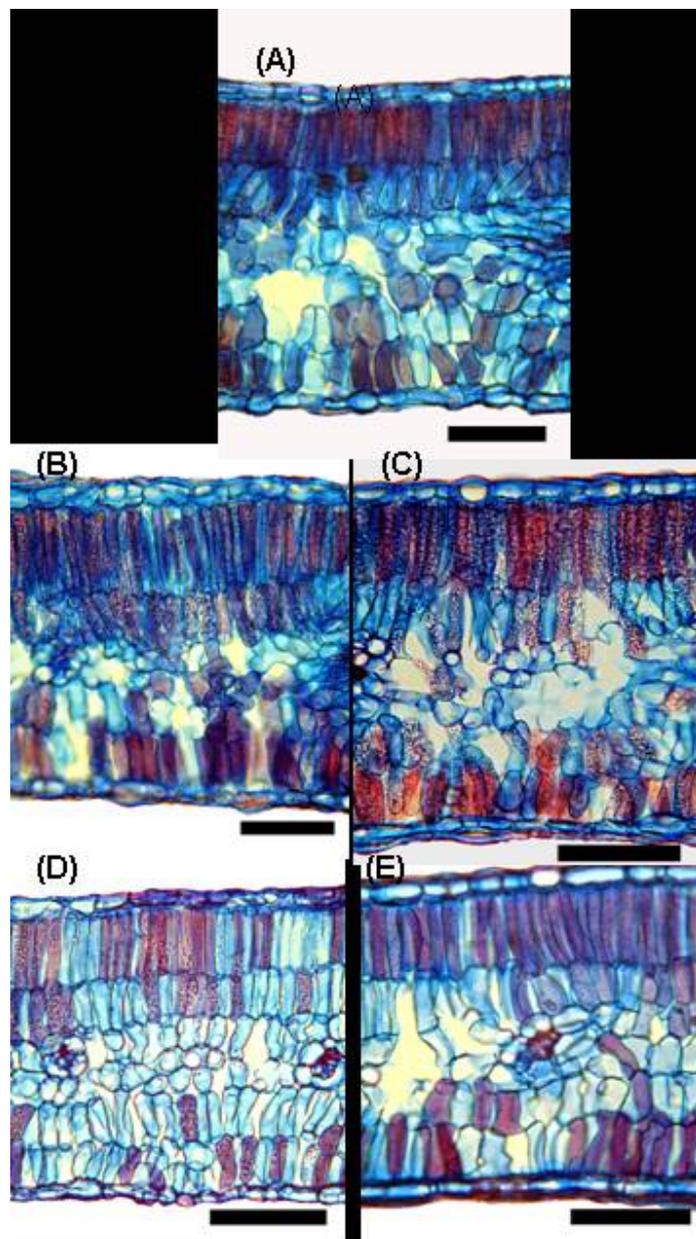


FIGURA 28 Secção transversal do limbo foliar das folhas de *E. camaldulensis* submetida a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante um período de 20 dias. A barra horizontal em negrito corresponde a 100 μM .

Por apresentar acúmulo de cargas negativas, o aumento na espessura da epiderme pode ampliar o papel de filtro biológico para os íons metálicos exercido por esse tecido. O aumento em espessura da endoderme, uma barreira apoplástica, pode representar uma menor translocação do Cd para a parte aérea, diminuindo os efeitos tóxicos deste metal no sistema fotossintético. A tolerância aos metais pesados pode estar relacionada à proporção da raiz ocupada pelos tecidos epidérmicos e pelas barreiras apoplásticas. Lux et al. (2004), trabalhando com clones de *Salix* contrastantes quanto às características de acumulação e sensibilidade ao Cd, verificaram que clones caracterizados por alta tolerância têm elevada proporção desses tecidos, independente de suas características de acumulação e translocação de metais.

Modificações quanto à espessura e à constituição química das barreiras apoplásticas são adaptações importantes para a tolerância das plantas a fatores de estresse. Muitos estudos relatam que a endoderme é um dos principais locais de alocação de metais pesados nas raízes (Wójcik et al., 2006; Lux et al., 2004; Ederli et al., 2004). Segundo Enstone & Peterson (2003), esse tecido constitui uma barreira fisiológica que exerce, além de suas funções básicas, papel importante de proteção contra estresses diversos.

O mesofilo e o limbo foliar de folhas de *E. camaldulensis* foram também afetados pela presença do Cd. As espessuras do mesofilo e do limbo foliar diminuíram de acordo com o aumento nas doses de Cd, não tendo diferenciado entre os tratamentos 15 e 25 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ e entre os tratamentos 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ (Tabela 3). Diminuição no tamanho das células do mesofilo tem sido relatada em plantas expostas a metais pesados (Sridhar et al., 2005; Zhao et al., 2000). Sirdhar et al. (2005) verificaram o colapso de células dos parênquimas paliçádico e lacunoso de *Brassica juncea* exposta a Zn e a Cd. Tais dados poderiam explicar a redução nas espessuras do mesofilo e do limbo foliar, verificada no presente estudo. A diminuição em espessura do mesofilo sugere

uma redução na capacidade fotossintética das plantas expostas ao Cd, o que tem sido verificado em vários estudos (Di Cagno et al., 2001; Chugh et al., 1999; Baszynski et al., 1980).

A espessura das epidermes abaxial e adaxial da folhas foi menor nos tratamentos 45 e 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$, que não diferiram entre si (Tabela 3). De acordo com Vollenweider et al. (2006), o colapso de células da epiderme da face adaxial das folhas, a deposição de compostos polifenólicos e o maior espessamento das paredes celulares das células epidérmicas de ambas as faces do limbo foliar são algumas das variações anatômicas observadas em plantas expostas ao Cd. Em experimentos com feijão, a expansão celular foi inibida e o teor relativo de água foi reduzido, sugerindo que o Cd induziu a redução na extensibilidade celular (Poschenrieder et al., 1989), o que poderia, em parte, explicar a diminuição da epiderme foliar nos tratamentos de maior dose de Cd.

O número de células das epidermes das faces abaxial e adaxial das folhas aumentou proporcionalmente com o aumento das doses de Cd na solução, não diferindo entre os tratamentos controle e 15 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$ na epiderme da face abaxial (Tabela 3). O aumento no número de células das epidermes pode constituir uma adaptação deste tecido foliar para suportar o estresse ambiental. A epiderme, tanto em folha quanto em raízes, é um tecido bastante responsivo ao estresse, sendo verificadas variações para este tecido em plantas submetidas a diferentes condições de ambiente, como luz, salinidade, umidade, seca e inundação (Melo et al. 2007; Enstone & Peterson, 1998; Reinhardt & Rost, 1995).

TABELA 3 Densidade estomática e espessura de células e tecidos de plantas jovens de *E. camaldulensis* submetidas a doses crescentes de Cd em solução nutritiva.

Características avaliadas	Tratamentos ($\mu\text{mol Cd L}^{-1}$)				
	0	15	25	45	90
Epid. radicular (μm)	10,1 e	16,6 d	20,5 c	25,3 b	30,2 a
End. radicular (μm)	11,4 e	13,6 d	15,5 c	17,4 b	25,1 a
Mesofilo foliar (μm)	292,4 a	273,5 b	272,6 b	208,3 c	209,7 c
Limbo foliar (μm)	326,8 a	312,2 b	309,5 b	236,4 c	241,2 c
Epid abaxial (μm)	16,8 a	17,2 a	17,2 a	11,4 b	13,8 b
Epid adaxial (μm)	18,0 a	21,7 a	19,8 a	15,9 b	17,7 b
N° cel. EAb.	1509,2 d	1510, 3 d	1596,8 c	1787,9 b	2249,1 a
N° cel. EAd.	1204,0 e	1373,9 d	1627,0 c	1699, 6 b	2050,9 a
Dens. est. ad.	326,8 e	240,5 d	416,5 b	388,7 c	457,3 a
DPEEAb (μm)	21,4 a	22,1 a	20,3 a	18,9 a	18,3 a
DEEEAb (μm)	15,2 a	15,6 a	13,3 a	13,5 a	13,4 a
Dens. est. ab.	187,4 e	231,6 d	270,9 c	283,6 a	274,8 b
DPEEAd (μm)	22,1 a	22,5 a	22,6 a	22,2 a	20,0 a
DEEEAd (μm)	14,3 a	14,6 a	14,6 a	12,7 a	12,7 a

Epid. radicular = epiderme radicular; End. radicular = endoderme radicular; N° cel. EAb = n° de células da epiderme abaxial; N° cel. EAd. = n° de células da epiderme adaxial; Dens. est. ad. = densidade estomática da epiderme adaxial ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$); DPEEAd = diâmetro polar dos estômatos da epiderme adaxial; DEEEAd = diâmetro equatorial do estômatos da epiderme adaxial; Dens. est. ab. = densidade estomática da epiderme abaxial ($\text{n}^\circ/\text{mm}^2$); DPEEAb = diâmetro polar dos estômatos da epiderme abaxial; DEEEAb = diâmetro equatorial do estômatos da epiderme abaxial. Médias seguidas pela mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste Scott-Knott, a $P \leq 0,05$ ($n=5$).

O número de estômatos por mm^2 da epiderme das faces abaxial e adaxial teve aumento proporcional ao aumento das doses de Cd na solução (Tabela 3 e Figura 29). Os estômatos encontrados em folhas de *E. camaldulensis* estão

distribuídos em ambas as faces, porém, maior número de estômatos é encontrado na face abaxial, sendo, então, classificado como anfi-hipoestomático (Apezatto-da-Glória & Carmello-Guerreiro, 2003).

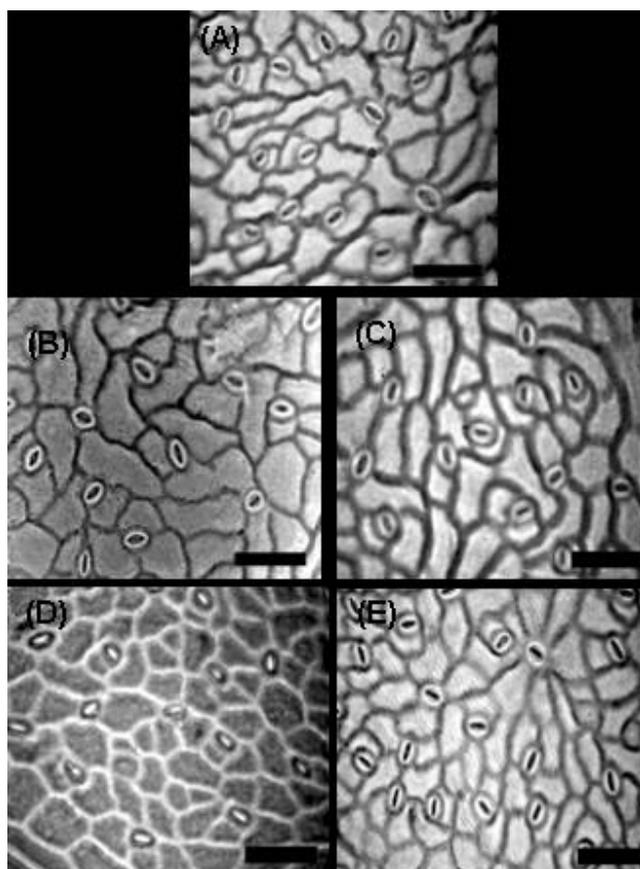


FIGURA 29 Seção paradérmica de folhas de *E. camaldulensis* submetidas a doses crescentes de Cd, em solução nutritiva, durante um período de 20 dias. A barra horizontal em negrito corresponde a 100 μ M.

Os diâmetros polar e equatorial dos estômatos de ambas as faces não diferiram entre os tratamentos (Tabela 3 e Figura 29). Aumento na densidade estomática de folhas em condições de estresse por Cd tem sido verificado em

Silene vulgaris (Chardonens et al., 1998), *Brassica napus* (Baryla et al., 2001) e *Brassica juncea* (Salt et al., 1995). O aumento na densidade estomática poderia constituir uma estratégia adaptativa das plantas visando à manutenção do suprimento adequado de CO₂, necessário à fotossíntese, tendo em vista que a elevação no potencial hídrico das plantas de acordo com o tempo de exposição ao Cd sugere uma redução nas taxas de transpiração. Melo et al. (2007) correlacionaram positivamente o aumento na densidade estomática com o suprimento de CO₂ em situações de baixa transpiração. Acréscimo na densidade estomática e redução na taxa de transpiração de plantas expostas ao Cd foram verificados em *Phaseolus vulgaris*, considerado sensível ao Cd (Barceló & Poshenrieder, 1990).

5 CONCLUSÕES

As espécies *P. glomerata* e *E. camaldulensis* podem acumular certa quantidade de Cd sem demonstrar fitotoxicidade ou redução no crescimento da planta, quando a concentração do Cd no meio ambiente for baixa. Entretanto, concentrações altas resultarão em variações na produção de matéria seca, na estrutura das folhas, estimulação do sistema antioxidante, podendo sugerir que essas plantas apresentam potencial para a detoxificação de Cd.

No presente trabalho, foram observadas algumas das implicações fisiológicas de alterações estruturais causadas pela absorção, translocação e acúmulo do Cd. A adição de Cd no meio de solução reduziu a produção de matéria seca das raízes e da parte aérea, diminuiu os teores de clorofila com o aumento do tempo de exposição e alterou o estado nutricional das duas espécies estudadas. Em *P. glomerata*, os teores de carotenóides foram reduzidos, enquanto, em *E. camaldulensis*, esses teores foram aumentados com o tempo de exposição. O potencial hídrico de *P. glomerata* foi reduzido com o aumento do estresse e foi maior no final do período experimental em *E. camaldulensis*, aos 12 e 20 DAT. Ocorreram alterações no metabolismo do oxigênio ativado, evidenciadas pelo aumento da peroxidação de lipídios nas doses maiores de Cd nas raízes e na parte aérea de *P. glomerata* e na parte aérea de *E. camaldulensis*. Em *P. glomerata*, as enzimas do sistema antioxidativo tiveram suas atividades afetadas com a adição de Cd. A SOD apresentou maiores atividades no início da fase experimental. A CAT encontrada nas folhas apresentou aumento na atividade com o aumento de Cd em solução para o 1º DAT e redução na atividade com o aumento do tempo de exposição ao metal, enquanto, nas raízes, a atividade da enzima foi maior aos 12 e 20 DAT, no tratamento com 90 $\mu\text{mol Cd L}^{-1}$. A atividade da APX nas raízes e parte aérea foi reduzida com o aumento do estresse, enquanto a atividade da GPX nas raízes foi reduzida apenas no 1º DAT, com o aumento das doses de Cd, sendo pouco afetada nos outros

tratamentos. Quanto a atividade da GR, tendo, nas folhas, sido observado um ligeiro aumento e, nas raízes, redução na atividade com o aumento dos níveis de Cd, com exceção da atividade avaliada no 12º DAT, que apresentou aumento na atividade, tanto nas folhas quanto nas raízes. Por meio dos cortes anatômicos realizados, constataram-se aumento dos números de estômatos e alterações em seus diâmetros com o aumento das doses de Cd. O Cd na solução também reduziu a espessura do limbo foliar de *E. camaldulensis*.

A temática deste estudo exige pesquisas complementares para a compreensão, em nível mais aprofundado, de estudos relacionados a: regulação de proteínas transportadoras, determinações da quantidade de substâncias produzidas como glutatona oxidada (GSSG), H₂O₂ e sua localização na célula, também estudos histoquímicos da localização do metal na célula, além de peptídeos de complexação de metais, como as fitoquelatinas.

A complementação do estudo torna-se necessária, a fim de eleger genótipos tanto fitorremediadores quanto bioindicadores, para se obter um conjunto maior de informações para traçar estratégias de melhoramento diretamente relacionadas ao programa de fitorremediação de solos contaminados e de monitoramento ambiental. Porém, a identificação de rotas bioquímicas individuais, tais como a produção de fitoquelatinas, a regulação de proteínas transportadoras, entre outras, é essencial. Sem a integração dentro de uma resposta em âmbito celular, o estudo pode vir a perder a direção, supervalorizando certa rota metabólica no melhoramento da tolerância.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCIOLY, A.M.A.; SIQUEIRA, J.O.; CURI, N.; MOREIRA, F.M.S. Amenização do calcário na toxidez de zinco e cádmio para mudas de *Eucalyptus camaldulensis* cultivadas em solo contaminado. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, n.4, p.775-783, jul./ago. 2004.

ALCANTARA, E.; ROMERA, F.J.; CAÑETE, M.; GUARDA, M.D. de la. Effects of heavy metals on both induction and function of root Fe (III) reductase in Fe - deficient cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants. **Journal Experimental of Botany**, Oxford, v.45, n.281, p.3-1898, 1994.

ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n.373, p.1331, May 2002.

ANGELOV, M.; TSONEV, T.; UZUNOVA, A.; GAIDARDJIEVA, K. Cu²⁺ effect upon photosynthesis, chloroplast structure, RNA and protein-synthesis of pea-plants. **Photosynthetica**, Prague, v.28, n.3, p.341-350, 1993.

APEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. Viçosa: Ed. UFV, 2003. 438p.

ARNON, D.I. Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, Washington, v.24, n.1, p.1-15, Jan. 1949.

ARTETXE, U.; GARCIA-PLAZAOLA, J.I.; HERNÁNDEZ, A., BECERRIL, J.M. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, n.10, p.859-863, Oct. 2002.

ASADA, K. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.50, p.601-639, 1999.

ASLAN, M.; UNLU, M.Y.; TURKMEN, N.; YILMAZ, Y.Z. Sorption of cadmium and effects on growth, protein content and photosynthetic pigment composition of *Nasturtium officinale* R. Br. and *Mentha aquatica* L. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.71, n.2, p.323-329, Aug. 2003.

ASSCHE, F. van; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.13, n.3, p.195-206, Apr. 1990.

AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.104, n.2, p.280-292, 1998.

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

BAKER, A.J.M. Metal tolerance. **New Phytologist**, Cambridge, v.106, n.1, p.93-111, 1987.

BARCELÓ, J.; POSHENRIEDER, C. Plant water relations as affected by heavy metal stress: a review. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.13, n.1, p.1-37. 1990.

BARCELÓ, J.; POSHENRIEDER, C.; ANDREU, J.; GUNSE, B. Cadmium-induced decrease of water stress resistance in bush bean plant (*Phaseolus vulgaris* – cv. Contender). I. Effects of Cd on water potential, relative water content, and cell wall elasticity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.125, n.1/2, p.17-25, 1986.

BARCELÓ, J.; VÁSQUEZ, M.D.; POSHENRIEDER, C. Structural and ultrastructural disorders in cadmium-treated bush bean plants. **The New Phytologist**, Cambridge, v.108, n.1, p.37-49, Jan. 1988.

BARYLA, A.; CARRIER, P.; FRANCK, F.; COULOMB, C.; SAHUT, C.; HAVAUX, M. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. **Planta**, Berlin, v.212, n.5/6, p.696-709, Apr. 2001.

BASZYNSKI, T.; WAJDA, L.; KRÓL, M.; WOLÍNSKA, D.; KRUPA, Z.; TUKENDORF, A. Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. **Plantarum**, Copenhagen, v.48, n.3, p.365-370, 1980.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.44, n.1, p.276-287, Nov. 1971.

BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.17, n.1, p.21-34, Jan./Apr. 2005.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockille, v.116, n.2, p.651-658, Feb. 1998.

BRADFORD, J.M. A rapid and sensitive method for qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, n.1/2, p.248-254, 1976.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, Amsterdam, v.52, p.302-310, 1978.

CAKMAK, I.; HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.83, n.3, p.463-468, 1991.

CARNEIRO, M.A.C.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Estabelecimento de plantas herbáceas em solo com contaminação de metais pesados e inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.12, p.1443-1452, dez. 2001.

CHAOUI, A.; MAZHOUDI, S.; GHORBAL, M.H.; ELFERJANI, E. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzymes activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, Clare, v.127, n.2, p.139-147, Sept. 1997.

CHARDONNENS, A.N.; BOOKUM, W.M. ten; KUIJPER, D.J.; VERKLEIJ, J.A.C.; ERNST, W.H.O. Distribution of cadmium in leaves of cadmium tolerant and sensitive ecotypes of *Silene vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v.104, n.1, p.75-80, Sept. 1998.

CHASSAIGNE, H.; VACCHINA, V.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Identification of phytochelatin-related peptides in maize seedlings exposed to cadmium and obtained enzymatically *in vitro*. **Phytochemistry**, Oxford, v.56, n.7, p.657-668, Apr. 2001.

CHUGH, L.K.; SAWHNEY, S.K. Photosynthetic activities of *Pisum sativum* seedlings grown in presence of cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.37, n.4, p.297-303, Apr. 1999.

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

COBBETT, C.S. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, n.3, p.825-832, June 2000.

COHEN, C.K.; FOX, T.C.; GARVIN, D.F.; KOCHIAN, L.V. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v.116, n.3, p.1063-1072, Mar. 1998.

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

DELL, B.; ROBINSON, J.M. Symptoms of mineral nutrient deficiencies and the nutrient concentration ranges in seedlings of *Eucalyptus maculate* Hook. **Plant Soil**, The Hague, v.156, p.255-261, Oct. 1993.

DI CAGNO, R.; GUIDI, L.; DE GARA, L.; SOLDATINI, G.F. Combined cadmium and ozone treatments affect photosynthesis and ascosbate defences in sunflower. **New Phytologist**, New York, v.151, n.3, p.627-636, Sept. 2001.

DI CAGNO, R.; GUIDI, L.; STEFANI, A.; SOLDATINI, G.L. Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. **New Phytologist**, New Yor, v.144, n.1, p.65-71, Oct. 1999.

DUKE, S.O.; KENYON, W.H. Effects of dimethazone (FMC) on chloroplast development. II. Pigment synthesis and photosynthesis function in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v.25, n.1, p.11-18, 1986.

EDERLI, L.; REALE, L.; FERRANTINI, F.; PASQUALINI, S. Responses induced by high concentration of cadmium in *Phragmites australis* roots. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.121, n.1, p.66-74, May 2004.

EDREVA, A. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, Amsterdam, v.106, n.2/3, p.119-133, Apr. 2005.

ELTROP, L.; BROWN, G.; JOACHIM, O.; BRINKMANN, K. Lead tolerance of *Betula* and *Salix* in the mining area of Mechernich/Germany. **Plant and Soil**, Neetherland, v.131, n.2, p.275-285, 1991.

ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A. Effects of exposure to humid air on epidermal viability and suberin deposition in maize (*Zea mays* L.) roots. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.21, n.8, p.837-844, May 1998.

ENSTONE, D.E.; PETERSON, C.A.; MA, F. Root endodermis and exodermis: structure, function, and responses to the environment. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v.21, n.4, p.335-351, Dec. 2003.

ERNST, W.H.O.; KRAUSS, G.J.; VERKLEIJ, J.A.C.; WESENBERG, D. Interation of heavy metals with the sulphur metabolism in angiosperms from an ecological point of view. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.31, n.1, p.123-143, Jan. 2008.

FATH, A.; BETHEK P.; BELLIGNI, V.; JONES, R. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n.372, p.1273-1282, May 2002.

FIELDES, M.A.; GERHARDT, K.E. Flax guaiacol peroxidases can be used to illustrate the possibility of misinterpreting the effects of stress on the activity of developmentally regulated enzymes. **Plant Science**, Clare, v.132, n.1, p.89-99, Feb.1998.

FODOR, E.; SZABÓ-NAGY, A.; ERDEI, L. The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.147, n.1, p.87-92, Oct. 1995.

FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, J.K. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Stuttgart, v.92, p.696-717, 1994.

FOYER, C.H.; LOPEZDELGADO, H.; DAT, J.F.; ISCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.100, n.2, p.241-254, June 1997.

GALLEGO, S.M.; BENEVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of cadmium ions an antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Biology Plantarum**, Prague, v.42, n.1, p.49-55, 1999.

GALLEGO, S.M.; BENAVIDES, M.P.; TOMARO, M.L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Clare, v.121, n.2, p.151-159, Dec. 1996.

GHNAYA, T.; NOUAIRI, I.; SLAMA, I.; MESSEDI, D.; GRIGNON, C.; ABDELLY, C.; GHORBEL, M.H. Cadmium effects on growth and mineral nutrition of two halophytes: *Sesuvium portacastrum* and *Mesembryanthemum crystallinum*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.162, n.10, p.1133-1140, Oct. 2005.

GRATÃO, P.L. **Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 submetidas ao cádmio**. 2003. 109p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

GUO, T.R.; ZHANG, G.P.; ZHOW, M.X.; WU, F.B.; CHEN, J.X. Influence of aluminium and cadmium stresses on mineral nutrition and root exudates in two barley cultivars. **Pedosphere**, Beijing, v.17, n.4, p.505-512, Aug. 2007.

GUSSARSSON, M.; ASP, H.; ADALSTEINSSON, S.; JENSÉN, P. Enhancement of cadmium effects on growth and nutrient composition of birch (*Betula pendula*) by buthionine sulfoximine (BSO). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.47, n.2, p.211-215, Feb. 1996.

GWOZDZ, E.A.; PRZYMUSINSKI, R.; RUCINSKA, R.; DECKERT, J. Plant cell responses to heavy metals: molecular and physiological aspects. **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v.19, n.4, p.459-465, Dec. 1997.

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

HASSON, M.J.; WANG, F.; ALI, S.; ZHANG, G. Toxic effect of cadmium on rice as affected by nitrogen fertilizer form. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.277, n.1/2, p.359-365, Dec. 2005.

HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Diego, v.125, n.1, p.189-198, Apr. 1968.

- HEGEDÜS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Clare, v.160, n.6, p.1085-1093, May 2001.
- HERNÁNDEZ, L.E.; CÁRPENA-RUIZ, R.; GARATE, A. Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.19, n.12, p.1581-1598, 1996.
- HERNÁNDEZ, L.E.; COOKE, D.T. Modification of the roots plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum*. **Journal Experimental and Botany**, Oxford, v.48, n.7, p.1375-1381, July 1997.
- HERNÁNDEZ, L.E., LOZANO-RODRIGUEZ, E.; GÁRATE, A.; CARPENA-RUIZ, R. Influence of cadmium on the uptake, tissue accumulation and subcellular distribution of manganese in pea seedlings. **Plant Science**, Clare, v.132, n.2, p.139-151, Mar. 1998.
- HOLTMAN, W.L.; HEISTEK, J.C.; MATTER, K.A.; BAKHUIZEN, R.; DOUMA, A.C. β -Oxidation of fatty acids is linked to the glyoxylate cycle in the aleurone but not in the embryo of germinating barley. **Plant Science**, Clare, v.94, n.1, p.43-53, 1994.
- HORVÁTH, G.; DROPPA, M.; ORAVECZ, A.; RASKIN, V.I.; MARDER, J.B. Formation of the photosynthetic apparatus during greening of cadmium-poisoned barley leaves. **Planta**, Berlin, v.199, n.2, p.238-243, June 1996.
- ILANGOVA, K.; CAÑIZARES-VILLANUEVA, R.O.; MORENO, S.G.; VOLTOLINA, D. Effect of cadmium and zinc on respiration and photosynthesis in suspended and immobilized cultures of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus acutus*. **Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v.60, n.6, p.936-943, June 1998.
- ISAURE, M.P.; FAYARD, B.; SARRET, G.; PAIRIS, S.; BOURGUIGNON, J. Localization and chemical forms of cadmium in plant samples by combining analytical electron microscopy and X-ray spectromicroscopy. **Spectrochimica Acta: Part B**, Oxford, v.612, n.12, p.1242-1252, Dec. 2006.
- ISRAR, M.; SAHI, S.V.; JAIN, J. Cadmium accumulation and antioxidative responses in the *Sesbania drummondii* callus. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.50, n.1, p.121-127, Jan. 2006.

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

KARPINSKI, S.; REYNOLDS, H.; KARPINSKA, B.; WINGSLE, G.; CREISSEN, G.; MULLINEAUX, P. Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. **Science**, Washington, v.284, n.5414, p.654-657, Apr. 1999.

KIRKHAM, M.B. Water relations of cadmium-treated plants. **Journal Environmental of Quality**, Madison, v.7, n.3, p.334-336, 1978.

KORSHUNOVA, Y.O.; EIDE, D.; CLARK, W.G.; GUERINOT, M.L.; PAKRASI, H.B. The IRT1 protein from *Arabidopsis thaliana* is a metal transporter with a broad substrate range. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.40, n.1, p.37-44, May 1999.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Seropédica: EDUR, 1997.

KRAUS, T.E.; MCKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.145, n.4, p.570-576, Feb. 1995.

KRUPA, Z. Cadmium-induced changes in composition and structure of the light-harvesting complex II in radish cotyledons. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.73, n.4, p.518-524, Aug. 1988.

KÜPPER, H.; ŠETLÍK, I.; SPILLER, M.; KÜPPER, F.C.; PRÁŠÍL, O. Heavy metal-induced inhibition of photosynthesis: targets of *in vivo* heavy metal chlorophyll formation. **Journal of Phycology**, Malden, v.38, n.3, p.429-441, June 2002.

LABOURIAU, L.G.; OLIVEIRA, J.C.; SALGADO-LABOURIAU, M.L. Transpiração de *Schizolobium parahiba* (Vell.) Toledo: comportamento na estação chuvosa, nas condições de Caeté, Minas Gerais, Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v.33, n.2, p.237-257, June 1961.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v.27, n.4, p.969-978, 1988.

LOLKEMA, P.C.; VOOIJS, R. Copper tolerance in *Silene cucubalus*. **Planta**, Berlin, v.167, n.1, p.30-36, Jan. 1986.

LUX, A.A.; SOTTNIKOVÁ, A.; OPATRŇÁ, J.; GREGER, M. Differences in structure of adventitious roots in *Salix* clones with contrasting characteristics of cadmium accumulation and sensitivity. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v.120, n.4, p.537-545, Apr. 2004.

MacFARLANE, G.R. Leaf biochemical parameters in *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh as potential biomarkers of heavy metal stress in estuarine ecosystems. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v.44, n.3, p.244-256, Mar. 2002.

MACNAIR, M.R. The genetics of metal tolerance in vascular plants. **New Phytologist**, New York, v.124, n.4, p.541-559, Aug. 1993.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C.; OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional da planta: princípios e fatos**. Piracicaba: POTAFÓS, 1989. 201p.

MARQUES, T.C.L.L.S.M.; MOREIRA, M.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.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 1995. 902p.

MAZHOUDI, S.; CHAOUI, A.; GHORBAL, M.H.; ELFERJANI, E. Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). **Plant Science**, Clare, v.127, n.2, p.129-137, Sept. 1997.

MEHARG, A.A. Integrated tolerance mechanisms: constitutive and adaptive plant responses to elevated metal concentrations in the environment. **Plant, Cell and Environmental**, Oxford, v.17, n.9, p.989-993, Sept. 1994.

MELO, H.C.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M.; MELO, L.A.; ALVES, J.D. Alterações anatômicas e fisiológicas em *Setaria anceps* Stapf ex Massey e *Paspalum paniculatum* L. sob condições de déficit hídrico. **Hoehnea**, São Paulo, v.34, n.2, p.145-153, 2007.

MENGEL, K. KIRKBY, E.A. **Principles of plant nutrition**. 4.ed. Bern: International Potash Institute, 1987. 593p.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAKOSE, S.V.; PRASAD, M.N.V. Phytochelatin synthesis and response of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.44, n.1, p.25-37, Jan. 2006.

MOCQUOT, B.; VANGRONVELD, J.; CLIJSTERS, H.; MENCH, M. Cooper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and enzymes activities. **Plant Science**, Dordrecht, v.182, n.2, p.287-300, May 1996.

MONNI, S.; UHLIG, C.; HANSEN, E.; MAGEL, E. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. **Environmental Pollution**, Oxford, v.112, n.2, p.121-129, Apr. 2001.

NAKANISHI, H.; OGAWA, I.; ISHIMARU, Y.; MORI, S.; NISHIZAWA, N.K. Iron deficiency enhances cadmium uptake and translocation mediated by the Fe²⁺ transporters OsIRT1 and OsIRT2 in rice. **Soil Science & Plant Nutrition**, Oxford, v.52, n.4, p.464-469, Aug. 2006.

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

NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.49, p.249-279, 1998.

OLIVEIRA, J.A.; OLIVA, M.A.; CAMBRAIA, J. Effects of cadmium on chlorophyll contents and peroxidase activity in soyabean. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v.6, n.2, p.97-101, dez. 1994.

OUZOUNIDOU, G.; MOUSTAKAS, M.; ELEFThERIOUS, E.P. Physiological and ultrastructural effects of cadmium on wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.32, n.2, p.154-160, Feb. 1997.

OVEN, M.; RAITH, K.; NEUBERT, R.H.H.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Homo-phytochelatins are synthesized in response to cadmium in azuki beans. **Plant Physiology**, Rockville, v.126, n.3, p.1275-1280, July 2001.

- PAIVA, H.N.; CARVALHO, J.G.; SIQUEIRA, J.O.; MIRANDA, J.R.P.; FERNANDES, A.R. Absorção de nutrientes por mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.) em solução nutritiva contaminada por cádmio. **Revista Árvore**, Viçosa, v.28, n.2, p.189-197, mar./abr. 2004.
- PATRA, J.; PANDA, B.B. A comparison of biochemical responses to oxidative and metal stress in seedlings of barley, *Hordeum vulgare* L. **Environmental Pollution**, Oxford, v.101, n.1, p.99-105, 1998.
- PEREIRA, G.L.G.; MOLINA, S.M.G.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.239, n.1, p.123-132, Feb. 2002.
- PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHARDT, N.; VAVASSEUR, A.; FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **The Plant Journal**, Oxford, v.32, n.4, p.539-548, Nov. 2002.
- PILON-SMITS, E.A.H.; ZHU, Y.L.; SEARS, T.; TERRY, N. Overexpression of glutathione reductase in *Brassica juncea*: effects on cadmium accumulation and tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.110, p.455-460, 2000.
- POLIDOROS, A.N.; SCANDALIOS, J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.106, n.1, p.112-120, May 1999.
- POSCHENREIDER, C.; GUNSE, B.; BARCELÓ, J. Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance, and abscisic acid content in expanding bean leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.90, n.4, p.1365-1371, Aug. 1989.
- PRASAD, K.V.S.K.; SARADHI, P.P.; SHARMILA, P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.42, n.1, p.1-10, Aug, 1999.
- PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plant. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.35, n.4, p.525-545, Oct. 1995.

QUARTACCI, M.F.; PINZINO, C.; SGHERRI, C.L.M.; VECCHIA, F.D.; NAVARIZZO, F. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII - enriched membranes in wheat. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.108, n.1, p.87-93, Jan. 2000.

REINHARDT, D.H.; ROST, T.L. Salinity accelerates endodermal development and induces an exodermis in cotton seedling roots. **Environment of Experimental Botany**, Oxford, v.35, n.4, p.563-674, Oct. 1995.

RESENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.2, p.123-130, mar./abr. 2003.

ROGERS, E.E.; EIDE, D.J.; GUERINOT, M.L. Altered selectivity in an *Arabidopsis* metal transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United State of America**, Washington, v.97, p.12356-12360, 2000.

SABER, N.E.; ABDEL-MONEIM, A.M.; BARAKAT, S.Y. Role of organic acids in sunflower tolerance to heavy metal. **Biologia Plantarum**, Prague, v.42, n.1, p.65-73, Mar. 1999.

SANDMANN, G.; BÖGER, P. Comparison of the bleaching activity of norflurazon and oxyfluorfen. **Weed Science**, Chanpaign, v.31, n.3, p.338-341, 1983.

SALT, D.E.; PRINCE, R.C.; PICKERING, J.J.; RASKIN, I. Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian Mustard. **Plant Physiology**, Rockville, v.109; n.4, p.1427-1433, Dec. 1995.

SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; RIO, L.A. del. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.52, n.364, p.2115-2126, Nov. 2001.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Rockville, v.101, n.1, p.7-12, Jan. 1993.

SCHICKLER, H.; CASPI, H. Response of antioxidative enzymes to nickel and cadmium stress in hyperaccumulator plants of the genus *Alyssum*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.105, n.1, p.39-44, Jan. 1999.

SCHUTZENDUBEL, A.; POLLE, A. Plant response to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.53, n.372, p.1351-1365, May 2002.

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.

SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z. Interaction between cadmium and iron and its effects on photosynthetic capacity of primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.34, n.6, p.833-841, Nov./Dec. 1996.

SILVA, F.C. (Org.). **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: EMBRAPA, 1999. 370p.

SINGH, S.; EAPEN, S.; D'SOUZA, S.F. Cadmium accumulation and its influence on lipid peroxidation and antioxidative system in an aquatic plant, *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, Oxford, v.62, n.2, p.233-246, Jan. 2006.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G. de, MOREIRA, F.M.S. Fitotoxicidade de cádmio para *Eucalyptus maculata* e *E. uruophylla* em solução nutritiva. **Revista Árvore**, Viçosa, v.29, n.2, p.175-183, mar./abr. 2005.

SOMASHEKARAI AH, B.V.; PADMAJANA, K.; PRASAD, A.R.K. Phytotoxicity of cadmium ion on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.85, n.1, p.85-89, May 1992.

SOUZA, I. R. P.; MacADAM, J. W. A transient increase in apoplastic peroxidase activity preceds decrease in elongation rate of B73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.104, n.4, p.556-562, Dec. 1998.

SRIDHAR, B.B.M; DIEHL, S.V.; HAN, F.X.; MONTS, D.L.; SU, Y. Anatomical changes due to uptake and accumulation of Zn and Cd in Indian mustard (*Brassica juncea*). **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.2, p.131-141, Sept. 2005.

STEFFENS, J.C. Heavy metal-binding peptides of plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.41, p.553-575, 1990.

STOBART, A.K.; GRIFFITHS, W.T.; AMEEN-BUKHARI, I.; SHERWOOD, R. The effect of Cd²⁺ on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v.63, n.3, p.293-298, 1985.

STOLT, J.P.; SNELLER, F.E.C.; BRYNGELSSON, T.; LUNDBORGT, T.; SCHAT, H. Phytochelatin and cadmium accumulation in wheat. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.49, n.1, p.21-28, Feb. 2003.

TOPPI, L.S. di; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.41, n.2, p.105-130, Apr. 1999.

VERKLEIJ, J.A.C.; SCHAT, H. Mechanisms of metal tolerance in plants. In: SHAW, A.J. (Ed.), **Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects**. Boca Raton: CRC Press, 1990. p.179-193.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. **Phytochemistry**, Oxford, v.57, n.5, p.701-710, July 2001.

VOLLENWEIDER, P.; COSIO, C.; GÜNTHARDT-GOERG, M.S.; KELLER, C. Localization and effects of cadmium in leaves of a cadmium-tolerant willow (*Salix viminalis* L.). Part II. Microlocalization and cellular effects of cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.58, n.1/3, p.25-40, Dec. 2006.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D.; BREUSEGEM, F. van. Signal transduction during oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n.372, p. 1227-1236, May 2002.

WAGNER, G.J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. **Advances in Agronomy**, San Diego, v.51, p.173-212, 1993.

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

WINGLSE, G.; GARDESTROM, P.; HALLGRENT, J.E.; KARPINSKI, S. Isolation, purification and subcellular localization of isozymes of superoxide-dismutase from scots pines (*Pinus sylvestris* L.) needles. **Plant Physiology**, Rockville, v.95, n.1, p.21-28, Jan. 1991.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; MONTAGU, M. van; CAMP, W. van. Catalase in plants. **Molecular Breeding**, London, v.1, p.207-228, 1995.

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; MONTAGU, M. van; INZÉ, D.; CAMP, W. van. Catalase is a sink or H₂O₂ and is indispensable for stress defense in C₃ plants. **The EMBO Journal**, Oxford, v.16, n.16, p.4806-4816, Aug.1997.

WÓJCIK, M.; SKÓRZYNSKA-POLIT; TUKIENDORF, A. Organic acid accumulation and antioxidant enzyme activities in *Thlaspi caerulescens* under Zn and Cd stress. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.48, n.2, p.145-155, Feb. 2006.

WOOLHOUSE, H.W. Toxicity and tolerance in responses of plant to metals. In: LANGE, O.L.; NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B.; ZIEGLER, H. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology**. Berlin: CRC Press, 1983. v.12C, p.245-300.

YANG, X.E.; LONG, X.X.; YE, H.B.; HE, Z.L.; CALVERT, D.V.; STOFELLA, P.J. Cadmium tolerance and hyperaccumulation in a new Zn hyperaccumulating plant species (*Sedum alfredii* Hance). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.259, p.181-189, 2004.

ZHAO, F.J.; LOMBI, E.; BREEDON, T. Zinc hyperaccumulation and cellular distribution in *Arabidopsis halleri*. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v.23, n.5, p.507-514, 2000.