



Carlos Diego Lima de Albuquerque

**Avaliação dos efeitos da contaminação por Cd e Pb
na alface (*Lactuca Sativa* L.) hidropônica
empregando métodos de reconhecimento de padrões
não supervisionados: PCA e HCA.**

LAVRAS - MG

2013

CARLOS DIEGO LIMA DE ALBUQUERQUE

**Avaliação dos efeitos da contaminação por Cd e Pb
na alface (*Lactuca Sativa* L.) hidropônica
empregando métodos de reconhecimento de padrões
não supervisionados: PCA e HCA.**

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

Orientador

Prof. Dr. Ruy Carvalho

LAVRAS – MG

2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Albuquerque, Carlos Diego Lima de.

Avaliação dos efeitos da contaminação por Cd e Pb na alface
(*Lactuca sativa* L.) hidropônica empregando métodos de
reconhecimento de padrões não supervisionados : PCA e HCA /
Carlos Diego Lima de Albuquerque. – Lavras : UFLA, 2013.

77 p. : il.

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

Orientador: Ruy Carvalho.

Bibliografia.

1. Metais pesados. 2. Quimiometria. 3. Contaminantes. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 546.66

CARLOS DIEGO LIMA DE ALBUQUERQUE

**Avaliação dos efeitos da contaminação por Cd e Pb
na alface (*Lactuca Sativa* L.) hidropônica
empregando métodos de reconhecimento de padrões
não supervisionados: PCA e HCA.**

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

APROVADA em 19 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. Márcio Pozzobon Pedroso

DQI/UFLA

Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes

DCA/UFLA

Prof. Dr. Ruy Carvalho

Orientador

LAVRAS – MG

2013

DEDICO

Aos meus pais, **Célia Regina** e **José Carlos**, por terem sempre acreditado e confiado em mim. Amo vocês.

A meu irmão, **Carlos Victor**, pelo incentivo e força nos momentos difíceis. Amo você.

À minha namorada, **Jéssica**, pelo amor, carinho, força, apoio, dedicação, amizade e pela compreensão nos momentos ausentes. Amo você.

“Na essência, devemos permanecer químicos e adaptar a estatística a química, em vez de vice-versa. E os quimiometristas devem continuar a ser motivados para resolver problemas da química, não para desenvolver método.”
(Svante Wold, 1995)

AGRADECIMENTOS

- A Deus e a Nossa Senhora por terem iluminado e guiado o meu caminho até a vitória deste dia.
- Ao meu orientador professor Ruy Carvalho, o qual agradeço pela confiança, pelos ensinamentos, na construção deste trabalho e, principalmente, por sua amizade. MUITO OBRIGADO POR TUDO!
- Aos membros da banca prof. Cleiton, prof. Walcleé e, em especial, o prof. Márcio pela grande amizade, profissionalismo, conhecimento transmitido e importantes discussões, que ajudaram muito na minha formação e a alcançar o meu principal objetivo deste ano.
- Aos meus amigos e colegas da UFLA pelo apoio: Felipe, Juliana, Alexandre, Thallis, Robson, Joális, Ana, Shirley, etc.
- Ao Cléber L. Rodas, Ana Rosa, prof. Janice e todo pessoal do departamento de solos que me cederam o espaço para realização do experimento e valiosas discussões.
- Ao prof. Ronei J. Poppi, por revisar de forma crítica os artigos desta dissertação, por fornecer muitos dos conhecimentos presentes neste trabalho e por ter me aceitado como seu aluno de doutorado, será um prazer trabalharmos juntos (na Quimiometria).
- A todos os profs. do DQI/UFLA, de tal maneira auxiliaram na minha formação. E em especial, os professores Teodorico C. Ramalho e Matheus P. Freitas pelos conhecimentos transmitidos e pela fina demonstração de profissionalismo.
- A CAPES pela concessão da bolsa de estudos, durante o mestrado.

RESUMO

ALBUQUERQUE, Carlos Diego Lima de. **Avaliação dos efeitos da contaminação por Cd e Pb na alface (*Lactuca Sativa* L.) hidropônica empregando métodos de reconhecimento de padrões não supervisionados: PCA e HCA.** 2013. 79p. (Dissertação – Mestrado em Agroquímica) – UFLA, Lavras¹.

Um ensaio em casa de vegetação utilizando alface (*Lactuca Sativa*) em sistema hidropônico foi realizado para avaliar os seguintes efeitos de contaminação por cádmio (Cd), (**artigo 1**), e por chumbo (Pb), (**artigo 2**): 1) avaliar os efeitos de doses crescentes de Cd (0,000; 0,025; 0,100; 0,500 e 1,000 mg L⁻¹) e Pb (0,00; 0,25; 1,00; 5,00 e 10,00 mg L⁻¹) no teor e no acúmulo de nutrientes; 2) investigar possíveis mecanismos de destoxificação de Cd e de Pb, empregando ferramentas quimiométricas: os modelos de análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA). **PCA:** Nos artigos 1 e 2, o K obteve maior mobilidade e a produção de matéria seca pela alface não foi alterada com as doses. A maioria dos nutrientes se concentraram nas raízes, exceto o Ca, para Cd e Pb, e Mg para o Pb; o aumento da concentração de Cd foi antagônico para os teores de Ca, Mg, Mn e Zn e sinérgico para o N e o Cu; o Pb demonstrou antagonismo ao Ca e Mg e sinérgico ao N, S e P. No acúmulo, o Pb foi mais estático que o Cd, concentrando-se mais nas raízes; Pb e Cd foram sinérgicos ao S e antagônicos ao Fe, Cu e Mn. **HCA:** Não forneceu resultados adicionais ao método PCA, para os dois metais contaminantes. O método PCA foi suficientemente eficaz no estabelecimento de todas as conclusões.

Palavras-chave: metais pesados, PCA, HCA, quimiometria, alface

¹Comitê orientador: Ruy Carvalho – UFLA (orientador).

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, Carlos Diego Lima de. **Evaluate the effects of contamination by Cd and Pb of lettuce (*Lactuca Sativa* L.) employing unsupervised pattern recognition method: PCA and HCA.** 2013. 79p. (Dissertation – Mater's student in Agrochemistry) – UFLA, Lavras¹.

A greenhouse assay using a lettuce (*Lactuca Sativa*) hydroponics system was carried out to evaluate the following effects of contamination by cadmium (Cd), (**article 1**), and by lead (Pb), (article 2): 1) evaluate the effects of increasing doses of Cd (0,000; 0,025; 0,100; 0,500 e 1,000 mg L⁻¹) and Pb (0,00; 0,25; 1,00; 5,00 e 10,00 mg L⁻¹) on the contents and accumulation of nutrients; 2) evaluate possible mechanisms to Cd and Pb detoxification, employing chemometric tools: principal components analysis (PCA) and hierarchical clusters analysis (HCA) models. **PCA** In articles 1 and 2, the K get high mobility and dry matter by lettuce is not change with dosages. Most chemical elements concentrated in roots, excluding the Ca for Cd and Pb, and Mg for Pb; the increasing dosages of Cd was antagonistic for levels of Ca, Mg, Mn, and Zn and synergism for N and Cu; the Pb proved to be antagonistic for Ca and Mg, and synergism for N, S and P. In accumulation, the Pb was more estatic as Cd, concentrated in roots; Pb and Cd were synergisms for S and antagonistic for Fe, Cu, and Mn. **HCA**: Additional results not provided to the PCA method, for two heavy metals. The PCA model was sufficiently effective in any conclusions.

Keywords: heavy metals, PCA, HCA, chemometric, lettuce

¹CAdvising Committee: Ruy Carvalho – UFLA (advisor).

LISTA DE FIGURAS

	Página
PRIMEIRA PARTE	
Figura 1 Organização hipotética dos dados multivariados numa matriz X, na qual as linhas são amostras e as colunas são variáveis.....	23
SEGUNDA PARTE	
ARTIGO 1	
Figura 1 Representação gráfica do modelo PCA pela decomposição em SVD. Decomposição da matriz X em três sub-matrizes U, S e V^T mais a matriz E.....	50
Figura 2 Representações do modelo HCA. (a) Esquema do cálculo da distância euclidiana e do agrupamento médio das amostras. (b) Dendrograma Euclidiano médio.....	52
Figura 3 Gráficos biplots (escores X pesos). (a) Teor de nutrientes e de Cd e produção de massa de matéria seca (DM) (b) Acúmulo de nutrientes e de Cd (R – raiz e S – parte aérea; doses de Cd: 1 – 0,000; 2 – 0,025; 3 – 0,100; 4 – 0,500 e 5 – 1,000 mg L ⁻¹).....	52
Figura 4 Dendrogramas Euclidiano Médio. (a) Teor de nutrientes e de Cd e produção de massa de matéria seca (b) Acúmulo de nutrientes e de Cd (R – raiz e S – parte aérea; doses de Cd: 1 – 0,000; 2 – 0,025; 3 – 0,100; 4 – 0,500 e 5 – 1,000 em mg L ⁻¹).	53
ARTIGO 2	
Figura 1 Representação gráfica do modelo PCA pela decomposição em SVD. Decomposição da matriz X em três sub-matrizes U, S e V^T mais a matriz E.....	72
Figura 2 Representações do modelo HCA. (a) Esquema do cálculo da distância euclidiana e do agrupamento médio das amostras. (b)	

Dendrograma Euclidiano médio.....	72
Figura 3 Gráficos biplots (escores X pesos). (a) Teor de nutrientes e de Pb e produção de massa de matéria seca (DM) (b) Acúmulo de nutrientes e de Pb (R – raiz e S – parte aérea; doses de Cd: 1 – 0,00; 2 – 0,25; 3 – 1,00; 4 – 5,00 e 5 – 10,00 mg L ⁻¹).....	73
Figura 4 Dendrogramas Euclidiano Médio. (a) Teor de nutrientes e de Pb e produção de massa de matéria seca (b) Acúmulo de nutrientes e de Pb (R – raiz e S – parte aérea; doses de Cd: 1 – 0,00; 2 – 0,25; 3 – 1,00; 4 – 5,00 e 5 – 10,00 em mg L ⁻¹).	73

SUMÁRIO

	Página
PRIMEIRA PARTE	
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	
ARTIGO 1 PCA and HCA to evaluate the effects of increasing doses of Pb on the content and accumulation of nutrients and production of lettuce (<i>Lactuca Sativa</i> L.).....	33
ARTIGO 2 PCA and HCA to evaluate the effects of increasing doses of Pb on the content and accumulation of nutrients and production of lettuce (<i>Lactuca Sativa</i> L.).....	53
ANEXOS.....	73

PRIMEIRA PARTE

Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O grupo de Química Ambiental do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) tem demonstrado os efeitos maléficos de metais pesados, como o Zn, o Cu, o Pb e o Cd, principalmente os dois últimos, em solos e diversas espécies vegetais empregadas na alimentação humana (PAIM et al., 2006; CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; CANNATA et al., 2012a; CANNATA et al., 2012b; BERTOLI et al., 2012). Entre os efeitos adversos, o Cd e o Pb afetam o crescimento e a produção das plantas (TANHAN et al., 2007; CARVALHO et al., 2008; CARVALHO et al., 2009), além da toxicidade aos seres vivos (ATSDR, 2008). Além disso, os metais pesados quando absorvidos pelas plantas podem alterar diversas funções biológicas, devido alta capacidade de mimetização com outros elementos (Zn, Cu, Cu, Mn, Fe, Ca, Se, etc.) de propriedades químicas semelhantes, tais como eletronegatividade, estrutura iônica, dentre outras (KABATA-PENDIAS, 2010). Diferindo somente na translocação (movimentação de metais: raiz → parte aérea), que é outra característica muito importante desses elementos, devido à facilidade de formar complexos de alto impedimento estérico, o que dificulta a mobilidade nos diferentes compartimentos das plantas (SILVA et al., 2007a; SILVA et al., 2007b).

Muitos estudos relacionados à fitorremediação (absorção de metais pesados por plantas) desses elementos (QU et al., 2003; ZHAO et al., 2006; NIU et al., 2007; SOLÍS-DOMINGUES et al., 2007; TANHAN et al., 2007; BONFRANCESCHI et al., 2009; MELO et al., 2009; COSTA et al., 2012) ou sobre a tolerância de plantas olerícolas (LIU et al., 2008; BERTOLI et al., 2012; CANNATA et al., 2012a; CANNATA et al., 2012b) têm apresentado seus resultados empregando-se métodos univariados, como o teste de diferença mínima significativa (LSD) ou, na maioria das vezes, com a análise de variância

(ANOVA). Em contrapartida, a quantidade de variáveis analisadas (teores e acúmulos de diversos nutrientes essenciais em função de doses crescentes ou tempo de exposição aos metais pesados, dentre outras), assim como o espaço amostral (diferentes tipos e espécies de plantas, etc), vem aumentando gradativamente, de acordo com a necessidade de estudo. Nesse contexto, um fato que preocupa é se as informações extraídas dos modelos convencionais (univariados) representam de forma adequada o que realmente acontece com as plantas.

Dentre os métodos de estatística multivariada, o reconhecimento de padrões não supervisionados: Análise de Componentes Principais (do inglês, *Principal Components Analysis*, **PCA**) e Análise de Agrupamento Hierárquico (do inglês, *Hierarchical Cluster Analysis*, **HCA**) são ferramentas que demonstraram ser muito eficientes na identificação de tendências, semelhanças e diferenças entre as amostras, mesmo quando não se tem nenhuma informação prévia do conjunto de dados analisados (MOITA NETO e MOITA, 1998; SENA et al., 2000; SOUSA et al., 2006; CORREIA e FERREIRA, 2007; XUE et al., 2011; KARADAŞ e KARA, 2012). Nesses métodos, as amostras similares são agrupadas e amostras diferentes formaram outros grupos e assim sucessivamente, até que todos os padrões sejam formados. Além disso, evidenciam quais variáveis estão influenciando no agrupamento ou na diferenciação das amostras. A PCA é uma técnica que reduz a dimensão dos dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Dessa forma, os dados são projetados num espaço de menor dimensão, normalmente duas ou três dimensões e, como resultado, as informações mais relevantes se tornam mais óbvias e, portanto, muito mais passíveis de interpretação (BEEBE et al., 1998; MARTENS e NAES, 2002). Na HCA, o objetivo principal é o agrupamento dos dados, através da distância entre eles. As amostras mais próximas terão distâncias menores e, portanto, um novo grupo será formado (BEEBE et al.,

1998). Esta técnica, assim como em PCA, é muito útil para averiguar as similaridades entre as amostras e suas tendências.

Desse modo, os objetivos desta dissertação, estruturada em dois artigos, foram: 1) avaliar os efeitos da contaminação por Cd e Pb sobre os teores e os acúmulos de nutrientes essenciais e na produção da alface; 2) avaliar possíveis mecanismos de destoxificação ao Pb e ao Cd, empregando PCA e HCA. Outras considerações foram em relação à toxicidade e os limites de tolerância ao Cd e ao Pb.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metais pesados (ou elementos traços)

Os termos “metais pesados” ou “elementos traços” ou “metais tóxicos” são definições para compostos de propriedades e características químicas semelhantes (ex.: alta densidade), concentração (baixa) e toxicidade (alta), respectivamente (DUFFUS, 2002). Embora esses termos nunca tenham sido definidos por nenhum órgão competente, como a IUPAC, os mesmos são amplamente utilizados para classificar este tipo de metais (KABATA-PENDIAS, 2010). Os quatro elementos mais comuns e tóxicos são o arsênio (As), o mercúrio (Hg), o **chumbo (Pb)** e o **cádmio (Cd)**, em razão do constante uso, toxicidade e ampla distribuição. Um grande problema associado a esses elementos é que ambos se acumulam em diferentes ambientes, seja na água, no solo ou na atmosfera, não podendo ser degradados, assim como, os compostos orgânicos tóxicos (BAIRD, 2002). Por isso, o Pb e o Cd ganham um lugar de destaque na lista de elementos mais perigosos, o segundo e o sétimo, respectivamente, com base na frequência, toxicidade e potencial de exposição humana (ATSDR, 2011).

No ambiente, os metais pesados não são tão perigosos na forma de vapor, quanto são na forma de cátions (em solução) ou ligados a pequenas cadeias carbônicas, principalmente quando se unem fortemente ao enxofre na forma de grupos sulfidrila (–SH). Nessa forma, os metais pesados impedem que algumas enzimas que controlam a velocidade do metabolismo dos seres humanos funcionem, podendo levar à morte (BAIRD, 2002).

A equação química geral entre a ligação do metal (M^{2+}) com o grupo sulfidrila (–SH):



A combinação estável dos metais pesados, notadamente o Cd^{2+} e o Pb^{2+} , com grupos orgânicos sulfurados das enzimas envolvidos no metabolismo deve-se ao conceito de substâncias “duras e moles”, uma contribuição de Pearson ao conceito de ácidos e bases de Lewis (SHRIVER, 2003). Assim, o Cd^{2+} e o Pb^{2+} , “ácidos moles”, de elevados raios iônicos, combinam-se facilmente com doadores de elétrons também volumosos (“bases moles”), como é o caso dos grupos sulfidrilas das enzimas.

2.1.1 Chumbo (Pb)

Na crosta terrestre, o chumbo (Pb) tem uma ocorrência de 15 mg Kg^{-1} , com maior concentração nas séries ácidas das rochas ígneas e sedimentos argilosos e, em baixa concentração, nas rochas ultramáficas e sedimentos calcários (KABATA-PENDIAS, 2010). Seu estado de oxidação mais comum é o Pb^{2+} e, em menor escala, o Pb^{4+} (KABATA-PENDIAS, 2010). Assim como outros metais pesados, as concentrações de Pb no solo e na água vêm aumentando ao longo dos anos (GULSON et al., 1981; SANTOS et al., 1993; DEAVIS, 1997; PREGO et al., 2004; BARON et al., 2006; WARMATE et al., 2011). Esse aumento se deve às constantes práticas industriais, de mineração e, numa pequena parcela, ao decaimento radioativo natural do Urânio (GULSON et al., 1981; SANTOS et al., 1993; DAVIES, 1997). Além disso, o chumbo está presente em baterias (atualmente recicláveis), soldas, ligas, cabos, produtos químicos, dentre outros.

O Pb, quando presente em altas concentrações, pode se tornar nocivo e prejudicial à saúde humana (BUTLER WALKER et al., 2006). Sua maior parcela pode ser encontrada no sangue dos seres humanos, porém quanto mais se expõe a ele, maior será sua concentração no organismo e, como consequência, pode penetrar nos tecidos e os órgãos internos do corpo, como é o caso do

cérebro (BUTLER WALKER et al., 2006; BAIRD, 2002). Um agravante para o quadro de intoxicação por Pb é, além da deficiência de cálcio (BAIRD, 2002), cujo cátion divalente assemelha-se em tamanho ao Pb^{2+} , o fato dos fumantes se intoxicarem a longo prazo pela inalação do Pb contido na fumaça do cigarro (BUTLER WALKER et al., 2006).

Os mais afetados pela intoxicação por chumbo são os fetos e as crianças menores, que apresentam maior sensibilidade decorrente da facilidade de absorção exigida pelo desenvolvimento rápido de seus cérebros. Daí decorrem a má formação e dificuldade de aprendizado, distúrbios no comportamento e da capacidade de atenção (BAIRD, 2002). Uma revisão mais detalhada sobre os malefícios do chumbo pode ser encontrada em ATSDR (2007).

2.1.2 Cádmio (Cd)

A concentração média de cádmio (Cd) na crosta terrestre é de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$, comum em rochas ígneas e sedimentares. Raramente é encontrada na forma livre; normalmente está ligado ao enxofre (CdS), selênio (CdSe) ou oxigênio (CdO) ou associado ao Zn e ao Pb. O Cd tem alta similaridade química com o Zn, tais como estrutura iônica, eletronegatividade, dentre outras. E, como qualquer metal pesado, tem alta afinidade de ligar-se ao S. Ainda, apresenta mesma carga e raio iônico do Ca^{2+} , porém não o substitui nos minerais. Outros elementos isotópicos do Cd, são o Co^{2+} , o Ni^{2+} , o Fe^{2+} e o Mg^{2+} (KABATA-PENDIAS, 2010).

Um uso importante do Cd é como eletrodos de baterias recarregáveis, chamadas de nicad (níquel-cádmio), comumente utilizadas em calculadoras e outros aparelhos (BAIRD, 2002). O descarte indevido destes produtos pode chegar aos ambientes e acumular-se ao longo da cadeia trófica. Outras formas de

contaminação se devem às práticas de mineração, irrigação de águas residuais, galvanoplastia e fertilização (XIN et al., 2010).

No organismo, o Cd apresenta toxicidade aguda, sendo a dose letal de aproximadamente um grama. Em contrapartida, os seres humanos podem funcionar mecanismos de defesa contra este elemento, através da complexação com proteínas ricas em enxofre, como a metalotioneína, cuja função é regular o metabolismo do zinco (BAIRD, 2002). Nas plantas também são conhecidos, mas ativados por fitoquelatinas, glutioninas ou quaisquer aminoácidos que possam se ligar ao metal contaminante (INOUE, 2005; BENAVIDES, 2005).

2.2 Absorção e acumulação de Cd e Pb e competição com os nutrientes em plantas

Como todo organismo vivo, as plantas necessitam absorver diversos nutrientes essenciais, variando de acordo com a sua necessidade. São eles, os macronutrientes: N, P, K, Ca, Mg e S e os micronutrientes: B, Cl, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Se e Zn. Cada um deles desempenhará uma função biológica importante. Atualmente, vinte e três metais tem atividade fisiológica conhecida em seres vivos e, alguns deles, como o Fe, o Zn e o Cu são considerados essenciais (KARADAŞ e KARA, 2012). O problema é que quando as plantas são cultivadas em ambientes contaminados por Cd ou por Pb, esses podem ser absorvidos, devido sua alta capacidade de mimetização com outros elementos de propriedades químicas semelhantes, tais como o Zn, Cu, Mn, Fe, Ca e Se (KABATA-PENDIAS, 2010). Diferindo dos outros elementos, apenas na sua translocação, devido sua facilidade também em formar complexos de alto impedimento estérico, que dificultam a sua mobilidade nas plantas (SILVA et al., 2007a).

De acordo com Kabata-Pendias (2010), foi comprovada a interferência dos metais pesados na absorção em outros elementos químicos de propriedades semelhantes pelas plantas. Bertoli e colaboradores (2012) observaram que, ao aplicar doses crescentes de cádmio (Cd 0,000; 0,025; 0,100; 0,500 e 1.000 mg L⁻¹), as mesmas utilizadas neste trabalho, ocorreu uma redução no teor de K, Ca, Mn e Zn na parte aérea de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Além disso, houve uma redução de K nos frutos e Mn nas raízes. À medida que as doses foram aumentando, a translocação de P e Cu foram afetadas, o mesmo não acontecendo com K, Ca, Mg e Zn, o que possivelmente indica que o Cd pode interferir na absorção e translocação de outros nutrientes. Em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), Cannata e colaboradores (2012a) relataram que, todos os teores de nutrientes analisados (P, K, Ca, Mg, S, Cu, Mn, Zn, e Fe) foram reduzidos após a aplicação de doses crescentes de Pb (0,00; 0,25; 1,00; 5,00; 10,00 mg L⁻¹), exceto o P nas raízes, Mg nos frutos e S nas raízes e nos frutos. Quanto ao acúmulo, houve uma redução de todos os nutrientes nas três partes das plantas e um aumento na translocação de Mg, Zn e S.

2.2.1 Efeitos tóxicos de Cd e Pb em plantas

De maneira geral, Cd e Pb provocam efeitos degenerativos, como a dificuldade no desenvolvimento das plantas (raízes, grãos, tubérculos, etc) e no crescimento (CANNATA, 2011). Ou ainda, na redução da produção de frutos: tubérculos (CANNATA, 2011), grãos de feijão (CARVALHO et al., 2008, 2009) e tomate (BERTOLI, 2011). Além da redução de matéria seca de raízes, partes aéreas e frutos (CARVALHO et al., 2008, 2009; BERTOLI, 2011; CANNATA et al., 2011).

No trabalho de Costa et al. (2012), as plantas de pinhão manso (*Ricinus communis* cv. Guarany) demonstraram baixa tolerância à presença de Cd em

solução nutritiva, nas doses de 0, 1, 2, 4, 8 e 16 mg L⁻¹, promovendo o aparecimento de sintomas como: clorose, necrose, quedas das folhas mais velhas e escurecimento das raízes. Já no trabalho de Zhao et al. (2006), em plantas de *Arabidopsis halleri*, somente após a aplicação da dose 2 mg L⁻¹ é que os sintomas de clorose apareceram. Em outro experimento, as variadas populações de *Chromolaena odorata* apresentaram sintomas de clorose e redução de biomassa e na taxa de crescimento, somente na dose de 10 mg L⁻¹ e, nas doses de 0,25 e 0,5 mg L⁻¹, foram observados sintomas de necrose e redução no crescimento, em todas as populações de *Chromolaena odorata* (TANHAN et al., 2007).

Entretanto, apesar da contaminação por Cd e Pb ocasionar diversos efeitos deletérios já citados, é sabido que as plantas chegam resistir a doses muito elevadas deste contaminantes. São as chamadas plantas hiperacumuladoras, que têm como características principais rápido crescimento, com biomassa apreciável e ampla distribuição. Apresentam, portanto considerável potencial de fitorremediação de metais, em solos contaminados (ZHAO et al., 2006; TANHAN et al., 2007).

2.2.2 Mecanismo de destoxificação de metais pesados

De acordo com Benavides et al. (2005) e Inouhe (2005) as plantas, principalmente as hiperacumuladoras, apresentam como característica comum à formação (síntese) de fitoquelatinas, um complexo à base de enxofre que destoxifica, impedindo a migração dos metais pesados para a parte aérea. Estes mecanismos se baseiam no sequestro de metais contaminantes em vacúolos pela formação de complexos, altamente estáveis. Outro possível mecanismo são os acoplamentos com a glutathionina e com alguns aminoácidos (SHARMA e DUBEY, 2005).

Apesar da destoxificação de metais por fitoquelatinas sugerir ser um tipo de mecanismo de defesa evolutivamente antigo, estabelecido em microalgas ou microfungos e, posteriormente, desenvolvido pelas plantas superiores, somente na década de 80, elas foram identificadas (BENAVIDES et al. e INOUHE, 2005).

2.3 Quimiometria

A quimiometria é uma ciência que surgiu da natureza da química. Ela reuni métodos de estatística multivariada, álgebra linear e computacionais. Seu objetivo é tratar dados de uma forma mais eficiente, simplificada e mais abrangente, ou seja, tendo sempre o compromisso de ampliar o seu leque de interpretação.

A quimiometria demorou muito tempo para ser aplicada na prática devido à falta de tecnologia computacional capaz de resolver cálculos altamente complexos e demorados (BARROS NETO et al., 2006). A análise de componentes principais, proposta por Pearson (1901), e desenvolvida por Hotelling (1933) anos depois, somente nos anos 70 começou a ser utilizada como método de agrupamento na química (BRUNS e FAIGLE, 1985).

Dentre os métodos quimiométricos destacam-se como principais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação), calibração multivariada e resolução de curvas multivariadas. Neste trabalho, o foco será no reconhecimento de padrões, especificamente na análise exploratória, também conhecida como reconhecimento de padrões não supervisionados.

2.3.1 Reconhecimento de padrões não supervisionados ou Análise exploratória

Um conjunto de dados é definido pelo número de amostras ou objetos e pelo número de variáveis medidas no sistema. Tipicamente, os **objetos** são compostos, amostras analíticas, espectros ou cromatogramas e as **variáveis** são características ou propriedades dos objetos, como concentração, alturas de picos em perfis cromatográficos, ou intensidades e absorbâncias em diferentes comprimentos de onda (BARROS NETO et al., 2006). Esses dados podem ser organizados na forma matricial X_{ij} , na qual suas linhas constituem as diferentes amostras e suas colunas são as variáveis medidas no sistema (Figura 1).

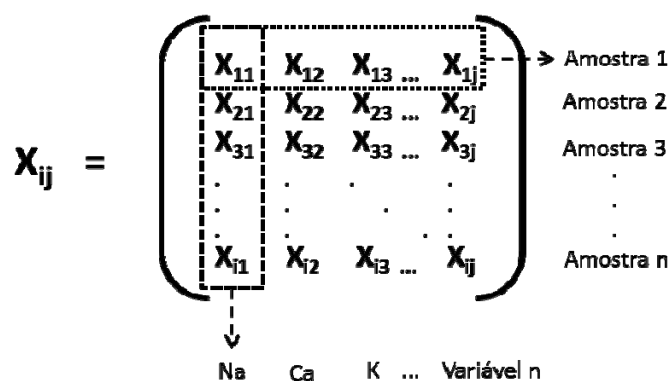


Figura 1 Organização hipotética dos dados multivariados numa matriz X , na qual as linhas são amostras e as colunas são variáveis.

Como exemplo, representado na figura 1, para i ésima amostra, X_{i1} , X_{i2} , X_{i3} , ..., X_{ij} , são anotadas as concentrações de cada variáveis, neste caso, as concentrações de Na, Ca, K até a variável n , repetindo-se para cada amostra n . Após a organização dos dados, pode-se submetê-los a uma análise criteriosa de associações, como a análise exploratória. Nessa, é feita uma tentativa de agrupamento, pela qual se pode estabelecer relações entre os objetos e as variáveis (BARROS NETO et al., 2006).

Uma característica principal da análise exploratória é que nela os dados são muitas vezes desconhecidos, ou seja, não é possível definir quais as características (concentrações) das amostras previamente, portanto, este método também é conhecido como reconhecimento de padrões não supervisionados. Dentre os mais utilizados podemos destacar a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise de Agrupamento Hierárquico (HCA).

2.3.1.1 PCA

A PCA (BEEBE et al., 1998; MARTENS e NAES, 2002; BRERETON, 2009) é um método de decomposição dos dados multivariados, que visa resumir num espaço de menor de menor dimensão, normalmente em duas ou três dimensões, que é visível ao “olho humano”. Uma matriz \mathbf{X} (capítulo 2.3.1) é decomposta em que a somatória de A componentes principais, de acordo com o seguinte modelo estrutural:

$$\mathbf{X} = t_1p_1^T + t_2p_2^T + t_3p_3^T \dots + t_Ap_A^T + \mathbf{E} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E} \quad (1)$$

no qual, a matriz T é denominada escores (*scores*), a qual contém as informações sobre as amostras, e P é a matriz de pesos (*loadings*), a qual contém as informações sobre as variáveis e E é a matriz de resíduos, erros aleatórios e sistemáticos. Essas novas matrizes serão utilizadas para construir os novos eixos (componentes principais), que exprimem a natureza dos dados originais, sem qualquer alteração sobre eles. Uma importante vantagem da PCA, como já foi dito, é a redução da dimensão, pois, dessa forma, os dados podem ser avaliados todos ao mesmo tempo, sendo possível verificar qual(is) variável(is) está(ão) influenciando no sistema. É importante destacar também que o número de

componentes principais, ou seja, os novos eixos que descreveram o sistema serão determinados após uma análise de variância explicada e/ou acumulada (BEEBE et al., 1998). Mais informações, ler o capítulo Teoria de ambos os artigos.

2.3.1.2 HCA

No método HCA (BEEBE et al., 1998), as distâncias entre as amostras são calculadas, por algum método matemático, por exemplo, pela distância euclidiana, e quanto menor a distância entre elas, maior será sua similaridade. Outras amostras de características diferentes formarão outro grupo, diferente do primeiro, e este processo ocorre até que todas sejam agrupadas. Dada uma matriz \tilde{X} (capítulo 2.3.1), as diferentes distâncias entre os vetores X_r e X_s são definidos como se segue:

$$d_{rs}^2 = (X_r - X_s)(X_r - X_s)' \quad (2)$$

no qual, X_r é o vetor característica da primeira amostra e X_s é o vetor característica da segunda amostra; dessa forma são calculadas as distâncias entre elas, e o processo é repetido para todas as amostras.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método multivariado (Análise de Componentes Principais, PCA) empregado na interpretação dos dados dos dois artigos que compõe esta dissertação permitiu ampliar o espectro de discussão dos resultados quando comparados ao emprego, pelo grupo de Química Ambiental, da metodologia até então usual e univariada (ANOVA, Teste de Média, Regressões Polinomiais,

dentre outros), ferramentas comuns em pesquisas de Química Pura, ou seja, apenas laboratorial. A quimiometria mostrou-se eficiente também em estudos de outras áreas de interface com a Química, como foi o caso desta pesquisa com plantas de alface. A análise de agrupamento hierárquico (HCA) não adicionou nenhuma informação já reconhecida no método PCA.

REFERÊNCIAS

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **Toxicological Profile for Cadmium**. U.S. Dept. of Health & Human Services. September 2008. Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>, 2012.
- ATSDR(Agency for Toxic Substances and Disease Registry). **CERCLA Priority List of Hazardous Substances**. Agency for Toxic Substances and Disease Control. 2011. Available URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>. Accessed August 2012.
- BAIRD, C. **Química ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 579p.
- BARON, S. J. et al. Dispersion of Heavy Metals (Metalloids) in Soils from 800-Year-Old Pollution (Mont-Lozère, France). **Environmental Science & Technology**. v.40, n.17, p. 5319-5326, 2006.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 Anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v.29, n.6, p.1401-1406, 2006.
- BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. **Chemometrics: a practical guide**. John Wiley & Sons: New York, 1997.
- BENAVIDES, M; GALLEGO, S; TOMARO, M. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Special Issue: Toxic Metals in Plant, Londrina, v.17, n.1, p. 21-24, 2005.
- BERTOLI, A. C. **Efeitos do cádmio e do chumbo no crescimento, translocação e teor de nutrientes em tomateiro (*Lycopersicum esculentum*) cultivado em solução nutritiva**. 2011. 101p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- BERTOLI, A. C. et al. *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 86, p. 176-181, 2012.
- BONFRANCESCHI, B. A. et al. Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. **Journal of Hazardous Materials**. v.165, n.1-3, p. 366-371, 2009.

- BRERETON, R. G. **Chemometrics for pattern recognition**. John Wiley & Sons: New York, 2009.
- BRUNS, R. E. e FAIGLE, J.F.G.; Quimiometria. **Química Nova**, v.8, n.2, p.84-98, 1985.
- BUTLER WALKER, J. et al. Maternal and umbilical cord blood levels of mercury, lead, cadmium, and essential trace elements in Arctic Canada. **Environmental Research**. v.100, n.3, p. 295-318, 2006.
- CANNATA, M. G. **Efeitos de cádmio e chumbo no desenvolvimento de rúcula (*Eruca sativa* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solução nutritiva**. 2011. 211p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.
- CANNATA, M. G. et al. Effect of lead on the content, accumulation and translocation of nutrients in bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivated in nutritive solution. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. 2012a (no prelo).
- CANNATA, M. G. et al. Effect of cadmium and lead on the plant growing and content of heavy metals in arugula (*Eruca sativa* L.). **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. 2012b (no prelo).
- CARVALHO, A. V. S. et al. Produção de matéria seca e de grãos por plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas em solos tratados com metais pesados. **Química Nova**, v.31, n.5, p.949-955, 2008.
- CARVALHO, A. V. S. et al. Bean Plant Production of Dry Matter and Grain Related to Soil Citric Acid–Extractable Copper, Zinc, Cadmium, and Lead. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.40, p.2959-2974, 2009.
- CORREIA, P. R. M. e FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**. v.30, p. 481-487, 2007.
- COSTA, E. S. et al. Assessing the Tolerance of Castor Bean to Cd and Pb for Phytoremediation Purposes. **Biological Trace Element Research**. v.145,p. 93-100, 2012.
- DAVIES, B. E. HEAVY METAL CONTAMINATED SOILS IN AN OLD INDUSTRIAL AREA OF WALES, GREAT BRITAIN: SOURCE

IDENTIFICATION THROUGH STATISTICAL DATA INTERPRETATION. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.94, n.1, p.85-98, 1997.

DUFFUS, J. H. "Heavy Metals" – A Meaningless term? **Pure and Applied Chemistry**. v.74, n.5, p. 793-807, 2002.

GULSON, B.L. et al. Use of lead isotopes in soils to identify the source of lead contamination near Adelaide, South Australia. **Environmental Science & Technology**, v.15, n.6, p.691-696, 1981.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. **Journal of Educational Psychology**, v.24, n. 7, p. 498-520, 1933.

INOUE, M. Phytochelatins. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, n.1, p.65-78, 2005.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. Boca Raton: CRC Press, 2010.

KARADAŞ , C. e KARA, D. Chemometric approach to evaluate trace metal concentrations in some spices and herbs. **Food Chemistry**, v.130, n.1, p.196-202, 2012.

LIU, Q. et al. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions. **Journal of Environmental Sciences**, v.20, n.3, p.326-331, 2008.

MARTENS, H. e NAES, T. **Multivariate Calibration**. Wiley: New York, 2002.

MELO, E. E. C. et al. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Harzadous Materials**. v.168,p. 479-483, 2009.

MOITA NETO, J. M. e MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**. v.21, p. 467-469, 1998.

NIU, Z-x. et al. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. **Journal of Environmental Sciences**. v.19,p. 961-967, 2007.

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

PEARSON, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. **Philosophical Magazine**, v.2, n.11, p. 559-572, 1901.

PREGO, R. et al. Cadmium, copper and lead contamination of the seawater column on the Prestige shipwreck (NE Atlantic Ocean). **Analytica Chimica Acta**, v.524, n.1-2, p.23-26, 2004.

QU, R. L. et al. Lead uptake by roots of four turfgrass species in hydroponic cultures. **Hortscience**. 38 (4): p. 623-626. July 2003.

SANTOS, P. L. et al. Lead-210 in vegetables and soils from an area of high natural radioactivity in Brazil. **The Science of The Total Environment**. v.138, n.1-3, p.37-46, 1993.

SENA, M. M. et al. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos. **Química Nova**. v.23, p. 547-556, 2000.

SHARMA, P. e DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Special Issue: Toxic Metals in Plant, Londrina, v.17, n.1, p. 35-52, 2005.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. **Química Inorgânica**; Porto Alegre: Bookman, trad. Maria Aparecida Gomes; 816p., 3^a ed., 2003.

SILVA, V. L. et al. Structural determination of Zn and Cd-DTPA complexes: MS, infrared, ¹³C NMR and theoretical investigation. **Spectrochimica Acta Part A**. v.68, p. 1197-1200, 2007a.

SILVA, V. L. et al. Spectrometric and theoretical investigation of the structures of Cu and Pb/DTPA complexes. **Structural Chemistry**. v.18, p. 605-609, 2007b.

SOLÍS-DOMÍNGUES, F. A. et al. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. **Journal of Hazardous Materials**. v.141, n.3, p.630-636, 2007.

SOUSA, R. A. et al. Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES. **Química Nova**. v.29, p. 654-656, 2006.

TANHAN, P. et al. Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. **Chemosphere**. v.68, n.2, p.323-329, 2007.

WARMATE, W. M.; et al. Concentrations of heavy metals in soil and water receiving used engine oil in Port Harcourt, Nigeria. **Journal Ecology and the Nature Environment**, v.3, n.2, p.54-57, 2011.

XIN, F. I.; et al. Responses of different water spinach cultivars and their hybrid to Cd, Pb and Cd-Pb exposures. **Journal of Hazardous Materials**, v.174, n.1-3, p.468-476, 2010.

XUE, J. et al. Using principal components analysis (PCA) with cluster analysis to study the organic geochemistry of sinking particles in the ocean. **Organic Geochemistry**. v.42, p. 356-367, 2011.

ZHAO, F. J. et al. Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulation *Arabidopsis halleri*. **New Phytologist**. v.172, p. 646-654, 2006.

SEGUNDA PARTE

Artigos

ARTIGO 1: Chemometric approach: PCA and HCA to evaluate the effects of increasing doses of Cd on the content and accumulation of nutrients and production of lettuce (*Lactuca Sativa* L.)

Normas da revista científica *Journal of Hazardous Materials* (artigo submetido)

Highlights:

- In this work, the Cd did not show high mobility.
- Most chemical elements concentrated in the roots, excluding K.
- Cd reduced of Ca, Mg, Mn and Zn (antagonism) and increased N and Cu (synergism).
- The accumulation of Cd was antagonistic to Fe, Cu and Mn and synergistic to S.
- Plants developed and produced dry matter normally, reveal defense mechanisms.

Chemometric approach: PCA and HCA to evaluate the effects of increasing doses of Cd on the content and accumulation of nutrients and production of lettuce (*Lactuca Sativa* L.)

Carlos D. L. Albuquerque*,¹ Ruy Carvalho,¹ Alexandre C. Bertoli,¹ Ronei J. Poppi,² Ana R. R. Bastos,³ Janice G. Carvalho³

¹*Department of Chemistry, Federal University of Lavras (UFLA), CP 3037, 37220-000 Lavras, Minas Gerais, Brazil*

²*Institute of Chemistry, University of Campinas (Unicamp), CP 6154, 13084-971 Campinas, São Paulo, Brazil*

³*Department of Science in Soil, Federal University of Lavras (UFLA), CP 3037, 37220-000 Lavras, Minas Gerais, Brazil*

*Corresponding author: Phone: +55 35 3829 1276; Fax: +55 35 3829 1812;
Email address: carlostak2@yahoo.com.br

ABSTRACT

A greenhouse assay using a lettuce (*Lactuca Sativa*) hydroponics system was carried out to evaluate the following effects of contamination of cadmium: 1) evaluate the effects of increasing doses of Cd on the contents and accumulation of nutrients in lettuce; 2) evaluate possible mechanisms to Cd detoxification, employing powerful chemometric tools: PCA and HCA models. With the PCA model, in content, the PC1 was responsible for distinguishing samples shoots, with high levels of K and DM, from roots, with high levels of other nutrients, except to Ca and Cd. This indicates that in spite the high translocation of Cd, the formation of complex with glutioninas, phytochelatins and amino acids and/or precipitates (phosphates and nitrates), probably hampered mobility, justified by the high amounts of S, N and P in roots. For PC2, higher doses were separated from the others by their high levels of Cd, N and Cu (synergistic effect) and low levels of Ca, Mg, Mn and Zn (antagonistic effect). In accumulation, the nutrients accumulated in shoots and Cd did not change (PC1). In PC2, the increased accumulation of Cd increased the S (phytochelatins) and reduced Fe, Cu and Mn. With the HCA model, it became evident that the dose 0.025 mg L⁻¹ were very similar than the dose control. Furthermore, the dose 10.000 mg L⁻¹ promoted greater variability in the content, accumulation and production in the different parts. PCA and HCA models demonstrated to be effective in the recognition and clustering tendencies.

Keywords: Principal Components Analysis, Hierarchical Cluster Analysis, Cadmium, Nutrition, Detoxification, Lettuce.

1. INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um contaminante em potencial, presente naturalmente no solo introduzido por fontes antropogênicas, como um resultado de práticas mineração, atividades de fundição, efluentes de irrigação, galvanoplastia e fertilização, podendo atingir, inclusive, os ambientes aquáticos [1-2]. É um problema antigo, relatados até hoje por diversos países [3-7]. Na China, por exemplo, cerca de um quinto dos solos são contaminadas por Cd, Pb e As [8] e, como a maioria deles são alagados para o cultivo de arroz, a contaminação pode-se estender facilmente para outras áreas, já que na água, o Cd encontra-se na forma solúvel, Cd^{2+} , que possui alta mobilidade [1].

Sabe-se que as plantas necessitam absorver diversos nutrientes essenciais, variando de acordo com a sua necessidade. São os macronutrientes: N, P, K, Ca, Mg e S e os micronutrientes: B, Cl, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Se e Zn. Cada um deles desempenhará uma função biológica importante, não só as plantas, mas também aos demais seres vivos ao longo da cadeia alimentar. Atualmente, vinte e três metais têm atividade fisiológica conhecida em seres vivos e alguns deles, como o Fe, o Zn e o Cu são considerados essenciais [9]. O problema é que quando as plantas são cultivadas em ambientes contaminados por Cd, este pode ser absorvido, principalmente na forma de Cd^{2+} , devido sua alta capacidade de mimetização com outros elementos de propriedades químicas semelhantes, tais como o Zn, Cu, Mn, Fe, Ca e Se [1]. Diferindo dos outros elementos, apenas na sua translocação, devido sua facilidade também em formar complexos de alto impedimento estérico, que impede sua mobilidade nas plantas [10]. Entre os efeitos diversos, o Cd também pode afetar no crescimento, como também na produção das plantas [11-13], além de ser tóxicos aos seres vivos [14].

Estudos relacionados à habilidade das plantas em absorver Cd, Pb, As, Zn, Ni, Cr (III) e Cr (VI), como proposta de fitorremediação [11,15-21] ou

pesquisas de tolerância em plantas olerícolas [22-24] focadas na produção e na absorção de nutrientes e do contaminante têm sido uma constante. Os resultados desses estudos têm sido apresentados e discutidos empregando-se métodos univariados, como o teste de diferença mínima significativa (LSD) ou, na maioria das vezes, a análise de variância (ANOVA). No entanto, como a quantidade de variáveis analisadas (teores e acúmulos de diversos nutrientes em função de doses crescentes ou tempo de exposição aos metais pesados, dentre outras), assim como o espaço amostral (diferentes tipos e espécies de plantas, etc), vem aumentando gradativamente, de acordo com a necessidade de estudo. Um fato que preocupa é se as informações extraídas desses modelos convencionais representam de forma adequada o que realmente acontece com as plantas na natureza.

Dentre os métodos de estatística multivariada, o reconhecimento de padrões não supervisionados: *Principal Components Analysis* (PCA) e *Hierarchical Cluster Analysis* (HCA) são ferramentas que demonstraram ser muito eficientes na identificação de tendências, semelhanças e diferenças entre as amostras, mesmo quando não se tem nenhuma informação prévia do conjunto de dados analisados [9,25-30]. Nesses métodos, as amostras similares são agrupadas e amostras diferentes formaram outros grupos e assim sucessivamente, até que todas sejam agrupadas. Além disso, evidenciam quais variáveis que estão influenciando no agrupamento ou diferenciação dos grupos formados. A PCA é uma técnica que reduz a dimensão dos dados a partir de combinações lineares das variáveis originais, dessa forma, os dados serão projetados num espaço de menor dimensão, normalmente duas ou três dimensões, e, como resultado, as informações mais relevantes se tornam mais óbvias e, portanto, muito mais passíveis de interpretação [31,32]. Na HCA, o objetivo principal é o agrupamento dos dados, através da distância entre eles. As amostras mais próximas terão distâncias menores e, portanto, um novo grupo

será formado [31]. Esta técnica, assim como em PCA, é muito útil para averiguar as similaridades entre as amostras e suas tendências. Desse modo, os objetivos deste artigo foram: 1) avaliar os efeitos da contaminação por Cd sobre os teores e os acúmulos de nutrientes e a produção da alface; 2) avaliar possíveis mecanismos de destoxificação ao Cd, empregando PCA e HCA. A toxicidade e os limites de tolerância ao Cd também foram estudados.

2. TEORIA

2.1. Modelo PCA

A *Principal Components Analysis* (PCA) é um método de decomposição bilinear dos dados multivariados, em escores (T), informações sobre os objetos ou amostras, e em pesos (P^T), informações sobre as variáveis. De modo que, os dados são descritos de forma condensada, em relação ao conjunto de dados originais, e de tal forma, que o erro seja mínimo [32]. Como os dados são apresentados ao modelo na forma matricial, (X) (i – amostras e j – variáveis), estes podem ser decompostos pelo algoritmo decomposição de valores singulares (SVD) em três submatrizes: a ortonormal, $U_{i \times A}$, a diagonal, $S_{A \times A}$, que o produto entre elas nos fornece $T_{i \times A}$, e a matriz transposta $V_{A \times j}^T$, que representa a matriz P^T , mais a matriz de erros, E (Fig. 1) [33]:

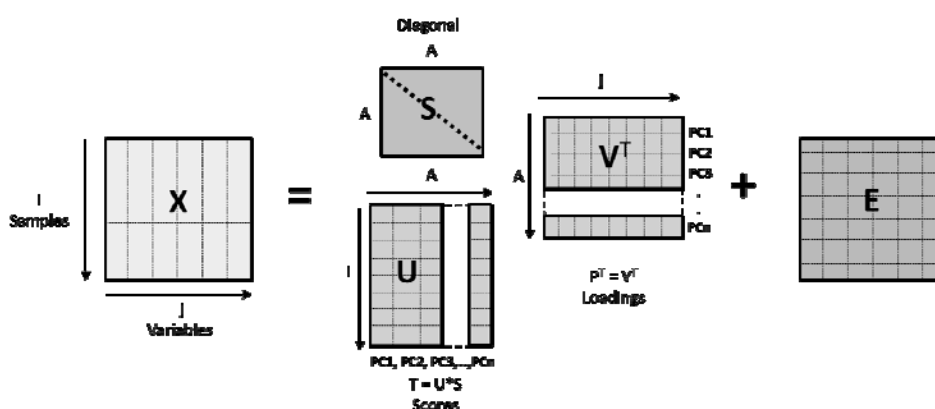


Fig.1. Representação gráfica do modelo PCA pela decomposição em SVD. Decomposição da matriz X em três sub-matrizes U, S e V^T mais a matriz E.

Resumindo, a equação básica em PCA pode ser descrita como:

$$\hat{X} = t_1P_1^T + t_2P_2^T + t_3P_3^T \dots + t_AP_A^T + E = TP^T + E \quad (1)$$

Em que $t_1P_1^T, t_2P_2^T, t_3P_3^T, \dots, t_AP_A^T$, representa o número de componentes principais, PC1, PC2, PC3, ..., PCn (Fig. 1), ou seja, os novos eixos responsáveis por descreverem o conjunto de dados original (\hat{X}). No qual, o número correto de PCn a ser utilizado será determinado pelo analista, através da análise das variâncias explicada (VE) e/ou acumulada (VA) [31].

2.2. Modelo HCA

No método HCA, as amostras são agrupadas baseadas nas suas distâncias no espaço, que pode ser multidimensional [31]. Como em PCA, o conjunto de dados também pode ser organizado na forma matricial (\hat{X}). Em seguida, as distâncias entre as amostras são calculadas e o agrupamento é realizado. As mais próximas (similares) formam grupos primeiro entre si e depois, com as mais distantes e assim sucessivamente, até que todas sejam agrupadas, formando um único grupo, maior que os outros, que as contém.

Na Fig. 2, uma representação esquemática de uma das formas de calcular a distância entre as amostras pelo método das distâncias euclidianas (equação 2) e pelo agrupamento médio destas distâncias e, graficamente, na forma de dendrograma [31].

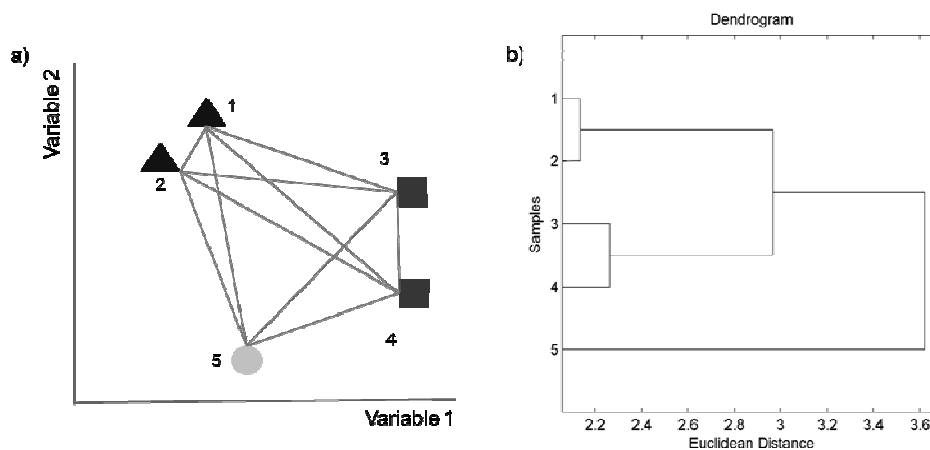


Fig.2. Representações do modelo HCA. (a) Esquema do cálculo da distância euclidiana e do agrupamento médio das amostras. (b) Dendrograma Euclidiano médio.

As amostras 1 e 2 e 3 e 4 formaram grupos entre si, o que não aconteceu para a amostra 5, devido a sua distância das demais.

$$d_{r_s} = (X_r - X_s)(X_r - X_s)' \quad (2)$$

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo e contaminação da alface

As mudas de alface do tipo crespa (*Lactuca Sativa*) (cultivar Solaris) foram adquiridas de um produtor rural da cidade de Lavras (MG, Latitude: 21,23927° S e Longitude: 44,99858° W), que obteve as plantas, após semeadura em bandejas com substrato comercial (Plantmax).

Em casa de vegetação, vinte mudas saudáveis (uma por recipiente de cultivo) foram escolhidas e transplantadas para frascos de polietileno com oxigenação, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon [34] a 20% de sua força iônica, previamente preparada com água deionizada, durante a fase de

adaptação. Na segunda semana, a força da solução foi aumentada para 50% e, na terceira, para 80%, na qual foram aplicadas doses crescentes do metal contaminante (nível de Cd: **1** – controle; **2** – 0,025; **3** – 0,100; **4** – 0,500 e **5** – 1,000 mg L⁻¹), na forma de nitrato (Cd(NO₃)₂.4H₂O), marca Vetec P.A., em quadruplicata. Vale ressaltar que essas doses foram baseadas em estudos realizados por Cannata et al. [24]. As trocas de solução nutritiva do metal contaminante foram realizadas semanalmente, durante três semanas, sendo 21 dias de contaminação, totalizando 32 dias de experimento.

3.2. Análise e tratamento dos dados

Após o ciclo comercial, as alfaces foram colhidas, lavadas com água deionizada, separadas por doses e divididas em raízes (R1, R2, R3, R4 e R5) e partes aéreas (S1, S2, S3, S4 e S5) e postas para secagem, em estufa, a temperatura constante de 60°C. Após a secagem, as amostras de massa de matéria seca (DM) na parte aérea e na raiz foram pesadas e trituradas para a dosagem dos teores dos metais (Ca: 422,7 nm, fenda: 0,5; Mg: 285,2 nm, fenda: 0,5; Cu: 324,7 nm, fenda: 0,2; Mn: 279,5 nm, fenda: 0,2; Zn: 213,9 nm, fenda: 0,2; Fe: 248,3 nm, fenda: 0,2 e Cd: 228,8 nm, fenda: 0,5) num espectrofotômetro de absorção atômica de chama (Varian, Modelo SpectrAA-110), de N por Kjeldahl, de P (420 nm) e B (540 nm) por colorimetria (PerkinElmer, Modelo Lambda-25), K (766 nm) por fotometria de chama (Modelo Micronal B262) e S (420 nm) por turbidimetria (Modelo Lambda-25 [35]).

Os valores de acúmulo de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Zn, Fe e Cd foram calculados multiplicando-se seus teores pelas produções de matérias massa seca na respectiva parte da planta, Rs ou Pas (equação 3).

$$\text{Acúmulo} = \frac{\text{Teor} \times \text{Matéria seca}}{1000} \quad (3)$$

Acúmulo → macronutrientes (g vaso⁻¹) e micronutrientes e de Cd (mg vaso⁻¹)

Teor → macronutrientes (g kg^{-1}) e micronutrientes e de Cd (mg kg^{-1})

Massa de matéria seca → Rs e Pas (g)

Os dados foram importados e tratados por rotinas próprias de pré-processamento, de PCA e de HCA. O programa MATLAB versão R2007b (The MathWorks, Natick, USA) foi utilizado para o processamento.

Os valores médios referentes a produção de massa de matéria seca (DM) e aos teores e os acúmulos de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Zn e Fe), de Cd nas diferentes partes da planta foram previamente organizados na forma matricial (X , Fig. 1), com dimensões de 10×13 (teor) ou 10×12 (acúmulo), referindo-se às 10 amostras \times 13 ou 12 variáveis, ou simplesmente, para o teor: raiz e parte aérea nos diferentes níveis \times teor de nutrientes e de Cd e produção de massa de matéria seca (DM) e para o acúmulo: raiz e parte aérea nos diferentes níveis \times acúmulo de nutrientes e de Cd, conforme representado na Fig. 1. Todos os conjuntos de dados foram pré-processados por autoescalamento e em seguida, submetidos aos modelos PCA e HCA.

No modelo PCA, os dados foram decompostos pelo algoritmo SVD e assim, os escores (T) e os pesos (P^T) foram calculados e plotados de forma simultânea, em gráficos biplots.

No modelo HCA, a distância entre as amostras foram calculadas pela distância Euclidiana (equação 3) e o agrupamento foi realizado pela média destas distâncias. Em seguida, os dendrogramas de HCA para o teor e o acúmulo de nutrientes e de Cd e produção de massa de matéria seca nas amostras de raízes (R1 a R5) e de partes aéreas (S1 a S5) foram representados (Fig. 4). Deixa-se claro, que o objetivo ao realizar este agrupamento foi de avaliar similaridade entre as amostras, após a aplicação ou não de Cd. Neste trabalho, apenas as distâncias menores que 50% do maior valor (distância máxima) foram consideradas como similares.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PCA do teor e acúmulo de nutrientes e de Cd

Analisando os modelos PCA, pode-se afirmar que para ambos, 2 componentes principais foram suficientes para descrevê-los, visto que, apresentaram VA maiores que 79 e 94%, respectivamente. Não existe um valor exato de VA e/ou VE para escolha do número correto de PCn. Muitas vezes esta decisão pode ser tomada após a análise da próxima componente principal e assim, sucessivamente. Neste trabalho, as PC3, PC4,..., PC12 não continham nenhuma informação relevante sobre os conjuntos de dados, portanto, foram descartadas.

Na Fig. 3 estão representados, na forma de gráfico biplot (informações sobre amostras e variáveis plotadas simultaneamente) e os dados referentes às análises de teor e acúmulo de nutrientes e de Cd.

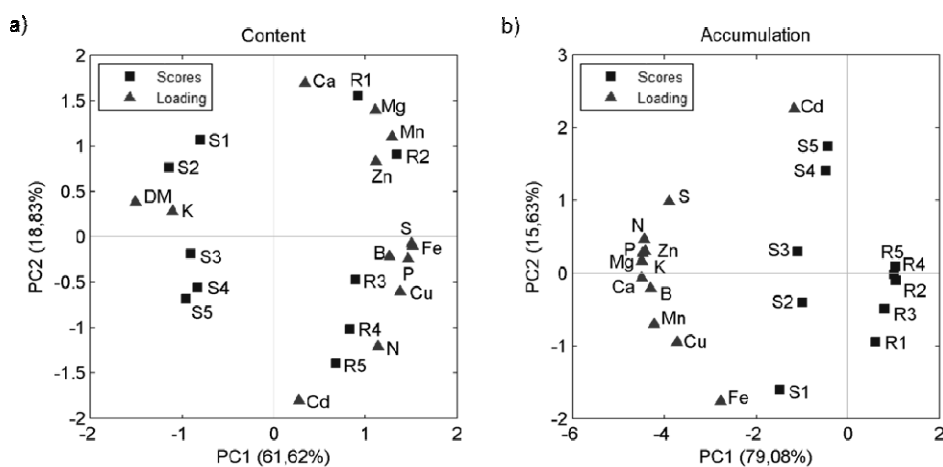


Fig.3. Gráficos biplots (escores X pesos). (a) Teor de nutrientes e de Cd e produção de massa de matéria seca (DM) (b) Acúmulo de nutrientes e de Cd (R – raiz e S – parte aérea; doses de Cd: 1 – 0,000; 2 – 0,025; 3 – 0,100; 4 – 0,500 e 5 – 1,000 mg L⁻¹).

Analisando a Fig. 3a, a PC1 representa 58,96% de VE, e é responsável pela distinção entre as amostras da raiz (R1 a R5), com altos teores de Mg, Mn, Zn, Fe, S, B, P, Cu e N, e da parte aérea (S1 a S5), altos teores de K e de DM. É importante destacar que, o K foi o único nutriente não sofreu influência das doses de cádmio, movendo-se (raiz → parte aérea) livremente na planta. Além disso, o teor médio de Cd não variou entre essas amostras, apesar de sua alta mobilidade [24]. Segundo Benavides [36] e Inouhe [37], as plantas, principalmente as hiperacumuladoras, apresentam como característica comum à formação de fitoquelatinas (PCs), um complexo a base de enxofre, que destoxifica a planta, impedindo a migração dos metais pesados para a parte aérea, confirmada neste trabalho pela alta concentração de S nas raízes. Outro possível mecanismo de exclusão ocorre pela formação de precipitados, sais insolúveis como o fosfato de cádmio, $Cd_3(PO_4)_2$, indicados pela presença de altos teores médios de P (PC1) [24,37].

Na PC2 (20,11%), a separação entre o nível controle (R1 e S1; 0.000 mg L⁻¹ de Cd) e o segundo nível (R2 e S2; 0.025 mg L⁻¹ de Cd) dos demais (R3 a R5 e S3 a S5; 0.100, 0.500 e 1.000 mg L⁻¹) está relacionada aos altos teores de Ca, Mg, Mn e Zn e de Cd, N e Cu, respectivamente, principalmente nas raízes.

No geral, a presença de Cd reduziu a absorção dos demais nutrientes, excluindo apenas o K (PC1). Além de, reduzir significativamente a presença de outros metais como o Ca, Mg, Mn e Zn, efeitos antagônicos, excluindo apenas o Cu, que aumentou (efeito sinérgico), e o Fe, que não obteve nenhuma alteração (PC2).

Na Fig. 3b, a PC1 (79,08%), assim como para o teor, também é responsável por separar as amostras de R1 a R5 e S1 a S5, com altos acúmulos de nutrientes nas partes aéreas, e, novamente, o acúmulo de Cd não variou entre as diferentes partes. A PC2 (15,63%) descreve o aumento do acúmulo de Cd à medida que aumentou-se as doses. As amostras S4 e S5 foram as que mais

acumularam o Cd e as que obtiveram maiores teores médios de S, provavelmente relacionado à formação de fitoquelatinas [24,36,37]. Em contrapartida, nas doses controle, S1 e R1, o acúmulo de Fe, Cu e Mn foram bem maiores do que nos níveis mais altos de Cd. E os demais nutrientes não variaram de forma significativa. Dessa forma, o acúmulo de Cd está altamente relacionado ao maior acúmulo de S, efeito sinérgico, e aos menores acúmulos de Fe, Cu e Mn, efeito antagônico, nas partes aéreas da planta, menos nas amostras S2 e S3 não variaram de forma relevante os acúmulos de nutrientes e de Cd, além das raízes, R2 a R5.

4.2. HCA do teor e acúmulo de nutrientes e de Cd

Analisando as Fig. 4a e Fig. 4b, nota-se que para o teor são formados 2 grupos e 6 subgrupos e para o acúmulo 2 grupos e 7 subgrupos (Tabela 1) e, para ambos, assim como no modelo PCA, também houve distinção entre as amostras de R1 a R5 e S1 a S5.

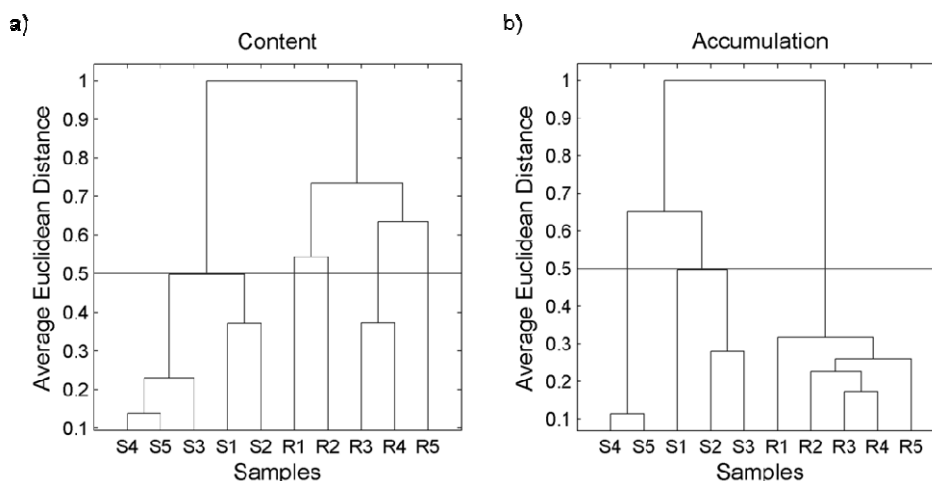


Fig. 4. Dendrogramas Euclidiano Médio. (a) Teor de nutrientes e de Cd e produção de massa de matéria seca (b) Acúmulo de nutrientes e de Cd (R – raiz

e S – parte aérea; doses de Cd: **1** – 0,000; **2** – 0,025; **3** – 0,100; **4** – 0,500 e **5** – 1,000 em mg L⁻¹).

No teor (Fig. 4a), no grupo das Rs, 3 subgrupos foram formados, R1 e R2 de baixa similaridade; R3 e R4 de alta similaridade e R5, que se agrupou com baixa similaridade ao subgrupo anterior. Já no grupo Ss, 3 subgrupos formados de alta similaridade entre si foram formados, S1 e S2; S3, agrupado ao S4 e S5. Pode-se perceber também que as amostras R1 e R2 são bem diferentes das R3, R4 e R5.

No acúmulo (Fig. 4b), grupo Rs, os subgrupos formados foram R4 e R5; R2 agrupado ao primeiro; R5, agrupado a R2, R3 e R4; e R1, agrupado aos demais, ambos com alta similaridade. No grupo Ss, se agruparam S2 e S3; S4 e S5 e S1, agrupado ao primeiro. Ambos os subgrupos apresentaram alta similaridade. Entretanto, o grupo S1; S2 e S3 demonstraram ter baixa similaridade com o grupo S4 e S5.

4.3. Produção de massa de matéria seca e toxicidade

Conforme foi relatado anteriormente, a produção de massa de matéria seca não variou entre a dose controle e as de Cd (PC2, Fig. 3a). Além disso, após a contaminação das alfices, pode-se observar que visualmente não houve distinção entre os tratamentos com Cd e o controle, como também não foram observados nenhum dos sintomas de clorose, necrose, queda de folhas mais velhas e escurecimento das raízes, conforme relatados por Costa et al. [21], que empregaram doses mais altas (0, 1, 2, 4, 8 e 16 mg L⁻¹), em *Ricinus communis* cv. Guarany, e por Zhao et al. [16], em *Arabidopsis halleri*.

Entretanto, as plantas submetidas a quaisquer doses de Cd, tornam-se impróprias para o consumo, devido aos diversos riscos de efeitos deletérios que este contaminante pode causar, ao longo da cadeia trófica. De acordo com a

ATSDR [14], a *Environmental Protection Agency* (EPA) determina que a dose de referência (RfD), não ultrapasse 1×10^{-3} mg/kg/dia em alimentos.

5. CONCLUSÕES

- O emprego do modelo PCA demonstrou ser eficaz e satisfatório no reconhecimento de tendências e agrupamentos entre as diferentes amostras e doses de Cd, entretanto, o modelo HCA não acrescentou nenhuma contribuição, neste caso.
- A maioria dos elementos químicos, essenciais ou não, obtiveram maiores teores nas raízes; o potássio na parte aérea.
- Teores de Cd superiores a $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ prejudicaram a absorção de Ca, Mg, Mn e Zn nas plantas (antagonismo), não prejudicando o Cu e o N (sinergismo).
- O acúmulo de Cd foi antagônico ao Fe, Cu e Mn, em contrapartida, sinérgico ao S (formação de fitoquelatinas).
- A dose $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ foi a que mais se assemelhou a dose sem tratamento (controle). Ambas demonstraram ser muito diferentes das demais.
- As plantas desenvolveram e produziram massa de matéria seca normalmente, independentemente das doses de Cd, sendo impróprias para o consumo pela presença deste contaminante (elemento deletério em qualquer dosagem) na parte aérea.
- O desenvolvimento das plantas sob efeito de Cd revela mecanismos biológicos de defesa, como a precipitação por fosfatos de Cd e a formação de complexos de alto impedimento estérico, com as glutioninas, as fitoquelatinas e os aminoácidos.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da CAPES e ao professor Matheus P. Freitas por ceder o programa Matlab para elaboração dos cálculos.

REFERÊNCIAS

- [1] A. Kabata-Pendias, Trace Elements in Soils and Plants. 4th ed., CRC Press: Boca Raton (2010) 548 pp.
- [2] L.A. Paim, R. Carvalho, C.M.P. Abreu, M.C. Guerreiro, Estudo dos efeitos do silício e do fósforo na redução da disponibilidade de metais pesados em área de mineração, *Quím. Nova*, 29 (2006) 28-33.
- [3] B.E. Davies, Heavy metal contaminated soils in an old in an old industrial area of Wales, great Britain: Source identification through statistical data interpretation, *Water, Air, & Soil Pollut.*, 94 (1997) 85-98.
- [4] B.J. Alloway, E. Steinnes, Anthropogenic additions of cadmium to soils. In: C.A. Grant, J.M. Clarke, S. Duguid, R.L. Chaney, Selection and breeding of plant cultivars to minimize cadmium accumulation, *Sci.total environ.*, 390 (2008) 301-310.
- [5] S.C. Wong, X.D. Li, G. Zhang, S.H. Qi, Y. S. Min, Heavy metals in agricultural soils of the Pearl River Delta, South China, *Environ. Pollut.*, 119 (2002) 33-44.
- [6] X. Zhao, W.H. Höll, G. Yun, Elimination of cadmium trace contaminations from drinking water, *Water Res.*, 36 (2002) 851-858.
- [7] A. G. Kachenko, B. Singh, Heavy metals contamination in vegetables grown in urban and metal smelter contaminated sites in Australia, *Water, Air, and Soil Poll.*, 169 (2006) 101-123.

- [8] J. Xin, B. Huang, Z. Yang, J. Yuan, H. Dai, Q. Qiu, Responses of different water spinach cultivars and their hybrid to Cd, Pb and Cd-Pb exposures, *J. of Hazard. Mater.*, 174 (2010) 468-476.
- [9] C. Karadaş, D. Kara, Chemometric approach to evaluate trace metal concentrations in some spices and herbs, *Food Chemistry*, 130 (2012) 196-202.
- [10] V.L Silva, R. Carvalho, M. P. Freitas, C.F. Tormena, W.C. Melo, Structural determination of Zn and Cd-DPTA complexes: MS, infrared, ¹³C NMR and theoretical investigation *Spectrochim. Acta A*, 68 (2007) 1197-1200.
- [11] P. Tanhan, M. Kruatrachue, P. Pokethitiyook, R. Chaiyarat, Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson], *Chemosphere*, 68 (2007) 323-329.
- [12] A.V.S.d. Carvalho, R. Carvalho, C.M.P.d. Abreu, A.E. Furtini Neto, Produção de matéria seca e de grãos por plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas em solos tratados com metais pesados, *Quím. Nova*, 31 (2008) 949-955.
- [13] A.V.S. Carvalho, R. Carvalho, C.M.P. Abreu, A.E. Furtini Neto, M.P. Freitas, Bean Plant Production of Dry Matter and Grain Related to Soil Citric Acid-Extractable Copper, Zinc, Cadmium, and Lead, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 40 (2009) 2959-2974.
- [14] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). *Toxicological Profile for Cadmium*, U.S. Dept. of Health & Human Services, September 2008, Available: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=48&tid=15>, 2012.

- [15] R.L. Qu, D. Li, R. Du, R. Qu, Lead Uptake by Roots of Four Turfgrass Species in Hydroponic Cultures, *HortScience*, 38 (2003) 623-626.
- [16] F.J. Zhao, R. F. Jiang, S. J. Duham, S. P. McGrath, Cadmium uptake, translocation and tolerance in the hyperaccumulation *Arabidopsis halleri*, *New Phytol.*, 172 (2006) 646-654.
- [17] Z.-x. Niu, L.-n. Sun, T.-h. Sun, Y.-s. Li, H. Wang, Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture, *Journal of Environmental Sciences*, 19 (2007) 961-967.
- [18] F.A. Solís-Domínguez, M.C. González-Chávez, R. Carrillo-González, R. Rodríguez-Vázquez, Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system, *Journal of Hazardous Materials*, 141 (2007) 630-636.
- [19] B.A. Bonfranceschi, C.G. Flocco, E.R. Donati, Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment, *Journal of Hazardous Materials*, 165 (2009) 366-371.
- [21] E. de Souza Costa, L. Guilherme, É. de Melo, B. Ribeiro, E. dos Santos B. Inácio, E. da Costa Severiano, V. Faquin, B. Hale, Assessing the Tolerance of Castor Bean to Cd and Pb for Phytoremediation Purposes, *Biological Trace Element Research*, 145 (2012) 93-100.
- [22] Q. Liu, C. Hu, Q. Tan, X. Sun, J. Su, Y. Liang, Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under hydroponic conditions, *Journal of Environmental Sciences*, 20 (2008) 326-331.
- [23] M.G. Cannata, R. Carvalho, A.C. Bertoli, A.R.R. Bastos, J.G. Carvalho, M.P. Freitas, A.S. Augusto, Effect of lead on the content, accumulation and

translocation of nutrients in bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivated in nutritive solution, Commun. Soil Sci. Plan., (2012) in prelo.

[24] M.G. Cannata, R. Carvalho, A.C. Bertoli, A.S. Augusto, A.R.R. Bastos, J.G. Carvalho, M.P. Freitas, Effect of cadmium and lead on the plant growing and content of heavy metals in arugula (*Eruca sativa* L.), Commun. Soil Sci. Plan., (2012) in prelo.

[25] J.M. Moita Neto, G.C. Moita, Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados, Quím. Nova, 21 (1998) 467-469.

[26] M.M. Sena, R.J. Poppi, R.T.S. Frighetto, P.J. Valarini, Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análises de solos, Quím. Nova 23 (2000) 547-556.

[27] R.A. Sousa, W. Borges Neto, R.J. Poppi, N. Baccan, S. Cadore, Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES, Quím. Nova, 29 (2006) 654-656.

[28] P.R.M. Correia, M.M.C. Ferreira, Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: Explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos, Quím. Nova, 30 (2007) 481-487.

[29] S.S. Souza, A.G. Cruz, E.H.M. Walter, J.A.F. Faria, R.M.S. Celeghini, M.M.C. Ferreira, D. Granato, A.S. Sant'Ana, Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach, Food Chemistry, 124 (2011) 692-695.

[30] J. Xue, C. Lee, S.G. Wakeham, R.A. Armstrong, Using principal components analysis (PCA) with cluster analysis to study the organic

geochemistry of sinking particles in the ocean, *Organic Geochemistry*, 42 (2011) 356-367.

[31] K.R. Beebe, R.J. Pell, M.B. Seasholtz, *Chemometrics: A Practical Guide*, A Wiley Interscience publication: New York, (1998).

[32] H. Martens, T. Naes, *Multivariate Calibration*, Wiley: New York, (2002).

[33] R.G. Brereton, *Chemometrics for pattern recognition*. John Wiley & Sons, (2009).

[34] D.R. Hoagland, D.I. Arnon, *The water-culture method for growing plants without soil*. California Agricultural Experiment: Circular 347, Berkeley, (1950).

[35] E. Malavolta, C.C. Vitti, S.A. Oliveira, *Avaliação do estado nutricional das plantas*. 2 ed. Piracicaba: Esalq-USP, (1997) 319 pp.

[36] M. Benavides, S. Gallego, M. Tomaro, Cadmium toxicity in plants, *Braz. J. Plant Physiol.*, 17 (2005) 21-34.

[37] M. Inouhe, Phytochelatins, *Plant Physiol.*, 17 (2005) 65-78.

ARTIGO 2: PCA and HCA to evaluate the effects of increasing doses of Pb on the content and accumulation of nutrients and production of lettuce (*Lactuca Sativa* L.)

Normas da revista científica *Chemosphere* (artigo submetido)

Highlights:

- This work confirmed the low mobility of Pb.
- Most chemical elements concentrated in the roots, excluding potassium.
- Pb reduced absorption of Ca and Mg (antagonism) and increased S and N (synergism).
- The accumulation of Pb was antagonistic to Fe, Cu and Mn and synergistic to S.
- Plants developed and produced dry matter normally, reveal defense mechanisms.

Abstract

A greenhouse assay using a lettuce (*Lactuca Sativa*) hydroponics system was carried out to evaluate the following effects of contamination of lead: 1) evaluate the effects of increasing doses of Pb on the contents and accumulation of nutrients in lettuce; 2) evaluate possible mechanisms to Pb detoxification, employing powerful chemometric tools: PCA and HCA models. With the PCA model, in content, the PC1 was responsible for distinguishing samples shoots, with high levels of K and DM, from roots, with high levels of Cu, Fe, P, Mn, Pb and Zn and B. The high amounts of S and P roots are highly correlated with those of Pb, due to complex formation with glutioninas, phytochelatins or amino acids and/or phosphates, which have prevented its translocation to the S. For

PC2, the high levels of Pb, N and S are present in higher doses and in return, low Ca and Mg (antagonistic effects). In accumulation, more Pb was accumulated in roots and nutrients in shoots (PC1). In PC2, accumulations of Fe, Cu and Mn decreased with increasing levels of Pb and, conversely, S, N and K increased. With the HCA model, it became evident that the dose 0.025 mg L⁻¹ were very similar than the dose control. Furthermore, the dose 10.000 mg L⁻¹ promoted greater variability in the content, accumulation and production in the different parts. PCA and HCA models demonstrated to be effective in the recognition and clustering tendencies.

Keywords: Principal Components Analysis, Hierarchical Cluster Analysis, Lead, Nutrition, Detoxification, Lettuce.

PCA and HCA to evaluate the effects of increasing doses of Pb on the content and accumulation of nutrients and production of lettuce (*Lactuca Sativa* L.)

Carlos D. L. Albuquerque*,¹ Ruy Carvalho,¹ Alexandre C. Bertoli,¹ Ronei J. Poppi,² Ana R. R. Bastos,³ Cleber L. Rodas³

¹*Department of Chemistry, Federal University of Lavras (UFLA), CP 3037, 37220-000 Lavras, Minas Gerais, Brazil*

²*Institute of Chemistry, University of Campinas (Unicamp), CP 6154, 13084-971 Campinas, São Paulo, Brazil*

³*Department of Science in Soil, Federal University of Lavras (UFLA), CP 3037, 37220-000 Lavras, Minas Gerais, Brazil*

*Corresponding author: Phone: +55 35 3829 1276; Fax: +55 35 3829 1812;
Email: carlostak2@yahoo.com.br

Email addresses: carlostaek2@yahoo.com.br (C.D.L. Albuquerque)*, ruy@dqi.ufla.br (R. Carvalho), bertolialexandre@yahoo.com.br (A.C. Bertoli), ronei@iqm.unicamp.br (R.J. Poppi), arosa@dcs.ufla.br (A.R.R. Bastos), cleberrodas@yahoo.com.br (C.L. Rodas).

1. Introdução

O chumbo (Pb) é um dos principais metais contaminantes do solo e da água (Paim et al., 2006) que, apesar de não ser elemento essencial para as plantas, pode ser absorvido e acumulado em seus compartimentos (Cannata et al., 2012), gerando graves problemas ambientais aos seres vivos (He et al., 2005; ATSDR, 2007). De acordo com a Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), o Pb é encontrado em segundo lugar numa lista de principais contaminantes. Devido a isso, uma gama de informações foram desenvolvidas sobre os riscos, efeitos, prevenções, dentre outras, sobre o risco da exposição e da contaminação ao Pb, nos organismos vivos (ATSDR, 2008).

Nas plantas, o Pb pode gerar diferentes sintomas indesejáveis, desde clorose, necrose, queda de folhas mais velhas e escurecimento das raízes até redução na produção de massa de matéria seca e no crescimento (Tanhan et al., 2007; Carvalho et al., 2008; Carvalho et al., 2009; Gopal & Rizvi, 2008; Cannata et al., 2012). Além disso, sua presença pode alterar o balanço nutricional do metabolismo das plantas, ou seja, pode competir com alguns nutrientes, devido sua alta capacidade de mimetização com elementos de propriedades químicas semelhantes, tais como o Zn, o Ca e o Cu (Silva et al., 2007; Kabata-Pendias et, 2010). Diferindo dos outros elementos, apenas na sua translocação, devido sua facilidade também em formar complexos de alto impedimento estéreo, que impede sua mobilidade nas plantas (Silva et al., 2007). De acordo ainda com Kabata-Pendias (2010), o antagonismo entre o Pb e o Zn

pode influenciar na translocação do Zn para a parte aérea das plantas. Já a relação entre o Pb e o Ca, pode ser benéfica, metabolicamente, desde que o Pb possa imitar o comportamento fisiológico do Ca e, portanto, pode inibir algumas enzimas.

A presença e os efeitos do Pb nas plantas são tolerados, até certo ponto. Existem diversos mecanismos de destoxificação, que tentam impedir sua ação deliberada. Estes mecanismos, se baseiam no sequestro de Pb, em vacúolos, pela formação de complexos, altamente estáveis, que se ligam a este metal. Dentre eles, destacam-se a glutathionina (GSH), alguns aminoácidos (AA) e as fitoquelatinas (PCs), oligômeros de GSH (Sharma & Dubey, 2005). Outros mecanismos baseiam-se na formação de precipitados insolúveis, tais como os fosfatos (Kabata-Pendias, 2010).

Nos estudos encontrados em literatura, na avaliação dos efeitos do Pb (Qu et al., 2003; Niu et al., 2007; Gopal & Rizvi, 2008; Tanhan et al., 2007; Cannata et al., 2012; Costa et al. 2012) ou qualquer outro metal contaminante (Niu et al., 2007; Solís-Domínguez et al., 2007; Tanhan et al., 2007; Liu et al., 2008; Bonfranceschi et al., 2009; Melo et al., 2009; Bertoli et al., 2012; Cannata et al., 2012; Costa et al. 2012) sobre as diferentes plantas, usualmente empregam-se métodos univariados, como por exemplo, a análise de variância (ANOVA) ou o teste de diferença mínima significativa (LSD).

No entanto, como a quantidade de variáveis analisadas (teores e acúmulos de diversos nutrientes em função de doses crescentes ou tempo de exposição aos metais pesados, dentre outras), assim como o espaço amostral (diferentes tipos e espécies de plantas, etc), vem aumentando gradativamente, de acordo com a necessidade de estudo, um fato preocupante, é se as informações extraídas desses modelos estão representando de forma adequada, o que realmente acontece na realidade, à natureza multivariada dos dados.

Dentre os métodos de estatística multivariada, o reconhecimento de padrões não supervisionados: **Principal Components Analysis (PCA)** e **Hierarchical Cluster Analysis (HCA)** são ferramentas que demonstraram ser muito eficientes na identificação de tendências, semelhanças e diferenças entre as amostras, mesmo quando não se tem nenhuma informação prévia do conjunto de dados analisados (Souza et al., 2011; Xue et al., 2011; Karada et al., 2012). Nesses métodos, as amostras similares são agrupadas e amostras diferentes formaram outros grupos e assim sucessivamente, até que todas sejam agrupadas. Além disso, evidenciam quais variáveis que estão influenciando no agrupamento ou diferenciação dos grupos formados. A PCA é uma técnica que reduz a dimensão dos dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Dessa forma, os dados serão projetados num espaço de menor dimensão, normalmente duas ou três dimensões, e, como resultado, as informações mais relevantes se tornam mais óbvias e, portanto, muito mais passíveis de interpretação (Beebe et al., 1998; Martens & Naes, 2002). Na HCA, o objetivo principal é o agrupamento dos dados, através da distância entre eles. As amostras mais próximas terão distâncias menores e, portanto, um novo grupo será formado (Beebe et al., 1998). Esta técnica, assim como em PCA, é muito útil para averiguar as similaridades entre as amostras e suas tendências. Desse modo, os objetivos deste artigo foram: 1) avaliar os efeitos de doses crescentes de Pb sobre os teores e os acúmulos de nutrientes e a produção da alface; 2) avaliar possíveis mecanismos de destoxificação ao Pb, empregando PCA e HCA. A toxicidade e os limites de tolerância ao Pb também foram estudados.

2. Teoria

2.1. Modelo PCA

A **Principal Components Analysis (PCA)** é um método de decomposição bilinear dos dados multivariados, em scores (T), informações sobre os objetos ou

amostras, e loadings (P^T), informações sobre as variáveis. De modo que, os dados são descritos de forma condensada, em relação ao conjunto de dados originais, e de tal forma, que o erro seja mínimo (Martens & Naes, 2002). Como os dados são apresentados ao modelo na forma matricial, (X) (i – amostras e j – variáveis), estes podem ser decompostos pelo algoritmo Singular Value Decomposition (SVD) em três submatrizes: a ortonormal, $U_{i \times A}$, a diagonal, $S_{A \times A}$, que o produto entre elas nos fornece $T_{i \times A}$, e a matriz transposta $V_{A \times j}^T$, que representa a matriz P^T , mais a matriz de erros, E (fig.1) (Brereton, 2009).

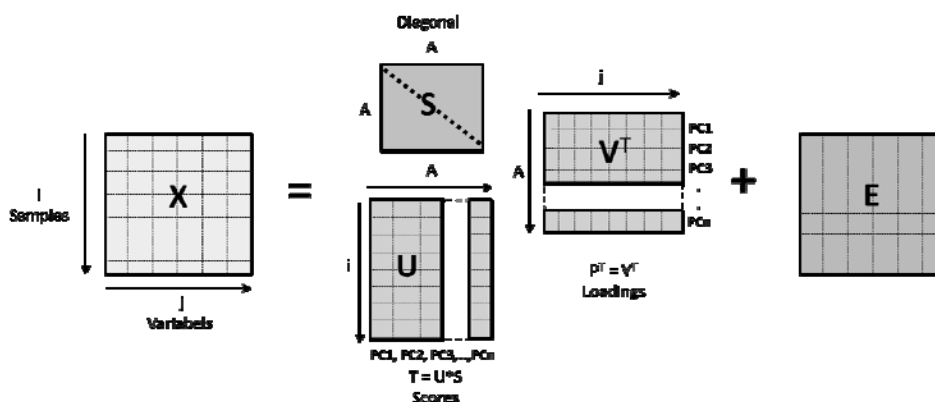


Fig.1. Representação gráfica do modelo PCA pela decomposição em SVD. Decomposição da matriz X em três sub-matrizes U , S e V^T mais a matriz E .

Resumindo, a equação básica em PCA pode ser descrita como:

$$\hat{X} = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + t_3 p_3^T \dots + t_A p_A^T + E = TP^T + E \quad \text{Equação 2}$$

Em que $t_1 p_1^T, t_2 p_2^T, t_3 p_3^T, \dots, t_A p_A^T$, representa o número de componentes principais, PC1, PC2, PC3, ..., PCn (Fig.1), ou seja, os novos eixos responsáveis por descreverem o conjunto de dados original (X). No qual, o número correto de

PCn a ser utilizado será determinado pelo analista, através da análise das variâncias explicada (VE) e/ou acumulada (VA) (Beebe et al., 1998).

2.2. Modelo HCA

No método **H**ierarchical **C**luster **A**nalysis (**HCA**), as amostras são agrupadas baseadas nas suas distâncias no espaço e este pode ser multidimensional (Beebe et al., 1998). Como em PCA, o conjunto de dados também pode ser organizado na forma matricial (\mathbf{X}). Em seguida, as distâncias entre as amostras são calculadas e o agrupamento é realizado. As mais próximas (similares) formaram grupos primeiro entre si e depois, com as mais distantes e assim sucessivamente, até que todas sejam classificadas, formando um único grupo, maior que os outros, que as contém.

Na fig.2, uma representação esquemática de uma das formas de calcular a distância entre as amostras pelo método das distâncias euclidianas (equação 3) e pelo agrupamento médio destas distâncias e, graficamente, na forma de dendrograma (Fig.2a e Fig.2b) (Beebe et al., 1998).

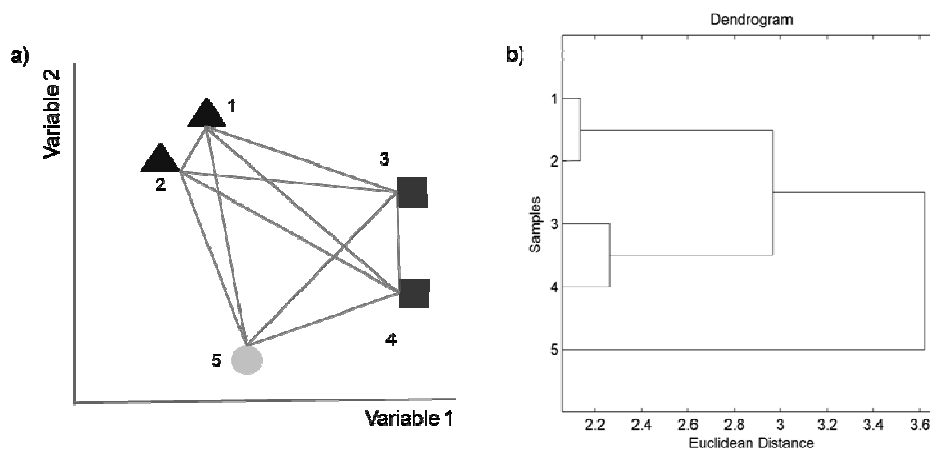


Fig.2. Representações do modelo HCA. (a) Esquema do cálculo da distância euclidiana e do agrupamento médio das amostras. (b) Dendrograma Euclidiano médio.

As amostras 1 e 2 e 3 e 4 formaram grupos entre si, o que não aconteceu para a amostra 5, devido a sua distância das demais.

$$d_{x_i x_j} = (X_i - X_j)(X_i - X_j)' \quad (2)$$

3. Material e métodos

3.1. Cultivo e contaminação da alface

As mudas de alface do tipo crespa (*Lactuca Sativa*) (cultivar Solaris) foram adquiridas de um produtor rural da cidade de Lavras (MG, Latitude: 21,23927° S e Longitude: 44,99858° W), que obteve as plantas, após semeadura em bandejas com substrato comercial (Plantmax).

Em casa de vegetação, vinte mudas saudáveis (uma por recipiente de cultivo) foram escolhidas e transplantadas para frascos de polietileno com oxigenação, contendo solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) a 20% de sua força iônica, previamente preparada com água deionizada, durante a fase de adaptação. Na segunda semana, a força da solução foi aumentada para 50% e, na terceira, para 80%, na qual foram aplicadas doses crescentes do metal contaminante (nível de Pb: **1** – controle; **2** – 0,25; **3** – 1,00; **4** – 5,00 e **5** – 10,00 mg L⁻¹), na forma de nitrato (Pb(NO₃)₂), marca Vetec p.a., em quadruplicata. Vale ressaltar que, essas doses foram baseadas em estudos realizados por Cannata et al. (2012). As trocas de solução nutritiva do metal contaminante foram realizadas semanalmente, durante três semanas, sendo 21 dias de contaminação, totalizando 32 dias de experimento.

3.2. Análise e tratamento dos dados

Após o ciclo comercial, as alfaces foram colhidas, lavadas com água deionizada, separadas por doses e divididas em raízes (R1, R2, R3, R4 e R5) e partes aéreas (S1, S2, S3, S4 e S5) e postas para secagem, em estufa, a temperatura constante de 60°C. Após a secagem, as amostras de massa de matéria seca (DM) na parte aérea e na raiz foram pesadas e trituradas para a dosagem dos teores dos metais (Ca: 422,7 nm, fenda: 0,5; Mg: 285,2 nm, fenda: 0,5; Cu: 324,7 nm, fenda: 0,2; Mn: 279,5 nm, fenda: 0,2; Zn: 213,9 nm, fenda: 0,2; Fe: 248,3 nm, fenda: 0,2 e Pb: 217,0 nm, fenda: 1,0) num espectrofotômetro da Varian (Modelo SpectrAA-110), de N por Kjeldahl, P (420 nm) e B (540 nm) por colorimetria PerkinElmer (Modelo Lambda-25), K (766 nm) por fotometria de chama (Modelo Micronal B262) e S (420 nm) por turbidimetria (Modelo Lambda-25) (Malavolta et al., 1997).

Os valores de acúmulo de N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Zn, Fe e Pb foram calculados multiplicando-se seus teores pelas produções de matérias massa seca na respectiva parte da planta, Rs ou Ss (equação 1).

$$\text{Acúmulo} = \frac{\text{Teor} \times \text{Matéria seca}}{1000} \quad \text{Equação 1}$$

Acúmulo → macronutrientes (g vaso⁻¹) e micronutrientes e de Pb (mg vaso⁻¹);

Teor → macronutrientes (g kg⁻¹) e micronutrientes e de Pb (mg kg⁻¹);

Massa de matéria seca → Rs e Ss (g).

Os dados foram importados e tratados por rotinas próprias de pré-processamento, de PCA e de HCA. O programa MATLAB versão R2007b (The MathWorks, Natick, USA) foi utilizado para o processamento.

Os valores médios referentes a produção de massa de matéria seca (DM) e aos teores e os acúmulos de nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Cu, Mn, Zn e Fe), de Pb nas diferentes partes da planta foram previamente organizados na forma matricial (\bar{X} , fig.1), com dimensões de 10×13 (teor) ou 10×12

(acúmulo), referindo-se às 10 amostras X 13 ou 12 variáveis, ou simplesmente, para o teor: raiz e parte aérea nos diferentes níveis X teor de nutrientes e de Pb e produção de massa de matéria seca (DM) e para o acúmulo: raiz e parte aérea nos diferentes níveis X acúmulo de nutrientes e de Pb, conforme representado na fig.1. Todos os conjuntos de dados foram pré-processados por autoescalamento e em seguida, submetidos aos modelos PCA e HCA.

No modelo PCA, os dados foram decompostos pelo algoritmo SVD e assim, os *Scores* (T) e os *Loadings* (P^T) foram calculados e plotados de forma simultânea, em gráficos biplots (Fig.3).

No modelo HCA, a distância entre as amostras foram calculadas pela distância Euclidiana (eq.3) e o agrupamento foi realizado pela média destas distâncias. Deixa-se claro, que o objetivo ao realizar este agrupamento foi para avaliar similaridade entre as amostras de raízes (Rs) e partes aéreas (Ss) nas diferentes doses (Fig.4). Neste trabalho, apenas as distâncias menores que 50% do maior valor (distância máxima) foram consideradas como similares, ou seja, as amostras que estão agrupadas, não necessariamente são similares.

4. Resultados e discussão

4.1. PCA

Analisando os modelos PCA, construídos para o teor e o acúmulo (fig.3a e fig.3b), pode-se afirmar que para ambos, duas componentes principais ($A = 2$ ou PC1 e PC2, fig.1) foram suficientes para descreverem os conjuntos de dados, visto que, representam VA maiores que 77 e 91%, respectivamente.

Não existe um valor exato de VA e/ou VE para escolha do número correto de PCn. Muitas vezes esta decisão pode ser tomada após a análise da próxima componente principal e assim, sucessivamente. Neste trabalho, as PC3, PC4,..., PC12 não continham nenhuma informação relevante sobre os conjuntos de dados, portanto, foram descartadas.

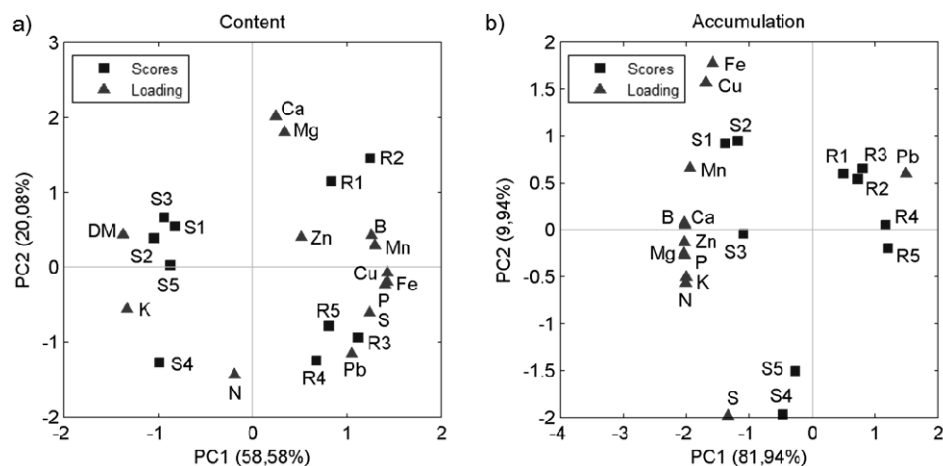


Fig.3. Gráficos biplots (escores X pesos). (a) Teor de nutrientes e de Pb e produção de massa de matéria seca (DM) (b) Acúmulo de nutrientes e de Pb (R – raiz e S – parte aérea; doses de Pb: 1 – 0,00; 2 – 0,25; 3 – 1,00; 4 – 5,00 e 5 – 10,00 mg L⁻¹).

Para o teor (fig.3a), é possível observar claramente a separação das amostras de raízes (R1 a R5), com altos teores médios de Cu, Fe, P, Mn, B, Pb e Zn, das partes aéreas (S1 a S5), alto teor de K e de DM (PC1, 56,16% de informação). Os demais nutrientes não variaram entre as partes. A PC2 (21,35%) é responsável por distinguir as amostras R1 e R2; S1 e S3, com altos teores de Ca e Mg, das R3 a R5; S4, altos teores de N, Pb e S. As amostras S2 e S5 não sofreram mudança significativa, assim como os teores dos demais nutrientes e DM. De acordo com Sharma & Dubey (2005) e Kabata-Pendias (2010), o Pb mostra interferências, também denominadas como efeitos antagônicos, com alguns macro e micronutrientes presentes nas plantas (K, Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Fe e N, aquele na forma de nitrato, NO₃⁻). A interferência do Pb com o Ca mostrada pela PC2, por exemplo, é relatada na literatura como de importância metabólica, desde que, o Pb possa imitar o comportamento fisiológico do Ca e, portanto, pode inibir algumas enzimas (Kabata-Pendias, 2010). Outro efeito observado, foi o impedimento da translocação do Zn para as partes aéreas das

plantas (PC1). Além disso, o Pb impediu a translocação do B, do Mn, do Fe e do Cu (PC1). Apenas o K, que possui alta mobilidade, não foi afetado pelo Pb, como o Ca, o Mg e o N que não variaram entre as partes. Ainda de acordo com Sharma & Dubey (2005), existem dois mecanismos sugeridos para o impedimento da absorção de macro e micronutrientes imposta pelo Pb. O primeiro, baseia-se no tamanho do raio iônico dos metais envolvidos, como é o caso do Cu, do Fe, do Mn e do Zn (PC1), que se concentraram mais nas raízes do que nas partes aéreas. O segundo, baseia-se num distúrbio induzido pelo Pb no metabolismo enzimático das células e na estrutura da sua membrana. É importante ressaltar que, o Pb interfere na absorção de outros nutrientes. Contudo, existem vários mecanismos impostos pelas plantas que tentam impedir sua ação (Sharma & Dubey, 2005; Kabata-Pendias, 2010). Estes mecanismos baseiam-se no sequestro do Pb, em vacúolos, pela formação de complexos, que se ligam a este metal, destacam-se a glutatoinina (GSH), alguns amino ácidos (AA) e as fitoquelatinas (PCs), oligômeros de GSH, ambos compostos a base de N e S (Sharma & Dubey, 2005), altos teores de S nas raízes e de N em ambas as partes estavam presentes nas maiores doses de Pb, ou na formação de precipitados insolúveis, tais como os fosfatos (Kabata-Pendias, 2010), comprovado pelos altos teores de P nas raízes.

No acúmulo (fig.3b), a PC1 (81,94%) foi responsável por separar as amostras de raízes (R4 e R5), onde foram aplicadas as maiores doses de Pb, com alto acúmulo de Pb, das partes aéreas (S1 a S3), altos acúmulos de nutrientes. As doses R1 a R3; S4 e S5 não variaram, devido as primeiras conterem baixos e as segundas conterem altos valores médios de acúmulo de Pb. Na PC2 (9,94%), pode-se observar que as amostras onde foram aplicados os níveis mais altos de Pb, S4 e S5, os acúmulos de S e N também foram maiores e, em contrapartida, nos níveis S1 e S2; R1 a R3 obtiveram maiores teores de Cu, Fe e Mn. Os acúmulos dos demais nutrientes não variaram.

4.2. HCA

Analisando as fig.4a e fig.4b, nota-se que para o teor são formados 2 grupos e 7 subgrupos e para o acúmulo 2 grupos e 6 subgrupos e, para ambos, assim como no modelo PCA, também houve diferenciação entre as amostras de R1 a R5 e S1 a S5, conforme observado, abaixo:

Teor

Grupo raiz: Sub-grupos: R1 e R2; R3; R4 e R5

Grupo parte aérea: Sub-grupos: S1; S2 e S3; S4 e S5

Acúmulo

Grupo raiz: Sub-grupos: R1; R2 e R3; R4 e R5

Grupo parte aérea: Sub-grupos: S1 e S2; S3; S4 e S5

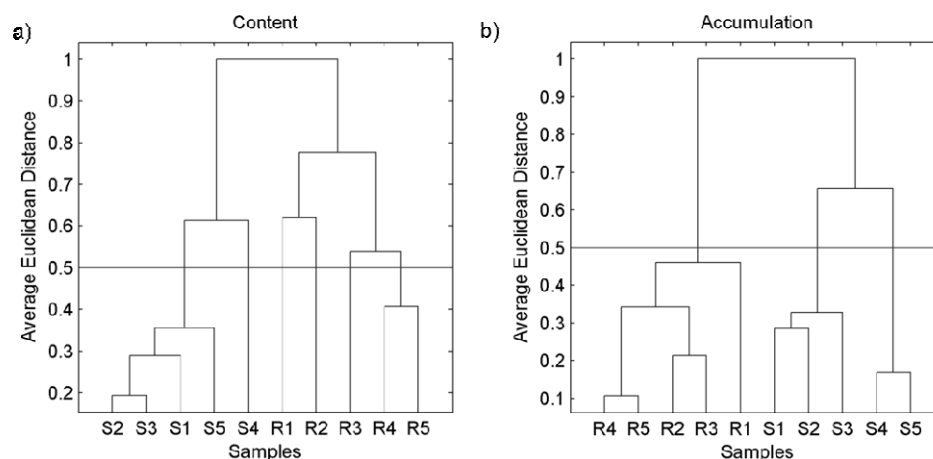


Fig. 4. Dendrogramas Euclidiano Médio. (a) Teor de nutrientes e de Pb e produção de massa de matéria seca (b) Acúmulo de nutrientes e de Pb (R – raiz e S – parte aérea; doses de Pb: **1** – 0,00; **2** – 0,25; **3** – 1,00; **4** – 5,00 e **5** – 10,00 em mg L⁻¹).

No teor fig.4a, no grupo das S, 4 subgrupos foram formados, com alta similaridade entre si, excluindo apenas a S4, que foi ao contrário. Isso mostra que, nesta dose o teor de nutrientes e de Pb e a produção de matéria seca foram diferentes das demais. Além disso, as amostras desse grupo foram as que obtiveram maior variabilidade entre si, em relação às demais. Já no grupo S, com 3 subgrupos formados, a R1 e R2 formaram um dos subgrupos, porém, apresentaram similaridade baixa, portanto, muito diferentes. Outros subgrupos formados foram entre as amostras R4 e R5, de alta similaridade, e a R3 que se agrupou com baixa similaridade com a anterior. Pode-se perceber também que as amostras R1 e R2 são bem diferentes das R3, R4 e R5.

No acúmulo fig.4b, grupo R, todos os subgrupos formados obtiveram alta similaridade. Foram eles, R1; R2 e R3 e R4 e R5, sendo que, a R1 (controle) foi um pouco diferente das demais. No grupo Ss, 3 subgrupos foram formados (S1 e S2; S3 agrupado aos primeiros e S4 e S5) e as doses S1 a S3 se diferenciaram das doses S4 e S5.

No geral, as doses aplicadas crescentes de Pb promoveram a alta variabilidade das amostras. Nota-se também que, a dose controle ($0,000 \text{ mg L}^{-1}$ de Cd) e a dose $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ foram as mais parecidas tanto para a raiz quanto para a parte aérea. A maior dose ($10,00 \text{ mg L}^{-1}$) aplicada promoveu maior diferenciação das amostras de raízes das demais, porém na parte aérea obtiveram alta similaridade com a dose 4 ($5,00 \text{ mg L}^{-1}$).

4.3. Produção de matéria seca, toxicidade e limites de tolerância

Conforme foi relatado anteriormente, a produção de massa de matéria seca não variou entre a dose controle e as de Cd (PC2, fig.3a). Além disso, após a contaminação das alfices, pode-se observar que visualmente não houve distinção entre os tratamentos com Cd e o controle, como também não foram observados nenhum dos sintomas de clorose, necrose, queda de folhas mais

velhas e escurecimento das raízes, conforme relatados por Tanhan et al. (2007), para a *Chromolaena odorata*. O autor observou que na dose 10 mg L^{-1} , as plantas apresentaram sintomas de clorose, baixa produção de biomassa e de crescimento relativo.

Entretanto, as plantas submetidas a quaisquer doses de Pb, tornam-se impróprias para o consumo, devido aos diversos riscos de efeitos deletérios que este contaminante pode causar, ao longo da cadeia trófica. De acordo com a ATSDR (2008), a *Environmental Protection Agency* (EPA) não determinou um valor de dose de referência (RfD), pois os efeitos na saúde associados a exposição ao chumbo inorgânico (e compostos de chumbo) ocorrem em níveis tão baixos no sangue, a ponto de não ser que um começo.

5. Conclusions

- O modelo PCA demonstrou ser eficaz no reconhecimento de tendências e agrupamentos entre as diferentes amostras e doses de Pb, entretanto, o modelo HCA não acrescentou informações adicionais ao primeiro.
- O teor e o acúmulo de Pb foram maiores nas raízes das plantas, confirmando sua baixa mobilidade.
- A maioria dos elementos químicos, essenciais ou não, concentraram-se nas raízes; o potássio na parte aérea.
- Teores de Pb superiores a $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ nas raízes prejudicaram a absorção de Ca e Mg nas plantas (antagonismo), não prejudicando o S e o N (sinergismo).
- O acúmulo de Pb foi antagônico ao Fe, ao Cu e ao Mn, em contrapartida, sinérgico ao S (formação de fitoquelatinas).
- A dose $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ foi a que mais se assemelhou a dose sem tratamento (controle). Ambas demonstraram ser muito diferentes das demais.
- As plantas desenvolveram e produziram massa de matéria seca normalmente, independentemente das doses de Pb, sendo impróprias para o consumo pela

presença deste contaminante (elemento deletério em qualquer dosagem) na parte aérea.

- O desenvolvimento das plantas sob efeito de Pb revela mecanismos biológicos de defesa, como a precipitação por fosfatos de Pb e a formação de complexos de alto impedimento estérico, com as glutioninas, as fitoquelatinas e os aminoácidos.

Agradecimentos

Ao apoio financeiro da CAPES e ao professor Matheus P. Freitas por ceder o programa Matlab para elaboração dos cálculos.

Referências

ATSDR, 2007. Toxicological Profile for Lead, U.S. Dept. of Health & Human Services [Online WWW], available, URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=96&t-id=22>. Accessed August 2012.

ATSDR, 2011. CERCLA Priority List of Hazardous Substances, Agency for Toxic Substances and Disease Control [Online WWW], available URL: <http://www.atsdr.cdc.gov/SPL/index.html>. Accessed August 2012.

Beebe K.R., Pell, R.J., Seasholtz, M.B., 1998. Chemometrics: A Practical Guide, John Wiley & Sons, New York.

Bonfranceschi, B.A., Flocco, C.G., Donati, E.R., 2009. Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. Journal of Hazardous Materials 165, 366-371.

Cannata, M.G., Carvalho, R., Bertoli, A.C., Bastos, A.R.R., Carvalho, J.G.; Freitas, M.P., Augusto, A.S. Effect of lead on the content, accumulation and translocation of nutrients in bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivated in nutritive solution. Communications in Soil Science and Plant Analysis. a

Cannata, M.G., Carvalho, R., Bertoli, A.C., Augusto, A.S., Bastos, A.R.R.; Carvalho, J.G.; Freitas, M.P. Effect of cadmium and lead on the plant growing and content of heavy metals in arugula (*Eruca Sativa* L.) cultivated in nutritive solution. Communications in Soil Science and Plant Analysis. b

Carvalho, A.V.S., Carvalho, R., Abreu, C.M.P., Furtini Neto, A.E., Freitas, M.P., 2009. Bean Plant Production of Dry Matter and Grain Related to Soil Citric Acid–Extractable Copper, Zinc, Cadmium, and Lead. Communications in Soil Science and Plant Analysis 40, 2959-2974.

Carvalho, A.V.S., Carvalho, R., Abreu, C.M.P.d., Furtini Neto, A.E., 2008. Produção de matéria seca e de grãos por plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas em solos tratados com metais pesados. Química Nova 31, 949-955.

Carvalho Bertoli, A., Gabriel Cannata, M., Carvalho, R., Ribeiro Bastos, A.R., Puggina Freitas, M., dos Santos Augusto, A., *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. Ecotoxicology and Environmental Safety.

de Souza Costa, E., Guilherme, L., de Melo, É., Ribeiro, B., dos Santos B. Inácio, E., da Costa Severiano, E., Faquin, V., Hale, B., 2012. Assessing the

Tolerance of Castor Bean to Cd and Pb for Phytoremediation Purposes. *Biological Trace Element Research* 145, 93-100.

Gopal, R., Rizvi, A.H., 2008. Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. *Chemosphere* 70, 1539-1544.

He, Z.L., Yang, X.E., Stoffella, P.J., 2005. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 125-140.

Hoagland, D.R, Arnon, D.I., 1950. The water-culture method for growing plants without soil: California Agricultural Experiment, Circular: Berkeley.

Kabata-Pendias, A., 2010. Trace elements in soils and plants, fourth ed. CRC Press, Boca Raton.

Karadaş, C., Kara, D., 2012. Chemometric approach to evaluate trace metal concentrations in some spices and herbs. *Food Chemistry* 130, 196-202.

Liu, Q., HU, C., Tan, Q., Sun, X., Su, J., Liang, Y., 2008. Effects of As on As uptake, speciation, and nutrient uptake by winter wheat (*Triticumaestivum* L.) under hydroponic conditions. *Journal of Environmental Sciences* 20, 326-331.

Martens, H., Naes, T., 1989. *Multivariate Calibration*, Wiley, New York.

Melo, E.E.C., Costa, E.T.S., Guilherme, L.R.G., Faquin, V., Nascimento, C.W.A., 2009. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants

grown on an As-enriched nutrient solution. *Journal of Hazardous Materials* 168, 479-483.

Niu, Z.-x., Sun, L.-n., Sun, T.-h., Li, Y.-s., Wang, H., 2007. Evaluation of phytoextracting cadmium and lead by sunflower, ricinus, alfalfa and mustard in hydroponic culture. *Journal of Environmental Sciences* 19, 961-967.

Paim, L.A., Carvalho, R., Abreu, C.M.P., Guerreiro, M.C., 2006. Estudo dos efeitos do silício e do fósforo na redução da disponibilidade de metais pesados em área de mineração. *Química Nova* 29, 28-33.

Qu, R.L., Li, D., Du, R., Qu, R., 2003. Lead uptake by roots of four turfgrass species in hydroponic cultures. *Hortscience* 38, 623-626.

Solís-Domínguez, F.A., González-Chávez, M.C., Carrillo-González, R., Rodríguez-Vázquez, R., 2007. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *Journal of Hazardous Materials* 141, 630-636.

Souza, S.S., Cruz, A.G., Walter, E.H.M., Faria, J.A.F., Celeghini, R.M.S., Ferreira, M.M.C., Granato, D., Sant'Ana, A.d.S., 2011. Monitoring the authenticity of Brazilian UHT milk: A chemometric approach. *Food Chemistry* 124, 692-695.

Tanhan, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P., Chaiyarat, R., 2007. Uptake and accumulation of cadmium, lead and zinc by Siam weed [*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson]. *Chemosphere* 68, 323-329.

Xue, J., Lee, C., Wakeham, S.G., Armstrong, R.A., 2011. Using principal components analysis (PCA) with cluster analysis to study the organic geochemistry of sinking particles in the ocean. *Organic Geochemistry* 42, 356-367.

ANEXOS

	Página
TABELA 1 Valores médios respectivos aos teores e acúmulos de nutrientes após aplicadas doses de Cd.....	74
TABELA 2 Valores médios respectivos aos teores e acúmulos de nutrientes após aplicadas doses de Cd.....	76
TABELA 3 Valores médios e desvios padrão de matéria seca e teor para o Cd.....	78
TABELA 4 Valores médios e desvios padrão de matéria seca e teor para o Pb.....	78

TABELA 1 Valores médios respectivos aos teores e acúmulos de nutrientes após aplicadas doses de Cd.

Teor	Parte da planta	Doses	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Zn	Fe
		mg L ⁻¹	#-----	-----	g Kg ⁻¹	-----	-----	-----#	#-----	-----	mg Kg ⁻¹	-----	-----#
Teor	Raiz	0.000	38.400	9.575	14.350	14.775	3.600	7.125	91.475	13.175	214.025	54.575	780.975
		0.025	39.575	10.050	11.375	11.300	3.475	7.725	99.750	12.150	247.375	78.800	736.050
		0.100	40.175	9.025	13.525	8.825	3.025	7.400	130.850	14.075	163.075	61.975	739.500
		0.500	40.375	9.650	13.225	10.000	3.150	6.925	145.775	14.250	95.575	43.625	747.800
		1.000	40.300	10.750	15.750	11.050	3.100	5.400	67.825	20.650	116.100	42.700	778.775
	Parte Aérea	0.000	38.100	6.675	17.750	12.825	3.250	2.325	50.325	3.200	87.750	46.425	214.050
		0.025	35.700	6.575	17.175	11.275	2.950	1.925	52.875	2.675	83.325	39.250	129.425
		0.100	38.050	6.875	15.125	9.675	2.850	3.075	56.575	2.800	66.825	36.150	119.875
		0.500	38.950	6.375	14.400	9.550	2.750	3.100	36.125	2.575	53.025	46.275	114.975
		1.000	38.275	6.050	14.925	9.075	2.700	3.575	37.800	2.575	49.375	40.450	102.175

TABELA 1 Continuação

	Parte da planta	Doses	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Zn	Fe
		mg L ⁻¹	#-----	-----	mg Kg ⁻¹	-----	-----	-----#	#-----	-----	µg Kg ⁻¹	-----	-----#
Acúmulo	Raiz	0.000	0.061	0.015	0.023	0.023	0.006	0.011	0.144	0.021	0.337	0.086	1.231
		0.025	0.041	0.010	0.012	0.012	0.004	0.008	0.102	0.012	0.254	0.081	0.756
		0.100	0.053	0.012	0.018	0.012	0.004	0.010	0.174	0.019	0.217	0.082	0.983
		0.500	0.045	0.011	0.015	0.011	0.003	0.008	0.161	0.016	0.106	0.048	0.826
		1.000	0.038	0.010	0.015	0.010	0.003	0.005	0.064	0.020	0.110	0.041	0.740
	Parte Aérea	0.000	0.346	0.061	0.161	0.116	0.029	0.021	0.456	0.029	0.796	0.421	1.941
		0.025	0.312	0.057	0.150	0.099	0.026	0.017	0.462	0.023	0.728	0.343	1.131
		0.100	0.340	0.061	0.135	0.086	0.025	0.027	0.505	0.025	0.597	0.323	1.071
		0.500	0.291	0.048	0.107	0.071	0.021	0.023	0.269	0.019	0.395	0.345	0.858
		1.000	0.283	0.045	0.110	0.067	0.020	0.026	0.280	0.019	0.365	0.299	0.756

TABELA 2 Valores médios respectivos aos teores e acúmulos de nutrientes após aplicadas doses de Pb

Teor	Parte da planta	Doses	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Zn	Fe
		mg L ⁻¹	#-----	-----	g Kg ⁻¹	-----	-----	-----#	#-----	-----	mg Kg ⁻¹	-----	-----#
Teor	Raiz	0.000	38,400	9,575	14,350	14,775	3,600	7,125	91,475	13,175	214,025	54,575	780,975
		0.025	39,175	10,875	13,125	18,075	3,800	7,725	107,275	13,875	338,000	38,625	786,725
		0.100	38,400	10,100	14,150	10,350	2,950	10,050	99,100	13,525	336,375	38,875	806,950
		0.500	41,550	10,175	15,650	10,075	3,125	6,950	46,925	13,800	179,825	45,950	825,225
		1.000	40,725	11,275	16,700	11,025	3,250	5,950	106,725	11,300	151,500	42,400	828,900
	Parte Aérea	0.000	38,100	6,675	17,750	12,825	3,250	2,325	50,325	3,200	87,750	46,425	214,050
		0.025	38,100	6,675	20,475	13,300	3,275	2,125	41,575	3,500	94,450	36,175	178,100
		0.100	38,175	6,800	17,950	14,100	3,275	1,875	49,175	2,500	84,625	39,350	140,975
		0.500	45,650	6,875	20,875	10,225	3,075	5,475	41,225	2,450	77,450	38,775	130,025
		1.000	39,975	6,675	20,350	11,800	3,425	4,850	45,450	2,600	77,500	37,175	145,775

TABELA 2 Continuação

Parte da planta	Doses	N	P	K	Ca	Mg	S	B	Cu	Mn	Zn	Fe
	mg L ⁻¹	#-----	-----	mg Kg ⁻¹	-----	-----	-----#	#-----	-----	µg Kg ⁻¹	-----	-----#
Acúmulo	0.000	0,061	0,015	0,023	0,023	0,006	0,011	0,144	0,021	0,337	0,086	1,231
	0.025	0,050	0,014	0,017	0,023	0,005	0,010	0,136	0,018	0,428	0,049	0,995
	0.100	0,050	0,013	0,019	0,014	0,004	0,013	0,130	0,018	0,441	0,051	1,059
	0.500	0,037	0,009	0,014	0,009	0,003	0,006	0,042	0,012	0,160	0,041	0,736
	1.000	0,033	0,009	0,014	0,009	0,003	0,005	0,087	0,009	0,123	0,034	0,672
	0.000	0,346	0,061	0,161	0,116	0,029	0,021	0,456	0,029	0,796	0,421	1,941
	0.025	0,342	0,060	0,184	0,119	0,029	0,019	0,373	0,031	0,848	0,325	1,599
	0.100	0,345	0,061	0,162	0,127	0,030	0,017	0,444	0,023	0,764	0,355	1,273
	0.500	0,306	0,046	0,140	0,068	0,021	0,037	0,276	0,016	0,519	0,260	0,871
	1.000	0,240	0,040	0,122	0,071	0,021	0,029	0,272	0,016	0,464	0,223	0,874

Tabela 3 Valores médios e desvios padrão de matéria seca e teor para o Cd

Cd (mg L ⁻¹)	Matéria Seca		Teor	
	Raiz (g)	Parte Aérea (g)	Raiz (mg Kg ⁻¹)	Parte Aérea (mg Kg ⁻¹)
0.000*	1,5765 ±0,1343	9,0690 ±1,5579	0,0000 ±0,0000	0,0000 ±0,0000
0.025	1,0268 ±0,1864	8,7408 ±0,8148	7,6250 ±2,1172	6,8750 ±1,6581
0.100	1,3295 ±0,1539	8,9323 ±1,1449	15,9250 ±0,6946	16,3500 ±0,5802
0.500	1,104 ±0,1586	7,4585 ±0,8290	62,1250 ±14,7687	41,2250 ±9,2168
1.000	0,9498 ±0,1655	7,3975 ±1,1610	137,1250 ±8,9504	46,4750 ±34,8620

*controle

Tabela 4 Valores médios e desvios padrão de matéria seca e teor para o Pb

Pb (mg L ⁻¹)	Matéria Seca		Teor	
	Raiz (g)	Parte Aérea (g)	Raiz (mg Kg ⁻¹)	Parte Aérea (mg Kg ⁻¹)
0.00*	1,5765 ±0,1343	9,0690 ±1,5579	0,0000 ±0,0000	0,0000 ±0,0000
0.25	1,2653 ±0,1309	8,9768 ±0,6733	666,075 ±59,851	66,350 ±68,092

1.00	1,3123	9,0333	1150,025	15,750
	±0,2080	±0,8330	±108,357	±5,618
5.00	0,8913	6,6953	1422,275	35,300
	±0,2556	±1,4881	±88,323	±7,995
10.00	0,8105	5,9933	1449,225	42,575
	±0,0955	1,1888	±142,723	±1,224

*controle