

MARISE CONCEIÇÃO MARQUES

**TOXICIDADE POR METAIS PESADOS EM PINHÃO-MANSO E MAMONA
CULTIVADAS EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**

**RECIFE-PE
2013**

MARISE CONCEIÇÃO MARQUES

**TOXICIDADE POR METAIS PESADOS EM PINHÃO-MANSO E MAMONA
CULTIVADAS EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciência do Solo.

RECIFE-PE

2013

MARISE CONCEIÇÃO MARQUES

Tese “**TOXICIDADE POR METAIS PESADOS EM PINHÃO-MANSO E MAMONA CULTIVADAS EM SOLUÇÃO NUTRITIVA**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Doutora, e aprovada em 27 de fevereiro de 2013.

Dr. Clístenes Williams Araújo do Nascimento
Presidente da Banca Examinadora
(Orientador)

Dr^a. Adriana Maria de Aguiar Accioly
Examinador

Dr. Eriberto Vagner de Souza Freitas
Examinador

Dr^a. Jerusa Schneider
Examinador

Dr^a. Lilian Gomes Willadino
Examinador

“Está:
Na dinâmica do Universo
Na fotossíntese
Na polinização das flores,
Na totipotência
Nos pássaros migratórios
Na piracema,
Nos animais
No homem
Na mulher
Em mim
Em você
Está na consciência de cada um...
e como o arremeterá
Para os mais céticos
A NATUREZA!”

Reginaldo C. Cerqueira

À minha avó Viturina Conceição (*in memoriam*), pelo exemplo de mulher, e pelas mãos fecundas e afáveis para muitas vidas.

Com eterno amor,

OFEREÇO ESTE TRABALHO

À minha família, pelo incondicional elo de amor. Apesar da distância, senti sempre o abraço caloroso e acolhedor, me dando a certeza que nunca estaria sozinha nesta caminhada.

Com amor e gratidão,

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, Ele representa o caminho por meio do qual tenho buscado força para vencer os limites. Agradeço-te por estar sempre comigo, iluminando meus passos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade.

À FACEPE e a CAPES pela concessão da bolsa para realização do curso de doutorado.

Ao Prof. Gustavo Pereira Duda, pela orientação inicial e por propiciar minha participação na proposta de pesquisa, juntamente com a FACEPE.

Ao Prof. Clístenes Williams Araújo do Nascimento, pela confiança depositada, orientação e apoio durante todo curso. Também agradeço pela oportunidade de convivência no estágio de docência, onde pude participar de momentos de profundas reflexões sobre a importância do papel do educador. Por sua excelente visão de raio-X nos resultados da nossa pesquisa que me instigou a uma melhor compreensão e discussão dessa bela relação entre a planta “coitadinha” e sua tolerância ou toxicidade provocada pelo estresse dos metais pesados. Assim como pela paciência e disponibilidade para escutar minhas lamúrias.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – UFRPE profissionais que fazem deste curso o seu grande referencial e pela dedicação e profissionalismo, além dos ensinamentos construídos para concretização desta pesquisa.

Aos membros da banca examinadora.

Aos orientadores Dr. Paulo Henrique Graziotti, Dr. Aldo Vilar Trindade, e Dr^a. Adriana Maria de Aguiar Accioly pessoas importantes para minha vida acadêmica, por terem contribuído para construção dos conhecimentos que me fizeram trilhar ao doutorado.

A Seu Zeca, braços forte e amigo. Como também aos funcionários (as) Liu, Seu Josué, Ana Katarina, Seu Noca, Seu Nárciso, Seu Luís e Seu Josias sempre recebendo a todos com carinho e atenção. Em especial agradeço a secretária Maria do Socorro de Santana (Soco), amor em pessoa, transmitindo sempre paz e conforto no seu abraço caloroso.

A todos os amigos da turma de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela amizade e companheirismo.

Ao amigo Airon José da Silva, pela convivência prazerosa e companheirismo no desenvolvimento deste trabalho, sem o mesmo possivelmente essa pesquisa não teria sido concretizado com tanta harmonia e eficiência. Tudo sempre esquematizado, mas a cada experimento um novo aprendizado e surpresas! Foi muito bom compartilhar as inquietações, dúvidas, erros e também as certezas e os acertos!

Ao Dr. José Nildo Tabosa do Instituto Agronômico de Pernambuco, Dr. Geraldo dos Santos Oliveira e à Dr^a. Nair Helena Castro Arriel da EMBRAPA Algodão pela doação de sementes para o desenvolvimento do trabalho.

A Elias pelo auxílio nas leituras e no processamento dos dados da avaliação da fluorescência de clorofila, pelo seu companheirismo e alegria. E ao Prof. Arthur por disponibilizar o equipamento para as avaliações.

À Prof^a. Lília pela disponibilidade do Laboratório de Tecido Vegetal da UFRPE. Ao laboratorista Welliton e o estagiário Ronaldo pela atenção e ajuda na realização das análises bioquímicas.

Aos estagiários do Laboratório de Fertilidade do Solo – UFRPE: William, Wildson, Dani, Taís, Fábio, Felipe, Alan e Isadora; e aos colegas do Grupo de Pesquisa Química Ambiental de Solos: Agenor, João Paulo, Welka, Hailson, Adelazil, Márcio, Paula, Bruno, Eriberto e Jerusa pela convivência. Em especial agradeço a Ygor pela atenção e auxílio nas leituras realizadas no equipamento ICP. À amiga Josângela pela ajuda nas leituras no equipamento de absorção atômica e pela sua agradável amizade, além dos sorrisos, deixando o ambiente de trabalho mais otimista e saudável. Às amigas Neila e Magda pela atenção, conversas e pelos momentos descontraídos e alegre.

À minha eterna e amada avó Viturina Conceição (*in memoriam*) pelo exemplo de mulher. A minha mãe, luz preciosa na minha vida, e ao meu pai. Ao meu grande irmão Reginaldo Conceição Cerqueira, pela inspiração e incentivo à minha vida profissional, pela sua dedicação e amor à nossa família. Às minhas amadas irmãs, em especial, Evanise pelos ensinamentos sábios que sempre deixaram um pouco de luz em minha vida. A Dilson, Nad, Brenda, Reinaldo e aos sobrinhos (as) pequeninos (as) desta família que encantam nossas vidas pela alegria constante.

Aos amigos do Doce Lar e do CELEC que me ensinaram a ser mais perseverante na caminhada da vida, seguindo a estrada apreciando os jardins e sentindo o perfume das flores, mesmo onde elas ainda nem sonham em desabrochar. Em especial a Antônio Gomes e Janaina.

À Renata Souza Resende pela amizade construída ontem, quanto tempo perdemos! Mas como não acredito em acaso penso que essa amizade chegou na hora certa, e disse para que veio.

À Vanusia Oliveira de Souza pelo exemplo de fé e vontade de não se deixar vencer, mesmo quando a vida testa teus limites físicos, te dizendo que não há mais como lutar. E a sua família pela amizade e incentivo.

À amiga Maria da Conceição de Almeida, amizade de sempre e para sempre, por tudo que é, e sempre representará na minha vida. E a sua família pela amizade.

À “irmã caçula” Marilúcia de Jesus Santos por toda amizade, alegria e momentos inesquecíveis.

À Celma, Cristiany, Isabel, Nielson e Jackson pela amizade, convivência harmoniosa e alegre, calor baiano nos longos dias do inverno frio e escuro do Recife.

À Ádila, Verena, Vânia, Marly, Antonivalda, Evaneide, Elvira, Rizomar, “vovó Dita”, Carlos Antônio, Roque, Seu Manoel e aos amigos que fazem parte da minha, poderia continuar citando nomes, mas estes sabem quem são e o quanto representam, lista que jamais será deletada do meu coração.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO GERAL	5
REFERÊNCIAS	10
CAPÍTULO I- TOXICIDADE POR Cd EM PINHÃO-MANSO (<i>Jatropha curcas</i> L.) AVALIADA POR FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA, BALANÇO NUTRICIONAL E ENZIMAS DE DEFESA	18
RESUMO	19
ABSTRACT	20
INTRODUÇÃO	21
MATERIAL E MÉTODOS	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA	25
TEOR DE Cd	27
TEORES DE NUTRIENTES	29
FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA	31
PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL	35
CONCLUSÕES	38
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO II- DEFICIÊNCIA E TOXICIDADE DE Zn EM PINHÃO-MANSO (<i>Jatropha curcas</i> L.) AVALIADO POR ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS E NO APARATO FOTOSSINTÉTICO	49
RESUMO	50
ABSTRACT	51
INTRODUÇÃO	52
MATERIAL E MÉTODOS	54
RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA	57
TEOR DE Zn NAS PLANTAS	59
TEOR DE NUTRIENTES	61
FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA	63
PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL	66
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	70
CAPÍTULO III- ALTERAÇÕES NO FOTOSSISTEMA II, COMPOSIÇÃO MINERAL E PRODUÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PINHÃO- MANSO (<i>Jatropha curcas</i> L.) EXPOSTO A DOSES DE CHUMBO	80
RESUMO	81

ABSTRACT	82
INTRODUÇÃO	83
MATERIAL E MÉTODOS	86
RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA.....	88
TEOR DE Pb.....	89
TEORES DE NUTRIENTES	91
FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA	92
PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL.....	95
CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS	99
CAPÍTULO IV- TOLERÂNCIA DE MAMONA (<i>Ricinus communis</i>) A ZINCO AVALIADA POR FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS	110
RESUMO	111
ABSTRACT	112
INTRODUÇÃO	113
MATERIAL E MÉTODOS	115
RESULTADOS E DISCUSSÃO	117
PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA.....	117
TEOR DE Zn.....	118
CONTEÚDO DE NUTRIENTES.....	119
FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA	122
PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL.....	125
CONCLUSÕES.....	128
REFERÊNCIAS	129
CAPÍTULO V- ALTERAÇÕES METABÓLICAS E FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA PARA DETECÇÃO PRECOCE DA TOXICIDADE DE Pb EM MAMONA (<i>Ricinus communis</i>)	137
RESUMO	138
ABSTRACT	139
INTRODUÇÃO	140
MATERIAL E MÉTODOS	143
RESULTADOS E DISCUSSÃO	145
PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA.....	145
TEORES DE Pb NAS PLANTAS	146
TEORES DE NUTRIENTES	148
FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA	149
PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICAS E PROTEÍNA SOLÚVEL	151

CONCLUSÕES.....	154
REFERÊNCIAS	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Visualização de plantas e raízes de pinhão-manso crescidas em solução nutritiva sob doses de Cd.	27
Figura 1.2. Teor de Cd em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.....	28
Figura 1.3. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva aos 20 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho= 680-700 nm e vermelho distante= 730-740 nm (Fr/FFr) (C).	32
Figura 1.4. Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 20 dias, em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva, referente às leituras do vermelho e vermelho distante (Fr/FFr) e teores de Cd nas folhas (A). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 20 dias, e conteúdo de clorofila b (B).	35
Figura 2.1. Redução de crescimento e sintomas de toxidez de Zn em plantas de pinhão-manso crescidas em solução nutritiva.	58
Figura 2.2. Teor de Zn em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5, 1% de probabilidade, respectivamente.....	60
Figura 2.3. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva (A e B) aos 40 dias. Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho e vermelho distante (Fr/FFr) (C).	65
Figura 3.1. Teor de Pb em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.....	90
Figura 3.2. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva aos 40 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho= 685nm e vermelho distante= 735 nm (Fr/FFr) (C).	93
Figura 4.1. Produção de matéria seca de folhas, caule, raízes e total de plantas de mamona cultivada em doses de Zn em solução nutritiva. * e ** : Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.	118
Figura 4.2. Teor de Zn em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.....	119
Figura 4.3. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva aos 28 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B), respectivamente. Razão dos	

espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo de plantas de mamona, referente às leituras do vermelho e vermelho distante (Fr/FFr) (C).....	123
Figura 4.4. Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 28 dias e matéria seca das folhas (A). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 28 e conteúdo de Zn das folhas (B).	125
Figura 5.1. Teor de Pb em plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.....	147
Figura 5.2. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva aos 28 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho= 685nm e vermelho distante= 735 nm (Fr/FFr) (C). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 28 dias, e teor de PN nas folhas (C).	150

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Matéria seca de plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva	26
Tabela 1.2. Equações de regressão dos teores de nutrientes em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva.....	30
Tabela 1.3. Equações de regressão de pigmentos em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva.....	36
Tabela 2.1. Matéria seca de plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva.....	57
Tabela 2.2. Equações de regressão dos conteúdos de nutrientes em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva.	62
Tabela 2.3. Conteúdo de pigmentos em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Zn	67
Tabela 3.1. Matéria seca de plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva.....	89
Tabela 3.2. Equações de regressão dos teores de nutrientes em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva.....	92
Tabela 3.3. Conteúdo de pigmentos em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva	96
Tabela 3.4. Atividade enzimática e proteína solúvel total em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva.....	96
Tabela 4.1. Equações de regressão do conteúdo de nutrientes em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva.....	120
Tabela 4.2. Equações de regressão de pigmentos em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva.....	126
Tabela 5.1. Matéria seca de plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva	146
Tabela 5.2. Conteúdo de pigmentos em plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva	152

RESUMO

Marques, Marise Conceição, D. Sc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Fevereiro de 2013. **Toxicidade por metais pesados em pinhão-manso e mamona cultivadas em solução nutritiva**. Orientador: Clístenes Williams Araújo do Nascimento. Examinadores: Adriana Maria de Aguiar Accioly, Eriberto Vagner de Souza Freitas, Jerusa Schneider e Lilian Gomes Willadino.

O presente trabalho avaliou a resposta do acúmulo e distribuição de Cd, Zn e Pb em pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e mamona (*Ricinus communis*) utilizando a técnica não invasiva da fluorescência de clorofila. A resposta das plantas às doses destes metais considerando-se sua toxicidade, essencialidade e tolerância, além da composição nutricional, atividade de enzimas antioxidantes, proteínas solúveis e pigmentos fotossintéticos, foram estudados. Foram conduzidos cinco ensaios em casa de vegetação, os quais três foram com pinhão-manso e dois com mamona. Em cada ensaio foi utilizado cinco doses de cada metal e um controle (sem adição de metal). Para o ensaio com doses de Zn, devido a essencialidade do metal, adotou-se um controle com dose $0,380 \mu\text{molL}^{-1}$ de Zn. Os ensaios foram conduzidos em blocos ao acaso com 3 repetições. Após aplicação dos metais, os ensaios foram conduzidos por períodos distintos. Foram determinadas: a matéria seca das folhas, caule, raízes e total, teores dos metais e nutrientes (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, M, Mo e B), pigmentos, atividade enzimática, proteína solúvel, assim como a fluorescência de clorofila. Verificou-se que a medida da fluorescência de clorofila foi eficiente para avaliar as alterações temporais ocasionadas pela toxicidade de Cd, Zn e Pb. O pinhão-manso apresentou relativa tolerância à toxicidade por Cd e não demonstrou efeitos deletérios nos teores de Fe e clorofila "a" nas folhas. Os sintomas visuais de toxicidade por Cd observados nas plantas foram caracterizados por clorose nas folhas mais novas, redução de crescimento da planta e escurecimento, além de restrição do crescimento, das raízes. A dose $227 \mu\text{molL}^{-1}$ de Zn foi correspondente a redução de 50% da matéria seca nas plantas de pinhão-manso. A deficiência e toxicidade por Zn provocaram desbalanço nutricional e reduziram as concentrações de pigmentos nas folhas de pinhão-manso. As doses de Pb provocaram alterações na composição nutricional das plantas, com redução na

concentração de N, P, Cu e Zn nas folhas. A toxicidade por Pb não provocou efeitos deletérios nos teores de Fe, Mg e pigmentos foliares em pinhão-manso. Apesar do declínio no *status* nutricional das plantas, com reduções no conteúdo de Fe e Mg nas folhas, a mamona apresentou relativa tolerância à toxicidade por Zn, não demonstrando efeitos deletérios aos pigmentos fotossintéticos. As doses de Pb não provocaram alterações na composição nutricional das plantas, e também nos pigmentos fotossintéticos nas folhas de mamona. As doses de Cd, Zn e Pb não provocaram alterações na atividade das enzimas antioxidantes e nas proteínas solúveis total nas folhas de mamona e pinhão-manso. As espécies estudadas, por sua relativa tolerância e capacidade de acumular Cd, Zn e Pb nas raízes, podem ser uma alternativa ambiental e economicamente atraente para fitoestabilização e fitoatenuação de áreas contaminadas por estes metais, com adicional vantagem econômica decorrente da utilização do óleo para fins industriais e produção de bioenergia durante o processo de remediação.

ABSTRACT

Marques, Marise Conceição, D. Sc. Universidade Federal Rural de Pernambuco, February 2013. Toxicity of heavy metals in jatropha and castor bean grown in nutrient solution. Adviser: Clístenes Williams Araújo do Nascimento. Committee members: Adriana Maria de Aguiar Accioly, Eriberto Vagner de Souza Freitas, Jerusa Schneider and Lilian Gomes Willadino

The work was carried out to study the response of jatropha (*Jatropha curcas* L.) and castor bean (*Ricinus communis*) to Cd, Zn, and Pb assessed by X-ray chlorophyll fluorescence. The effect of the metal doses on phytotoxicity, metal tolerance, nutrients composition, enzymes activity, soluble proteins and photosynthetic pigments were studied. Five experiments were conducted in greenhouse, being three of them using jatropha and two studying castor bean plants. Each experiment had five doses of each metal and a control (no metal addition). Given its essentiality, the experiment with Zn utilized a $0,380 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Zn as a control. All the experiments were carried out in randomized block design with three replicates. The metals were applied and the experiments conducted during different periods. The following characteristics were evaluated: biomass of roots, stem and leaves, concentration of metals and nutrients (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo and B), antioxidative enzymes activity, soluble protein, pigments as well as X-ray chlorophyll fluorescence. The results showed that chlorophyll fluorescence was efficient in determining the time alterations caused by Cd, Zn and Pb phytotoxicities. Jatropha showed a relative tolerance to Cd and did not present deleterious effects on the Fe contents and chlorophyll "a". The visual symptoms of Cd toxicity were chlorosis in newest leaves, plant growth reduction, besides darkening and restrict growth of roots. The $227 \mu\text{mol L}^{-1}$ of Zn was equivalent to a 50% reduction in jatropha biomass. Both the toxicity and deficiency of Zn provoked nutritional imbalance and diminished the pigments concentration in jatropha leaves. The Pb doses also caused changes in the chemical composition of plants with reduction of N, P, Cu and Zn in leaves. The Pb toxicity did not change the concentrations of Fe, Mg and foliar pigments in jatropha. In spite of the decreased nutritional status, with reduction of Fe and Mg in leaves, castor bean did show tolerance to Zn toxicity with no effects on photosynthetic pigments. The Pb doses did not provoke changes on the plants mineral composition as well as on castor bean photosynthetic pigments. The doses of Cd, Zn and Pb did not change the

activities of antioxidant enzymes neither the soluble proteins for both plant species. Owing to their relative tolerance to the studied metals, castor bean and jatropha can be environmental and economic alternatives to phytostabilization and phytoattenuation of contaminated areas with additional advantage of oil utilization in industry and bioenergy production during the remediation.

INTRODUÇÃO GERAL

O desenvolvimento tecnológico, econômico e agrícola, e, conseqüentemente, a grande quantidade de lixo e resíduos produzidos, o uso inadequado de resíduos e insumos agrícolas, assim como do descarte de resíduo no solo e aumento das emissões gasosas na atmosfera, têm contribuído para a contaminação ambiental. Dentre os diferentes contaminantes, os metais pesados tem recebido atenção especial, uma vez que estes elementos são persistentes no ambiente e podem atingir a cadeia trófica no seu mais alto nível, o homem. Sendo assim, os metais comprometem a sustentabilidade dos ecossistemas e a qualidade de vida humana e, neste sentido, se faz necessário o levantamento e monitoramento das áreas.

Os metais pesados Cd, Zn e Pb têm amplo espectro de uso em diversas atividades industriais. O Cd é componente da produção de bateria de Ni–Cd e Ag–Cd, galvanoplastia, fabricação de material de PVC, como também é bastante utilizado em pigmentos, ligas e estabilizadores para plásticos. O Zn também tem uso industrial na produção de bateria, galvanoplastia, pigmentos, plásticos, catalisação da produção de lubrificantes e pesticidas, estes dois metais tem ainda uso em equipamentos automobilístico, aparelhos domésticos e conservação de madeira, como também em diferentes compostos para aplicações médicas e dentárias. O Pb, proveniente da exploração de minério ou da reciclagem de baterias, tem muitos usos industriais. Sua combinação com outros metais forma ligas comumente encontradas em tubos, munições, soldas e cabos. Apresenta amplo uso em pigmentos, tintas, corantes e esmaltes cerâmicos. Por décadas, compostos de Pb (tetraetilchumbo e tetrametilchumbo) foram utilizados como aditivos na gasolina, no entanto, por causa do impacto ambiental proveniente do seu uso, essa prática foi proibida na década de 1980 e, posteriormente, banida a partir de 1996. O tetraetilchumbo, no entanto é usado na gasolina para veículos pesados e aviões em países em desenvolvimento (ATSDR, 2005; ATSDR, 2007; Kabata-Pendias, 2010).

Alguns estudos tem demonstrado a entrada de metais pesados, proveniente de via antropogênica, e os impactos provocados por estes contaminantes na qualidade de vida humana. Qu et al. (2012), avaliando a exposição humana a metais na China, verificaram elevados riscos para os

moradores que residiam próximo à área de mineração por exposição aos metais Pb, Cd e Hg, sendo que as principais vias de exposição aos elementos mais relevantes foram o contato com o solo, a ingestão de vegetais, e ar respirado. Cheng et al. (2012), avaliando a distribuição de metais pesados em ambiente aquático próximo a uma área industrial na China, verificaram, entre os metais avaliados, maiores concentrações de Pb e Cd em água e sedimentos na maioria dos locais investigados, sendo a via antropogênica apontada pelos autores como um dos fatores de enriquecimento dos elementos. Chabukdhara e Nema (2013), investigando a contaminação por metais pesados em solo urbano na Índia e a relação com o risco carcinogênico em crianças e adultos, indicaram que os níveis de Cr, Pb, Cd e Ni nas pessoas com câncer não se correlacionaram com a doença. No entanto, a ingestão de solo por crianças foi um dos fatores apontados pelos autores por aumentar o risco de outras enfermidades em crianças quando comparadas aos adultos.

Alguns autores também têm estudado o impacto provocado no sistema solo-água-planta-atmosfera. Silva et al. (2012a), avaliando o impacto ambiental do manejo agrícola adotado em área produtora de manga no Nordeste do Brasil, verificaram a relevante contribuição antropogênica na entrada de metais pesados nos solos, sendo observado contaminação por Cu, Zn e Cr nos pomares. Ren et al. (2006), investigando a concentração de Pb em diferentes locais na China, verificaram concentrações de Pb na seguinte ordem decrescente: área industrial, creches, jardim residencial, parque público, área comercial e fazenda, sendo o teor mais elevado (15127 mg kg^{-1} de Pb no solo) observado próxima a uma área de forno de fundição. Banerjee e Gupta (2012), estudando a caracterização de efluentes industriais e seu impacto sobre a água e sedimentos do Rio Dantas, próximo a uma área industrial na Índia, verificaram elevadas concentrações para Cd e Pb, demonstrando a contribuição do impacto provocado pelo descarte do resíduo industrial no ecossistema aquático. Brait e Antoniosi Filho (2010), avaliando a qualidade do ar em área urbana no Brasil, verificaram concentrações médias de Pb de $6,7 \mu\text{g}^{-1} \text{ m}^2 \text{ dia}^{-1}$, sendo o maior valor detectado em áreas de maior intensidade de trânsito. Gunawardena et al. (2013), em estudo realizado na Austrália, observaram que os tamanhos das partículas oriundas das emissões gasosas são relevantes para difusão de metais pesados no ambiente, sendo que a deposição úmida de partículas finas apresentaram positiva correlação com a

deposição dos metais Pb, Cd, Ni e Cu no solo e abrangeram uma maior extensão de área, sendo que a fonte de maior contribuição foi a emissões gasosas dos veículos. Haiyan e Stuanes (2003), investigando o acúmulo de metais pesados durante quatro anos em área industrial na China, verificaram predominância de Pb nas partículas de poeira e maior teor em plantas de áreas industriais próximo as emissões das chaminés do forno de fundição. Os autores ressaltaram ainda que os aspectos negativos para contaminação ambiente não ocorrem apenas localmente, mas também em áreas vizinhas.

O solo é o constituinte da biosfera que atua como tampão no controle das transformações e transporte de metais pesados para a atmosfera, hidrosfera e biota, por meio de várias reações na fase sólida/solução: adsorção/dessorção, precipitação/dissolução, complexação, lixiviação e volatilização, sendo a dinâmica destas reações controladas por vários atributos do solo, entre os quais o pH e potencial redox são de grande relevância. Outros fatores que podem prever a intensidade das transformações e transferência de metais no solo são características como qualidade e teor da matéria orgânica e assembleia mineralógica (Kabata-Pendias e Pendias, 2001).

Desta forma, no decorrer das três últimas décadas, a crescente contaminação do solo e águas por metais pesados tem despertado preocupação e as alternativas com finalidade de recuperação destas áreas impactadas por parte dos órgãos responsáveis devem envolver estratégias que assegurem a identificação da fonte de contaminação e os agravantes por elas provocados, como também a aplicação de medidas cabíveis à tomada de decisão e as formas de intervenção e monitoramento mais adequados, sempre com finalidade de reduzir a exposição (CETESB, 2013).

Nascimento e Xing (2006) citam como estratégias para recuperação de áreas contaminadas por metais pesados a fitoestabilização, prática que visa o estabelecimento de espécies vegetais tolerantes à concentrações elevadas de metais pesados nos solos. Esta prática, além de desempenhar papel de proteção do solo, imobiliza o metal pesado *in situ*. A fitoestabilização é uma técnica que reduz a mobilidade dos metais pesados, pois atua como barreira diminuindo a transferência do metal pesado para outros ambientes, por meio de processos como erosão e lixiviação.

Alguns autores têm demonstrado que o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e a mamona (*Ricinus communis* L.) são espécies oleaginosas promissoras

para produção de bioenergia (Kumar e Sharma, 2008; Sahoo et al., 2009; Sahoo e Das, 2009; Jingura et al., 2010; Berman et al., 2011). Estudos têm demonstrado que estas plantas apresentam tolerância a metais pesados (Romeiro et al. 2006; Niu et al., 2007; Juwarkar et al., 2008; Jamil et al. 2009; Shi e Cai, 2009; Yadav et al., 2009; Huang et al., 2011), e por serem culturas não-alimentícias apresentam grande potencial para programas de fitorremediação de áreas contaminadas por metais pesados.

O Cd, o Zn e o Pb provocam vários distúrbios nas plantas, os quais são devidos a alterações fotossintéticas, metabólicas, nutricionais e anatômicas e, conseqüentemente, dependendo da susceptibilidade das plantas à toxicidade, sintomas visuais destas alterações são externados (Cunha et al., 2008; Zhao et al., 2011; Bertoli et al., 2012; Costa et al., 2012; Solymosi e Bertrand, 2012; Luo et al., 2012). Por outro lado, quando as plantas apresentam mecanismos de defesa ao estresse provocado por estes metais, sinalizam alterações a nível metabólico e celular que demonstram sua capacidade de tolerar elevadas concentrações destes elementos no solo (Zhao et al., 2012; Lin e Aarts, 2012).

Por exemplo, a toxicidade por metais pesados pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio, tais como superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao interagirem com componentes celulares promovem danos oxidativos e conseqüente deterioração celular (Gadjev et al. 2008; Schutzendubel et al. 2001). Em espécies de plantas sensíveis a metais pesados, o conteúdo de espécies reativas de oxigênio aumenta consideravelmente se não houver um mecanismo eficiente de enzimas antioxidantes. Por conseguinte, o acúmulo de espécies reativas de oxigênio resultará em morte celular, afetando assim o metabolismo normal das plantas (Sharma e Dietz, 2009). Desse modo, a estratégia de elevação da atividade de enzimas antioxidantes indica o *status* de defesa nas células vegetais. Dentre estas se destacam a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase, glutatona redutase e glutatona S-transferase (Smeets et al., 2005; Sun et al., 2007; Jamil et al., 2009; Liu et al., 2011)

A fotossíntese é um dos mais importantes e complexos processos que ocorrem na natureza, pelo o qual as plantas utilizam a luz como fonte de energia para produzir carboidratos. Neste processo, o dióxido de carbono e a água são usados para produzir glicose e oxigênio. Todo metabolismo fotossintético é intermediado diretamente por pigmentos fotossintéticos, sendo

a clorofila a grande responsável por possibilitar essa interação entre a captura de energia solar e o processo desencadeado dentro dos cloroplastos, enquanto a clorofila b e os carotenóides atuam como pigmentos acessórios na transferência de elétrons para a clorofila a (Caires et al, 2009; Bohr, 2011).

A diminuição da atividade fotossintética é ocasionada por vários distúrbios, podendo apresentar-se de forma reversível ou irreversível, a depender da intensidade do estresse e da tolerância da planta ao estresse. O dano promovido pelo acúmulo de Zn, Pb e Cd em tecido vegetal é um dos responsáveis por desencadear alterações no aparato fotossintético, sendo o conteúdo de pigmentos comumente afetado (Khudsar et al. 2004; Silva et al., 2012b; Cambrollé et al., 2012; Cambrollé et al., 2013; Alfadul e Al-Fredan, 2013). As moléculas de clorofila que emitem fluorescência no cloroplasto são indicadoras sensíveis do *status* normal do aparato fotossintético. A medida de fluorescência de clorofila é caracterizada por um pico máximo na região vermelha (680-700 nm) que é atribuído ao fotossistema II (PSII) e outro na região vermelha distante (730-740 nm) correspondente ao fotossistema I (PSI) (Silva Junior, 2011). A fluorescência de clorofila reflete os processos da fotossíntese que ocorrem nos cloroplastos, incluindo a reação fotoquímica no PSII, tornando-se uma ferramenta útil para avaliar o desempenho fotossintético e monitorar precocemente o estresse ambiental (Dell et al., 1999; ;Joshi e Mohanty, 2004; Corcoll et al., 2011; Cambrollé et al., 2011). A correlação negativa do decréscimo da biossíntese de clorofila e eficiência quântica desencadeia declínio da assimilação de C, resultando em inibição do crescimento das plantas (Silva et al., 2012b).

Neste contexto, o presente trabalho avaliou a resposta do acúmulo e distribuição de Cd, Zn e Pb em pinhão-manso e mamona utilizando a técnica não invasiva da fluorescência de clorofila. A resposta das plantas às doses destes metais considerando-se sua toxicidade, essencialidade e tolerância, além da composição nutricional, atividade de enzimas antioxidantes, proteínas solúveis e pigmentos fotossintéticos, foram estudados. Estes resultados permitiram avaliar a tolerância do pinhão-manso e mamona aos metais estudados, podendo inferir a possibilidade do uso desta espécie em projetos de revegetação de áreas contaminadas.

REFERÊNCIAS

ALFADUL, S. M. S; AL-FREDAN, M. A. A. Effects of Cd, Cu, Pb, and Zn combinations on *Phragmites australis* Metabolism, Metal Accumulation and Distribution. **Arabian Journal for Science and Engineering** , v. 38, p. 38:11–19, 2013.

ATSDR, 2005. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Toxicological Profile for Zinc. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

ATSDR, 2007. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, U.S. Toxicological Profile for lead. Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA.

BANERJEE, U.; GUPTA, S. Source and distribution of lead, cadmium, iron and manganese in the river Damodar near Asansol industrial area, West Bengal, India. **Agris On-line Papers in Economics and Informatics**, v. 2, p. 1531–1542, 2012.

BERMAN, P.; NIZRI, S.; WIESMAN, Z. Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p. 2861–2866, 2011.

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

BOHR, H. G.; MALIK, F. B. A schematic model for energy and charge transfer in the chlorophyll complex. **Theoretical Chemistry Accounts** , v. 130, p. 1203–1210, 2011.

CHABUKDHARA, M., NEMA, A. K. Heavy metals assessment in urban soil around industrial clusters in Ghaziabad, India: Probabilistic health risk approach. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 87, p. 57–64, 2013.

CHENG, J., SHEN, M., WU, J., ZHAO, Z., MAO, L., GAO, S. Distribution and assessment of heavy metals in surface water and sediments from Nanjing Chemical Industrial Park . **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 21, p. 2702–2710, 2012.

CORCOLL, N.; BONET, B.; LEIRA, M.; GUASCH, H. Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 673, p. 119–136, 2011.

COSTA, E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; MELO, É. E. C.; RIBEIRO, B. T.; SANTOS, E., SEVERINO, E. C., FAQUIN, V.; HALE, B. A. Assessing the tolerance of castor bean to Cd and Pb for phytoremediation purposes. **Biological Trace Element Research**, v.145, p. 93–100, 2012.

CUNHA, K. C. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; PIMENTEL, R. M. M., ACCIOLY, M. A.; SILVA, A. J. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1319–1328, 2008.

DEELL, J. R.; VAN KOOTEN, O.; PRANGE, R. K.; MURR, D. P. Application of chlorophyll fluorescence techniques in postharvest physiology. **Horticultural Reviews**, v. 23, 169–197, 1999.

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

GUNAWARDENA, J.; EGODAWATTA, P.; AYOKO, G. A.; GOONETILLEKE, A. Atmospheric deposition as a source of heavy metals in urban stormwater. **Atmospheric Environment**, v. 68 , p. 235–242, 2013.

HAIYAN, W.; STUANES A. O. Heavy metal pollution in air-water-soil-plant system of zhuzhou city, hunan province, China. **Water, Air, and Soil Pollution** v. 147, p. 79–107, 2003.

HUANG, H.; YU, N.; WANG, L.; GUPTA, D. K.; HE, Z.; WANG, K.; ZHU, Z.; YAN, X.; LI, T.; YANG, X-E. The phytoremediation potential of bioenergy crop *Ricinus communis* for DDTs and cadmium co-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v.102, p. 11034–11038, 2011.

JAMIL, S.; ABHILASH, P. C.; SINGH, N.; SHARMA, P. N. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 269–275, 2009.

JINGURA, R. M.; MUSADEMBA, D.; MATENGAIFA, R. An evaluation of utility of *Jatropha curcas* L. as a source of multiple energy carriers. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 2, p. 115–122, 2010.

JOSHI, M. K; MOHANTY, P. Chlorophyll a Fluorescence as a Probe of Heavy Metal Ion Toxicity in Plants. In: **Advances in Photosynthesis and Respiration, Chlorophyll a Fluorescence**, v. 19, p. 637–651. 2004.

JUWARKAR, A. A.; YADAV, S. K. ; KUMAR, P.; SINGH, S. K. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. **Environ Monit Assess**, v.145, p.7–15, 2008.

KABATA – PENDIAS, A. **Trace Elements in soils and plants**. 4 ed. Boca Raton, CRC, 2010. 505p.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.

KHUDSAR, T.; MAHMOODUZZAFAR.; IQBAL, M.; SAIRAM, R. K. Zinc – induced changes in morpho-physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua*. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 255–260, 2004.

KUMAR A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 28, p.1–10, 2008.

LIN, Y.; AARTS, M. G. M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3187–3206, 2012.

LIU, Y-T.; CHEN, Z-S.; HONG, C-Y; Cadmium-induced physiological response and antioxidant enzyme changes in the novel cadmium accumulator, *Tagetes patula*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, p.724–731, 2011.

LOU, Y.; HUO, H.; HU, T.; LI, H.; FU, J. Toxic effects, uptake, and translocation of Cd and Pb in perennial ryegrass. **Ecotoxicology**, p.1–8, 2012.

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation **Scientia Agricola**, v. 63, p. 299–311, 2006.

NIU, Z-X.; SUN, L-N.; SUN, T-H.; LI, Y-S., WANG, H. 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.

QU, C.-S., MA, Z.-W., YANG, J., LIU, Y., BI, J., HUANG, L. Human exposure pathways of heavy metals in a lead-zinc mining area, Jiangsu Province, China, **PLoS One**, v. 7, n. 46793, 2012.

REN, H. M.; WANG, J. D.; ZHANG, X. L. Assessment of soil lead exposure in children in Shenyang, China. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 327–335, 2006.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R. ABREU, C. A. DE ; ABREU, M. F. DE; ERISMANN, N. M. Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L.Braz. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 4, p. 483–489, 2006.

SAHOO P. K.; DAS, L. M.; BABU, M. K. G.; ARORA, P.; SINGH, V. P.; KUMAR, N. R.; VARYANI, T. S. Comparative evaluation of performance and emission characteristics of jatropha, karanja and polanga based biodiesel as fuel in a tractor engine. **Fuel**, v.88, p. 1698–1707, 2009.

SAHOO, P.K.; DAS L. M. Process optimization for biodiesel production from jatropha, karanja and polanga oils. **Fuel** 88, 1588–1594, 2009.

SCHUTZENDUBEL, A.; SCHWANZ, P.; TEICHMANN, T.; GROSS, K.; LANGENFELD-HEYSER, R.; GODBOLD, D. L.; POLLE, A. Cadmium induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in scots pine roots. **Plant Physiology**, v. 127, p. 887–892, 2001.

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

SHI, G.; CAI, Q. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 555–561, 2009.

SILVA JUNIOR, E. A. da. Estudo de estresse abiótico em cana-de-açúcar e pinhão manso por fluorescência de clorofila. 2011.73f. Dissertação (Mestre em Física Aplicada) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, J. P. S. da; NASCIMENTO, C. W. A. do; BIONDI, C. M.; CUNHA, K. P.V. da. Heavy metals in soils and plants in mango orchards in Petrolina, Pernambuco, Brazil. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, v. 36, p. 1343–1353, 2012a.

SILVA, A. J. DA; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. DA S.; SILVA-Jr, E. A. da. LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, p. 3527–3533, 2012b.

SMEETS K, CUYPERS A, LAMBRECHTS A, SEMANE B, HOET P, VAN LAERE A, VANGRONSVELD J. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 437–444, 2005.

SOLYMOSI, K.; BERTRAND, M. Soil metals, chloroplasts, and secure crop production: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 245–272, 2012.

SUN, R-L; ZHOU, Q-X; SUN, F-H; JIN, C-X. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, 468–476, 2007.

YADAV, S. K.; JUWARKAR, A. A; KUMAR, G. P.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; CHAKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, v. 100 p. 4616–4622, 2009.

ZHAO, H.; WU, L.; CHAI, T.; ZHANG, Y.; TAN, J.; MA, S. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca Americana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1243–1252, 2012.

ZHAO, S.; YE, X.; ZHENG, J.; Lead-induced changes in plant morphology, cell ultrastructure, growth and yields of tomato. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 10116–10124, 2011.

CAPÍTULO I

TOXICIDADE POR Cd EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) AVALIADA
POR FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA, BALANÇO NUTRICIONAL E
ENZIMAS DE DEFESA

TOXICIDADE POR Cd EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) AVALIADA
POR FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA, BALANÇO NUTRICIONAL E
ENZIMAS DE DEFESA

RESUMO

A contaminação por Cd nos solos agrícolas é resultante da aplicação de fertilizantes e diferentes resíduos e compromete a sustentabilidade de ecossistemas, apresentando sérias consequências à saúde humana e animal. A revegetação com espécies não-alimentícias pode ser adotada como alternativa para imobilização de metais e recuperação desses solos. Considerando que o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) apresenta relativa tolerância à metais pesados e potencial para produção de biodiesel, o trabalho avaliou a toxicidade de Cd e o estresse fotossintético induzido pelo Cd utilizando a técnica da fluorescência de clorofila e as alterações provocadas pelo Cd no *status* nutricional e na atividade de enzimas antioxidativas, proteína solúvel, e pigmentos fotossintéticos nesta espécie. Para tanto, plantas de pinhão-manso foram cultivadas durante 20 dias em solução nutritiva com doses de 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd e um controle, sem adição de Cd, foi adotado. A fluorescência de clorofila foi sensível às alterações temporais ocasionada pela toxicidade por Cd nas plantas. O pinhão-manso apresentou tolerância à toxicidade por Cd e não demonstrou efeitos deletérios nos teores de Fe e clorofila a nas folhas. Os sintomas visuais de toxicidade por Cd observados nas plantas foram caracterizados por clorose nas folhas mais novas, redução de crescimento da planta e escurecimento, além de restrição do crescimento, das raízes. A toxicidade por Cd em pinhão-manso não provocou alterações na atividade de enzimas antioxidantes e no teor de proteína solúvel nas folhas. O pinhão-manso é considerado atualmente espécie não-alimentícia promissora para produção de bioenergia e pode ser uma espécie atraente para a estratégia de revegetação de áreas contaminadas por Cd, com a adicional vantagem econômica da produção de um óleo não comestível.

Palavras-chave: Oleaginosa. Metal pesado. Enzimas antioxidantes

TOXICITY OF CADMIUM IN JATROPHA ASSESSED BY X-RAY FLUORESCENCE, NUTRITIONAL IMBALANCE AND DEFENCE-RELATED ENZYMES

ABSTRACT

Cadmium contamination in agricultural soils is a result of fertilizers and wastes application. It hampers the ecosystems sustainability and presents serious consequences to animal and human health. The vegetation using non-edible crops can be an alternative to both immobilization of metals and remediation of metal contaminated areas. Giving jatropha (*Jatropha curcas* L.) poses a relative tolerance to heavy metals and potential to biofuel production, the work was carried out to study Cd toxicity and photosynthetic stress assessed by x-ray chlorophyll fluorescence as well as the effects of Cd on the mineral composition changes, enzymes activity, soluble proteins and photosynthetic pigments. Jatropha plants were grown during 20 days in a nutrient solution with five Cd rates: 5, 10, 20, 30 and 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a control with no Cd addition. Chlorophyll fluorescence was able to detect the alterations caused by Cd toxicity in plants. Jatropha posed tolerance to Cd and did not show effects on Fe contents and chlorophyll a in leaves. The plants displayed symptoms such as foliar chlorosis, biomass reduction, darkening and growth decreasing of root. Cd toxicity did not promote changes in enzymes with antioxidative activity and soluble protein contents in leaves. Jatropha is considered a promising crop for bioenergy production. It can also be used as an attractive alternative to vegetate contaminated areas with the economic advantage of commercial production of non-edible oil.

Keywords: Oilseed crop. Heavy metal. Antioxidant enzymes

INTRODUÇÃO

A contaminação por Cd nos solos agrícolas é resultante da aplicação de fertilizantes fosfatados, lodo de esgoto, esterco, calagem e diferentes resíduos (Chaffei et al., 2004; Campos et al., 2005; Gonçalves et al., 2008; Freitas et al., 2009). Essa contaminação compromete a sustentabilidade de ecossistemas, apresentando sérias consequências à saúde humana e animal. A revegetação com espécies não-alimentícias que apresentem potencial para tolerar elevadas concentrações de metais pesados nos tecidos, especialmente com seu acúmulo em raízes, apresenta-se como alternativa para recuperação desses solos.

Dentre as práticas fitorremediadoras, a fitoestabilização é uma técnica que estabelece cobertura vegetal na área contaminada imobilizando o metal pesado *in situ* (Nascimento e Xing, 2006). Essa técnica impede principalmente a mobilidade de metais pesados para outros ambientes através de processos como erosão e lixiviação, conseqüentemente reduz o risco de difusão da contaminação. Como alguns estudos têm demonstrado que o pinhão-manso apresenta tolerância a metais (Juwarkar et al., 2008; Jamil et al. 2009; Yadav et al., 2009), esta espécie poderia ser uma alternativa para sustentabilidade e recuperação de solos contaminados, pois além de ser uma cultura não-alimentícia, apresenta a vantagem de agregar valor econômico a fitoestabilização, visto a possibilidade de exploração industrial de óleo para produção de bioenergia (Kumar e Sharma, 2008; Sahoo et al., 2009; Sahoo e Das, 2009; Jingura et al., 2010).

O Cd, devido sua semelhança química com outros metais essenciais, pode substituir esses no sistema enzimático e em estruturas de proteínas e compostos bioativos, o que resulta em toxicidade (Babula et al., 2008). Ademais, apresenta alta mobilidade no floema podendo acumular-se em várias partes das plantas (Chaffei et al., 2004). Cabe salientar a elevada toxicidade do Cd, que mesmo em concentrações tão baixas como 5 a 10 mg kg⁻¹ na matéria seca de folhas, provoca toxidez em plantas (White e Brown, 2010). Kabata-Pendias (2010) citam teores considerado tóxicos entre 5 a 20 mg kg⁻¹ na matéria seca da parte aérea.

A elevação na concentração de Cd promove irreversíveis distúrbios celulares e de processos fisiológicos, por induzir estresse oxidativo (Smeets et

al., 2005). O aumento da reação de espécies reativas de oxigênio é considerado potencialmente prejudicial para os componentes celulares, mostrando-se como um dos danos comumente observados após exposição a metais pesados (Sharma e Dietz, 2009). Schutzendubel et al. (2001) sugerem que o Cd inibiu o sistema antioxidante e acelerou a produção de superóxido de hidrogênio, revelando-se, provavelmente, como efeito chave para inibição do crescimento e alongamento das raízes, induzindo uma sequência de reações, e conseqüentemente à morte celular. Estes autores ainda ressaltaram que o Cd não provocou deterioração nas células radiculares, mas acelerou os processos que conduzem ao envelhecimento celular. No entanto, o aumento da atividade de enzimas antioxidantes é mecanismo de defesa no balanço homeostático. Dentre estas enzimas podem ser citadas a ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) (Smeets et al., 2005; Sun et al., 2007; Jamil et al., 2009; Liu et al., 2011).

A toxidez por Cd altera o conteúdo de pigmentos e inibe a atividade fotossintética e metabólica das plantas (Dixit et al., 2001; Joshi e Mohanty, 2004; Maurya et al., 2008; Wang et al., 2009; Mohamed et al., 2012). Assim como provoca desbalanço nutricional (Bertoni et al., 2012; Li et al., 2012; Costa et al., 2012).

Além da avaliação da concentração dos níveis tóxicos nos tecidos vegetais, status nutricional, metabólicos e dos sintomas visuais dos danos provocados por acúmulo de Cd, e as técnicas que possibilitem identificar a toxidez de forma mais rápida e eficiente são de grande relevância para o monitoramento de contaminação por metais pesados nos ecossistemas. Assim, a medida da fluorescência de clorofila é uma técnica que utiliza informação sobre a atividade fotossintética das plantas, possibilitando detectar estresse ambiental (Giardi et al., 2001; Joshi e Mohanty, 2004; Maurya et al., 2008; Corcoll et al., 2011). Isto ocorre porque a molécula de clorofila é fluorescente e através da dissipação de energia pode-se elucidar alterações na transferência de elétrons à nível de membranas de tilacóides, possibilitando verificar alterações de forma pontual e em tempo real (Lin et al., 2007). Uma importante vantagem adicional dessa técnica é a sensibilidade para detectar distúrbios à nível celular sem destruir o tecido vegetal (Maurya e Gopal, 2008; Venterella et al., 2009; Cherif et al., 2010; Silva et al., 2012).

Considerando que o pinhão-manso apresenta relativa tolerância à metais pesados, o presente trabalho avaliou a toxicidade de Cd e o estresse fotossintético induzido pelo metal utilizando a técnica não destrutiva da fluorescência de clorofila e as alterações provocadas pelo Cd no *status* nutricional e na produção de enzimas antioxidativas, proteína solúvel e pigmentos fotossintéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de pinhão-manso (*Jatropha Curcas*, L.) foram colocadas para germinar em bandejas contendo vermiculita umedecida com solução de Ca $0,67 \text{ mmol L}^{-1}$ na forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vilela e Anghinomi, 1984). Treze dias após o semeio, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo seis litros de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950, modificada), contendo: 105,05; 15,5; 117,3; 100,2; 24,3; 32,1; 0,325; 0,25; 0,025; 0,01; 0,25; 0,005; 7,53 mg L^{-1} de N, P, K, Ca, Mg, S, Cl, Mn, Zn, Cu, B, Mo e Fe, respectivamente, a qual foi substituída semanalmente. Foi adicionado diariamente água deionizada nos vasos para reposição da água perdida por evapotranspiração. O pH da solução foi ajustado sempre que necessário, para valores próximos de 5,6 (+/- 0,2), sendo a correção efetuada com H_2SO_4 ou NaOH 1 mmol L^{-1} . Após 14 dias de cultivo, foram acrescentadas na solução doses de 5, 10, 20, 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Um controle sem adição de Cd foi adotado. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, (uma espécie vegetal com seis doses de Cd), com 3 repetições.

Após a adição do metal, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 20 dias. Posterior a esse período, procedeu-se a coleta e lavagem com água destilada das folhas, caule e raízes, sendo estes acondicionados em sacos de papel.

As amostras foram mantidas em estufa com circulação forçada de ar a 65°C até peso constante, obtendo-se a matéria seca das partes e, pela soma, a matéria seca total. Após secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey e acondicionadas em sacos plásticos. A digestão do material vegetal foi feita em ácidos nítrico e clorídrico em forno de microondas (MarsXpress), segundo o método 3051A (USEPA - 1996). Este material também foi submetido

à digestão sulfúrica para determinação de N realizada conforme Embrapa (1999).

No extrato da digestão foram determinados os teores de Zn e Cu por espectrofotometria de absorção atômica (AAAnalyst 800). Também foram determinados os teores de Ca, Mg, Fe, Mn, Mo e B por espectrometria de emissão ótica (ICP-OES/Optima 7000, Perkin Elmer). Os teores de N, K e P, foram determinados por titulometria, fotometria e colorimetria, respectivamente. A partir dos teores dos elementos e da matéria seca, foram calculados os conteúdos dos elementos. Para avaliação da qualidade das análises para Cd foi utilizado um padrão do National Institute of Standards and Technology (1750-a- *Trace elements in spinach*), sendo obtida uma recuperação de 108% de Cd do padrão utilizado.

As medidas de fluorescência de clorofila foram efetuadas com emissor de luz ultravioleta LED, com picos de comprimento de onda vermelho (685 nm) e vermelho distante (735 nm) obtidos pelo software do aparelho (Ocean Optics-Spectra Suite). Foram efetuadas cinco avaliações ao longo do experimento. A primeira avaliação foi tomada antes da adição do Cd e a última um dia antes da coleta das plantas. Estas avaliações foram realizadas à noite a partir da permanência das plantas por 20 minutos no escuro, com o intuito de garantir a desativação do transporte de elétrons fotossintético. As medidas foram efetuadas no segundo par de folhas abaixo do meristema apical, sendo realizadas quatro leituras por planta, as quais foram submetidas à emissão de luz por 10 segundos cronometrados.

Os espectros obtidos foram ajustados a duas curvas Gaussianas correspondentes ao 685nm e 735 nm. A razão entre a intensidade da fluorescência F_{685}/F_{735} (F_r/FF_r) de altura de pico foi calculada a partir da curva ajustada para cada uma das doses de Cd em solução e usadas para inferir sobre o efeito do elemento na biossíntese de clorofila e no PSII por meio do software Origin versão 6.0.

Para as análises bioquímicas, foi coletada uma amostra de cada planta do mesmo par de folhas utilizadas na avaliação da fluorescência de clorofila. Realizou-se a determinação dos conteúdos de clorofilas a, b, total e carotenóides mediante extração com acetona 80% (Arnon 1949), sendo o conteúdo de carotenóides calculado pela equação de Lichtenthaler (1987).

O extrato bruto utilizado na determinação da atividade das enzimas e do teor de proteínas foi obtido através de homogeneização de 200 mg do material vegetal em almofariz, com N₂ líquido, e adicionado 2,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mmolL⁻¹, pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a - 80°C. Foram determinadas as atividade de catalase (CAT) (Havir e Mchale, 1987), polifenoloxidase (Kar e Mishra, 1976), peroxidase do ascorbato (APX) (Nakano e Asada, 1981) e teor de proteína solúvel (Bradford, 1976). Todas as determinações foram efetuadas por espectrofotometria.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e à análise de regressão com Software SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA

A produção de matéria seca das folhas, raízes e total não foi reduzida com a adição de doses crescentes de Cd à solução nutritiva. No entanto, foi verificado significativo declínio na produção da matéria seca do caule (Tabela 1.1). As maiores reduções em relação ao controle foram observadas para dose 30 µmol L⁻¹ e 40 µmol L⁻¹, com declínio de 36 e 40%, respectivamente.

A toxicidade do Cd provoca diversos distúrbios metabólicos, nutricionais e também alterações morfológicas (Pereira et al., 2002; Chaffei et al., 2004; Cunha et al., 2008; Bertoli et al., 2012). Assim, cabe salientar que apesar do Cd não apresentar essencialidade para as plantas, observou-se nas doses mais baixas que as plantas apresentaram matéria seca praticamente constante, com declínio apenas a partir da dose 30 µmolL⁻¹. Avaliando a dose 30 µmol L⁻¹ em relação ao controle, a redução verificada foi de 13% e 36%, para folhas e raízes, respectivamente. Quando comparou-se as plantas cultivadas na dose 40 µmol L⁻¹ em relação ao controle, a redução verificada foi de 21% e 41%, para folhas e raízes, nessa ordem. Wang et al. (2009), monitorando a exposição de Cd em plantas de milho (*Zea Mays* L.) em curto período, verificaram que doses de 5 e 20 µmol L⁻¹ promoveram diferenciação na matéria seca das folhas apenas após 168 h de exposição, apesar do aumento do acúmulo de Cd após 24h de exposição. Comportamento similar foi verificado

por Arduini et al. (2004) em plantas de eulália (*Miscanthus sinensis* L.) cultivadas durante trinta dias sob baixos teores de Cd, no entanto, apenas após 90 dias de cultivo foi verificado declínio da matéria seca.

De maneira geral, a atrofia do crescimento, clorose e deterioração do sistema radicular são os sintomas visuais da toxicidade por Cd (Barros et al., 2009; Costa et al., 2012; Mohamed et al., 2012; Silva et al., 2012), pois os efeitos da exposição a teores tóxicos da Cd inibe processos celulares, ocasionando danos irreversíveis a nível celular, como redução da atividade enzimática e alteração no DNA (Smeets et al., 2005; White e Brown, 2010). De acordo com Schutzendubel et al. (2001), a exposição ao Cd pode acelerar processos que conduzem ao envelhecimento celular. Assim, os sintomas visuais de toxidez de Cd observados nas plantas cultivadas sob $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ foram caracterizados por clorose nas folhas mais novas, redução de crescimento da planta e escurecimento, além de restrição do crescimento, das raízes (Figura 1.1).

Tabela 1.1. Matéria seca de plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva

Doses de Cd ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Matéria seca, g vaso ⁻¹			
	Folhas	Caule	Raízes	Total
0	6,82	19,08	5,87	31,77
5	6,13	17,52	4,80	28,44
10	7,39	17,71	5,40	30,50
20	8,29	16,86	4,99	30,14
30	5,93	12,25	3,74	21,92
40	5,41	11,48	3,26	20,16
Variável	Equação de regressão ajustada			
Matéria seca Caule	$y = -0,195 \cdot x + 19,238$, $R^2 = 0,91^*$			

*: Significativo a 5% de probabilidade.

Durante o período do ensaio constatou-se incidência de *Oidium* sp., a qual ficou mais acentuada nas plantas aos 15 dias de tratamento, a infestação foi favorecida pela combinação da temperatura (máx. e mín. de 41C° e 22C°) e umidade relativa (máx. e mín. de 89% e 21%) encontrada na casa de vegetação no período do ensaio, que indicou condições ambientais propícias a ocorrência de injúrias provocadas pelo patógeno nas folhas, caracterizadas

visualmente por manchas marrom escuro na face abaxial, sintoma fitopatológico também verificado por Dianese e Carginin (2008) em pinhão-manso em fase inicial do ataque pelo patógeno. O avanço das manchas possibilitaram observações também na face adaxial das folhas, no entanto em menor intensidade. O diagnóstico da presença do patógeno foi confirmada com base em preparação microscópica feita a partir de tecido vegetal infectado, a qual permitiu a visualização de conidióforos. Cabe ressaltar, que a ocorrência dos sintomas visuais apresentou-se em todas as plantas, isto indicou que a infestação ocorreu provavelmente via sementes contaminada.

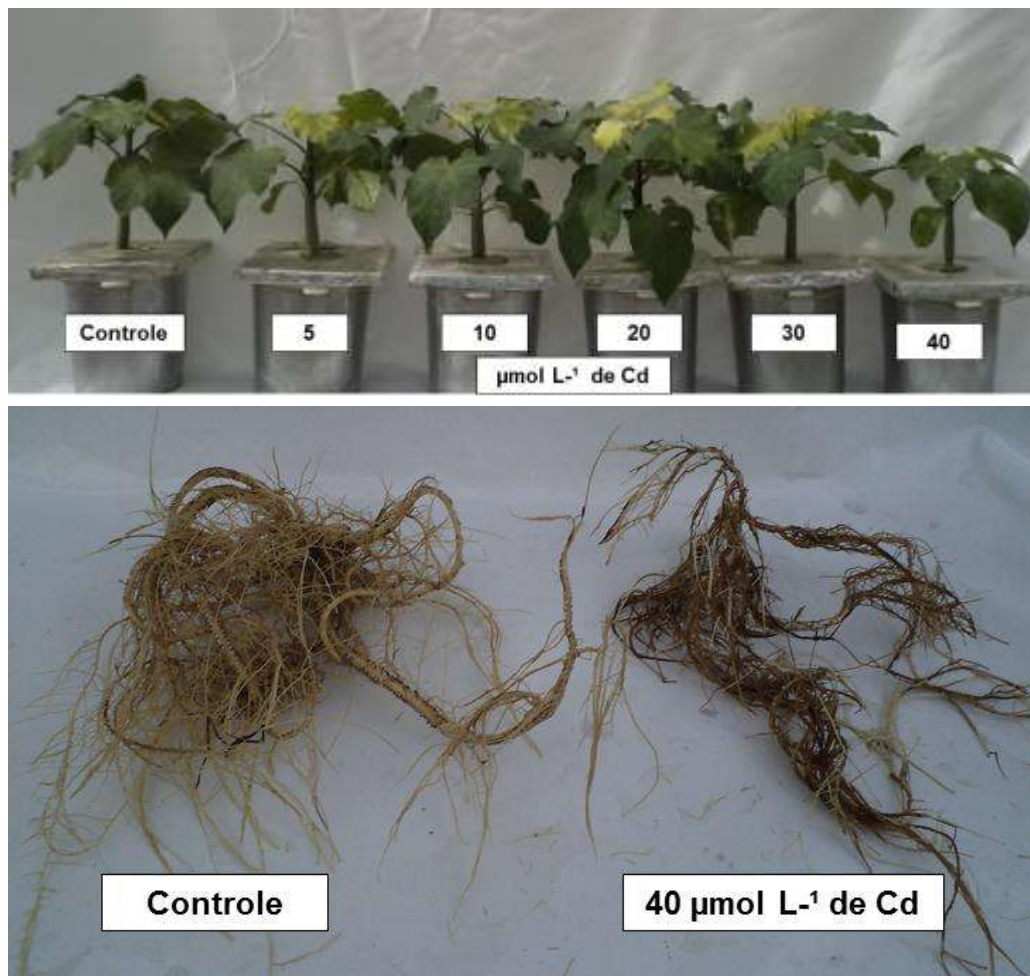


Figura 1.1. Visualização de plantas e raízes de pinhão-manso crescidas em solução nutritiva sob doses de Cd.

TEOR DE Cd

O aumento das doses foi acompanhado pelo aumento dos teores de Cd nas folhas, caule e raízes, sendo o maior teor detectado nas raízes, seguido pelo caule (Figura 1.2). O incremento de Cd do controle para a maior dose (40

μmolL^{-1} de Cd) foi de 280%, 1360% e 45078%, para folhas, caule e raízes, respectivamente.

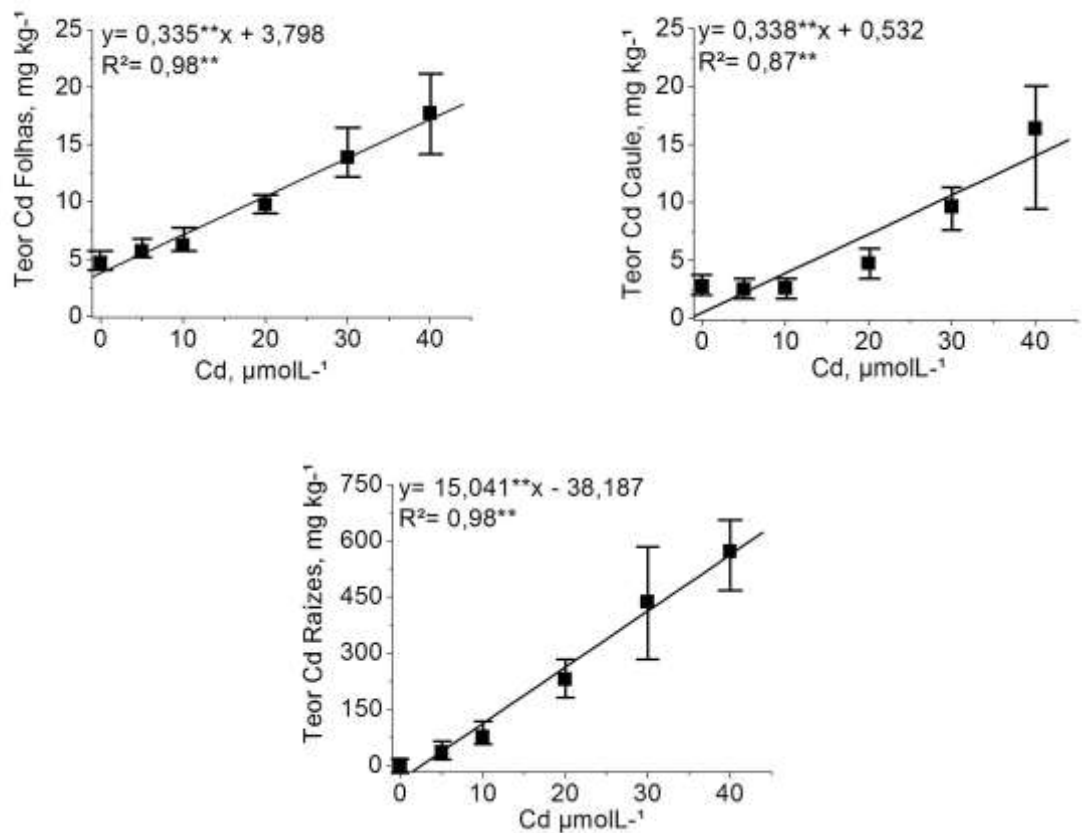


Figura 1.2. Teor de Cd em plantas de pinhão-mansão cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Comparando o teor de Cd nas raízes para a dose $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ e sua distribuição no caule e nas folhas, observou-se um acúmulo 34 vezes maior nas raízes. Isto ocorre porque as plantas sob estresse por Cd sinalizam estratégias de defesa à toxicidade por Cd, como por exemplo, a compartimentalização no vacúolo reduzindo a disponibilidade e translocação do metal por meio do acúmulo no vacúolo de células radiculares e foliares (Nascimento e Xing, 2006; Verbruggen et al., 2009). A quelação também desempenha papel relevante na acumulação e transporte de metais pesados, pois quelantes como histidina e citrato, inativam o metal evitando sua reação com outra substância, as quais provocariam danos celulares (Wu et al., 2010). Assim como os peptídeos (fitoquelatina e glutatona) são apontados como responsáveis por quelatar metais pesados favorecendo a desintoxicação, as

proteínas ricas em cistinas atuam como complexantes (Cobbett e Goldsbrough, 2002; Ma et al., 2005).

No entanto, apenas a dose $40 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd em solução (571 mg kg^{-1} nas raízes) demonstrou danos radiculares. Silva et al. (2012) verificaram teores de $2733,2 \text{ mg kg}^{-1}$ em raízes de plantas de milho cultivadas em solução nutritiva contendo 6 mg L^{-1} de Cd. Costa et al. (2012) verificaram acúmulo de 12800 mg kg^{-1} em raízes de mamona cultivadas sob concentração de 11 mg L^{-1} de Cd em solução nutritiva.

Os dados indicam que o pinhão-manso apresentou relativa tolerância para acumular Cd em tecido radicular. Isto demonstra sua relevância para revegetação de áreas contaminadas por Cd com a vantagem de se destacar como oleaginosa não-alimentícia promissora para produção de bioenergia (Kumar e Sharma, 2008; Sahoo et al., 2009; Sahoo e Das, 2009; Jingura et al., 2010), além da cobertura vegetal contribuir para redução da mobilidade do Cd no solo por erosão, lixiviação e escoamento superficial (Soares et al., 2001; Melo et al., 2009).

As doses $30 \mu\text{molL}^{-1}$ e $40 \mu\text{molL}^{-1}$ de Cd provocaram acúmulo nas folhas de 14 e 18 mg kg^{-1} de Cd (Figura, 2), respectivamente, concentrações consideradas tóxicas para a maioria das espécies. De acordo com Leita et al. (1995), o efeito tóxico de Cd nas plantas influencia o movimento e absorção de água, que se inicia após algumas horas que as plantas são expostas ao Cd, ocasionando primeiramente efeito indireto na abertura dos estômatos, induzido por aumento do potencial osmótico nas folhas; em seguida, o Cd age diretamente nas células-guarda e causa inibição no crescimento das raízes, as quais induzem ao declínio na transpiração, e limita a demanda e absorção de água, conseqüentemente provocando o fechamento dos estômatos; por conseguinte, quando a concentração no tecido vegetal torna-se elevada ou após longo período de exposição, há um declínio metabólico e diminuição da produção de biomassa.

TEORES DE NUTRIENTES

Um dos sintomas de toxicidade por Cd nas plantas foi o desbalanço nutricional ocasionando incremento dos teores de N e K nas folhas e caule e de

K, Cu, Fe e Mn nas raízes, além de reduções nos teores de P, Ca, Mg, e Mo nas folhas, e também nos teores de Mg e B no caule (Tabela 1.2).

Os maiores incrementos foram verificados nas raízes, com aumento de 20, 126, 142 e 215%, respectivamente, para os teores de K, Cu, Fe e Mn. Como as maiores reduções dos teores de nutrientes foram verificadas no caule, sendo observado declínio de 18, 42 e 148%, para Ca, Mg e B, respectivamente.

Tabela 1.2. Equações de regressão dos teores de nutrientes em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva

Variáveis	Equações de Regressão Ajustadas
Teor N Folhas, g kg ⁻¹	$y = -0,1240^{**}x + 27,5252, R^2 = 0,88^{**}$
Teor P Folhas, g kg ⁻¹	$y = 0,0385^{**}x^2 - 1,9129^{**}x + 75,0186, R^2 = 0,79^{**}$
Teor K Caule, g kg ⁻¹	$y = -0,0043^{**}x^2 + 0,2619^{**}x + 16,7796, R^2 = 0,94^{**}$
Teor K Raízes, g kg ⁻¹	$y = 0,1687^{**}x + 24,2983, R^2 = 0,85^{**}$
Teor Ca Folhas, g kg ⁻¹	$y = -0,225^{**}x + 46,6928, R^2 = 0,87^{**}$
Teor Ca Caule, g kg ⁻¹	$y = -0,025^{**}x + 7,685, R^2 = 0,54^{**}$
Teor Mg Folhas, g kg ⁻¹	$y = -0,064^{**}x + 21,2982, R^2 = 0,45^{**}$
Teor Mg Caule, g kg ⁻¹	$y = -0,029^{**}x + 3,097, R^2 = 0,91^{**}$
Teor Cu Folhas, mg kg ⁻¹	$y = 0,0913^{**}x + 3,2089, R^2 = 0,86^{**}$
Teor Cu Raízes, mg kg ⁻¹	$y = 0,1156^{**}x + 5,7181, R^2 = 0,83^*$
Teor Mo Folhas, mg kg ⁻¹	$y = 0,003^{**}x^2 - 0,0183^{**}x + 0,8244, R^2 = 0,87^{**}$
Teor Fe Raízes, mg kg ⁻¹	$y = 20,1714^{**}x + 515,3021, R^2 = 0,82^*$
Teor Mn Raízes, mg kg ⁻¹	$y = 9,194^{**}x + 188,1957, R^2 = 0,82^{**}$
Teor B Caule, mg kg ⁻¹	$y = 0,002^{**}x^2 - 0,056^{**}x + 1,033, R^2 = 0,89^{**}$

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

O desbalanço nutricional é considerado sintoma de toxicidade comum provocado por acúmulo de Cd em plantas. Mohamed et al. (2012) verificaram incremento de teores de Ca e decréscimo de Fe nas raízes de mustarda da Índia (*Brassica juncea* L. Czern) e incremento de teores de Ca, K, Mg e Zn nas folhas. Vassilev et al. (1998) observaram inibição da absorção de Fe em plantas de trigo (*Hordeum vulgare* L., cv. Hemus). Souza et al. (2011) verificaram que o acúmulo de Cd em jenipapo (*Genipa americana*) provocou

decréscimo dos teores de K nas folhas, enquanto para Ca e Zn houve incremento nas raízes. López-Millán et al. (2009), avaliando a concentração de nutrientes N, P, Mg, Ca e K em plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) sob estresse de Cd, verificaram alteração apenas no desbalanço de K nas raízes. Bertoli et al. (2012), avaliando o estresse de Cd em tomate, citam reduções no conteúdo de K, Ca, Mn e Zn na parte aérea, de K nos frutos e Mn nas raízes. Costa et al. (2012), avaliando a toxicidade por Cd em mamona, espécie da mesma família do pinhão-manso, verificaram correlação positiva entre Ca, Cu, Fe, Mn e Zn nas raízes. Estes autores ainda relataram que o elevado potencial fitotóxico do Cd ocasionou deterioração celular, alterando a permeabilidade e seletividade das membranas celulares e induzindo o acúmulo indiscriminado de nutrientes. Outro fato que provoca o desbalanço nutricional é a similaridade do Cd com metais essenciais, como Zn, Ca e Fe, inibindo a absorção destes, por conseguinte o Cd interfere no balanço homeostático desses metais, ou causam desbalanço nas proteínas transportadoras desses elementos (Nascimento et al., 1998).

Shaul (2002) cita que mesmo quando o desbalanço do conteúdo de Mg é pouco afetado, as alterações nas concentrações de Mg no citosol e cloroplastos implicam em redução na atividade fotossintética, visto que o Mg é o metal divalente mais abundante no citosol, além da sua capacidade para interagir com ligantes nucleófilos, observada na presença deste metal no centro da molécula de clorofila, como constituinte na agregação de ribossomos e participação na atividade enzimática. Como o Mg, o elemento Fe também apresenta denotada importância, uma vez que este metal participa tanto da constituição dos cloroplastos como de reações enzimáticas e de oxirredução (Hansch e Mendel, 2009). No entanto, comparando os teores nas folhas das plantas cultivadas no controle e dose 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Cd, apenas foi verificado redução para os teores de Mg (7%). Aparentemente, o Fe não representou participação significativa na redução fotoquímica das plantas cultivada sob maior dose de Cd (40 $\mu\text{mol L}^{-1}$), as quais apresentaram maior declínio da produção de biomassa e teores de Cd.

FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA

Observou-se diferenças nos picos de absorção nos espectros da fluorescência de clorofila (Figura 1.3). Nota-se que a menor reabsorção da fluorescência foi verificada nas plantas cultivadas sob maior dose de Cd (Figuras 3A e 3B), demonstrando a sensibilidade da fluorescência de clorofila para detectar alterações no PSII em plantas com toxidez por Cd, o qual acentuou-se em relação as demais doses, resultados também verificados para os sintomas visuais de toxicidade e na produção de biomassa das folhas.

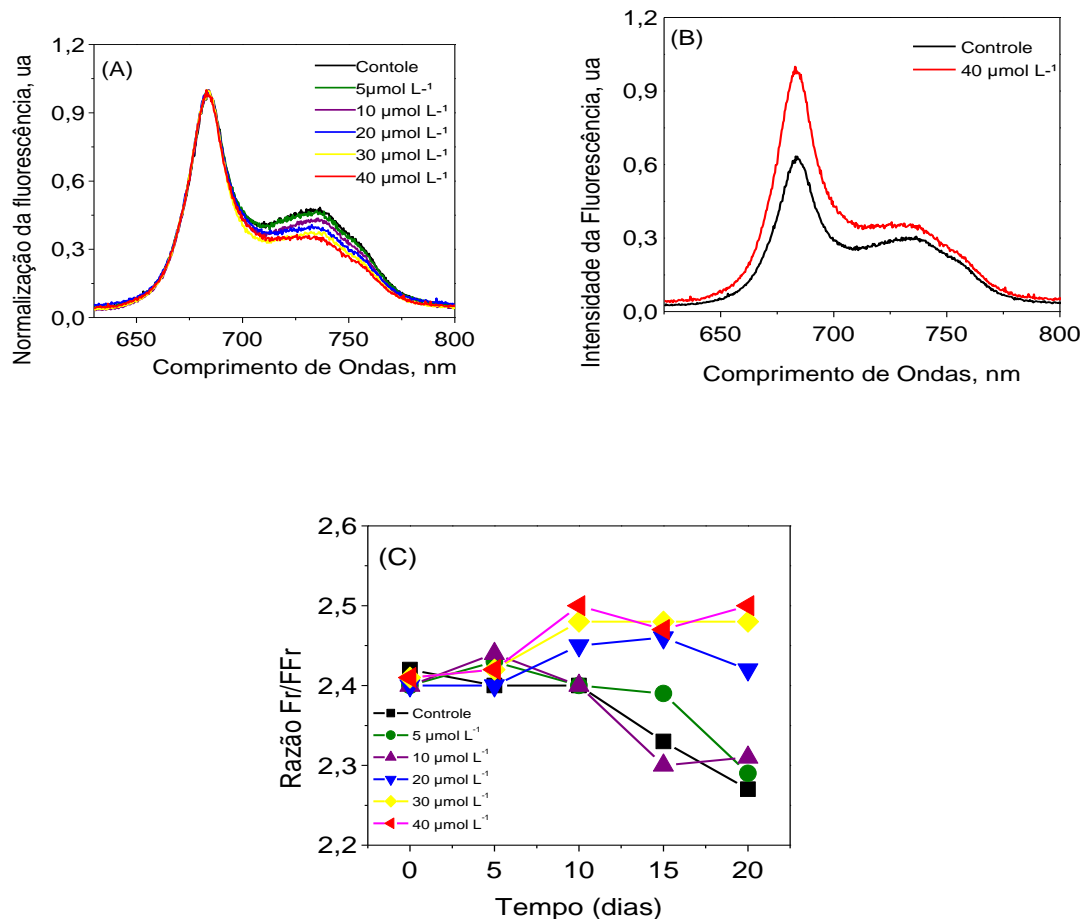


Figura 1.3. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de pinhão-mansão cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva aos 20 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho= 680-700 nm e vermelho distante= 730-740 nm (Fr/FFr) (C).

A razão Fr/FFr demonstra que as doses de Cd promoveram alterações temporais na biossíntese fotossintética, as quais se acentuaram aos 10 dias após adição das doses (Figura 1.3C). É interessante ressaltar que o acúmulo de Cd nas menores doses não alterou a eficiência de absorção de fótons, uma vez que as razões das plantas cultivadas sob as doses 5 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$

mantiveram as razões Fr/FFr similares ao controle, com declínio ao longo do cultivo, o que indica que as plantas apresentaram *status* fotossintético normal. Maurya et al. (2008) observaram comportamento similar avaliando a toxicidade por Cd em plantas de milho sob dose de $0,01\text{mmolL}^{-1}$ do metal.

A incidência do patógeno (*Oidium* sp.) durante o ensaio não apresentou efeito sobre a fluorescência de clorofila, uma vez que os maiores danos provocados pelo patógeno foram visualizados na face abaxial das folhas. Segundo Buschmann (2007), a medida da fluorescência de clorofila tomada nas diferentes faces foliares apresentam comportamentos distintos, oriundos das diferenças anatômicas nestas regiões, sendo a melhor resposta de modificações no PSII na face adaxial devido a maior densidade de moléculas de clorofilas nesta região.

A medida da fluorescência de clorofila é não destrutiva e pode avaliar alterações nas membranas dos cloroplastos de forma a elucidar o aparato fotoquímico anormal das plantas (Krause e Weis, 1991). Valores da razão Fv/Fm (máxima fluorescência/máxima variação da emissão de fluorescência) e Fr/FFr (pico máximo na região vermelho/pico máximo na região vermelho distante) podem ser utilizados para detectar estresse no PSII, pois verifica-se que o declínio da concentração de clorofila indica condição de biossíntese anormal do aparato fotossintético, conseqüentemente diminuição da razão Fv/Fm. No entanto, os valores da razão Fr/FFr demonstram que em condição de biossíntese anormal ocorre elevação dos valores. Situações inversas ocorrem em condição de estresse (Gopal et al., 2002; Maurya et al., 2008; Silva et al, 2012).

Observa-se que o estresse provocado por toxicidade à Cd nas plantas ocorreu a partir da dose $20\ \mu\text{molL}^{-1}$ em solução, evoluindo com aumento dos teores de Cd no tecido foliar (Figura 1.2). Isto demonstra o potencial da fluorescência de clorofila para detectar concentrações tóxicas de Cd nas folhas de pinhão-manso. Assim, verifica-se que os acúmulos de 10, 14 e $18\ \text{mg kg}^{-1}$ de Cd nas folhas, correspondentes as doses 20, 30 e $40\ \mu\text{molL}^{-1}$, podem implicar em vários distúrbios, incluindo a inibição fotoquímica, principalmente porque os metais pesados podem induzir alterações à nível estrutural das membranas e de células do aparato fotossintético. Vitória et al. (2006), observaram modificações no formato dos cloroplastos de plantas cultivados sob doses de Cd, assim como de sua membrana interna e organização do

estroma. Sagardoy et al. (2010) verificaram que a toxicidade por Zn afetou a condutância estomática em consequência da menor densidade das células-guarda das folhas, no entanto, estes autores não verificaram significativa inibição a nível fotossintético. Pietrini et al. (2003) apontam a toxicidade de Cd associada a redução do conteúdo de Fe nas folhas, interferindo na biossíntese da clorofila e, conseqüentemente, na maior emissão de fótons. No entanto, os autores também relacionaram o declínio na eficiência quântica com a permuta do Cd por Mg na molécula de clorofila.

Alguns estudos têm demonstrado a sensibilidade da medida da fluorescência de clorofila associada a outras técnicas como ferramenta segura e vantajosa para mensurar com acurácia a toxicidade de Cd, principalmente, por obter resposta rápida e sem danificar a planta avaliada. Pietrini et al. (2003) e Wang et al. (2009), utilizando a razão F_v/F_m , um dos parâmetros obtidos por meio da leitura da fluorescência de clorofila, verificaram declínio da razão em resposta ao estresse de Cd, indicando que o potencial máximo de produção de quantum do PSII foi inibido, sendo os resultados confirmados por distúrbios na atividade de enzimas antioxidantes. Silva et al. (2012) observaram notável diferença na razão F_r/FF_r em plantas de milho, após quatro dias de exposição a doses 3 e 6 mg L⁻¹ de Cd em solução nutritiva, sendo o estresse corroborado pelo resultado dos conteúdos de pigmentos e concentração de Cd em tecido vegetal.

Verifica-se que os aumentos dos teores de Cd e clorofila b nas folhas correlacionaram-se com a elevação da razão F_r/FF_r a medida que aumentou as doses de Cd em solução (Figura 1.4A e 1.4B). Além disso, faz-se notável a confirmação da relativa tolerância do pinhão-manso à toxicidade por Cd nas doses 5 µmolL⁻¹ e 10 µmolL⁻¹, com correspondentes teores de 5,7 e 6,2 mg kg⁻¹ nas folhas, pois ainda assim as plantas apresentaram a razão F_r/FF_r próxima ao valor da planta controle, qual apresentou-se com melhor *status* nutricional.

Apesar da clorofila b e carotenóides apresentarem menor influência na eficiência quântica para o PSII estas podem atuar como pigmentos acessórios transferindo elétrons à clorofila a (Bohr, 2011). Silva et al. (2012) também verificaram redução do conteúdo de clorofila b, acompanhada por aumento da razão F_r/FF_r em plantas sob estresse de Cd. Wang et al. (2009) e Pietrini et al. (2003) observaram declínio na razão F_v/F_m em plantas sob estresse de Cd, isto indicou que o potencial máximo de produção de quantum do PSII foi

inibido, corroborando os resultados dos sintomas visuais cloróticos observados nas folhas provocados por estresse de Cd. Wang et al. (2009) observaram que o estresse de Cd inicialmente reduziu a atividade da rubisco e fosfenol piruvato carboxilase nas folhas e, conseqüentemente, afetou a transferência de elétrons do PSII. Por isso, os autores apontam o ciclo de Calvin como primeiro alvo envolvido na toxicidade de Cd em plantas de milho.

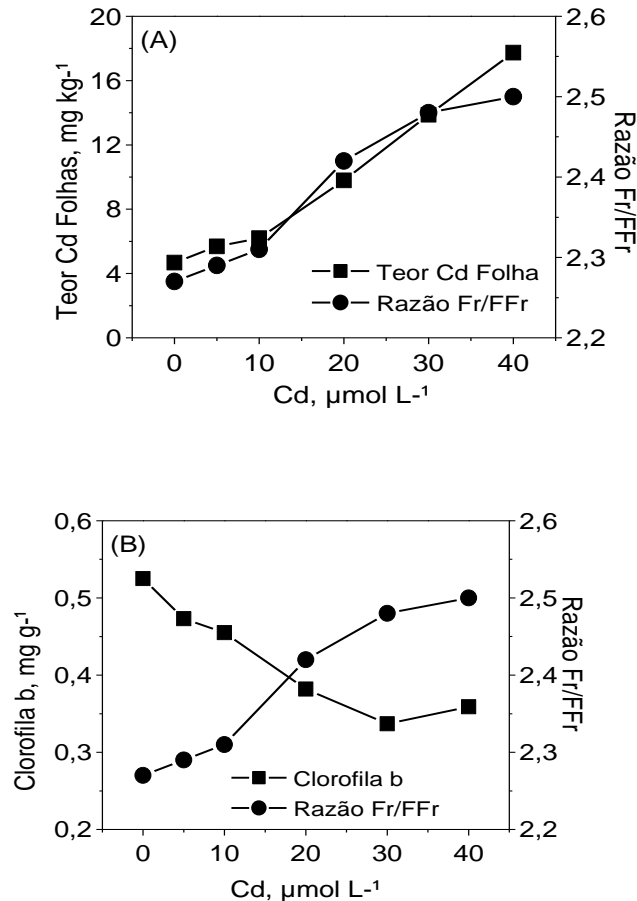


Figura 1.4. Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 20 dias, em plantas de pinhão-mansão cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva, referente às leituras do vermelho e vermelho distante (Fr/FFr) e teores de Cd nas folhas (A). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 20 dias, e conteúdo de clorofila b (B).

PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL

Os conteúdos de clorofila b e total apresentaram declínio com aumento das doses de Cd (Tabela 1.3). A redução das concentrações de pigmentos são sintomas comumente observadas em plantas por toxicidade à metais pesados

(Joshi e Mohanty, 2004; Chaffei et al., 2004; Shi e Cai, 2009; Silva et al., 2012; Cambrollé et al., 2013). Como observado anteriormente, a fluorescência de clorofila foi sensível para elucidar alterações no PSII e um efeito que se relacionou com esse efeito tóxico provocado por Cd foi o declínio do conteúdo de clorofila b. Apesar de não ser encontrado ajuste de regressão para a clorofila “a”, as doses 20, 30 e 40 $\mu\text{mol L}^{-1}$ apresentaram clara tendência de redução em relação ao controle e as doses mais baixas.

Tabela 1.3. Equações de regressão de pigmentos em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Cd em solução nutritiva

Doses de Zn ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenóides
	mg g ⁻¹ de matéria fresca			
0	1,32	0,52	1,84	0,29
5	1,31	0,47	1,78	0,30
10	1,38	0,45	1,83	0,29
20	1,10	0,38	1,48	0,25
30	0,93	0,34	1,27	0,23
40	1,05	0,36	1,41	0,24
Variáveis	Equações de Regressão Ajustadas			
Clorofila b	$y = 0,499^{**}x - 0,004$, $R^2 = 0,86^*$			
Clorofila total	$y = -0,014^{**}x - 1,855$, $R^2 = 0,79^*$			

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Não foi observada resposta significativa para as enzimas catalase, polifenoloxidase, ascorbato peroxidase e proteína solúvel. Alterações na atividade de enzimas antioxidantes podem demonstrar estratégia de defesa ou indicar toxicidade em plantas sob condições de estresse por metais pesados. Um efeito negativo do Cd na síntese enzimática é sua substituição em estruturas de proteínas e compostos bioativos, devido sua semelhança com outros metais (Babula et al., 2008). Dixit et al. (2001) observaram que o acúmulo de Cd induziu incremento de H_2O_2 nas folhas e raízes, e a elevação da atividade de enzimas antioxidantes (ascorbato peroxidase e catalase) foi expressiva para manter a integridade celular, pois uma vez não controlado o excesso das espécies reativas de oxigênio, estas danificaram organelas presentes no citosol. Sun et al. (2007) verificaram que o aumento da atividade da catalase, peroxidase e concentrações de prolina desempenharam

importante papel na tolerância de Cd em plantas hiperacumuladoras (*Solanum nigrum* L. e *S. melongena*). Smeets et al. (2005) verificaram que o estresse por Cd provocou aumento das concentrações de ascorbato peroxidase e glutatona em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), sendo estas enzimas apontadas como mecanismos indiretos de defesa no balanço homeostático.

Apesar de não haver elevação da atividade de enzimas antioxidantes em função do acúmulo de Cd nas plantas, também não foi verificada redução da atividade à medida que foi induzido o estresse por Cd. Estes resultados, associados a outras observações anteriores, corroboram a relativa tolerância do pinhão-manso a toxicidade por Cd. Neste sentido, essa pode ser uma espécie vantajosa para introdução em estratégias fitorremediadoras em áreas contaminadas por Cd, pois além de acumular o metal principalmente no tecido radicular, a espécie é não-alimentícia e considerada promissora para produção de bioenergia.

CONCLUSÕES

A medida da fluorescência de clorofila foi eficiente para avaliar as alterações temporais ocasionadas pela toxicidade de Cd em plantas de pinhão-manso.

Apesar das alterações no desbalanço nutricional, o pinhão-manso apresentou relativa tolerância à toxicidade por Cd e não demonstrou efeitos deletérios nos teores de Fe e clorofila "a" nas folhas.

O aumento das doses de Cd para pinhão-manso não provocou alterações na atividade de enzimas antioxidantes nem no teor de proteína solúvel nas folhas.

Os sintomas visuais de toxicidade por Cd observados nas plantas foram caracterizados por clorose nas folhas mais novas, redução de crescimento da planta e escurecimento, além de restrição do crescimento, das raízes.

O pinhão-manso, por produzir um óleo não comestível e ser promissora para produção de bioenergia, pode ser uma espécie importante em estratégias para revegetação de áreas contaminadas por Cd, com adicional vantagem econômica decorrente do uso comercial do óleo durante o processo de remediação.

REFERÊNCIAS

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

ARDUINI, I.; MASONI, A.; MARIOTTI, M.; ERCOLI, L. Low cadmium application increase miscanthus growth and cadmium translocation. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 89–100, 2004.

BABULA, P.; ADAM, V.; OPATRILOVA, R.; ZEHNALÉK, J.; LADISLAV HAVEL, L.; KIZEK, R. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p.6, v. 189–213, 2008.

BARROS A. B.; FLOCCO, C. G.; DONATI, E. R. Study of the heavy metal phytoextraction capacity of two forage species growing in an hydroponic environment. **Journal of Hazardous Materials**, v.165, p. 366–371, 2009.

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

BOHR, H. G.; MALIK, F. B. A schematic model for energy and charge transfer in the chlorophyll complex. **Theoretical Chemistry Accounts**, v. 130, p. 1203–1210, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.

BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaf. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261–271, 2007.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTON, J. M.; MUNOZ-VALLES, S.; FIGUEROA-LUQUE, E.; T. LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E.; Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85 p. 50–57, 2013

CAMPOS, M. L.; SILVA, F. N. DA; FURTINI NETO, A. E.; GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; ANTUNES, A. S. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.361–367, 2005.

CHAFFEI, C.; PAGEAU, K.; SUZUKI, A.; GOUIA, H.; GHORBEL, M. H.; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. Cadmium Toxicity Induced Changes in Nitrogen Management in *Lycopersicon esculentum* Leading to a Metabolic Safeguard Through an Amino Acid Storage Strategy. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, p. 1681–1693, 2004.

CHERIF, J.; DERBEL N. NAKKACH, M. BERGMANM, H. V.; JEMAL, F., LAKHDAR, Z. B.; Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 101, p. 332–339, 2010.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Reviews Plant Physiology**, v.53, p.159–82, 2002.

CORCOLL, N.; BONET, B.; LEIRA, M.; GUASCH, H. Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 673, p. 119–136, 2011.

COSTA, E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; MELO, É. E. C.; RIBEIRO, B. T.; SANTOS, E., SEVERINO, E. C., FAQUIN, V.; HALE, B. A. Assessing the tolerance of castor bean to Cd and Pb for phytoremediation purposes. **Biological Trace Element Research**, v.145, p. 93–100, 2012.

CUNHA, K. C. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; PIMENTEL, R. M. M., ACCIOLY, M. A.; SILVA, A. J. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1319–1328, 2008.

DIANESE, A. de C.; CARGNIN, A. Ocorrência Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) em Planaltina, DF. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADO, 2008. Documentos, n. 231, 15p. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/download/1272/t>>. Acesso em: 10/10/2012.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36–41, 2008.

FREITAS, E. V. de S.; NASCIMENTO, C. W. A. do; GOULART, D. F.; SILVA, J. P. S. da. Disponibilidade de cádmio e chumbo para milho em solo adubado com fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p. 1899–1907, 2009.

GIARDI, M. T.; KOBLÍZEK, M.; MASOJÍDEK, J. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 1027–1033, 2001.

GONÇALVES, V. C.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P.; CARVALHO, S. A.; SANTOS NETO, O. A. dos. Biodisponibilidade de cádmio em fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2871–2875, 2008.

GOPAL, R.; MISHRA, K. B.; ZEESHAN, M.; PRASAD, S. M.; JOSHI, M. M. Laser-induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress. **Current Science**, v. 83, p. 880–884, 2002.

HANSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 259–266, 2009.

HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tabacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: University of California, 1950. p. 32 (Circular, 347).

JAMIL, S.; ABHILASH, P. C.; SINGH, N.; SHARMA, P. N. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 269–275, 2009.

JINGURA, R. M.; MUSADEMBA, D.; MATENGAIFA, R. An evaluation of utility of *Jatropha curcas* L. as a source of multiple energy carriers. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 2, p. 115–122, 2010.

JOSHI, M. K.; MOHANTY, P. Chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants. In: **Advances in Photosynthesis and Respiration, Chlorophyll a Fluorescence**, v. 19, p. 637–651. 2004.

JUWARKAR, A. A.; YADAV, S. K.; KUMAR, P.; SINGH, S. K. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.145, p.7–15, 2008.

KABATA – PENDIAS, A. **Trace Elements in soils and plants**. 4 ed. Boca Raton, CRC, 2010. 505p.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315–319, 1976.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, . v. 42, p. 313–49, 1991.

KUMAR A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 28, p.1–10, 2008.

LEITA, L. et al. Transpiration dynamics in cadmium-treated soybean (*Glycine max* L.) plants. **Journal Agronomy Crop Science**, v.175, p.153–156, 1995.

LI, B.; WANG, X.; HUANG, L.; YE, Z. Identification of rice cultivars with low brown rice mixed cadmium and lead contents and their interactions with the micronutrients iron, zinc, nickel and manganese. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24 p. 1790–1798, 2012.

LICHTENTHALER H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R (eds) **Methods in Enzymology Academic Press**, NewYork, p 350-382.

LIN, Z.; LIU, N.; LIN, G.; PAN, X. PENG., C; Stress-induced alteration of chlorophyll fluorescence polarization and spectrum in leaves of *Alocasia macrorrhiza* L. schott. **Journal of Fluorescence**, v. 17, p. 663–669, 2007.

LIU, Y-T.; CHEN, Z-S.; HONG, C-Y; Cadmium-induced physiological response and antioxidant enzyme changes in the novel cadmium accumulator, *Tagetes patula*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, p.724–731, 2011.

LÓPEZ-MILLÁN, A.; SAGARDOY, R.; SOLANAS, M.; ABADÍA, A.; ABADÍA, J. Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. **Environmental and Experimental Botany**, v.65, p. 376–385, 2009.

MA, J.F.; UENO, D.; ZHAO, F.J.; McGRATH, S.P. Subcellular localisation of cadmio and Zn in the leaves of a cadmio-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens*. **Planta**, v.220, p.731–736, 2005.

MAURYA, A. R., PRASAD, S. M.,; GOPAL, R. LIF technique offers the potential for the detection of cadmiuminduced alteration in photosynthetic activities of *Zea mays* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 9, p. 29–35, 2008.

MAURYA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser-induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

MELO, E. E. C.; COSTA , E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; NASCIMENTO, C. W. A. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean

plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 479–483, 2009.

MOHAMED, A. A.; CASTAGNA, A.; ANNAMARIA RANIERI, A.; TOPPI, L. S. D.; Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant *status* and phytochelatin biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 57, p. 15–22, 2012.

NAKANO, Y; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068–1072, 1981.

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation **Scientia Agricola**, v. 63, p. 299–311, 2006.

NASCIMENTO, C. W. A. ; FONTES, R. L. F. ; NEVES, J. C. L. Mineral composition of two brazilian corn cultivars as a function of cadmium in the nutrient solution. **Journal of Plant Nutrition**, v. 21, p. 2369–2379, 1998.

PEREIRA, G. J. G.; MOLINA, S. M. G.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. **Plant and Soil**, v. 239, 123–132, 2002.

PIETRINI, F., IANNELLI, M. A., PASQUALINI, S., MASSACCI, A. Interaction of cadmium with glutathione and photosynthesis in developing leaves and chloroplasts of *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel. **Plant Physiology**, v.133, p. 829–837, 2003.

SAGARDOY, R.; VÁZQUEZ, V.; FLOREZ-SARASA, I. D.; ALBACETE, A.; RIBAS-CARBÓ, M.; FLEXAS, J.; ABADÍA, J.; MORALES, F. Stomatal and mesophyll conductances to CO₂ are the main limitations to photosynthesis in

sugar beet (*Beta vulgaris*) plants grown with excess zinc. **New Phytologist**, v. 187, p. 145–158, 2010.

SAHOO P. K.; DAS, L. M.; BABU, M. K. G.; ARORA, P.; SINGH, V. P.; KUMAR, N. R.; VARYANI, T. S. Comparative evaluation of performance and emission characteristics of jatropha, karanja and polanga based biodiesel as fuel in a tractor engine. **Fuel**, v.88, p. 1698–1707, 2009.

SAHOO, P. K.; DAS L. M. Process optimization for biodiesel production from jatropha, karanja and polanga oils. **Fuel** 88, 1588–1594, 2009.

SCHUTZENDUBEL, A., SCHWANZ, P., TEICHMANN, T., GROSS, K., LANGENFELD-HEYSER, R., GODBOLD, D. L., POLLE, A. Cadmium induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in Scots pine roots. **Plant Physiology**, v. 127, p. 887–892, 2001.

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

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **BioMetals**, v. 15, p. 309–323, 2002.

SHI, G.; CAI, Q. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 555–561, 2009.

SILVA, A. J. DA; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. DA S.; SILVA-Jr, E. A. da. LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, p. 3527–3533, 2012.

SMEETS K, CUYPERS A, LAMBRECHTS A, SEMANE B, HOET P, VAN LAERE A, VANGRONSVELD J. Induction of oxidative stress and antioxidative

mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 437–444, 2005.

SOARES, C. R. F. S.; GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; CARVALHO, J. G. de C.; MOREIRA, F. M. S. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 339–348, 2001.

SOUZA, V. L.; ALMEIDA, A. F. DE; LIMA, S. G. C; CASCARDO, J C. DE M.; SILVA, D. DA C.; MANGABEIRA, P. A. O.; GOMES, F. P. Morphophysiological responses and programmed cell death induced by cadmium in *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Biometals**, v. 24, p. 59–71, 2011.

SUN, R-L; ZHOU, Q-X; SUN, F-H; JIN, C-X. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, 468–476, 2007.

USEPA - MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES. Method 3051A, CD-ROM, 1996.

VASSILEV, A; BEROVA, M.; ZLATEV, V. Influence de Cd²⁺ on growth, chlorophyll content, and water relations in young barley plants. **Biologia Plantarum**, v. 41, p. 601–606, 1998.

VENTRELLA, A.; CATUCCI, L.; PILETSKA, E.; PILETSKY, S.; AGOSTIANO, A. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 19–25, 2009.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759–776, 2009.

VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de sojas afetadas pela interação alumínio-fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p. 91–96, 1984.

VITÓRIA, A.; CUNHA, P. M. DA; AZEVEDO, R. A. Ultrastructural changes of radish leaf exposed to cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 58, p. 47–52, 2006.

WANG, H.; ZHAO, S. C.; LIU, R. L.; ZHOU, W.; JIN, J. Y.; Changes of photosynthetic activities of maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to cadmium stress. **Photosynthetica**, v. 47, p. 277–283, 2009.

WHITE, P. J.; BROWN, P. H. Plant nutrition for sustainable development and global health. **Annals of Botany**, v. 105, p. 1073–1080, 2010.

WU, G.; KANG, H.; ZHANG, X.; SHAO, H.; CHU, L.; RUAN, C.; A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p.1–8, 2010.

YADAV, S. K.; JUWARKAR, A. A; KUMAR, G. P.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; CHAKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4616–4622, 2009.

CAPÍTULO II

DEFICIÊNCIA E TOXICIDADE DE Zn EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas*
L.) AVALIADO POR ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS E NO APARATO
FOTOSSINTÉTICO

DEFICIÊNCIA E TOXICIDADE DE Zn EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.) AVALIADO POR ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS E NO APARATO FOTOSSINTÉTICO

RESUMO

O Zinco (Zn) é um elemento requerido para o metabolismo das plantas. Entretanto, teores elevados de Zn provocam distúrbios no aparato fotossintético antes das plantas apresentarem sintomas visuais de toxicidade. Considerando a essencialidade e toxicidade de Zn, o trabalho avaliou o estresse de Zn utilizando a técnica da fluorescência de clorofila em plantas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). As alterações provocadas pelo Zn no *status* nutricional e fitotóxico, na atividade de enzimas antioxidantes, proteínas solúveis e pigmentos fotossintéticos foram também estudadas. Para tanto, plantas de pinhão-manso foram cultivadas durante 40 dias em solução nutritiva com cinco doses de Zn: 100, 200, 300, 400 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e um controle, contendo 0,380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. Os resultados demonstraram que a medida de fluorescência detectou precocemente a toxicidade por Zn e indicou potencial para monitorar áreas contaminadas por este metal. A razão Fr/FFr foi sensível para elucidar alterações no PSII em plantas de pinhão-manso com sintomas de toxicidade provocados por Zn. A deficiência e toxicidade por Zn provocaram desbalanço nutricional e reduziram as concentrações de pigmentos nas folhas. A dose 227 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn foi correspondente a redução de 50% da matéria seca. O pinhão-manso apresentou relativa tolerância à toxicidade por Zn não demonstrando redução na atividade de enzimas antioxidantes e conteúdo de proteína solúvel nas folhas. Pode ser indicada como espécie promissora para programas de fitorremediação de áreas contaminadas por este metal.

Palavras-chave: Fluorescência de clorofila. PSII. Pigmentos. Enzimas antioxidantes.

DEFICIENCY AND TOXICITY OF Zn IN JATROPHA ASSESSED BY NUTRITIONAL STATUS AND PHOTOSYNTHETIC ALTERATIONS

ABSTRACT

Zinc (Zn) is an essential element, although high concentrations of the metal cause disturbance in the photosynthetic apparatus even before visual symptoms are displayed. The work was carried out to evaluate the deficiency and toxicity of Zn assessed by X-ray fluorescence chlorophyll in jatropha plants (*Jatropha curcas* L.). The alterations caused by Zn on the nutritional status, phytotoxicity, antioxidative enzyme activity, soluble proteins, and photosynthetic pigments were studied. Jatropha plants were grown during 40 days in a nutrient solution with five Zn rates: 100, 200, 300, 400 and 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and a control with 0,380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Zn. The results showed that X-ray fluorescence early detected Zn toxicity and has potential to monitoring of contaminated areas. The Fr/FFr ratio was sensible to elucidate changes in photosystem II in jatropha plants displaying symptoms of Zn toxicity. Both the deficiency and toxicity of Zn provoked nutritional imbalance and diminished the pigments concentration in leaves. The 227 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dose of Zn caused a 50% reduction of biomass. Jatropha posed a relative tolerance to Zn toxicity since it did not present alteration in the antioxidative enzyme activities or in the contents of soluble proteins in leaves. Therefore it can be indicated as a promising species to phytoremediation of areas contaminated by Zn.

Keywords: Chlorophyll fluorescence. PSII. Pigments. Antioxidant enzymes.

INTRODUÇÃO

O Zn é um elemento requerido para o metabolismo das plantas, atuando principalmente como componente estrutural, catalítico ou cofator enzimático (Clemens et al., 2002). É componente essencial para um vasto número de enzimas, entre estas, superóxido dismutase, desidrogenase, RNA polimerase. O metal está também presente em proteínas ligadas ao DNA, e participa do metabolismo de carboidratos e fosfatos, síntese de proteínas, regulação e expressão de gene e estrutura de ribossomos (Broadley et al., 2007). Considerando-se condições favoráveis de disponibilidade do Zn no solo, este apresenta elevada ou intermediária mobilidade nas plantas. No entanto, em condições de deficiência, pode apresentar baixa mobilidade, acumulando-se nas folhas mais velhas.

A sensibilidade para deficiência depende de fatores intrínsecos das plantas, assim como da interação do Zn com outros metais. A faixa de deficiência nas plantas varia entre 10 a 20 mg kg⁻¹, sendo apresentados sintomas visuais inicialmente nas folhas mais novas, induzindo a atrofia do crescimento (Kabata-Pendias, 2010). Silva et al. (2009) verificaram que a omissão de Zn para plantas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) promoveu encurtamento dos internódios, clorose internerval e encarquilhamento para cima de folhas novas, algumas das quais exibiram coloração avermelhada. Por outro lado, quando sua concentração na planta excede 300 mg kg⁻¹, observa-se inibição do crescimento e clorose em folhas como principais sintomas de toxicidade (Vitosh et al., 1994, Cunha et al., 2008; Babula et al., 2008; Lin e Aarts, 2012). Sintomas visuais como clorose induzida pelo excesso de Zn podem ser resultantes da redução no conteúdo de clorofilas (a e b), principalmente devido a deficiência de Fe e Mg, frente a semelhança do Zn com estes metais podendo participar dos mesmos sítios bioativos (Soares et al., 2001a; Sagardoy et al., 2009).

Uma das formas de absorção de Zn pelas plantas é por meio de proteínas transportadoras, tendo estas afinidades por outros metais, razão pela qual estes podem interferir na seletividade da proteína ao Zn. Plantas que são submetidas ao excesso de Zn podem inibir o seu influxo mediante da regulação das proteínas transportadoras (Lin e Aarts, 2012). Kramer et al. (2007) relatam que a absorção de Zn por plantas hiperacumuladoras é conduzida por

proteínas transportadoras atreladas a genes da família ZIP, as quais são também reguladores da absorção de Fe.

As plantas evoluíram complexos mecanismos para controlar e minimizar os danos por exposição a metais pesados, mas existem muitas dúvidas relativas ao mecanismo de acumulação, desintoxicação, transporte, quelação, e sequestro de metais que contribuem para a redução da fitotoxicidade. Podem ser citadas como duas estratégias básicas, a acumulação e a exclusão de metais, resultantes de mecanismos de desintoxicação interna (Gallego et al., 2012). Observa-se que, em condições de estresse por Zn, a translocação é limitada por sequestro e acúmulo no vacúolo das células radiculares (Verbruggen et al., 2009). Segundo Nascimento e Xing (2006), a compartimentalização no vacúolo de células de raízes e folhas, bem como a complexação por peptídeos e proteínas, contribuem para tolerância ao estresse de metais pesados. Alguns estudos demonstram que, dentre estes mecanismos, a quelação desempenha um papel importante na acumulação e transporte de Zn, pois normalmente quelantes como histidina e citrato podem inativar o Zn, evitando sua reação com outras moléculas que causariam danos celulares (Wu et al., 2010). Salt et al. (1999) verificaram que histidina estava relacionada ao transporte Zn enquanto os ácidos orgânicos de baixo peso molecular contribuíram tanto para seu transporte como para o armazenamento no vacúolo de células radiculares em *Thlaspi caerulescens*.

As moléculas de clorofila a que emitem fluorescência no cloroplasto são indicadoras sensíveis do *status* normal do aparato fotossintético. A medida de fluorescência de clorofila é caracterizada por um pico máximo na região vermelha (680-700 nm) que é atribuído ao fotossistema II (PSII) e outro na região vermelha distante (730-740 nm) correspondente ao fotossistema I (PSI) (Silva Junior, 2011). A fluorescência de clorofila reflete os processos da fotossíntese que ocorrem nos cloroplastos, incluindo a reação fotoquímica no PSII, tornando-se uma ferramenta interessante para avaliar o desempenho fotossintético e monitorar precocemente o estresse ambiental (Deell et al., 1999 ; Joshi e Mohanty, 2004; Corcoll et al., 2011; Cambrollé et al., 2011). A correlação negativa do decréscimo da biossíntese de clorofila e eficiência quântica desencadeia declínio da assimilação de C, resultando em inibição do crescimento das plantas (Silva et al., 2012).

A medida da fluorescência de clorofila é uma ferramenta não invasiva e pode revelar alterações nas membranas dos cloroplastos resultantes de alterações do aparato bioquímico (Joshi e Mohanty, 2004). A razão obtida através da fluorescência de clorofila máxima na região do vermelho e vermelho distante (Fr/FFr) pode ser utilizada para esta finalidade, visto que a adequada concentração de clorofila indica condições normais do aparato fotossintético, apontando conseqüentemente a diminuição da razão Fr/FFr. Situação inversa ocorre em condições de estresse promovidos por danos na integridade da atividade fotoquímica das plantas (Gopal et al., 2002; Maurya et al., 2008; Silva et al., 2012).

A toxicidade por Zn pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao interagir com componentes celulares promovem danos oxidativos e conseqüente deterioração celular (Gadjev et al., 2008). Em espécies de plantas sensíveis à metais pesados, o conteúdo de ROS aumenta

consideravelmente se não houver um mecanismo eficiente de enzimas antioxidantes. Por conseguinte, o acúmulo de ROS resultará em morte celular, afetando assim o metabolismo normal das plantas (Sharma e Dietz, 2009). Desse modo, a estratégia de elevação da atividade de enzimas antioxidantes indica o status de defesa nas células vegetais. Dentre estas destacam-se a superóxido dismutase, catalase, ascorbato peroxidase e glutathione redutase (Lin e Aarts, 2012; Matilla-Vázquez e Matilla, 2012).

O presente trabalho avaliou a resposta do acúmulo e distribuição do metal em pinhão-mansão utilizando a técnica não invasiva da fluorescência de clorofila. A resposta das plantas às doses de Zn, considerando-se sua essencialidade e toxicidade, além da produção de enzimas antioxidantes, proteínas solúveis e pigmentos fotossintéticos, foram estudados. Estes resultados permitem avaliar a requerimento metabólico e a tolerância do pinhão-mansão ao Zn, bem como inferir a possibilidade do uso desta espécie em projetos de revegetação de áreas contaminadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de pinhão-mansão foram colocadas para germinar em bandejas contendo vermiculita umedecida com solução de Ca $0,67 \text{ mmol L}^{-1}$ na

forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vilela e Anghinomi, 1984). Treze dias após o semeio, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo seis litros de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950, modificada), contendo: 105,05; 15,5; 117,3; 100,2; 24,3; 32,1; 0,65; 0,5; 0,05; 0,02; 0,5; 0,01; 7,35 mg L^{-1} de N, P, K, Ca, Mg, S, Cl, Mn, Zn, Cu, B, Mo e Fe, respectivamente, a qual foi substituída semanalmente. Adicionou-se diariamente água deionizada nos vasos para reposição da água perdida por evapotranspiração. O pH da solução foi ajustado sempre que necessário para valores próximos de 5,6 (+/- 0,2), sendo a correção efetuada com H_2SO_4 ou NaOH 1 mmol L^{-1} . Após 14 dias de cultivo, foram acrescentadas à solução doses de 100, 200, 300, 400 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Foi adotado um controle contendo 0,380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, (uma espécie vegetal com seis doses de Zn), com 3 repetições.

Depois da adição das doses de Zn, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 40 dias. Após esse período, procedeu-se a coleta e lavagem com água destilada das folhas, caule e raízes, sendo estes acondicionados em sacos de papel. As amostras foram mantidas em estufa a 65 °C com circulação forçada de ar até peso constante, obtendo-se a matéria seca das partes e total. Após secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey e acondicionadas em sacos plásticos. A digestão do material vegetal foi feita em ácidos nítrico e clorídrico em forno de microondas (Mars Xpress), segundo o método 3051A (USEPA - 1996) e submetido à digestão sulfúrica para determinação de N (Embrapa, 1999).

No extrato da digestão foram determinados os teores de Zn e Cu por espectrofotometria de absorção atômica (AAAnalyst 800). Também foram determinados os teores de Ca, Mg, Fe, Mn, Mo e B por espectrometria de emissão ótica (ICP-OES/Optima 7000, Perkin Elmer). Os teores de N, K e P, foram determinados por titulometria, fotometria e colorimetria, respectivamente. A partir dos teores dos elementos e da matéria seca, foram calculados os conteúdos dos elementos. Para avaliação da qualidade das análises para Zn foi utilizado um padrão do Nacional Institute of Standards and Technology (1570a-*Trace elements in spinach*), sendo obtida uma recuperação de 98%.

As medidas de fluorescência de clorofila foram efetuadas com um emissor de luz ultravioleta LED, com picos de comprimento de onda vermelho (685 nm) e vermelho distante (735 nm) obtidos pelo software do aparelho

(Ocean Optics-Spectra Suite). Foram efetuadas 5 avaliações ao longo do experimento. A primeira avaliação foi tomada antes da adição do Zn e a última um dia antes da coleta das plantas. Estas avaliações foram realizadas à noite a partir da permanência das plantas por 20 minutos no escuro, com o intuito de garantir a desativação do transporte de elétrons fotossintéticos. As medidas foram efetuadas no segundo par de folhas abaixo do meristema apical, sendo realizadas quatro leituras por planta, as quais foram submetidas à emissão de luz por 10 segundos cronometrados.

Os espectros obtidos foram ajustados a duas curvas Gaussianas correspondentes ao 685 nm e 735 nm. A razão entre a intensidade da fluorescência F685/F735 (Fr/FFr) de altura de pico foi calculada a partir da curva ajustada para cada uma das doses de Zn em solução e usadas para inferir sobre o efeito do elemento na biossíntese de clorofila e no PSII por meio do software Origin versão 6.0.

Para as análises bioquímicas, foi coletada uma amostra por planta do mesmo par de folhas utilizadas na avaliação da fluorescência de clorofila na última avaliação. Realizou-se a determinação dos conteúdos de clorofila a, clorofila b e carotenóides mediante extração com acetona 80% (Arnon 1949) e para determinação de carotenóides utilizou-se a equação segundo Lichtenthaler (1987).

O extrato bruto utilizado na determinação da atividade das enzimas e do teor de proteínas foi obtido através de homogeneização de 200 mg do material vegetal em almofariz, com N₂ líquido, e adicionado 2,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mmolL⁻¹, pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a - 80°C. Foram determinadas as atividade de catalase (CAT) (Havir e Mchale, 1987), polifenoloxidase (Kar e Mishra, 1976), peroxidase do ascorbato (APX) (Nakano e Asada, 1981) e teor de proteína solúvel (Bradford, 1976). Todas as determinações foram efetuadas por espectrofotometria.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e à análise de regressão com Software SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA

As produções de matéria seca das folhas e raízes foram reduzidas de forma quadrática, enquanto que a do caule decresceu linearmente com a adição das doses crescentes de Zn à solução nutritiva (Tabela 2.1). A aplicação de Zn promoveu resposta positiva no crescimento das plantas, evidenciando a sua essencialidade, e, em doses mais elevadas, um decréscimo acentuado neste crescimento (Figura 2.1). A dose 100 mol L⁻¹ de Zn em solução provocou o maior incremento na biomassa das plantas (Tabela 4). No entanto, cabe salientar o efeito benéfico do Zn para as plantas, uma vez que o suprimento de 100 µmol L⁻¹ possibilitou aumento de 788%, 146%, 428% na produção de matéria seca das folhas, caule e raízes, respectivamente, em relação ao controle. A dose tóxica de um elemento, segundo a Agência e Proteção Ambiental do EUA, corresponde a 50% de redução da matéria seca (King, 1996). No presente ensaio, esta dose foi 227 µmol L⁻¹. Observa-se que a dose 300 µmol L⁻¹ provoca ponto de inflexão na curva com acentuada queda na matéria seca das plantas.

Tabela 2.1. Matéria seca de plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva

Doses de Zn (µmol L ⁻¹)	Matéria seca, g vaso ⁻¹			
	Folhas	Caule	Raízes	Total
0,380	2,84	9,80	2,15	14,79
100	25,22	24,07	11,35	60,65
200	18,02	18,34	7,65	44,01
300	14,57	13,68	8,48	36,73
400	7,08	9,08	4,72	20,88
600	1,50	4,54	1,85	7,89
Variáveis	Equações de regressão ajustadas			
Matéria seca Folhas	$y = -0,0001^{**}x^2 - 0,067^{**}x + 9,7158$, R ² = 0,52 ^{**}			
Matéria seca Caule	$y = -0,0200^{*}x + 18,5854$, R ² = 0,38 [*]			
Matéria seca Raízes	$y = -0,0001^{**}x^2 + 0,0302^{*}x + 4,6530$, R ² = 0,56 ^{**}			
Matéria seca Total	$y = -0,0003^{**}x^2 + 0,1186^{*}x + 29,0710$, R ² = 0,54 ^{**}			

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

As condições de deficiência ou toxidez provocaram severas reduções de crescimento nas plantas. O decréscimo observado para a maior dose em

relação a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi de 94%; 81% e 84% para folhas, caule, raízes, nessa ordem. Como também reduções de 89%, 59% e 81% para folhas, caule, raízes, respectivamente, foram registradas para dose controle em relação a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$. Ambas as condições induzem profundas alterações moleculares, estruturais e metabólicas, com declínio das funções fisiológicas, tendo como consequência a diminuição de biomassa e produtividade (Solymosi e Bertrand, 2012).



Figura 2.1. Redução de crescimento e sintomas de toxidez de Zn em plantas de pinhão-mansão crescidas em solução nutritiva.

Os sintomas visuais de deficiência detectados nas plantas durante o ensaio foram clorose interneval (esbranquiçada) nas folhas novas, e algumas folhas exibiram coloração avermelhada, e severa restrição no crescimento das plantas, corroborando os resultados de Silva et al. (2009), no que se refere a omissão de Zn em pinhão-mansão. Zinco, juntamente com B e Cu, é um dos micronutrientes mais limitantes para produtividade do pinhão-mansão (Laviola e Dias, 2008). Silva et al. (2009) citam a sequência $\text{Fe} > \text{Cu} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{B}$ para a limitação de micronutrientes para produção de biomassa desta espécie. Chaves et al. (2010) afirmam que quando existe suprimento adequado de Zn, muitas espécies translocam quantidades apreciáveis do elemento das folhas

mais velhas para órgãos de crescimento. Lima et al. (2011) estudando a mobilidade de Zn em plantas de pinhão-manso verificaram intensa redistribuição de Zn das folhas mais velhas para os tecidos mais novos. No entanto, Lange et al. (2005) verificaram baixa redistribuição de Zn para folhas mais novas em mamona, planta da mesma família do pinhão-manso cultivada sob condição de deficiência. Kabata-Pendias (2010) cita que, apesar da alta mobilidade do Zn nas plantas, em condições de deficiência as mesmas podem apresentar baixa mobilidade, acumulando-se nas folhas mais velhas.

Os sintomas visuais de toxidez observados para a dose mais elevada ($600 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram clorose seguida de necrose nas folhas mais novas, com severa restrição no crescimento das plantas, sendo esta mais acentuada nas folhas, e necrose do meristema apical. Para as doses $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ verificou-se apenas a ocorrência da redução do crescimento e clorose nas folhas mais novas. Na dose $600 \mu\text{mol L}^{-1}$, o aparecimento dos sintomas visuais teve início na segunda semana de tratamento, e nas demais doses apenas após a terceira semana de tratamento. Nas raízes, além da redução do crescimento, observou-se também escurecimento, comportamento não verificado em condição de deficiência (Figura 2.1).

TEOR DE Zn NAS PLANTAS

O aumento das doses foi acompanhado pelo acúmulo de Zn nas folhas e caule de forma quadrática, enquanto que, nas raízes, este aumento ocorreu linearmente (Figura 2.2). Considerando que o maior acúmulo foi verificado na dose $400 \mu\text{mol L}^{-1}$, o incremento em relação ao controle foi de até 2825% e 2804%, nas folhas e caule, respectivamente. Avaliando a dose $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ em relação ao controle, o acréscimo verificado foi de 26062%.

A partir da dose $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, os teores de Zn encontrados nas folhas estiveram na faixa de 296 a 842 mg kg^{-1} , teores considerados tóxicos para a maioria das espécies. Isto demonstra a interferência do acúmulo de Zn a partir dessa dose na biossíntese normal das plantas, coincidindo com significativa redução na matéria seca. Verificou-se também que as plantas em melhor status nutricional visual ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) acumularam 213 mg kg^{-1} nas folhas.

Apesar da toxidez, o acúmulo de Zn nas raízes de 4399 mg kg^{-1} para dose $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ indica o potencial desta espécie para tolerar teores elevados de Zn no solo imobilizando-os nas raízes. Logo, comparando a distribuição do

teor nas folhas em relação às raízes, observa-se para 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a relação de 6 vezes maior o acúmulo nas raízes para ambas doses. Sendo interessante destacar que a dose 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$ não inibiu a translocação do Zn para parte aérea. No entanto, a maior dose (600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de Zn apresentou a relação 11 vezes maior o acúmulo de Zn nas raízes em comparação com a folha.

A translocação de metais pesados pode ser limitada pelo sequestro do metal, o qual se concentra no vacúolo das células radiculares (Verbruggen et al. (2009). Sendo assim, observa-se que a baixa translocação de metais para parte aérea é considerado mecanismo importante para imobilização de metais em áreas contaminadas, pois reduz a transferência de metais do solo por erosão e lixiviação (Soares et al., 2001b; Melo et al., 2009).

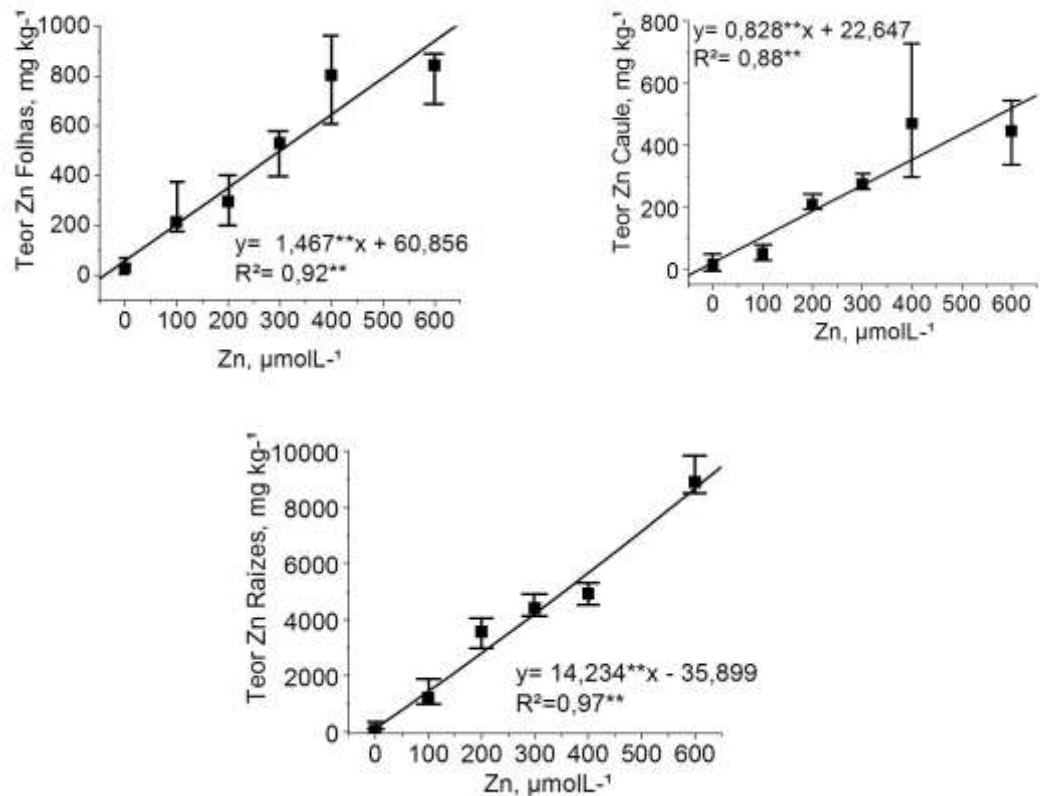


Figura 2.2. Teor de Zn em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5, 1% de probabilidade, respectivamente.

Alguns autores têm demonstrado que o pinhão-mansó apresenta tolerância a metais pesados (Juwarkar et al., 2008; Jamil et al., 2009; Yadav et al., 2009, Chaves et al., 2010). Plantas tolerantes a metais pesados podem

desenvolver três estratégias para manter a homeostase de metais. Uma delas é a exclusão, em que os metais são excluídos ou tem sua absorção limitada, reduzindo sua concentração nas células; outra é o sequestro de metais em vacúolos ou seu efluxo para o citoplasma. Na terceira estratégia, praticada por espécies hiperacumuladoras, os metais são eficientemente transportados para os vacúolos por vários transportadores específicos (Lin e Aarts, 2012). No entanto, pode-se inferir que, apesar do pinhão-manso apresentar relativa tolerância em acumular elevados teores nas raízes, a concentração de 8899 mg kg⁻¹ observado na maior dose (600 molL⁻¹) promoveu severa toxicidade devido a perda da capacidade de retenção nas raízes da grande quantidade de Zn absorvido. O efeito tóxico de metais pesados em plantas ocasiona deterioração celular e consequente morte de tecidos (Kopittke et al., 2007; Sagardoy et al., 2008; Costa et al., 2012)

TEOR DE NUTRIENTES

Um dos efeitos da toxicidade por Zn nas plantas foi a redução de todos os nutrientes avaliados (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, B e Mo) (Tabela 2.2). Alguns estudos têm demonstrado que o desbalanço nutricional é um sintoma de toxidez desencadeado pelo acúmulo de metais pesados nas plantas (Bonnet et al., 2000; Martin et al., 2012; Safarzadeh et al., 2013; Lima et al., 2013).

Kupper et al. (1998) citam interferência dos elevados teores de Zn nas plantas reduzindo o conteúdo de Mg provocado por substituição do Zn por Mg na molécula de clorofila. Sagardoy et al. (2009) observaram reduções nas concentrações de nutrientes em plantas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) sob estresse de Zn cultivadas em solução nutritiva. Estes autores ressaltaram que um dos sintomas de toxicidade por Zn foi a interferência na absorção do Fe induzindo sua deficiência. Bonnet et al. (2000) citam que as reduções nos conteúdos de P, Ca, K, Mg, e Cu em folhas de azevém (*Lolium perene*) cultivadas sob doses de Zn provocam distúrbios em processos metabólicos, incluindo a fotossíntese e a assimilação do nitrogênio. Tewari et al. (2008) avaliando a toxicidade por Zn em plantas de amoreira (*Morus alba* L.) observaram decréscimo nas concentrações de Fe, Mn, e Cu em folhas novas e também o incremento de H₂O₂, induzindo estresse oxidativo. Wang et al.

(2009) observaram maiores decréscimos nos conteúdos de Cu, Fe, Mg e Mn nas raízes do que nas folhas de colza (*Brassica napus*) sob estresse de Zn. Cambrollé et al. (2013) avaliando o estresse por Zn em *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boss (arbusto costeiro) observaram reduções nas concentrações de Cu e Fe nas folhas, embora o conteúdo destes metais foram praticamente inalterados nas raízes.

Tabela 2.2. Equações de regressão dos conteúdos de nutrientes em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva.

Variáveis	Equações de Regressão Ajustadas
Conteúdo N Folhas, g vaso ⁻¹	$y = -0,4x 10^{-5}x^2 + 0,0020x + 0,3093, R^2 = 0,53^{**}$
Conteúdo N Caule, g vaso ⁻¹	$y = 0,000x^2 - 0,0001x + 0,0489, R^2 = 0,61^{**}$
Conteúdo N Raiz, g vaso ⁻¹	$y = 0,2x10^{-5}x^2 + 0,0008x + 0,1033, R^2 = 0,54^{**}$
Conteúdo P Folhas, g vaso ⁻¹	$y = -0,6x10^{-5}x^2 + 0,0025x + 0,4918, R^2 = 0,53^{**}$
Conteúdo P Raiz, g vaso ⁻¹	$y = -0,4x10^{-5}x^2 + 0,0019x + 0,2037, R^2 = 0,54^{**}$
Conteúdo K Folha, g vaso ⁻¹	$y = -0,7x10^{-5}x^2 + 0,0037x + 0,3213, R^2 = 0,66^{**}$
Conteúdo K Caule, g vaso ⁻¹	$y = -0,3x10^{-5}x^2 + 0,0014x + 0,3351, R^2 = 0,67^{**}$
Conteúdo K Raiz, g vaso ⁻¹	$y = -0,3x10^{-5}x^2 + 0,0015x + 0,1784, R^2 = 0,55^{**}$
Conteúdo Ca Folhas, mg vaso ⁻¹	$y = -0,41x10^{-5}x^2 + 0,0002x + 0,369, R^2 = 0,51^*$
Conteúdo Mg Caule, g vaso ⁻¹	$y = -0,084x + 62,75, R^2 = 0,51^*$
Conteúdo Mg Raízes, g g vaso ⁻¹	$y = -0,5x10^{-7}x^2 + 0,0002x + 0,044, R^2 = 0,52^*$
Conteúdo Cu Folhas, mg kg ⁻¹	$y = 0,1x10^{-5}x^2 + 0,0003x + 0,057, R^2 = 0,70^{**}$
Conteúdo Cu Caule, mg kg ⁻¹	$y = 0,1x10^{-4}x + 0,086, R^2 = 0,41^{**}$
Conteúdo Cu Raízes, mg kg ⁻¹	$y = -0,1x10^{-5}x^2 + 0,0003x + 0,040, R^2 = 0,58^{**}$
Conteúdo Fe Folhas, mg vaso ⁻¹	$y = -0,00001x^2 + 0,004x + 0,909, R^2 = 0,44^*$
Conteúdo Mn Folhas, mg vaso ⁻¹	$y = -0,2.10^{-4}x^2 + 0,0103x + 1,234, R^2 = 0,68^*$
Conteúdo Mn Caule, mg vaso ⁻¹	$y = -0,1x10^{-4}x^2 + 0,0057x + 0,637, R^2 = 0,94^*$
Conteúdo Mn Raízes, mg vaso ⁻¹	$y = 0,006x + 1,117, R^2 = 0,54^*$
Conteúdo B Folhas, mg vaso ⁻¹	$y = -0,0000x^2 + 0,0001x + 0,0436, R^2 = 0,45^*$
Conteúdo Mo Folhas, mg vaso ⁻¹	$y = -0,000028x + 0,116, R^2 = 0,33^*$

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

O desbalanço nutricional em plantas provocado por outros metais pesados também foi citado por Li et al. (2010) avaliando a toxicidade de Pb e Cd em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) observaram nas folhas de correlação positiva para concentração dos teores de Pb com os de Fe, Mn e Ni, e dos teores de Cd e Ni, e também correlações negativas entre os teores de Cd, Fe e Mn. Costa et al. (2012), avaliando a toxicidade por Cd em mamona, verificaram correlação positiva entre Cd e Ca, Cu, Fe, Mn e Zn nas raízes, pois o elevado potencial fitotóxico do Cd, ocasiona deterioração celular das raízes e

consequentemente interfere na permeabilidade da membrana induzindo ao acúmulo indiscriminado de nutrientes. No entanto, Zhao et al. (2012), avaliando a toxicidade por Mn em *Phytolacca americana*, verificaram que não houve desbalanço nutricional nas plantas e apontam outros efeitos positivos na tolerância dessa espécie em acumular 5996 mg kg^{-1} de Mn nas folhas, entre os quais citam a elevação da atividade enzimática superóxido de hidrogênio e catalase, comportamentos não verificados nas plantas à toxicidade por Zn e Cu.

As plantas com sintomas de deficiência e toxidez por Zn reduziram 96% e 91% de Fe nas folhas, respectivamente, em relação a dose $100 \mu\text{molL}^{-1}$. Isto confirma o severo desbalanço de Fe para ambas as situações de estresse. Lin e Aarts (2012) ressaltam que o mecanismo de homeostase de um metal essencial é mais fácil de ser controlado em condição de deficiência do que em níveis tóxicos. As implicações sobre o metabolismo das plantas tanto em condições de deficiência como toxidez inibiram a capacidade fotossintética das plantas, pois o declínio de Fe e outros micronutrientes são relevantes para o metabolismo fotossintético, uma vez que, participam tanto da constituição celular, como também de reações enzimáticas e de oxirredução (Hansch e Mendel, 2009). As reduções nos conteúdos de Mg nas folhas de 77 % e 96% para as plantas cultivadas nas doses controle (deficiência) e $600 \mu\text{molL}^{-1}$ (toxicidade), respectivamente, em relação a dose $100 \mu\text{molL}^{-1}$ foi outro fator que implica em declínio da atividade fotossintética principalmente porque o Mg é um elemento abundante no citosol, e interage com ligantes nucleófilos, propriedade qual possibilita sua presença no centro da molécula de clorofila e também como constituinte na agregação de ribossomos. Além da participação na atividade enzimática da RNA-polimerase, ATPase, fosfatase, e na síntese de glutatona e carboxilase (Shaul, 2002).

FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA

Os espectros apresentaram diferenças nos picos de absorção da fluorescência de clorofila (Figura 2.3A e 2.3B). Verificou-se que os espectros das plantas sob cultivo em condições de toxicidade e deficiência foram distintos, com menor pico observado em condição de estresse sob toxicidade por Zn.

As folhas de pinhão-manso analisadas parecem ter propriedades anatômicas que dificultam a detecção da fluorescência de clorofila, apesar do baixo conteúdo de pigmentos fotossintéticos. Buschmann (2007) afirma que propriedades ópticas das folhas têm um papel importante na passagem da fluorescência de clorofila, e podem ser específicas para diferentes espécies vegetais, assim como, a idade da folha.

Segundo Silva et al. (2012), a diminuição da razão Fr/FFr ocorre quando a concentração de clorofila aumenta, indicando maior reabsorção de fluorescência no comprimento 685 nm detectando condições de funcionamento normal do aparato fotossintético. Contudo, como citado anteriormente a razão Fr/FFr não confirmou a inibição do funcionamento de clorofila em plantas com deficiência de Zn. Morales et al. (2000) verificaram que a medida da fluorescência de clorofila pode também ser uma ferramenta potencial para detectar alterações na fluorescência de clorofila em plantas cultivadas sob deficiência, observando esse efeito para Fe. Pois os sintomas de deficiência são provenientes de modificações exteriores ocasionadas por danos bioquímicos que ocorrem em nível molecular e celular nos tecidos vegetais. Esses danos podem ser reproduzidos em plantas de espécies diferentes, uma vez que os processos bioquímicos exercem funções específicas, que variam pouco entre espécies (Silva et al., 2009).

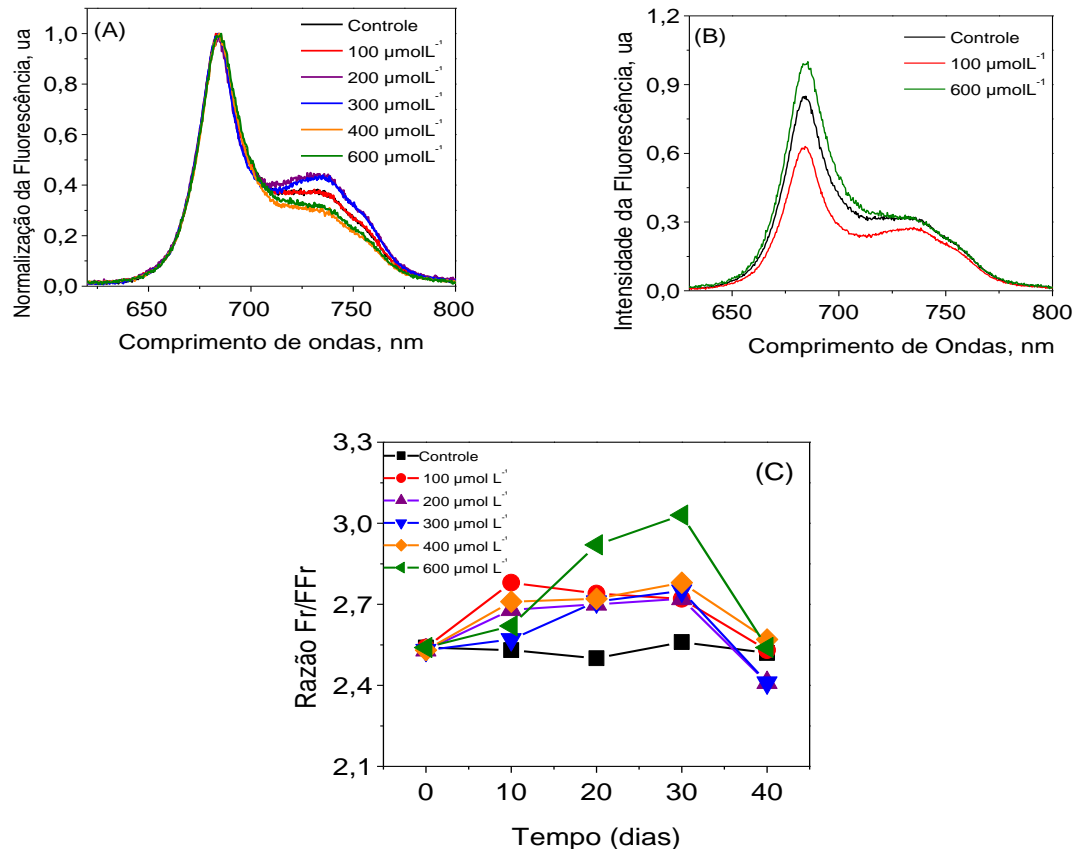


Figura 2.3. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva (A e B) aos 40 dias. Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho e vermelho distante (Fr/FFr) (C).

De maneira geral a razão Fr/FFr das plantas controle foram praticamente constantes ao longo do ensaio, sendo que as plantas apresentaram baixo índice de emissão de folhas. As leituras foram realizadas praticamente na mesma folha em todas as avaliações, e estas não apresentaram clorose, podendo ter possibilitado essa constante nos resultados (Figura 2.3C).

Observou-se que a avaliação temporal indicou maior elevação da razão Fr/FFr para dose (600 µmol L⁻¹), exceto após os 30 dias de avaliação. A partir deste período as plantas apresentaram decréscimos e igualaram-se, exceto para as doses 200 e 400 µmol L⁻¹. Pode-se inferir que declínio da razão Fr/FFr das plantas aos 40 dias de tratamento indica melhor adaptação das plantas a condições de estresse.

A detecção precoce da toxicidade por Zn em plantas também foi demonstrado para Cd (Baryla et al., 2001; Maurya e Gopal, 2008; Silva et al.,

2012), como também para Ni (Gopal et al., 2002; Mishra e Gopal, 2008), e Cu e Hg (Ventrela et al., 2009).

Bonnet et al. (2000) verificaram declínio na capacidade de transporte de elétrons em plantas submetidas a estresse de Zn, representada pela redução na razão Fv/Fm, parâmetro também utilizado para avaliar alteração no PSII. De acordo com Buschmann (2007), a razão Fr/FFr depende principalmente do conteúdo da clorofila, e em menor relevância da atividade fotossintética e das características ópticas e arranjos celulares do tecido foliar. No entanto, Cherif et al. (2010) citam que aumento da razão Fr/FFr não é apenas indicativo de redução do conteúdo de clorofila, mas pode também ser elevada quando o processo fotossintético de conversão de quantum é afetado.

PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL

O conteúdo de pigmentos foi influenciado significativamente pela adição das doses de Zn (Tabela 2.3). O comportamento quadrático do conteúdo de pigmentos, demonstra sua função do Zn como micronutriente e seu efeito tóxico em doses elevadas. Verifica-se que o conteúdo de clorofilas (a e total) e carotenóides aumentaram 174%, 137% e 42%, respectivamente, com relação ao controle quando adicionado $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. O aumento da concentração de clorofila indica condições de biossíntese normal do aparato fotossintético, conseqüentemente, maior produção de biomassa.

A inflexão da curva na dose $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 2.3) coincide com os efeitos de toxidez observados visualmente, que promoveram reduções de 65, 56, 63 e 40 % no conteúdo de clorofilas a, b, total e carotenóides, respectivamente. A redução da concentração de clorofilas e carotenóides também são sintomas comuns ocasionados por estresse de metais pesados (Joshi e Mohanty, 2004; Cambrollé, 2012; Cambrollé, 2013). O conteúdo de pigmentos fotossintético é indicador sensível do status fisiológico das plantas. No entanto, os métodos para a sua determinação são invasivos, lentos e trabalhosos (Peñuelas e Filella, 1998), razão pela qual a correlação destas com a fluorescência de clorofila pode ser utilizada para avaliação do estresse.

Não foi verificada alteração significativa para a catalase, polifenoloxidase, peroxidase do ascorbato e proteína solúvel. No entanto, observou-se para atividade da polifenoloxidase e peroxidase do ascorbato, tendência à elevação até a dose $300 \mu\text{mol L}^{-1}$, mantendo-se constante. Para

atividade da catalase e conteúdo de proteína solúvel, observou-se tendência de aumento até a dose 400 mol L⁻¹, com posterior declínio.

Tabela 2.3. Conteúdo de pigmentos em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Zn

Doses de Zn ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenóides
	mg g ⁻¹ de matéria fresca			
0,380	0,466	0,258	0,724	0,366
100	1,276	0,437	1,713	0,519
200	1,203	0,426	1,629	0,502
300	0,939	0,305	1,244	0,449
400	0,443	0,188	0,632	0,329
600	0,447	0,193	0,640	0,313
Variáveis	Equação de regressão ajustadas			
Clorofila a	$y = -0,0000x^2 + 0,00219x + 0,7530$, R ² = 0,44**			
Clorofila Total	$y = -0,6 \times 10^{-5}x^2 + 0,00246x + 1,0866$, R ² = 0,45**			
Carotenóides	$y = -0,1 \times 10^{-4}x^2 + 0,0004x + 0,4217$, R ² = 0,56**			

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Yadav et al. (2009) observaram que o estresse causado por Cromo (Cr) em plantas de pinhão-mansó cultivadas em solos contendo 0, 25, 50, 100 e 250 mg kg⁻¹ de Cr, elevaram os teores das enzimas antioxidantes catalase, peroxidase do ascorbato e glutatona S-transferase à medida que aumentava o acúmulo de Cr na planta. Isto ressalta a importância da síntese dessas enzimas na inibição da toxicidade. A elevação da atividade enzimática é uma importante estratégia de tolerância de plantas sob estresse de metais pesados, principalmente por inibir a produção de espécies reativas de oxigênio (Sun et al., 2007; Jamil et al., 2009; Yadav et al., 2009; Lin e Aarts, 2012; Juknys et al., 2012). Sendo assim, em espécies de plantas sensíveis a metais pesados, o conteúdo de espécies reativas de oxigênio aumenta consideravelmente se não houver um mecanismo eficiente de enzimas antioxidantes. Conseqüentemente, o dano celular induzido por espécies reativas de oxigênio resultará em morte celular, afetando o funcionamento fotossintético das plantas (Sharma e Dietz, 2009). Cabe salientar a relativa tolerância das plantas de pinhão-mansó, visto que a atividade enzimática não apresentou declínio em condições de estresse de Zn. Este fato, aliado a outras observações sobre a tolerância da espécie à Zn, pode ser útil para sua utilização em projetos de revegetação de áreas contaminadas pelo elemento. Neste caso, como se trata de uma espécie

oleaginosa, a produção de óleo não comestível, especialmente para biodiesel, pode ser uma alternativa viável ambientalmente e geradora de renda durante o processo de remediação da área.

CONCLUSÕES

A medida da fluorescência de clorofila detectou precocemente a toxicidade por Zn e indicou potencial para monitorar áreas contaminadas por este metal. A razão Fr/FFr foi sensível para elucidar alterações no PSII em plantas de pinhão-mansão com sintomas de toxicidade provocados por Zn.

A dose $227 \mu\text{molL}^{-1}$ de Zn foi correspondente a redução de 50% da matéria seca.

A deficiência e toxicidade por Zn provocaram desbalanço nutricional e reduziram as concentrações de pigmentos nas folhas.

O pinhão-mansão apresentou relativa tolerância à toxicidade por Zn não demonstrando redução na atividade de enzimas antioxidantes e conteúdo de proteína solúvel nas folhas, e pode ser indicado como espécie promissora para programas de fitorremediação de áreas contaminadas por este metal.

REFERÊNCIAS

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

BABULA, P.; ADAM, V.; OPATRILOVA, R.; ZEHNÁLEK, J.; LADISLAV HAVEL, L.; KIZEK, R. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p.6, v. 189–213, 2008.

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

BONNET, M.; CAMARES, O.; VEISSEIRE, P. Effect of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 945–953, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.

BROADLEY, M. R. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, p. 677–702. 2007.

BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leave. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261–271, 2007.

CAMBROLLÉ, J., MATEOS-NARANJO, E., REDONDO-GÓMEZ, S., LUQUE, T., FIGUEROA, M. E. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz.. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 57–64, 2011.

CAMBROLLÉ, J., MANCILLA-LEYTON, J. M., MUNOZ-VALLES, S., LUQUE, T., FIGUEROA, M. E. Zinc tolerance and accumulation in the salt-marsh shrub *Halimione portulacoides*. **Chemosphere**, v. 86, p. 867–874, 2012.

CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTON, J. M.; MUNOZ-VALLES, S.; FIGUEROA-LUQUE, E.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85, p.50–57, 2013.

CHAVES, L. H. G.; MESQUITA, E. F. de; ARAUJO, D. L. de; FRANÇA, C. P. DE. Crescimento, distribuição e acúmulo de cobre e zinco em plantas de pinhão-manso. **Revista Ciência Agronômica**, v. 41, p. 167–176, 2010.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G.; KRAMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 309–315, 2002.

CORCOLL, N.; BONET, B.; LEIRA, M.; GUASCH, H. Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 673, p. 119–136, 2011.

COSTA, E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; MELO, É. E. C.; RIBEIRO, B. T.; SANTOS, E., SEVERINO, E. C., FAQUIN, V.; HALE, B. A. Assessing the tolerance of castor bean to Cd and Pb for phytoremediation purposes. **Biological Trace Element Research**, v.145, p. 93–100, 2012.

CUNHA, K. C. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; PIMENTEL, R. M. M., ACCIOLY, M. A.; SILVA, A. J. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1319–1328, 2008.

CHERIF, J.; DERBEL, N.; NAKKACH, M.; BERGMANN, H. V.; JEMAL, F.; Lakhdar, Z. B. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology**, v. 101, p.332–339, 2010.

DEELL, J. R.; VAN KOOTEN, O.; PRANGE, R. K.; MURR, D. P. Application of chlorophyll fluorescence techniques in postharvest physiology. **Horticultural Reviews**, v. 23, 169–197, 1999.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA–EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36–41, 2008.

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

GALLEGO, S.; PENA, L. B.; BARCIA, R. A.; AZPILICUETA, C. E.; LANNONE, M. F.; ROSALES, E. P.; ZAWOZNIK, M. S.; GROPPA, M. D.; BENAVIDES, M. P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p.33–46, 2012.

GOPAL, R.; MISHRA, K. B.; ZEESHAN, M.; PRASAD, S. M.; JOSHI, M. M. Laser-induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress. **Current Science**, v. 83, p. 880–884, 2002.

HANSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 259–266, 2009.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tabocco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: University of California, 1950. p. 32 (Circular, 347).

JAMIL, S.; ABHILASH, P. C.; SINGH, N.; SHARMA, P. N. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 269–275, 2009.

JOSHI, M. K; MOHANTY, P. chlorophyll a fluorescence as a probe of heavy metal ion toxicity in plants. 2004 In: **Advances in Photosynthesis and Respiration, Chlorophyll a Fluorescence**, v. 19, p. 637–651.

JUKNYS, R.; VITKAUSKAITE, G.; RAČAITE, M.; VENCLOVIENE, J.; The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. **Central European Journal of Biology**, v. 7, p. 299–306, 2012.

JUWARKAR, A. A.; YADAV, S. K. ; KUMAR, P.; SINGH, S. K. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.145, p.7–15, 2008.

KABATA–PENDIAS, A. **Trace Elements in soils and plants**. 4 ed. Boca Raton, CRC, 2010. 505p.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315–319, 1976.

KING, L. D. Soil heavy metals. In ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E.; FONTES, M. P. **Os solos nos grandes domínios do Brasil e o desenvolvimento**

sustentado. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 823–836, 1996.

KRAMER U, TALKE I, HANIKENNE M. Transition metal transport. **Febs Letters**, v. 581, p. 2263–2272, 2007.

KOPITTKE. P. M.; COLIN J. ASHER, C. J.; MENZIES, N. W. Toxic effects of Ni^{2+} on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant Soil**, p. 283–289, 2007.

KUPPER, H.; KUPPER, F.; SPILLER, M. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. **Photosynthesis Research**, v. 58, p. 123–133, 1998.

LANGE, A.; MARTINES, A. M.; SILVA, M. A. C. DA; SORREANO, M. C. M.; CABRAL, C. P.; MALAVOLTA, E. Efeito de deficiência de micronutrientes no estado nutricional da mamoneira cultivar Iris. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.61–67, 2005.

LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. dos S. Teor e acúmulo de nutrientes em folhas e frutos de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p.1969 –1975, 2008.

LI, B., WANG, X., QI, X., HUANG, L., YE, Z. Identification of rice cultivars with low brown rice mixed cadmium and lead contents and their interactions with the micronutrients iron, zinc, nickel and manganese. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24 p. 1790–1798, 2010.

LICHTENTHALER H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R (eds) **Methods in Enzymology**. Academic Press, NewYork, p 350–382.

LIN, Y.; AARTS, M. G. M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3187–3206, 2012.

LIMA, F. DE S.; NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. DE A.; SOUSA, C. DA S.; CUNHA FILHO, F. F. DA. Bioconcentração de chumbo e micronutrientes em hortaliças cultivadas em solo contaminado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p.234–241, 2013.

LIMA, R. L. S.; SEVERINO, L. S.; CAZETTA, J. O.; AZEVEDO, C. A. V. DE; SOFIATTI, V.; ARRIEL, N. H. C. Redistribuição de nutrientes em folhas de pinhão-mansão entre estádios fenológicos. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, p.1175–1179, 2011.

MARTIN, S. R., LLUGANY, M., BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, C. Cadmium exclusion a key factor in differential Cd-resistance in *Thlaspi arvense* ecotypes. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 729–734, 2012.

MATILLA-VÁZQUEZ, M.; MATILLA, A. (2012) Role of H₂O₂ as signaling molecule in plants. In: **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**, Springer, New York, p 361–380.

MAURYA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser-induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

MAURYA, R.; PRASAD, S. M.; GOPAL, R.; LIF technique offers the potential for the detection of cadmium-induced alteration in photosynthetic activities of *Zea Mays* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 9, p. 29–35, 2008.

MELO, E. E. C.; COSTA, E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; NASCIMENTO, C. W. A. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean

plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials**, v.168, p. 479–483, 2009.

MISHRA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p.157–173, 2008.

MORALES, F., BELKHODJA, R., ABADIA, A., ABADIA, J. Photosystem II efficiency and mechanisms of energy dissipation in iron-deficient, field-grown pear trees (*Pyrus communis* L.). **Photosynthesis Research**, v. 63, p.9–21, 2000.

NAKANO, Y; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p.1068–1072, 1981.

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, v. 63, p. 299–311, 2006.

PEÑUELAS, J.; FILELLA, I.; Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological *status*. **Trends in Plant Science**, p. 151–156, 1998.

SAGARDOY, R.; MORALES, F; LÓPEZ-MILLÁN, A-F; ABADÍA, A.; ABADÍA, J.; Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v.11, p. 339–350, 2009.

SALT, D. E.; PRINCE, R. C.; BAKER, A. J. M.; RASKING, J.; PICKERING, I. J. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy. **Environmental Science Technology**, v. 33, p.713–717, 1999.

SAFARZADEH, S.; RONAGHI, A.; KARIMIAN, N. Effect of cadmium toxicity on micronutrient concentration, uptake and partitioning in seven rice cultivars. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, p. 231–245, 2013.

SHAUL, O. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. **BioMetals**, v. 15, p. 309–323, 2002.

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

SILVA JUNIOR, E. A. da. Estudo de estresse abiótico em cana-de-açúcar e pinhão manso por fluorescência de clorofila. 2011.73f. Dissertação (Mestre em Física Aplicada) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, A. J. DA; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. DA S.; SILVA-Jr, E. A. da. LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, p. 3527–3533, 2012.

SILVA, E. B. de; TANURE, L. P. P.; SANTOS, S. R.; RESENDE Jr, P. S. DE. Sintomas visuais de deficiências nutricionais em pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.392–397, 2009.

SOARES, C. R. F. S.; GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; CARVALHO, J. G. de C.; MOREIRA, F. M. S. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 339–348, 2001a.

SOARES, C. R. F. S.; ACCIOLY, A. M. de A.; MARQUES, T. C. L. L. de S.; SIQUEIRA, M. J. O. do; MOREIRA, F. M. S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, p. 302–315, 2001b.

SOLYMOSI, K.; BERTRAND, M. Soil metals, chloroplasts, and secure crop production: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 32, p. 245–272, 2012.

SUN, R-L; ZHOU, Q-X; SUN, F-H; JIN, C-X. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, 468–476, 2007.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 171, p. 286–294, 2008.

USEPA - MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES. Method 3051A, CD-ROM, 1996.

VENTRELA, A.; CATUCCI, L.; PILETSKA, E.; PILETSKY, S.; AGOSTIANO, A. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 19–25, 2009.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759–776, 2009.

VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de sojas afetadas pela interação alumínio-fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p. 91–96, 1984.

VITOSH, M. L.; WARNCKE, D. D.; LUCAS, R. E. Secondary and micronutrients: for vegetables and field crops. 1994. Disponível em: <<https://www.msu.edu/~warncke//E0486.pdf>>. Acesso em: 10/10/2012.

WU, G.; KANG, H.; ZHANG, X.; SHAO, H.; CHU, L.; RUAN, C.; A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues,

progress, eco-environmental concerns and opportunities. **Journal of Hazardous Materials**, v. 174, p.1–8, 2010.

WANG, C.; ZHANG, S. H.; WANG, P. F.; HOU, J.; ZHANG, W. J.; LI, W.; LIN, Z. P.; The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. p. 1468–1476, 2009.

YADAV, S. K.; JUWARKAR, A. A; KUMAR, G. P.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; CHAKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L. Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, v. 100 p. 4616–4622, 2009.

ZHAO, H.; WU, L.; CHAI, T.; ZHANG, Y.; TAN, J.; MA, S. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca Americana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1243–1252, 2012.

CAPÍTULO III

ALTERAÇÕES NO FOTOSSISTEMA II, COMPOSIÇÃO MINERAL E
PRODUÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha
curcas* L.) EXPOSTO A DOSES DE CHUMBO

ALTERAÇÕES NO FOTOSSISTEMA II, COMPOSIÇÃO MINERAL E
PRODUÇÃO DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PINHÃO-MANSO (*Jatropha
curcas* L.) EXPOSTO A DOSES DE CHUMBO

RESUMO

O monitoramento da contaminação por Pb, assim como alternativas de recuperação de áreas contaminadas é de grande relevância para redução de impactos ambientais. Considerando que o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie promissora para fitoestabilizar áreas contaminadas por metais pesados, o presente trabalho avaliou o acúmulo, distribuição e toxicidade por Pb em plantas de pinhão-manso. A técnica da fluorescência de clorofila foi utilizada para avaliar as alterações provocadas pelo metal na atividade fotossintética. Adicionalmente, a composição mineral, a atividade de enzimas antioxidantes, proteínas solúveis e pigmentos fotossintéticos foram também estudados. Para esta finalidade, plantas de pinhão-manso foram cultivadas durante 40 dias em solução nutritiva com cinco doses de Pb (25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e um controle, sem adição do metal, foi adotado. A fluorescência de clorofila detectou alterações no PSII em plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb, indicando relevância da técnica para monitoramento ambiental de área contaminada pelo metal. As doses de Pb provocaram alterações na composição mineral das plantas, com redução nas concentrações de N, P, Cu e Zn nas folhas. A toxicidade por Pb não provocou efeitos deletérios nos teores de Fe, Mg e pigmentos foliares, apesar das razões Fr/FFr verificarem alterações no *status* fisiológico das plantas. A toxicidade por Pb em pinhão-manso não provocou alterações na atividade de enzimas antioxidantes e nas proteínas solúveis nas folhas.

Palavras-chave: Contaminação. Monitoramento. Metabolismo fotossintético.

ALTERATIONS IN PHOTOSYSTEM II, MINERAL COMPOSITION AND
DEFENCE-RELATED ENZYMES ACTIVITY IN JATROPHA PLANTS
EXPOSED TO LEAD

ABSTRACT

The monitoring of Pb contamination as well as the study of techniques for remediation of Pb affected areas is of great relevance for ameliorating environmental impacts. Taking into account that jatropha (*Jatropha curcas*) is a promising candidate to Pb phytostabilization, the work was carried out to evaluate the effects of Pb doses on the accumulation, distribution and toxicity in jatropha plants. The X-ray chlorophyll fluorescence was used to assess the effects of Pb on the photosynthetic activity. Additionally, the mineral composition, antioxidative enzymes activity, soluble proteins and photosynthetic pigments were also studied. Jatropha plants were grown in a nutrient solution with five Pb doses (25, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) besides a control with no Pb addition. Fluorescence of chlorophyll detected alterations in the photosystem II therefore this technique is relevant to monitoring of Pb contaminated areas. Pb doses provoked alterations in the mineral composition of plants with decreased concentrations of N, P, Cu, and Zn in leaves. The Pb toxicity did not cause deleterious effects on Fe, Mg and foliar pigments in spite of the Fr/FFr ratio has detected changes in the physiological status of plants. On the other hand, Pb toxicity did not affect antioxidative related-enzymes activity or soluble proteins in leaves.

Keywords: Contamination. Monitoring. Photosynthetic metabolism.

INTRODUÇÃO

A entrada de metais pesados na atmosfera, água e solo e posterior transferência do solo para as plantas, promove efeitos adversos como fitotoxicidade e contaminação da cadeia trófica, refletindo diretamente na qualidade de vida. O Pb é um metal pesado que tem provocado grandes problemas ambientais, por isso alguns estudos têm avaliado seu potencial de difusão nos ecossistemas. Uma fonte pontual considerada mais relevante para contaminação ambiental por Pb é a atividade de refinaria do metal (Paoliello et al., 2002). Outras atividades antropogênicas geradoras de emissões oriundas de diversos processos industriais, incineração de resíduos, fabricação de cimento, queima de combustíveis e produção de energia também adicionam Pb ao meio (Kabata-Pendias, 2010; Toledo et al., 2008).

Haiyan e Stuanes (2003), investigando o acúmulo de metais pesados durante quatro anos em área industrial, verificaram predominância de Pb nas partículas de poeira e maior teor em plantas de áreas industriais próximas às emissões das chaminés do forno de fundição, enquanto que as partículas menores foram depositadas no solo principalmente por precipitação. Os autores ainda ressaltaram que os aspectos negativos para contaminação ambiente não ocorrem apenas localmente, mas também em áreas vizinhas. Ren et al. (2006), investigando a concentração de Pb em diferentes locais, verificaram concentrações de Pb nesta ordem decrescente: área industrial, creches, jardim residencial, parque público, área comercial e fazenda, quais registraram teores médios de 1723, 135, 99, 99, 67, 35 mg kg⁻¹ de solo, respectivamente, sendo o teor mais elevado (15127 mg kg⁻¹ de Pb no solo) observado próximo à área do forno de fundição. Brait e Antoniosi Filho (2010), avaliando a qualidade do ar, verificaram concentrações médias de Pb de 6,7 µg⁻¹ m² dia⁻¹ sendo o maior valor detectado em áreas de maior intensidade de trânsito.

O monitoramento ambiental da contaminação por Pb, e também a recuperação das áreas contaminadas, é de grande relevância para sustentabilidade dos ecossistemas. Nascimento e Xing (2006) citam como estratégias para recuperação de áreas contaminadas a fitoestabilização, prática que visa o estabelecimento de espécies vegetais tolerantes à concentrações elevadas de metais pesados nos solos. Esta prática, além de

desempenhar papel de proteção do solo, imobiliza o metal pesado *in situ*. A fitoestabilização é uma técnica que reduz o risco de difusão da contaminação pois atua como barreira diminuindo a transferência do metal pesado para outros ambientes, por meio de processos como erosão e lixiviação.

Alguns estudos têm demonstrado que o pinhão-manso apresenta tolerância a metais pesados (Juwarkar et al., 2008; Jamil et al., 2009; Yadav et al., 2009) podendo ser indicada como espécie relevante para fitoestabilizar áreas contaminadas por metais pesados, com vantagem de atribuir valor econômico no período de recuperação da área, visto que é atualmente considerada espécie oleaginosa não comestível promissora para produção de biocombustível (Kumar e Sharma, 2008; Sahoo et al., 2009; Sahoo e Das, 2009; Jingura et al., 2010).

O Pb provoca alterações morfológicas e funcionais nas células vegetais (Malone, et al., 1974; Wierzbicka et al., 2007; Zhao et al., 2011). De maneira geral, os efeitos tóxicos do Pb nas plantas são caracterizados por inibição da atividade fotossintética e mitose, redução da absorção de água e, como observado para outros metais pesados, a toxicidade por Pb desencadeia danos no sistema radicular e provoca efeitos secundários na absorção e transporte de outros elementos (Kabata-Pendias, 2010).

A diminuição da atividade fotossintética é causada por vários distúrbios, podendo apresentar-se de forma reversível ou irreversível, a depender da intensidade do estresse e da tolerância da planta ao estresse. O dano promovido pelo acúmulo de Pb em tecido vegetal é um dos responsáveis por desencadear alterações no aparato fotossintético, sendo o conteúdo de pigmentos comumente afetado. Zhou et al. (2010) verificaram redução do conteúdo de clorofila a, b e carotenóides em folhas de íris (*Iris pseudacorus* L.) cultivadas sob estresse de Pb. Alfadul e Al-Fredan (2013) verificaram redução no conteúdo de clorofila a e clorofila b em folhas de *Phragmites australis* cultivada sob estresse de Cu, Zn, Pb e Cd.

As moléculas de clorofilas (a e b) e carotenóides são componentes incorporadas nas unidades dos fotossistemas, as quais localizam-se nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Há dois tipos de fotossistemas (PSI e PSII), sendo que a principal diferença entre eles é o pico máximo de absorção, de 700 e 680 nm, respectivamente (Shabala, 2009).

A medida da fluorescência de clorofila possibilita avaliar os efeitos de estresse em plantas, por meio da inibição do transporte de elétrons à nível de membrana dos cloroplastos e, conseqüentemente, demonstra como a atividade fotossintética é negativamente afetada. Giardi et al. (2001) e Corcoll et al. (2011) ressaltam que a técnica consegue detectar alterações no PSII em diferentes condições de estresse, pois este fitossistema é sensível a um vasto número de contaminantes, desde substâncias orgânicas e metais pesados.

Um dos parâmetros obtidos com a medida da fluorescência de clorofila é a razão Fr/FFr, obtida das medidas do pico 680-700 nm (Fr= vermelho) e 730-740 nm (FFr= vermelho distante), valor do qual pode-se inferir alterações no aparato fotossintético, porque o aumento da razão Fr/FFr, além de detectar redução do conteúdo de clorofila, também possibilita relacionar distúrbios no aparato fotossintético, indicando que a conversão de quantum foi afetado (Cherif et al., 2010). Alguns estudos tem demonstrado o potencial da fluorescência de clorofila para detectar precocemente a toxicidade por metais pesados em plantas (Baryla et al., 2001; Maurya e Gopal, 2008; Gopal et al., 2002; Mishra e Gopal, 2008; Ventrela et al., 2009; Silva et al., 2012).

A toxicidade por metais pesados pode provocar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas reativas, tais como superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que ao entrar em contato com componentes celulares induzem estresses oxidativos nas células e ocasionam danos em membranas e, em condições extremas de estresse, podem ainda resultar em morte celular (Gadjev et al., 2008; Sharma e Dietz, 2009). Desta forma, plantas tolerantes a metais pesados podem induzir mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo e eliminação de ROS por meio da elevação da produção de enzimas antioxidantes capazes de desintoxicar as células. Entre estas podem ser citadas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutaciona redutase (GR) (Sun et al., 2007; Lin e Aarts, 2012; Zhao et al., 2012).

Considerando que o pinhão-manso é uma espécie promissora para fitoestabilizar áreas contaminadas por metais pesados, o presente trabalho avaliou o acúmulo, distribuição e toxicidade por Pb em plantas de pinhão-manso utilizando a técnica da fluorescência da clorofila e as alterações provocadas pelo Pb na composição mineral, na produção de enzimas antioxidantes, proteína solúveis e pigmentos fotossintéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*, L.) foram colocadas para germinar em bandejas contendo vermiculita umedecida com solução de Ca $0,67 \text{ mmol L}^{-1}$ na forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vilela e Anghinomi, 1984). Treze dias após o semeio, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo seis litros de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950, modificada), contendo: 105,05; 15,5; 117,3; 100,2; 24,3; 32,1; 0,65; 0,5; 0,05; 0,02; 0,5; 0,01; 7,53 mg L^{-1} de N, P, K, Ca, Mg, S, Cl, Mn, Zn, Cu, B, Mo e Fe, respectivamente, a qual foi substituída semanalmente. Foi adicionado diariamente água deionizada nos vasos para reposição da água perdida por evapotranspiração. O pH da solução foi ajustado sempre que necessário, para valores próximos de 5,6 (+/- 0,2), sendo a correção efetuada com H_2SO_4 ou NaOH 1 mmol L^{-1} . Após 14 dias de cultivo, foram acrescentadas na solução doses de 25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]. Um controle (sem adição de Pb) foi adotado. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso (uma espécie vegetal com seis doses de Pb), com 3 repetições.

Após a adição do Pb, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 40 dias. Posterior a esse período, procedeu-se a coleta e lavagem com água destilada das folhas, caule e raízes, sendo estes acondicionados em sacos de papel.

As amostras foram mantidas em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ com circulação forçada de ar até peso constante, obtendo-se a matéria seca das partes e, pela soma, a matéria seca total. Após secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey e acondicionadas em sacos plásticos. A digestão do material vegetal foi feita em ácidos nítrico e clorídrico em forno de microondas (MarsXpress), segundo o método 3051A (USEPA - 1996). Este material também foi submetido à digestão sulfúrica para determinação de N (Embrapa, 1999).

No extrato da digestão foram determinados os teores de Pb, Zn e Cu por espectrofotometria de absorção atômica (AAAnalyst 800). Também foram determinados os teores de Ca, Mg, Fe, Mn, Mo e B por espectrometria de emissão ótica (ICP-OES/Optima 7000, Perkin Elmer). Os teores de N, K e P, foram determinados por titulometria, fotometria e colorimetria, respectivamente.

A partir dos teores dos elementos e da matéria seca, foram calculados os conteúdos dos elementos.

As medidas de fluorescência de clorofila foram efetuadas com emissor de luz ultravioleta LED, com picos de comprimento de onda vermelho (685 nm) e vermelho distante (735 nm) obtidos pelo software do aparelho (Ocean Optics-Spectra Suite). Foram efetuadas cinco avaliações ao longo do experimento. A primeira medida foi tomada antes da adição do Pb e a última um dia antes da coleta das plantas. Estas medidas foram realizadas à noite a partir da permanência das plantas por 20 minutos no escuro, com o intuito de garantir a desativação do transporte de elétrons fotossintético. As leituras foram efetuadas no segundo par de folhas abaixo do meristema apical, sendo realizadas quatro leituras por planta, as quais foram submetendo à emissão de luz por 10 segundos cronometrados.

Os espectros obtidos foram ajustados a duas curvas Gaussianas correspondentes ao 685 nm e 735 nm. A razão entre a intensidade da fluorescência F_{685}/F_{735} (F_r/FF_r) de altura de pico foi calculada a partir da curva ajustada para cada uma das doses de Pb em solução e usadas para inferir sobre o efeito do elemento na biossíntese de clorofila e no PSII por meio do software Origin versão 6.0.

Para as análises bioquímicas, foi coletada uma amostra por planta do mesmo par de folhas utilizadas na avaliação da fluorescência de clorofila. Realizou-se a determinação dos conteúdos de clorofilas a, b, total e carotenóides mediante extração com acetona 80% (Arnon 1949), sendo o conteúdo de carotenóides calculado pela equação de Lichtenthaler (1987).

O extrato bruto utilizado na determinação da atividade das enzimas e do teor de proteínas foi obtido através de homogeneização de 200 mg do material vegetal em almofariz, com N_2 líquido, e adicionado 2,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mmolL^{-1} , pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C . Foram determinadas as atividade de catalase (CAT) (Havir e Mchale, 1987), polifenoloxidase (Kar e Mishra, 1976), peroxidase do ascorbato (APX) (Nakano e Asada, 1981) e teor de proteína solúvel (Bradford, 1976). Todas as determinações foram efetuadas por espectrofotometria.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e à análise de regressão com Software SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA

Apenas a produção de matéria seca das folhas diminuiu linearmente com adição das doses de Pb em solução (Tabela 3.1). Verificou-se redução de 29% da matéria seca das folhas para dose 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em relação ao controle. O Pb é um metal que não apresenta função biológica e pode provocar várias alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas nas plantas, ocasionando redução do crescimento e interferência na síntese de clorofila (Sharma e Dubey, 2005).

Os sintomas visuais de toxicidade por Pb observados durante o ensaio foram caracterizados por redução do crescimento apenas nas plantas cultivadas sob as doses 150 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e escurecimento das raízes, além de restrição do crescimento na dose 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Shu et al (2012), avaliando o efeito de doses de Pb (0; 0,5; 1; 2; 3 e 4 mmol kg^{-1} de solo) em plantas de pinhão-manso, observaram como sintomas visuais de toxicidade por Pb a redução da área foliar, escurecimento das raízes e redução do crescimento.

As plantas de pinhão-manso cultivadas sob estresse de Pb apresentaram relativa tolerância à toxicidade por este metal, visto que não apresentaram significativas reduções na produção de matéria seca e não demonstraram severos sintomas visuais de alterações metabólicas.

Tabela 3.1. Matéria seca de plantas de pinhão-manso cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva

Doses de Pb ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Matéria seca, g vaso ⁻¹			
	Folhas	Caule	Raízes	Total
0	43,33	30,36	16,19	89,87
25	38,51	31,80	15,80	86,11
50	35,69	31,45	15,19	82,33
100	37,19	31,71	17,41	86,32
150	34,15	26,29	17,69	78,14
200	30,65	26,14	14,26	71,05
Variável	Equação de regressão ajustada			

Matéria seca folhas $y = -0,0502^{**} + 40,9773$, $R^2 = 0,82^{**}$

** : Significativo a 1% de probabilidade.

TEOR DE Pb

O aumento das doses foi acompanhado pelo acúmulo de Pb nas folhas, caule e raízes (Figura 3.1), sendo o maior teor detectado nas raízes, seguido pelas folhas. Malone et al. (1974) verificaram que, após absorção pelas raízes, o Pb acumula-se nas raízes, caule e folhas predominantemente na parede celular formando precipitados e cristais, não interagindo com a membrana plasmática. Meyers et al. (2008) citam como defesa à toxicidade por Pb o sequestro de Pb e compartimentalização em vacúolo e citoplasma em plantas de mostarda da Índia (*Brassica juncea*) e ainda sugeriram que o Pb não foi depositado nos tecidos internos da estria de Caspary, sendo este um indicativo de integridade da membrana plasmática. No entanto, Zhao et al. (2011) citam que o acúmulo de Pb provocou desorganização e alteração do tamanho de cloroplastos e mitocôndrias, além de rompimento da membrana plasmática em célula foliar de tomate. Eun et al. (2000) citam que o efeito tóxico de metais pesados inibe o crescimento de raízes e um dos mecanismos responsáveis por essa inibição induzida por Pb foi a elevação da concentração em tecido celular, provocando alterações na organização dos microtúbulos e consequente inibição na divisão celular do meristema das raízes.

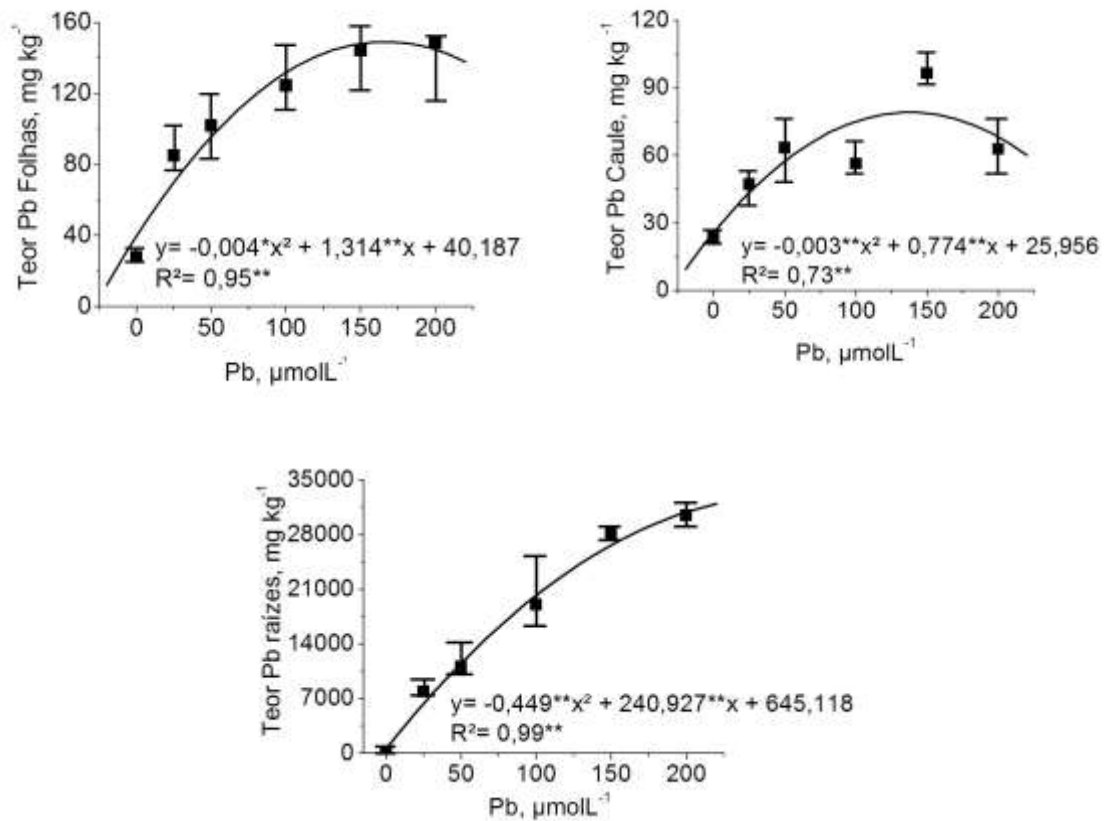


Figura 3.1. Teor de Pb em plantas de pinhão-mansão cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Romeiro et al. (2007) também observaram em plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformes* L.) elevado acúmulo de Pb nas raízes, sendo pouco translocado para a parte aérea. Os autores observaram que as plantas removeram 84%, 67% e 88% dos 100, 200 e 400 μmol L⁻¹, respectivamente, do Pb aplicado na solução. Zhao et al. (2011) verificaram de 250 a 2564 vezes maior o acúmulo nas raízes comparando com as concentrações nos frutos de tomate, sendo que apenas a dose 900 mg kg⁻¹ de Pb no solo induziu o incremento na concentração de Pb nos frutos. Ashraf et al. (2011) verificaram maior acúmulo de Pb nas raízes de canola (*Brassica napus* L.), com máximo conteúdo acumulado de 354 mg kg⁻¹ de matéria seca.

Baker et al. (2000) citam que plantas hiperacumuladoras de Pb, Zn e Cd apresentam potencial para concentrar na matéria seca das folhas 0,1%, 1% e 0,01%, respectivamente. Antiochia et al. (2007) verificaram teores de Pb em plantas de vetiver (*Vetiveria zizanioides*) de 0,4 e 0,1 % de Pb da matéria seca das folhas e raízes, respectivamente, e apontaram a planta como

hiperacumuladora de Pb. Observou-se que o aumento das doses de Pb promoveu acúmulo de 0,01% e 3,0% de Pb da matéria seca das folhas e raízes, respectivamente (Figura 3.1). Nota-se que o elevado acúmulo de Pb nas raízes das plantas, indica a espécie como tolerante a teores elevados de Pb no solo.

O maior acúmulo verificado (30457 mg kg^{-1} de Pb) nas raízes para a dose $200 \mu\text{molL}^{-1}$ é um mecanismo de defesa relevante pelo qual as plantas podem inibir a toxicidade por Pb. O pinhão-mansão é uma oleaginosa não-alimentícia promissora para produção de bioenergia e com potencial para imobilização de Pb em áreas contaminadas. O cultivo dessa espécie pode reduzir custos na recuperação da área, gerando benefício ambiental aliado a exploração econômica para produção de biocombustível e extração de compostos ativos das sementes para finalidades industriais (Ginnerken et al., 2007).

TEORES DE NUTRIENTES

Um dos efeitos da toxicidade por Pb nas plantas foi a alteração na composição mineral das plantas. Houve redução dos conteúdos de N, P, Cu e Zn nas folhas e N, Ca e Zn no caule. Para as raízes, verificou-se incremento dos conteúdos de P e Fe (Tabela 3.2). O desbalanço nutricional tem frequentemente sido citado como um importante efeito tóxico de metais em plantas (Tewari et al., 2008; Sagardoy et al., 2009; Martin et al., 2012; Safarzadeh et al., 2013; Lima et al., 2013). A toxicidade por Pb nas plantas provoca alterações na absorção e transporte de outros elementos, sendo verificado mecanismo antagônico entre os teores de Pb e Zn, assim como a sua semelhança com o Ca pode induzir sua absorção e, conseqüentemente, substituí-lo em sítios ativos provocando redução da atividade fotossintética e de algumas enzimas (Kabata-Pendias, 2010).

Li et al. (2010) observaram em folhas de arroz (*Oryza sativa* L.) correlação positiva entre os teores de Pb e Fe, Mn e Ni e Cd e Ni, e correlações negativas entre os teores de Cd, Fe e Mn. Sinha et al. (2006) verificaram reduções na concentração de Fe, Mn e Cu, e incremento de Zn em repolho (*Brassica oleracea* L.) cultivadas sob doses de Pb, sendo tóxico o acúmulo de 150 mg kg^{-1} de Pb no tecido vegetal. Ashraf et al. (2011)

verificaram reduções nos conteúdos de N, P e K nos folhas e raízes de canola e diminuição dos teores de Fe, Cu, Mn e Zn nas raízes acompanhado pelo aumento de doses de Pb até 90 mg kg^{-1} de Pb no solo.

Tabela 3.2. Equações de regressão dos teores de nutrientes em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva

Variáveis	Equações de Regressão Ajustadas
Conteúdo N Folhas, g vaso^{-1}	$y = -0,0021^{**}x + 1,3376$, $R^2 = 0,87^*$
Conteúdo N Caule, g vaso^{-1}	$y = -0,0012^{**}x + 0,4915$, $R^2 = 0,80^*$
Conteúdo P Folhas, g vaso^{-1}	$y = -0,0027^{**}x + 2,4581$, $R^2 = 0,73^*$
Conteúdo P Raízes, g vaso^{-1}	$y = 0,0028^{**}x + 0,7144$, $R^2 = 0,84^{**}$
Conteúdo Ca Caule, g vaso^{-1}	$y = -0,0004^{**}x + 0,347$, $R^2 = 0,85^*$
Conteúdo Cu Folhas, mg vaso^{-1}	$y = -0,0008^{**}x + 0,7441$, $R^2 = 0,74^*$
Conteúdo Zn Folhas, mg vaso^{-1}	$y = -0,0016^{**}x + 0,9539$, $R^2 = 0,44^{**}$
Conteúdo Zn Caule, mg vaso^{-1}	$y = -0,0009^{**}x + 0,4593$, $R^2 = 0,78^{**}$
Conteúdo Fe Raízes, mg vaso^{-1}	$y = -0,001^{**}x^2 + 0,361^{**}x + 16,143$, $R^2 = 0,86^{**}$

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Observou-se incremento de 85% no conteúdo de fósforo nas raízes comparando a dose controle e a dose $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, a qual apresentou maior conteúdo de P. De acordo com Kabata-Pendias (2010) o P pode ligar-se ao Pb e formar fosfatos insolúveis, reduzindo o efeito tóxico do metal. Este é um comportamento intrínseco do Pb verificado no tecido vegetal. Também observou-se incremento de 175% do conteúdo de Fe nas raízes, comparando a dose controle com a dose $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, a qual apresentou maior conteúdo acumulado com posterior declínio na dose $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA

Os espectros apresentaram diferenças nos picos de absorção da fluorescência de clorofila (Figura 3.2A e 3.2B). Observou-se menor reabsorção da fluorescência nas plantas sob maior estresse de Pb. A medida da fluorescência é uma ferramenta que consegue detectar alterações no PSII em diferentes condições de estresse, por este ser um fotossistema sensível a uma

ampla variação de contaminantes, incluindo o Pb. Alguns estudos demonstram que essa técnica pode ser utilizada para monitoramento do estresse abiótico em plantas (Kummerová et al., 2006; Maurya et al., 2008; Dai et al., 2009; Gonçalves et al. 2010; Willadino et al., 2012; Fan et al., 2013).

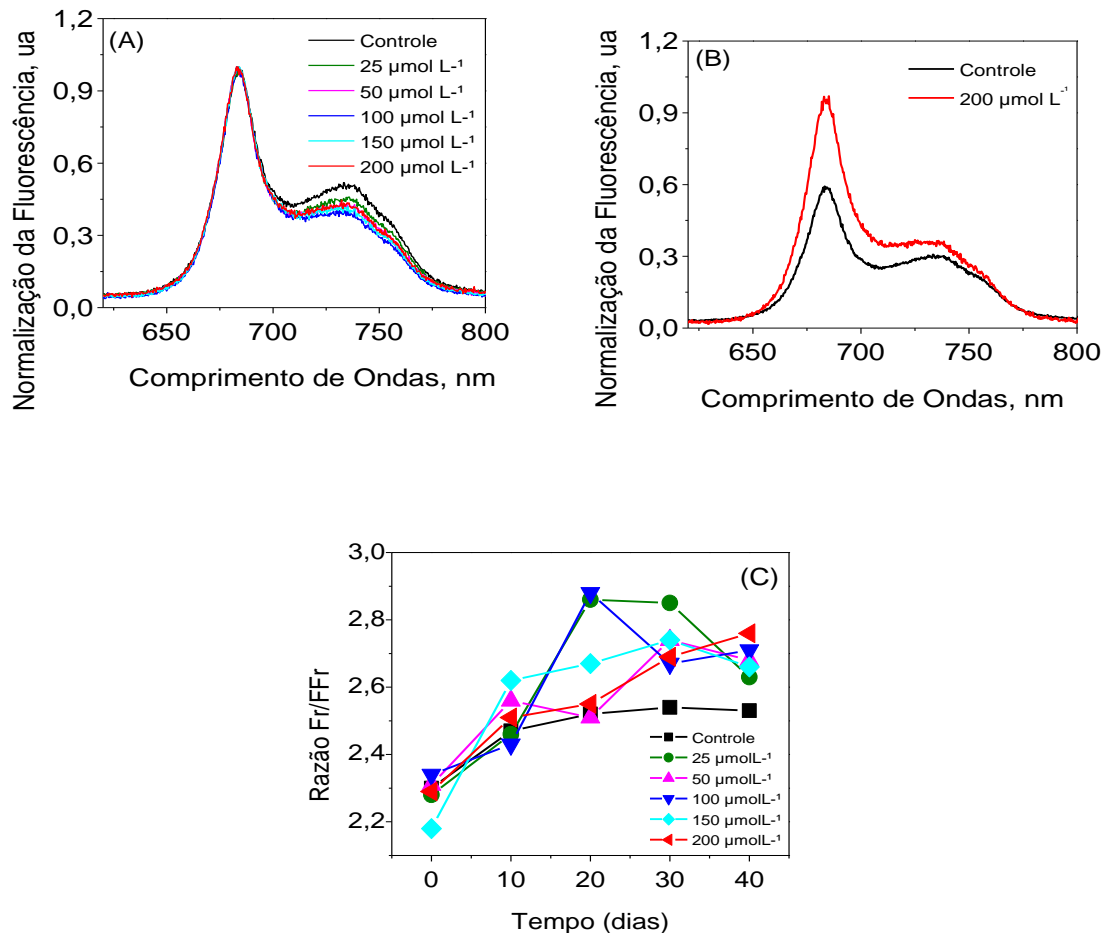


Figura 3.2. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva aos 40 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho= 685nm e vermelho distante= 735 nm (Fr/FFr) (C).

Após excitação pela luz ultravioleta, o espectro de fluorescência característico de plantas superiores contém quatro bandas centralizadas próximo de 450 nm (azul), 520 nm (verde), 685 nm (vermelho) e nm 735 (vermelho-distante). No entanto, as faixas vermelho e vermelho-distante são obtidas pelas reações desencadeadas dentro das membranas dos cloroplastos. Sendo assim, as variáveis obtidas a partir das informações destes dois picos

das bandas de fluorescência têm importante potencial para avaliar o *status* fisiológico normal das plantas ou se a mesma encontra-se submetida a alguma condição de estresse (Mishra e Gopal, 2008).

A razão Fr/FFr demonstrou que as doses de Pb promoveram alterações temporais no cultivo das plantas (Figura 3.2C). Verifica-se que apenas após 30 dias da aplicação do Pb as razões Fr/FFr de todas as doses diferenciaram-se do controle. Nota-se que este comportamento pode ser um indicativo da maior retenção do Pb nas raízes até esse período. Com o incremento da concentração nas raízes, a capacidade de restringir o movimento de Pb é superado e o metal é significativamente transportado para a parte aérea causando os danos detectados pela fluorescência. O maior valor da razão Fr/FFr para as plantas cultivadas na dose $200 \mu\text{molL}^{-1}$ corrobora o maior teor de Pb (148 mg kg^{-1}) acumulado nas folhas para esta dose e os sintomas visuais de toxicidade, especialmente a redução da biomassa.

A medida da fluorescência de clorofila foi capaz de detectar alterações no aparato fotossintético, embora as plantas não demonstraram reduções significativas da matéria seca, sendo este um comprotamente importante no monitoramento e detecção precoce de contaminação ambiental por metais pesados. Mesmo não havendo redução dos conteúdos de Fe e Mg nas folhas, e de outros nutrientes que desempenham papel relevante no status fotossintético, o aumento das doses de Pb aplicada em solução provocou redução na eficiência quântica.

Um outro efeito que pode estar envolvido no declínio da eficiência da absorção de fóton é a inibição da enzima rubisco. Wang et al. (2009), avaliando a toxicidade por Cd em plantas de milho, sugerem que o estresse reduziu inicialmente a atividade da rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase) e fosfenol piruvato carboxilase (PEPC) nas folhas e, conseqüentemente, afetou a transferência de elétrons do PSII. Os autores sugeriram que o ciclo de Calvin foi o primeiro alvo envolvido na toxicidade por Cd nas plantas. Segundo Siedlecka e Krupa (2004) e Mateos-Naranjo et al. (2008), a rubisco é uma enzima importante para o ciclo de Calvin, pois participa da catalisação de reações de carboxilação e oxigenação e, desta forma, o estresse por metais em plantas pode inibir o transporte de elétrons no PSII e a fixação e assimilação de CO_2 , processo desencadeado por declínio da atividade da rubisco.

PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL

O conteúdo de pigmentos não foi afetado pelo Pb (Tabela 3.3), apesar da alteração na fluorescência de clorofila. Alguns estudos demonstram que a redução na concentração de pigmentos está diretamente relacionada ao declínio na taxa fotossintética e indiretamente pela substituição de metais pesados em sítios bioativos no PSII (Monnet et al., 2001; Cambrollé et al., 2011; Lin e Aarts, 2012).

Shu et al. (2012) verificaram elevação do conteúdo de clorofila a, b e carotenóides em plantas de pinhão-manso cultivadas sob dose de 0,5 mmol L⁻¹ de Pb no solo e posterior declínio dos pigmentos nas doses mais elevadas. Zhou et al. (2010) e Alfadul e Al-Fredan (2013) verificaram efeito de redução nos conteúdos de pigmentos fotossintéticos em condições de toxicidade por Pb, comportamento também verificado por Khudsar et al. (2004) em plantas de artemísia (*Artemisia annua L.*) cultivada em solo sob doses de Zn até 400 mg kg⁻¹. Estes autores ainda verificaram os efeitos deletérios da toxicidade por Zn na atividade da enzima nitrato redutase e conteúdo de proteína.

A avaliação do conteúdo de pigmentos fotossintético é indicador do *status* fisiológico normal das plantas. No entanto, os métodos para sua determinação são lentos e trabalhosos (Peñuelase Filella, 1998). Apesar de não ter sido verificada alteração na concentração de pigmentos, a medida da fluorescência da clorofila demonstrou ser ferramenta sensível para detectar alterações no PSII em plantas sob estresse de Pb, embora o distúrbio provocado por Pb não reduziu a eficiência da biossíntese de clorofila, podendo este ser um indicativo de tolerância das plantas de pinhão-manso a toxicidade.

Tabela 3.3. Conteúdo de pigmentos em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva

Doses de Pb ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenóides
	mg g ⁻¹ de matéria fresca			
0	1,701	0,543	2,244	0,51
25	1,536	0,438	1,974	0,38
50	1,537	0,472	2,009	0,37
100	1,535	0,516	2,050	0,37
150	1,703	0,511	2,214	0,41
200	1,541	0,505	2,046	0,34

Não foi verificado efeito significativo para a atividade das enzimas antioxidativas catalase, polifenoloxidase, ascorbato peroxidase nem para o conteúdo de proteína solúvel total (Tabela 3.4). Alterações na atividade de enzimas antioxidantes podem demonstrar estratégia de defesa ou indicar toxicidade por metais pesados em plantas sob condições de estresse. Plantas tolerantes a Pb apresentam como mecanismo de defesa à toxicidade por este metal a exclusão impedindo a entrada do metal dentro da célula ou conectando-a à parede celular. Outra estratégia de defesa relevante é o aumento da produção de enzimas antioxidantes e outros compostos que evitem o acúmulo de ROS, inibindo os danos oxidativos nas células (Gupta et al., 2013).

Tabela 3.4. Atividade enzimática e proteína solúvel total em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva

Variáveis	Doses de Pb, $\mu\text{mol L}^{-1}$					
	0	25	50	100	150	200
APX ¹	4886,28	9511,96	5602,94	7818,05	8990,79	6319,59
Polifenoloxidase ²	18782,62	22646,13	20714,37	22408,37	21457,35	23626,87
CAT ¹	587,80	253,36	334,44	466,19	334,44	476,32
Proteína solúvel ³	2,24	2,11	3,88	2,63	2,78	2,55

1: ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{g}$ matéria fresca /min); 2:(μmol piragalol/g matéria fresca/min) e 3: (μg /g matéria fresca).

Alguns estudos têm demonstrado efeitos tóxicos do Pb no *status* metabólico das plantas. Gupta et al. (2011) não verificaram redução no

conteúdo de pigmentos, porém observaram declínio no conteúdo de proteína solúvel total e incremento da atividade da catalase e superóxido dismutase nas raízes e folhas de *Pfaffia glomerata* sob dose de Pb até 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$. No entanto, esse aumento na atividade antioxidante não foi suficiente para inibir os efeitos tóxicos do metal. Shu et al. (2012), avaliando a toxicidade por Pb em plantas de pinhão-manso, verificaram incremento do conteúdo de proteína solúvel total, atividade da superóxido dismutase, catalase e peroxidase acompanhado pelo aumento das doses de Pb no solo. Yadav et al. (2009) observaram que a toxicidade por Cr em plantas de pinhão-manso elevou a atividade das enzimas antioxidantes catalase, peroxidase, ascorbato peroxidase e glutathione S-transferase acompanhada pelo aumento das doses do metal no solo.

Ben Ammar et al. (2008) verificaram que o estresse por Cd em plantas de tomate provocou aumento da ROS e, conseqüentemente, induziu o aumento da peroxidação lipídica. Khudsar et al. (2004) observaram reduções na atividade da enzima nitrato redutase e conteúdo de proteína, além do declínio no conteúdo de pigmentos em artemísia (*Artemisia annua* L.) cultivada em solo sob doses de até 400 mg kg^{-1} de Zn. Zhao et al. (2012) ressaltam a tolerância de *Phytolacca americana* em acumular Mn em tecido vegetal e apontaram a elevação da atividade enzimática superóxido de hidrogênio e catalase como mecanismo estratégico das plantas à tolerância do estresse por Mn, comportamento não verificado avaliando a toxicidade para os metais Zn e Cu, tal como observado para Pb no presente trabalho. Rellán-Álvarez et al. (2006), avaliando a toxicidade por Cd e Hg em folhas de milho, verificaram que o acúmulo de Cd aumentou a atividade da ascorbato peroxidase nas folhas e o incremento de Hg reduziu a atividade da mesma, efeito apontado pelos autores como inibidor na homeostase celular.

CONCLUSÕES

A medida da fluorescência de clorofila demonstrou potencial para detectar alterações no PSII em plantas de pinhão-mansó cultivadas sob doses de Pb, indicando relevância da técnica para monitoramento ambiental de área contaminada por Pb.

As doses de Pb provocaram alterações na composição mineral das plantas, com redução na concentração de N, P, Cu e Zn nas folhas.

A toxicidade por Pb não provocou efeitos deletérios nos teores de Fe, Mg e pigmentos foliares, apesar das razões Fr/FFr verificarem alterações no *status* fisiológico das plantas.

A toxicidade por Pb em pinhão-mansó não provocou alterações na atividade de enzimas antioxidantes e nas proteínas solúveis nas folhas de pinhão-mansó.

REFERÊNCIAS

ALFADUL, S. M. S; AL-FREDAN, M. A. A. Effects of Cd, Cu, Pb, and Zn combinations on phragmites australis metabolism, metal accumulation and distribution. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 38, p.11–19, 2013.

ANTIOCHIA, R.; CAMPANELLA, L.; GHEZZI, P.; MOVASSAGHI, K. The use of vetiver for remediation of heavy metal soil contamination. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p.947–956, 2007.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

ASHRAF, M. Y.; AZHAR, N.; ASHRAF, M.; HUSSAIN, M.; ARSHAD, M. Influence of lead on growth and nutrient accumulation. in canola (*Brassica napus* L.) cultivars. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, p. 659–666, 2011.

BAKER, A. J. M.; MCGRATH, S. P.; REEVES, R. D.; SMITH, J. A. C.; Metal hyperaccumulator plants: a review of the ecology and physiology of a biological resource for phytoremediation of metal polluted soils. 2000. In: Terry, N., Banuelos, G. (Eds.). **Phytoremediation of Contaminated Soil and Water**, p. 85–107.

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

BEN AMMAR, W.; MADIOUNI, C.; TRAY, B.; GHORBEL, M. H.; JEMAL, F.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p.248–254, 1976.

BRAIT, C. H. H.; ANTONIOSI FILHO, E. N. R. Desenvolvimento e aplicação de sistema passivo de coleta de poluentes atmosféricos para monitoramento de Cd, Cr, Pb, Cu, Fe, Mn, Zn e particulados totais. **Química Nova**, v. 33, p. 7–13, 2010.

CAMBROLLÉ, J., MATEOS-NARANJO, E., REDONDO-GÓMEZ, S., LUQUE, T., FIGUEROA, M. E. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellow-horned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 57–64, 2011.

CHERIF, J.; DERBEL, N.; NAKKACH, M.; BERGMANN, H. V.; JEMAL, F.; Lakhdar, Z. B. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology**, v. 101, p.332–339, 2010.

CORCOLL, N.; BONET, B.; LEIRA, M.; GUASCH, H. Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 673, p. 119–136, 2011.

DAI, Y.; SHEN, Z.; LIU, Y.; WANG, L.; HANNAWAY, D.; HONGFEI LU, H.; Effects of shade treatments on the photosynthetic capacity, chlorophyll fluorescence, and chlorophyll content of *Tetrastigma hemsleyanum* Diels et Gilg. **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, 177–182, 2009.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA–EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

EUN S. O.; YOUN, H. S.; LEE, Y. Lead disturbs microtubule organization in the root meristem of *Zea mays*. **Physiologia Plantarum**, v. 110, p.357–365, 2000.

FAN, S.-T.; YEH, D.-M.; CHEN, S.-J. Genotypic differences in post-storage photosynthesis and leaf chloroplasts in response to ethylene and 1-methylcyclopropene in *Aglaonema*. **Postharvest Biology and Technology**, v. 76, p. 98–105, 2013.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36–41, 2008.

GADJEV I, STONE JM, GECHEV TS. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 270, p. 87–144, 2008.

GIARDI, M. T.; KOBLÍZEK, M.; MASOJÍDEK, J. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 1027–1033, 2001.

GINNEKEN, L. V.; MEERS, E.; GUISSON, R.; RUTTENS, A.; ELST, K.; TACK, F. M. G.; VANGRONSSVELD, J.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Phytoremediation for heavy metal-contaminated soils combined with bioenergy production. **Journal of Environmental Engineering and Landscape Management**, v. 15, p 227–236, 2007.

Glutathione and phytochelatin contents in tomato plants exposed to cadmium. **Biologia Plantarum**, v. 52, p. 314–320, 2008.

GONÇALVES, E. R.; FERREIRA, V. M.; SILVA, J. V.; ENDRES, L.; BARBOSA, T. P.; DUARTE, W. DE G. Trocas gasosas e fluorescência da clorofila a em variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Energia Agrícola e Ambiental**, v. 14, p. 378–386, 2010.

GOPAL, R.; MISHRA, K. B.; ZEESHAN, M.; PRASAD, S. M.; JOSHI, M. M. Laser-induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress. **Current Science**, v. 83, p. 880–884, 2002.

GUPTA , D. K.; NICOLOSO, F. T.; SCHETINGER, M. R.; ROSSATO, L. V.; HUANG , H. G.; Yang , X. E. SRIVASTAVA, S. Lead induced responses of *Pfaffia glomerata*, an economically important brazilian medicinal plant, under in vitro culture. **Conditions Bull Environ Contam Toxicol**, v. 86, p. 272–277, 2011.

GUPTA, D. K.; HUANG, H. G.; CORPAS, F. J. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 1–12, 2013.

HAIYAN, W.; STUANES A. O. heavy metal pollution in air-water-soil-plant system of zhuzhou city, hunan province, China. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 147, p. 79–107, 2003.

HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tabocco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: University of California, 1950. p. 32 (Circular, 347).

JAMIL, S.; ABHILASH, P. C.; SINGH, N.; SHARMA, P. N. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 269–275, 2009.

JINGURA, R. M.; MUSADEMBA, D.; MATENGAIFA, R. An evaluation of utility of *Jatropha curcas* L. as a source of multiple energy carriers. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 2, p. 115–122, 2010.

JUWARKAR, A. A.; YADAV, S. K. ; KUMAR, P.; SINGH, S. K. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. **Environ Monit Assess**, v.145, p.7–15, 2008.

KABATA – PENDIAS, A. **Trace Elements in soils and plants**. 4 ed. Boca Raton, CRC, 2010. 505p.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315–319, 1976.

KHUDSAR, T.; MAHMOODUZZAFAR.; IQBAL, M.; SAIRAM, R. K. Zinc-induced changes in morpho-physiological and biochemical parameters in *Artemisia annua*. **Biologia Plantarum**, v. 48, p. 255–260, 2004.

KUMAR A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **International Journal of Engineering, Science and Technology**, v. 28, p.1–10, 2008.

KUMMEROVÁ, M.; KRULOVA, J.; ZEZULKA, S.; TRISKA, J. Evaluation of fluoranthene phytotoxicity in pea plants by Hill reaction and chlorophyll fluorescence. **Chemosphere**, v. 65, p.489–496, 2006.

LI, B., WANG, X., QI, X., HUANG, L., YE, Z. Identification of rice cultivars with low brown rice mixed cadmium and lead contents and their interactions with the micronutrients iron, zinc, nickel and manganese. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24 p. 1790–1798, 2010.

LICHTENTHALER H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R (eds) **Methods in Enzymology**. Academic Press, NewYork, p 350-382.

LIMA, F. DE S.; NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. DE A.; SOUSA, C. DA S.; CUNHA FILHO, F. F. DA. Bioconcentração de chumbo e micronutrientes

em hortaliças cultivadas em solo contaminado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p.234–241, 2013.

LIN, Y.; AARTS, M. G. M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3187–3206, 2012.

MALONE, C.; KOEPPE, D. E.; RAYMOND J. MILLER, R. J. Localization of Lead accumulated by corn plants. **Plant Physiology**, v. 53, p. 388–394, 1974.

MARTIN, S. R., LLUGANY, M., BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, C. Cadmium exclusion a key factor in differential Cd-resistance in *Thlaspi arvense* ecotypes. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 729–734, 2012.

MATEOS-NARANJO, E; REDONDO-GÓMEZ, S.; CAMBROLLÉ, J.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an invasive cordgrass *Spartina densiflora*. **Plant Biology**, v. 10, p. 754–762, 2008.

MAURYA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser-induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

MEYERS, D. E. R.; AUCHTERLONIE, G. J.; WEBB, R. W.; WOOD, B. Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 323–332, 2008.

MISHRA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

MONNET, F.; VAILLANT, N.; VERNAY, P. ; COUDRET, A.; H. SALLANON, H.; HITMI, A. Relationship between PSII activity CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg

contents of *Lolium perenne* under zinc stress. **Journal Plant Physiology**, v. 158, p. 1137–1144, 2001.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068–1072, 1981.

NASCIMENTO, C. W. A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation **Scientia Agricola**, v. 63, p. 299–311, 2006.

PAOLIELLO, M. M. B.; CAPITANI, E. M. DE.; CUNHA, F. G. DA; MATSUO, T.; CARVALHO, M. DE F. SAKUMA, A.; FIGUEIREDO, B. R. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. **Environmental Research Section**, v.88, p. 120-128, 2002.

PEÑUELAS, J.; FILELLA, I.; Visible and near-infrared reflectance techniques for diagnosing plant physiological *status*. **Trends in Plant Science**, p. 151–156, 1998.

RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; ORTEGA-VILLASANTE, C.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; CAMPO, F. F. D.; HERNÁNDEZ, L. E. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. **Plant and Soil**, v. 279, p. 41–50, 2006.

REN, H. M.; WANG, J. D.; ZHANG, X. L. Assessment of soil lead exposure in children in Shenyang, China. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 327–335, 2006.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R.; ABREU, C. A. de; PEREIRA, B. F. F.; Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes* L. **Bragantia**, v.66, p.327–334, 2007.

SAFARZADEH, S.; RONAGHI, A.; KARIMIAN, N. Effect of cadmium toxicity on micronutrient concentration, uptake and partitioning in seven rice cultivars. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, p. 231–245, 2013.

SAGARDOY, R.; MORALES, F; LÓPEZ-MILLÁN, A-F; ABADÍA, A.; ABADÍA, J.; Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v.11, p. 339–350, 2009.

SAHOO P. K.; DAS, L. M.; BABU, M.K.G.; ARORA, P.; SINGH, V.P.; KUMAR, N. R.; VARYANI, T. S. Comparative evaluation of performance and emission characteristics of jatropha, karanja and polanga based biodiesel as fuel in a tractor engine. **Fuel**, v.88, p. 1698–1707, 2009.

SAHOO, P.K.; DAS L.M. Process optimization for biodiesel production from Jatropha, Karanja and Polanga oils. **Fuel** 88, 1588–1594, 2009.

SHABALA, S. Metal cations in CO₂ assimilation and conversion by plants. **Journal of the Minerals, Metals and Materials Society**, 2009, v. 61, p. 28–34, 2009.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 35-52, 2005.

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

SHU, X.; YIN, L.; ZANG, Q.; WANG, W. Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 893–902, 2012.

SIEDLECKA, A., KRUPA, Z. Rubisco activity maintenance in environmental stress conditions-how many strategies. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 56–57, 2004.

SILVA, A. J. DA; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. DA S.; SILVA-Jr, E. A. da. LED-Induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, p. 3527–3533, 2012.

SINHA, P.; DUBE, B. K.; SRIVASTAVA, P.; CHATTERJEE, C.; Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. **Chemosphere**, v. 65, p. 651–656, 2006.

SUN, R-L.; ZHOU, Q-X.; SUN, F-H.; JIN, C.X. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, 468–476, 2007.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Morphology and physiology of zinc-stressed mulberry plants. **Journal Plant Nutrition Soil Science**, v. 171, p. 286–294, 2008.

TOLEDO, V. E.; ALMEIDA JÚNIOR, P. B.; QUITÉRIO, S. L.; ARBILLA, G.; MOREIRA, A.; MOREIRA, J. C. Evaluation of levels, sources and distribution of toxic elements in PM10 in a suburban industrial region, Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 139, p. 49–59, 2008.

USEPA - MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES. Method 3051A, CD-ROM, 1996.

VENTRELLA, A.; CATUCCI, L.; PILETSKA, E.; PILETSKY, S.; AGOSTIANO, A. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 19–25, 2009.

VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de sojas afetadas pela interação alumínio-fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 8, p. 91–96, 1984.

WANG, H.; ZHAO, S. C.; LIU, R. L.; ZHOU, W.; JIN, J. Y.; Changes of photosynthetic activities of maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to cadmium stress. **Photosynthetica**, v. 47, p. 277–283, 2009.

WIERZBICKA, M. H.; PRZEDPELSKA E.; RUZIK, R.; OUERDANE L., POLĘC´PAWLAK, K.; M. JAROSZ,M; SZPUNAR, J; SZAKIEL, A. Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. **Protoplasma**, v. 231, p. 99–111, 2007.

WILLADINO, L.; OLIVEIRA FILHO, R. A.; SILVA JUNIOR, E. A.; GOUVEIA NETO, A.; CÂMARA, T. R. Estresse salino em duas variedades de cana-de-açúcar: enzimas do sistema antioxidativo e fluorescência da clorofila. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, p. 417–422, 2011.

YADAV, S. K.; JUWARKAR, A. A; KUMAR, G. P.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; CHAKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, v. 100 p. 4616–4622, 2009.

ZHAO, H.; WU, L.; CHAI, T.; ZHANG, Y.; TAN, J.; MA, S. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca Americana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1243–1252, 2012.

ZHAO, S.; YE, X.; ZHENG, J.; Lead-induced changes in plant morphology, cell ultrastructure, growth and yields of tomato. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 10116–10124, 2011.

ZHOU, Y-Q.; HUANG, S-Z.; YU, S-L.; GU, J-G.; ZHOU J-Z.; HAN, Y-L.; FU, J-J.; The physiological response and sub-cellular localization of lead and cadmium in *Iris pseudacorus* L. **Ecotoxicology**, v. 19, p. 69–76, 2010.

CAPÍTULO IV

TOLERÂNCIA DE MAMONA (*Ricinus communis*) A ZINCO AVALIADA POR
FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

TOLERÂNCIA DE MAMONA (*Ricinus communis*) A ZINCO AVALIADA POR FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

RESUMO

A medida da fluorescência de clorofila pode ser uma ferramenta para avaliar a contaminação por metais pesados, pelo fato de detectar alterações no aparato fotossintético das plantas. Considerando que a detecção precoce da contaminação de zinco (Zn) em plantas é essencial para o monitoramento ambiental, o trabalho avaliou o estresse de Zn em plantas de mamona (*Ricinus communis*) utilizando a técnica da fluorescência de clorofila. As alterações provocadas pelo Zn no *status* nutricional e na atividade de enzimas antioxidativas, proteína solúvel e pigmentos fotossintéticos foram também estudadas. Para tanto, plantas de mamona foram cultivadas durante 28 dias em solução nutritiva com cinco doses de Zn (100, 200, 300, 400 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e um controle, contendo 0,380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. A fluorescência de clorofila detectou alterações temporais promovidas pelo acúmulo de Zn nas plantas e mostrou-se útil na detecção precoce da toxicidade do elemento em plantas de mamona. Apesar do declínio no *status* nutricional das plantas, com reduções no conteúdo de Fe e Mg nas folhas, a mamona apresentou relativa tolerância à toxicidade por Zn, não demonstrando efeitos deletérios aos pigmentos fotossintéticos. O acúmulo de Zn também não promoveu alterações na atividade de enzimas antioxidantes e no teor de proteína solúvel nas folhas. Considerando que a mamona apresentou relativa tolerância a doses elevadas do metal, esta espécie pode ser uma alternativa ambiental e economicamente atraente para fitoestabilização de áreas contaminadas, com adicional vantagem para produção de óleo industrial e bioenergia.

Palavras - Chave: Fotossistema II. Metal pesado. Toxicidade

TOLERANCE OF CASTOR BEAN (*Ricinus communis*) TO ZINC ASSESSED BY CHLOROPHYLL FLUORESCENCE

ABSTRACT

X-ray chlorophyll fluorescence is an useful tool for assessing alterations in the plants photosynthetic apparatus. Taking into account that early detection of Zn contamination is fundamental to assure environmental safety, this work evaluated Zn stress in castor bean (*Ricinus communis*) plants as assessed by X-ray chlorophyll fluorescence. Additionally, the mineral composition, antioxidative enzymes activity, soluble proteins and photosynthetic pigments were also studied. Castor bean plants were grown in a nutrient solution with five Zn doses (100, 200, 300, 400 and 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$) besides a control with 0,380 $\mu\text{mol L}^{-1}$ of Zn. Chlorophyll fluorescence detected temporal alterations owing to Zn accumulation in plants and is useful to early detection of Zn toxicity in castor bean plants. Despite the negative effects on nutritional status with significant decreasing of Fe and Mg in leaves, castor bean was relatively tolerant to Zn toxicity and no damages were observed in photosynthetic pigments. Zn accumulation did not promote alterations in activity of defense-related enzymes or in the soluble proteins in leaves. Due to its relative tolerance to Zn, castor bean can be an environmental-friendly and economic alternative to phytostabilization of Zn contaminated areas with the additional advantage of oil production for industry and biofuels.

Keywords: Photosystem II. Heavy metal. Toxicity

INTRODUÇÃO

O aumento das atividades industriais e de mineração, aliado ao uso inadequado de fertilizantes e pesticidas, têm contribuído para elevação dos teores de Zn no solo. O Zn desempenha importantes funções metabólicas nas plantas, sendo constituinte de enzimas como a desidrogenase, protease, peptidases e fosfohidrolase (Kabata-Pendias, 2010). Por outro lado, quando sua concentração na planta excede 300 mg kg^{-1} , observa-se inibição do crescimento e clorose em folhas como principais sintomas de toxicidade (Vitosh et al., 1994, Cunha et al., 2008; Babula et al., 2008; Lin e Aarts, 2012).

A diminuição do rendimento quântico da fotossíntese é causada por vários distúrbios bióticos ou abióticos, podendo apresentar-se de forma reversível ou irreversível, a depender da intensidade do estresse e da tolerância das plantas às condições adversas. O estresse promovido por elevado acúmulo de Zn em tecido vegetal é um dos responsáveis por desencadear alterações no aparato fotossintético. Cambrollé et al. (2013) observaram que doses de Zn acima de 90 mmol L^{-1} foram responsáveis pelo declínio na atividade fotossintética, resultando em decréscimo na concentração de pigmentos em *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. Cherif et al. (2011) observaram efeito benéfico do Zn até a dose $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tomate (*Solanum lycopersicum*), enquanto doses maiores induziram redução na concentração de clorofilas (a e b).

Existem cerca de 250 a 400 moléculas de clorofilas (a e b) e carotenóides incorporadas nas unidades dos fotossistemas, as quais se localizam nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos. Há dois tipos de fotossistemas (PSI e PSII), sendo que a principal diferença entre eles é o pico máximo de absorção, de 700 e 680 nm, respectivamente. Cada fotossistema apresenta dois componentes: um complexo de antena, responsável pela interceptação da luz, e um centro de reações (Shabala, 2009).

Após um pigmento absorver um fóton, há a possibilidade de transição de um elétron a um nível eletrônico mais elevado, levando à dissipação do excesso de energia, a qual ocorre mediante emissão de fluorescência. A fluorescência de clorofila é caracterizada por um pico máximo na região vermelha (680-700nm) que é atribuído ao fotossistema II (PSII) e outro na região vermelha distante (730-740 nm) correspondente ao fotossistema I (PSI)

(Silva junior, 2011). Essa fluorescência pode ser uma ferramenta potencial para avaliar a contaminação em ecossistemas causada por metais pesados em plantas pois consegue detectar alterações no aparato fotossintético (Joshi e Mohanty, 2004; Corcoll et al., 2011; Cambrollé et al., 2011; Silva et al., 2012).

A medida da fluorescência de clorofila é não invasiva e pode revelar alterações nas membranas dos cloroplastos resultantes do funcionamento anormal do aparato bioquímico (Joshi e Mohanty, 2004). Com base nos parâmetros das fases de indução cinética da fluorescência inicial (F_0) e máxima fluorescência (F_m), pode-se determinar a máxima variação da emissão de fluorescência (F_v), obtida por meio da equação $F_v = F_m - F_0$, representada pela variação entre diferentes pontos detectados (Krause e Weis, 1991). Valores da razão F_v/F_m podem ser usados para quantificar a fotoinibição decorrente do estresse por metais (Krivosheeva et al., 1996). A razão obtida através da fluorescência de clorofila máxima na região vermelha e vermelho distante (F_r/FF_r) também pode ser utilizada, pois verifica-se que o aumento da concentração de clorofila indica condições de biossíntese normal do aparato fotossintético, conseqüentemente diminuição da razão F_r/FF_r . Situação inversa ocorre em condições de estresse e integridade da atividade fotoquímica das plantas (Gopal et al., 2002; Maurya et al., 2008; Silva et al., 2012).

A toxidez por Zn pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), moléculas altamente reativas, tais como superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao interagir com componentes celulares promovem danos oxidativos em ácidos nucléicos, proteínas, açúcares e lipídios. Tais danos levam ao estresse oxidativo em células e membranas e, em condições extremas, pode ocorrer morte celular (Gadjev et al., 2008). Para inibição do estresse oxidativo, e eliminação de ROS, existem enzimas antioxidantes capazes de desintoxicar as células. Dentre estas podem ser citadas a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutatona redutase (GR), sendo que a CAT, APX e GR desempenham importante papel na desintoxicação de H_2O_2 . Deste modo, o aumento na concentração destas enzimas antioxidantes indica o status da defesa antioxidante nas células vegetais (Lin e Aarts, 2012; Matilla-Vázquez e Matilla, 2012).

Considerando que a detecção precoce da contaminação de Zn em plantas é essencial para o monitoramento ambiental, o presente trabalho

avaliou o estresse causado pelo metal em plantas de mamona utilizando a técnica não invasiva da fluorescência de clorofila e as alterações provocadas pelo Zn no *status* nutricional e na produção de enzimas antioxidativas, proteína solúvel e pigmentos fotossintéticos.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de mamona (*Ricinus communis* cv. BRS Energia) foram colocadas para germinar em bandejas contendo vermiculita umedecida com solução de Ca $0,67 \text{ mmol L}^{-1}$ na forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vilela e Anghinomi, 1984). Treze dias após o semeio, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo seis litros de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950, modificada), contendo: 105,05; 15,5; 117,3; 100,2; 24,3; 32,1; 0,325; 0,25; 0,025; 0,01; 0,25; 0,005; $7,53 \text{ mg L}^{-1}$ de N, P, K, Ca, Mg, S, Cl, Mn, Zn, Cu, B, Mo e Fe, respectivamente, a qual foi substituída semanalmente. Adicionou-se diariamente água deionizada nos vasos para reposição da água perdida por evapotranspiração. O pH da solução foi ajustado sempre que necessário, para valores próximos de 5,6 ($\pm 0,2$), sendo a correção efetuada com H_2SO_4 ou NaOH 1 mmol L^{-1} . Após 14 dias de cultivo, foram acrescentadas na solução doses de 100, 200, 300, 400 e $600 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Adotou-se um controle, contendo $0,380 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, (uma espécie vegetal com seis doses de Zn), com 3 repetições.

Após a adição do metal, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 28 dias. Posterior a esse período, procedeu-se a coleta e lavagem com água destilada das folhas, caule e raízes, sendo estes acondicionados em sacos de papel.

As amostras foram mantidas em estufa a 65°C com circulação forçada de ar até peso constante, obtendo-se a matéria seca das partes e, pela soma, a matéria seca total. Após secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey e acondicionadas em sacos plásticos. A digestão do material vegetal foi feita em ácidos nítrico e clorídrico em forno de microondas (Mars Xpress), segundo o método 3051A (USEPA - 1996). Este material também foi submetido à digestão sulfúrica para determinação de N (Embrapa, 1999).

No extrato da digestão foram determinados os teores de Zn e Cu por espectrofotometria de absorção atômica (AAAnalyst 800). Também foram determinados os teores de Ca, Mg, Fe, Mn, Mo e B por espectrometria de emissão ótica (ICP-OES/Optima 7000, Perkin Elmer). Os teores de N, K e P, foram determinados por titulometria, fotometria e colorimetria, respectivamente. A partir dos teores dos elementos e da matéria seca, foram calculados os conteúdos dos elementos. Para avaliação da qualidade das análises para Zn foi utilizado um padrão do National Institute of Standards and Technology (1570a-*Trace elements in spinach*), sendo obtida uma recuperação de 98% de Zn do padrão utilizado.

As medidas de fluorescência de clorofila foram efetuadas com um emissor de luz ultravioleta LED, com picos de comprimento de onda vermelho (685 nm) e vermelho distante (735 nm) obtidos pelo software do aparelho (Ocean Optics-Spectra Suite). Foram efetuadas quatro avaliações ao longo do experimento. A primeira medida foi tomada antes da adição do Zn e a última um dia antes da coleta das plantas. Estas avaliações foram realizadas à noite a partir da permanência das plantas por 20 minutos no escuro, com o intuito de garantir a desativação do transporte de elétrons fotossintéticos. As medidas foram efetuadas no segundo par de folhas abaixo do meristema apical, sendo realizadas quatro leituras por planta, as quais foram submetidas à emissão de luz por 10 segundos cronometrados.

Os espectros obtidos foram ajustados a duas curvas Gaussianas correspondentes ao 685 nm e 735 nm. A razão entre a intensidade da fluorescência F_{685}/F_{735} (F_r/FF_r) de altura de pico foi calculada a partir da curva ajustada para cada uma das doses de Zn em solução e usadas para inferir sobre o efeito do elemento na biossíntese de clorofila e no PSII por meio do software Origin versão 6.0.

Para as análises bioquímicas, foi coletada uma amostra por planta do mesmo par de folhas utilizadas na última avaliação da fluorescência de clorofila. Realizou-se a determinação dos conteúdos de clorofila a, b, total e carotenóides mediante extração com acetona 80%, sendo o conteúdo de carotenóides calculado pela equação segundo Lichtenthaler (1987).

O extrato bruto utilizado na determinação da atividade das enzimas e do teor de proteínas foi obtido através de homogeneização de 200 mg do material vegetal em almofariz, com N_2 líquido, e adicionado 2,0 mL de tampão fosfato

de potássio (100 mmolL^{-1} , pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C . Foram determinadas as atividades de catalase (CAT) (Havir e Mchale, 1987), polifenoloxidase (Kar e Mishra, 1976), peroxidase do ascorbato (APX) (Nakano e Asada, 1981) e teor de proteína solúvel (Bradford, 1976). Todas as determinações foram efetuadas por espectrofotometria.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e à análise de regressão com Software SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA

A produção de matéria seca das plantas diminuiu linearmente com a adição de doses crescentes de Zn à solução nutritiva (Figura 4.1). A redução de matéria seca para a maior dose em relação ao controle foi de 77%; 82%; 72%; 77% para folhas, caule, raízes e total, respectivamente.

Os efeitos visíveis da exposição a altas doses de Zn são, em geral, descritos como redução severa do crescimento, clorose e atrofia foliar (Cunha et al., 2008). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental do EUA (King, 1996), considera-se nível tóxico o teor de metal que provoca redução de 50 % do crescimento da planta, sendo que esta redução correspondeu a dose $404 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ de Zn. No entanto, cabe salientar que a partir da dose $300 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ de Zn as plantas apresentaram sintomas visuais de toxidez de Zn, caracterizados por redução do crescimento da parte aérea e escurecimento além de restrição do crescimento das raízes. Como observa-se na Figura 4.1, a dose $300 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$ de Zn em solução é a que provoca queda acentuada na matéria seca.

O Zn é um nutriente requerido para o metabolismo de carboidratos e fosfatos, síntese de proteínas, regulação e expressão de gene, bem como, estrutura de ribossomos, além de ser essencial para um vasto número de enzimas (Clemens et al., 2002; Broadley et al., 2007). Efeitos não deletérios do Zn foram observados até a dose $100 \text{ } \mu\text{molL}^{-1}$, visto que as plantas não apresentaram significativas reduções na produção de matéria seca nem demonstraram sintomas visuais de alterações metabólicas.

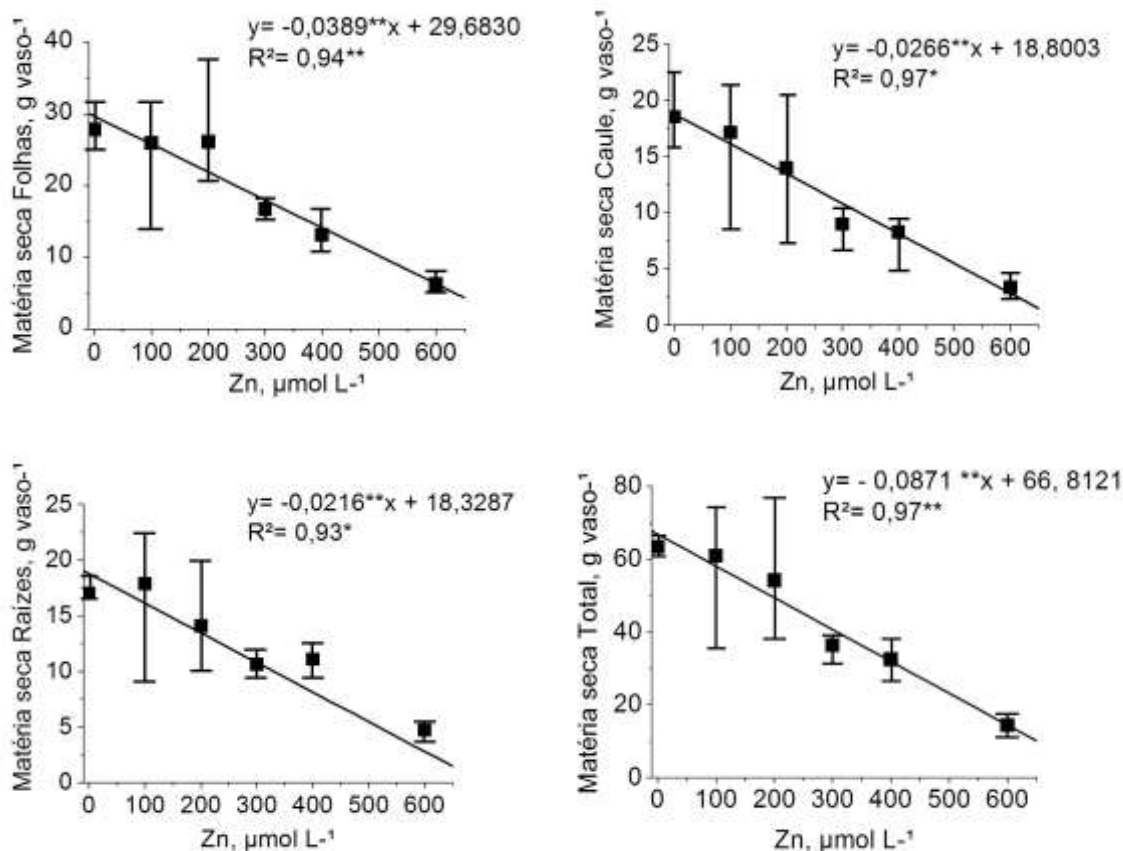


Figura 4.1. Produção de matéria seca de folhas, caule, raízes e total de plantas de mamona cultivada em doses de Zn em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

TEOR DE Zn

O aumento das doses foi acompanhado pelo acúmulo de Zn nas folhas, caule e raízes (Figura 4.2), sendo o maior teor detectado nas raízes, seguido pelas folhas. Isto ocorre porque a disponibilidade e translocação de metais é limitada pelo sequestro do metal concentrando-se no vacúolo das células radiculares (Verbruggen et al., 2009). O acúmulo de metais nas raízes é um mecanismo importante pelo qual o sistema radicular pode contribuir para a tolerância de plantas a metais, destacando-se como estratégia vantajosa para fitoestabilização.

A dose $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn acumulou 417 mg kg^{-1} nas folhas, concentração considerada tóxica para a maioria das espécies. No entanto, para mamona esse acúmulo foi considerado benéfico, pois verificou-se que apenas a partir de $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn em solução (903 mg kg^{-1} nas folhas) as plantas apresentaram sintomas visuais de toxidez e significativa redução na matéria

seca. Isso demonstra a tolerância da mamona e sua relevância para revegetação de áreas com teores elevados de Zn no solo.

O incremento de Zn do controle para maior dose (600 μmolL^{-1} de Zn) foi de 8150%, 6900% e 31473%, para folhas, caule e raízes, respectivamente. Avaliando a dose 300 μmolL^{-1} em relação ao controle, o acréscimo verificado foi de 3573%, 3016% e 17097%, para folhas, caule e raízes, nessa ordem.

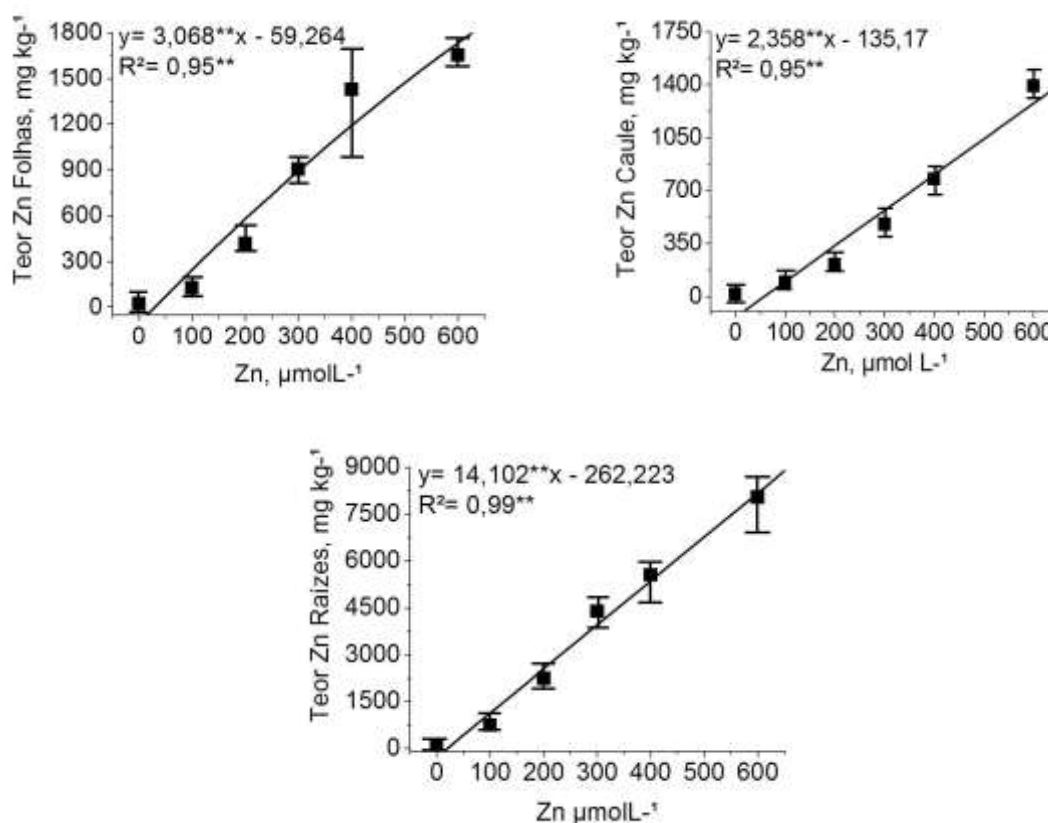


Figura 4.2. Teor de Zn em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

CONTEÚDO DE NUTRIENTES

Um dos efeitos da toxicidade de Zn nas plantas foi a redução dos conteúdos de todos os nutrientes analisados (N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, B, e Mo) (Tabela 4.1). O desbalanço nutricional tem frequentemente sido citado como um importante efeito tóxico de metais em plantas (Costa et al., 2012; Martin et al., 2012; Safarzadeh et al., 2013; Lima et al., 2013).

Tabela 4.1. Equações de regressão do conteúdo de nutrientes em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva

Variáveis	Equações de Regressão Ajustada
Conteúdo N Folhas, g vaso ⁻¹	$y = -0,0008^{**}x + 0,6239, R^2 = 0,88^{**}$
Conteúdo N Caule, g vaso ⁻¹	$y = -0,0019^{**}x + 0,1359, R^2 = 0,96^{**}$
Conteúdo P Folhas, g vaso ⁻¹	$y = -0,0019^{**}x + 1,5670, R^2 = 0,93^*$
Conteúdo K Folhas, g vaso ⁻¹	$y = -0,0012^{**}x + 1,1671, R^2 = 0,72^{**}$
Conteúdo K Caule, g vaso ⁻¹	$y = -0,001^{**}x + 0,7745, R^2 = 0,98^{**}$
Conteúdo K Raízes, g vaso ⁻¹	$y = -0,0009^{**}x + 0,7498, R^2 = 0,87^*$
Conteúdo Ca Folhas, g vaso ⁻¹	$y = -0,0001^*x + 0,933, R^2 = 0,96^*$
Conteúdo Ca Caule, g vaso ⁻¹	$y = -0,0004^*x + 0,275, R^2 = 0,97^*$
Conteúdo Ca Raízes, g vaso ⁻¹	$y = -0,5 \cdot 10^{-6} x^2 + 0,0003^{**}x + 0,0419, R^2 = 0,62^*$
Conteúdo Mg Folhas, g vaso ⁻¹	$y = -0,0002^*x + 0,184, R^2 = 0,95^*$
Conteúdo Mg Raízes, g vaso ⁻¹	$y = -0,01^*x + 0,00001, R^2 = 0,92^*$
Conteúdo Fe Folhas, mg vaso ⁻¹	$y = -0,011^*x + 7,205, R^2 = 0,81^{**}$
Conteúdo Fe Caule, mg vaso ⁻¹	$y = 0,6 \cdot 10^{-5} x^2 - 0,005^*x + 1,229, R^2 = 0,97^{**}$
Conteúdo Cu Folhas, mg vaso ⁻¹	$y = -0,0006^{**}x + 0,4525, R^2 = 0,91^{**}$
Conteúdo Cu Caule, mg vaso ⁻¹	$y = -0,0004^{**}x + 0,2712, R^2 = 0,95^{**}$
Conteúdo Mn Folha, mg vaso ⁻¹	$y = -0,005^*x + 4,058, R^2 = 0,87^*$
Conteúdo Mn Raízes, mg vaso ⁻¹	$y = 0,2 \cdot 10^{-4} x^2 - 0,02^*x + 5,019, R^2 = 0,88^*$
Conteúdo B Folha, mg vaso ⁻¹	$y = -0,0001^*x + 0,1164, R^2 = 0,94^*$
Conteúdo B Caule, mg vaso ⁻¹	$y = -0,3 \cdot 10^{-4} x^2 + 0,03, R^2 = 0,69^{**}$
Conteúdo B Raízes, mg vaso ⁻¹	$y = -0,5 \cdot 10^{-4} x + 0,03, R^2 = 0,91^*$
Conteúdo Mo Folha, mg vaso ⁻¹	$y = -0,2 \cdot 10^{-3} x + 0,192, R^2 = 0,85^*$

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Bonnet et al. (2000) verificaram reduções nos conteúdos de P, Ca, K, Mg, e Cu em folhas de azevém (*Lolium perene*) sob doses de Zn. Estes autores ressaltaram que deficiência destes nutrientes pode induzir distúrbios em diversos processos metabólicos, incluindo a fotossíntese e redução assimilatória do nitrogênio. Sinha et al. (2006) verificaram reduções na absorção de Fe, Mn e Cu, e incremento de Zn em repolho (*Brassica oleracea* L.) cultivadas sob doses de Pb, sendo considerada concentração tóxica o acúmulo de 150 mg kg⁻¹. Sagardoy et al. (2009) detectaram reduções nas concentrações de N, K, Mg e Mn em todas as partes das plantas de beterraba (*Beta vulgaris* L.) cultivadas sob estresse de Zn, além de incremento de P e Ca

apenas nos brotos. Estes autores, também verificaram sintomas de deficiência de Fe, com significativas reduções nas concentrações de pigmentos nas doses 50 μmolL^{-1} e 100 μmolL^{-1} ; sendo apontado efeitos mais severos para as plantas cultivadas sob 300 μmolL^{-1} , resultando em deficiência quântica, e conseqüentemente alterações no PSII. Wang et al. (2009) observaram maior decréscimo do conteúdo de Cu, Fe, Mg e Mn nas raízes do que nas folhas de colza (*Brassica napus*).

Bouazizi et al. (2010) verificaram que o estresse de Cu em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L) não promoveu alterações no mecanismo de enzimas antioxidantes CAT e guaiacol peroxidase (GPX), embora o desbalanço nutricional de Fe, Zn e K tenha sido um dos fatores que possibilitaram alterações morfológicas e inibição fotossintética. Bertoli et al. (2012), avaliando o estresse de Cd em tomate, citam reduções nos conteúdos de K, Ca, Mn e Zn na parte aérea, de K nos frutos e de Mn nas raízes. Li et al. (2010) observaram em folhas de arroz (*Oryza sativa* L.) correlação positiva entre os teores de Pb e de Fe, Mn e Ni e entre os teores de Cd e Ni, e correlações negativas entre os teores de Cd, Fe e Mn.

Zhao et al. (2012) verificaram acúmulo e tolerância de *Phytolacca americana* a Mn sem desbalanço nutricional. Estes autores também apontam como mecanismo estratégico das plantas para tolerar o estresse de Mn a elevação da atividade enzimática (SOD e CAT), comportamentos não verificados avaliando a toxicidade para os metais Zn e Cu.

Observou-se redução de 87% de Fe nas folhas para dose 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em relação ao controle (Tabela 4.1). Esse declínio implica danos no *status* fisiológico das plantas, principalmente porque o Fe desempenha relevantes funções metabólicas, participando de reações de oxirreduções na fotossíntese, respiração mitocondrial, assimilação de nitrogênio, biossíntese hormonal, produção e regulação de ROS e homeostase. Além disso, 80% do Fe nas plantas é encontrado nos cloroplastos, denotando sua importância no PSII (Hansch e Mendel, 2009). Assim como observado para o Fe, a redução do conteúdo dos micronutrientes Cu, Mn, Mo também apontam inibição no *status* fotossintéticos das plantas. Ademais, por possuir similaridade com cátions divalentes como Mn, Fe e Mg, o Zn pode competir por vários sítios bioativos, promovendo desequilíbrio a nível metabólico (Monnet et al. 2001). Uma alteração observada é a substituição do Mg por Zn na molécula de clorofila

(Kupper et al.,1998), o que pode ter implicações sobre a capacidade fotossintética das plantas.

FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA

Os espectros apresentaram diferenças nos picos de absorção da fluorescência de clorofila (Figura 4.3 A e 4.3B). Observou-se menor reabsorção da fluorescência nas plantas sob maior estresse de Zn. De acordo com Giardi et al. (2001), a técnica da fluorescência de clorofila baseia-se em informação biológica sobre efeitos de toxidez de contaminantes por meio da inibição na atividade do transporte de elétrons e evolução fotossintética. A técnica consegue detectar alterações no PSII em diferentes condições de estresse, por este ser um fotossistema sensível a uma ampla variação de contaminantes, incluindo Zn. O efeito de estresse por metais pesado afetam os fotossistemas, resultando em baixa produção de quantum, refletindo assim na intensidade normal no espectro de fluorescência (Golpal et al., 2002; Maurya et al., 2008).

Segundo Siedlecka e Krupa (2004), a rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase) é uma enzima muito importante para o ciclo de Calvin, pois participa da catalisação de reações de carboxilação e oxigenação. Em condições de estresse por metais pesados, estes podem substituir o Mg no centro ativo ou nas subunidades da rubisco, conseqüentemente, bloqueando sua atividade normal e promovendo alterações no funcionamento do ciclo de Calvin. Isto resulta na inibição do transporte fotossintético de elétrons e em danos ao PSII. De acordo com Mateos-Naranjo et al. (2008), a exposição de plantas ao excesso de Zn inibe o transporte de elétrons no PSII, influenciando a fixação e assimilação de CO₂, processo desencadeado por declínio da atividade da rubisco. Alterações na fluorescência são primariamente observados no PSII porque esse processo parece ser mais sensível a estresses ambientais (Silva et al., 2012).

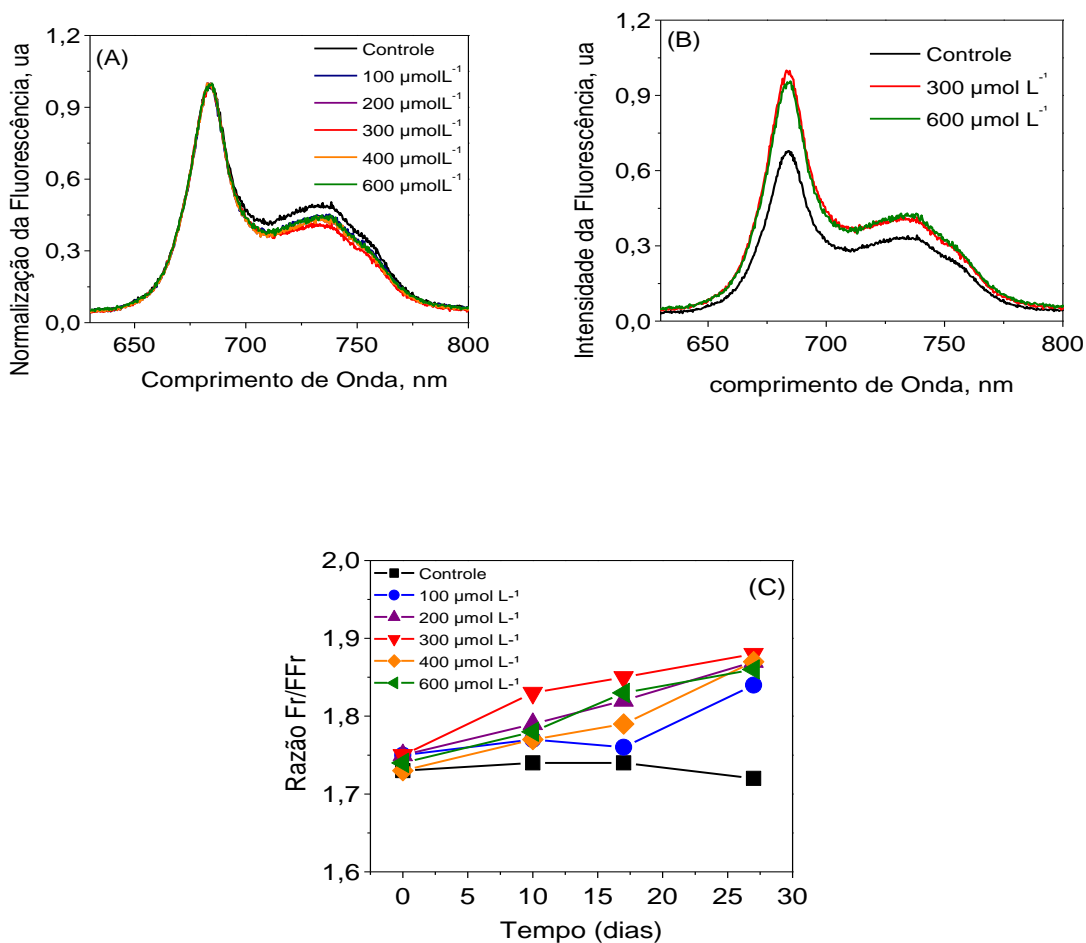


Figura 4.3. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva aos 28 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B), respectivamente. Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo de plantas de mamona, referente às leituras do vermelho e vermelho distante (Fr/FFr) (C).

A razão Fr/FFr demonstra que as doses de Zn promoveram alterações na biossíntese fotossintética ao longo do cultivo, a qual se acentuou após 18 dias de avaliação (Figura 4.3C). Os sintomas de toxidez visualizados na dose 300 µmol L⁻¹ coincidiram com o aumento na razão Fr/FFr. Percebe-se nesta dose que razão Fr/FFr detecta alterações bastante acentuadas, pois quanto maior essa razão maior indicativo o estresse. No entanto, o acúmulo de Zn nas folhas das plantas cultivadas sob doses mais elevadas apresentaram razão Fr/FFr menores que a dose 300 µmol L⁻¹, provavelmente por não apontar reduções significativas, no conteúdo de clorofila com doses superiores a 300 µmol L⁻¹ mecanismo induzido pela planta para reduzir os efeitos do acúmulo de Zn. De acordo com Buschmann (2007), a razão Fr/FFr depende principalmente

do conteúdo da clorofila e, em menor relevância, da atividade fotossintética e das características ópticas e arranjos celulares do tecido foliar. Como se pode visualizar na Figura 4.3B, o estresse causado pelo Zn no PSII foi muito semelhante para as doses 300 e 600 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Após 10 dias da adição das doses de Zn, a razão Fr/FFr (Figura 4.3C) possibilitou a detecção de alteração no PSII, mesmo sem as plantas apresentarem sintomas de toxidez. Portanto, confirma-se que a fluorescência de clorofila pode ser útil na detecção precoce da toxicidade por Zn em plantas, como anteriormente demonstrado para Cd (Baryla et al., 2001; Maurya e Gopal, 2008; Silva et al., 2012), Ni (Gopal et al., 2002; Mishra e Gopal, 2008), Cu e Hg (Ventrela et al., 2009). Contudo, observou-se que as plantas apresentaram uma resistência de elevação dessa razão, acentuando-se aos 28 dias de cultivos. Nota-se também que apenas neste período a razão Fr/FFr assemelhou-se para todas as doses. Isto pode sugerir um forte e brusco estresse pelo Zn iniciado na dose 300 mol L^{-1} e que se estabiliza a partir desta dose, sendo portanto menores os decréscimos nos teores de clorofila e na fluorescência de clorofila em doses mais elevadas (Figura 4.3B; Tabela 4.1). Isto pode ser ainda comprovado pela maior razão Fr/FFr ter ocorrido exatamente na maior taxa de decréscimo da matéria seca das plantas (Figura 4.4A), ou seja, na dose 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$; para as doses maiores esta relação se altera, relativamente, muito pouco.

O Zn por possuir similaridade com cátions divalentes como Mn, Fe, Mg pode competir por vários sítios bioativos promovendo desequilíbrio fotossintético, podendo plantas sob estresse de Zn evidenciar essa interferência no PSII (Monnet et al. 2001; Siedlecka e Krupa, 2004). No entanto, Kupper et al. (1998), citam que mesmo quando ocorre a substituição do Mg por Zn na molécula de clorofila, esta pode transferir elétrons para um nível eletrônico mais elevado, sendo possível detectar emissão de fluorescência na mesma faixa de comprimento de ondas de clorofilas que não sofreram alterações estruturais.

A razão Fr/FFr é uma ferramenta capaz de identificar alterações no aparato fotossintético, assim como, os valores da razão Fv/Fm podem ser usados para quantificar a fotoinibição promovida pelo estresse por metais (Krivosheeva et al., 1996). No presente caso, esta fotoinibição do PSII ocorreu a partir da dose 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Zn (Figura 4.4B), embora com reduzidos

efeitos na matéria seca (Figura 4.4A) e sem a apresentação de sintomas visuais de fitotoxicidade. Quando o estresse sobre o PSII atinge seu máximo (dose 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) a concentração de Zn nas folhas é de 903 mg kg^{-1} e os sintomas são externados.

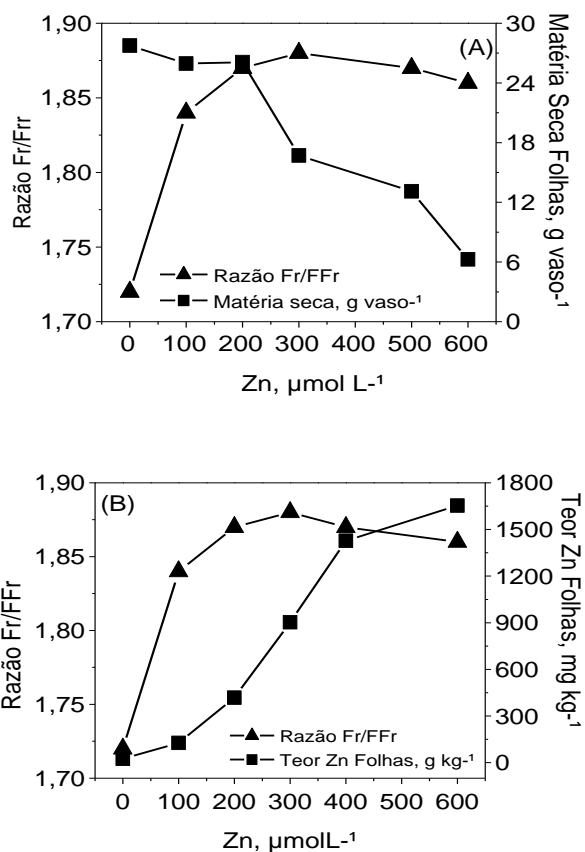


Figura 4.4. Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 28 dias e matéria seca das folhas (A). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 28 e conteúdo de Zn das folhas (B).

PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICA E PROTEÍNA SOLÚVEL

Os conteúdos de clorofila a e total (Tabela 4.2) apresentaram elevação com as doses de Zn, apesar do efeito tóxico observado visualmente e das alterações detectadas pela razão Fr/FFr (Figura 4.4). Não foi verificado efeito significativo para o conteúdo de clorofila b e carotenóides, comportamento também observado por Cambrollé et al. (2013), que observaram redução da fluorescência de clorofila em condições de estresse por Zn em *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. Estes autores, no entanto, também não detectaram modificações na concentração de clorofila até 60 mmol L^{-1} , apenas em doses

de Zn de 90 e 130 mmolL^{-1} . A baixa tolerância das plantas à toxidez por metais pesados pode reduzir os teores de clorofilas e carotenóides (Joshi e Mohanty, 2004; Maurya et al., 2008; Shi e Cai, 2009). Assim, pode-se inferir que a mamona foi relativamente tolerante à toxicidade por Zn, por não apresentar efeitos deletérios nos pigmentos avaliados, que são importantes indicadores de alterações fotossintéticas. Além disso, mesmo em teores nas folhas tão elevados quanto 417 mg kg^{-1} , a espécie não apresentou redução significativa de matéria seca.

Outro fato que pode ser um indicativo de estratégia de tolerância ao estresse após exposição prolongada sob Zn foi o declínio no conteúdo da clorofila até a dose $400 \mu\text{mol L}^{-1}$ com posterior elevação na dose $600 \mu\text{mol L}^{-1}$. Resultado também encontrado por Silva et al (2012), avaliando o efeito de Cd em pigmentos fotossintéticos, e por Alfadul e Al-Fredan (2013), avaliando a interação dos metais Zn, Cu, Cd e Pb no metabolismo das plantas. Podendo ter ocorrido efeito de concentração, devido uma menor produção de biomassa das folhas.

Tabela 4.2. Equações de regressão de pigmentos em plantas de mamona cultivadas sob doses de Zn em solução nutritiva

Doses de Zn ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Clorofila a	Clorofila Total
	mg g^{-1} de matéria fresca	
0,380	0,76	1,114
100	0,81	1,187
200	1,13	1,616
300	1,24	1,780
400	1,02	1,460
600	1,36	1,877
Variáveis	Equações de Regressão Ajustada	
Clorofila a	$y = 0,0009^{**}x + 0,8076, R^2 = 0,71^*$	
Clorofila total	$y = 0,0012^{**}x + 1,1888, R^2 = 0,68^*$	

* e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Não foi verificado efeito para as variáveis CAT, peroxidase, polifenoloxidase, APX e proteína solúvel. A ausência de elevação do conteúdo de enzimas antioxidantes indica que o excesso de metais pesados induz

acúmulo de ROS, alterando negativamente o crescimento das plantas e funcionamento normal da fotossíntese. Lin e Aarts (2012) afirmam que uma vez o metal acumulado no citosol, a estratégia de desintoxicação por meio de enzimas antioxidantes pode reduzir a toxicidade. Estudos têm demonstrado a sensibilidade do efeito de metais pesados em elevar a atividade de enzimas antioxidantes catalase, ascorbato peroxidase e Glutathione S-transferase como mecanismo da planta para inibir o efeito de toxidez (Sun et al., 2007; Jamil et al., 2009; Yadav et al., 2010; Lin e Aarts, 2012). Apesar de não verificar aumento na atividade enzimática nas folhas, essa atividade também não decresceu, em resposta as doses até $600 \mu\text{mol L}^{-1}$, podendo relacionar o maior acúmulo de Zn nas raízes ao mecanismo de defesa, que inibiu sua translocação para parte aérea, resultando em menor efeito metabólico a nível foliar.

CONCLUSÕES

A medida da fluorescência de clorofila detectou alterações temporais promovidas pelo acúmulo de Zn nas plantas e mostrou-se útil na detecção precoce da toxicidade do elemento em plantas de mamona.

Apesar do declínio no *status* nutricional das plantas, com reduções no conteúdo de Fe e Mg nas folhas, a mamona apresentou relativa tolerância à toxicidade por Zn, não demonstrando efeitos deletérios aos pigmentos fotossintéticos.

O acúmulo de Zn também não promoveu alterações na atividade de enzimas antioxidantes e no teor de proteína solúvel nas folhas.

Considerando que a mamona apresentou relativa tolerância a doses elevadas do metal, esta espécie pode ser uma alternativa ambiental e economicamente atraente para fitoestabilização de áreas contaminadas, com adicional vantagem para produção de óleo industrial e bioenergia.

REFERÊNCIAS

ALFADUL, S. M. S; AL-FREDAN, M. A. A. Effects of Cd, Cu, Pb, and Zn combinations on phragmites australis metabolism, metal accumulation and distribution. **Arabian Journal for Science and Engineering**, v. 38, p.11–19, 2013.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

BABULA, P.; ADAM, V.; OPATRILOVA, R.; ZEHNALÉK, J.; HAVEL, L.; KIZEK, R. Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. **Environmental Chemistry Letters**, p.6, v. 189–213, 2008.

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

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

BOUAZIZI, H.; JOUILI, H.; GEITMANN, A.; FERJANI, E. E. Copper toxicity in expanding leaves of *Phaseolus vulgaris* L.: antioxidant enzyme response and nutrient element uptake. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, p. 1304–1308, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p.248–254, 1976.

- BROADLEY, M. R. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, p. 677–702, 2007.
- BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leaf. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261–271, 2007.
- BONNET, M.; CAMARES, O.; VEISSEIRE, P. Effect of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 945–953, 2000.
- CAMBROLLÉ, J.; MANCILLA-LEYTON, J. M.; MUNOZ-VALLES, S.; FIGUEROA-LUQUE, E.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Evaluation of zinc tolerance and accumulation potential of the coastal shrub *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. **Environmental and Experimental Botany**, v. 85 p. 50–57, 2013.
- CAMBROLLÉ, J., MATEOS-NARANJO, E., REDONDO-GOMEZ, S., LUQUE, T., FIGUEROA, M. E. Growth, reproductive and photosynthetic responses to copper in the yellowhorned poppy, *Glaucium flavum* Crantz. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 57–64, 2011.
- CHERIF, J.; MEDIOUNI, C.; AMMAR, W. B.; JEMAL, F. Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). **Journal of Environmental Sciences**, v.23; p. 837–844, 2011.
- CORCOLL, N.; BONET, B.; LEIRA, M.; GUASCH, H. Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 673, p. 119–136, 2011.
- COSTA, E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; MELO, É. E. C.; RIBEIRO, B. T.; SANTOS, E., SEVERINO, E. C., FAQUIN, V.; HALE, B. A. Assessing the

tolerance of castor bean to Cd and Pb for phytoremediation purposes.

Biological Trace Element Research, v.145, p. 93–100, 2012.

CUNHA, K. C. V.; NASCIMENTO, C. W. A.; PIMENTEL, R. M. M., ACCIOLY, M. A.; SILVA, A. J. Disponibilidade, acúmulo e toxidez de cádmio e zinco cultivado em solo contaminado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1319–1328, 2008.

CLEMENS, S.; PALMGREN, M. G.; KRAMER, U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation. **Trends in Plant Science**, v.7, p. 309–315, 2002.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36–41, 2008.

GADJEV I, STONE JM, GECHEV TS. Programmed cell death in plants: new insights into redox regulation and the role of hydrogen peroxide. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 270, p. 87–144, 2008.

GIARDI, M. T.; KOBLÍZEK, M.; MASOJÍDEK, J. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 1027-1033, 2001.

GOPAL, R.; MISHRA, K. B.; ZEESHAN, M.; PRASAD, S. M.; JOSHI, M. M. Laser-induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress. **Current Science**, v. 83, p. 880–884, 2002.

HANSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v.12, p. 259–266, 2009.

HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tabocco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: University of California, 1950. p. 32 (Circular, 347).

JAMIL, S.; ABHILASH, P. C.; SINGH, N.; SHARMA, P. N. *Jatropha curcas* L: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 269–275, 2009.

JOSHI, M. K; MOHANTY, P. Chlorophyll a Fluorescence as a Probe of Heavy Metal Ion Toxicity in Plants. 2004. In: **Advances in photosynthesis and respiration, chlorophyll a fluorescence**, v. 19, p. 637–651.

KABATA – PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants**. 4 ed. Boca Raton, CRC, 2010. 505p.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315–319, 1976.

KING, L. D. Soil heavy metals. In ALVAREZ, V. H.; FONTES, L. E.; FONTES, M. P. **Os solos nos grandes domínios do Brasil e o desenvolvimento sustentado**. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 823–836, 1996.

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: The basics. **Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**. v. 42, p. 313–49, 1991.

KRIVOSHEEVA, A., TAO, D. L., OTTANDER, C., WINGSLE, G., DUBE, S. L., OQUIST, G. Cold acclimated and photoinhibition in *Scots pine*. **Planta**, v. 200, p. 296–305, 1996.

KUPPER, H. KUPPER, F. SPILLER, M. In situ detection of heavy metal substituted chlorophylls in water plants. **Photosynthetica**, v. 58, p.123–133, 1998.

LI, B., WANG, X., QI, X., HUANG, L., YE, Z. Identification of rice cultivars with low brown rice mixed cadmium and lead contents and their interactions with the micronutrients iron, zinc, nickel and manganese. **Journal of Environmental Sciences**, v. 24 p. 1790–1798, 2010.

LICHTENTHALER H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R (eds) **Methods in Enzymology**. Academic Press, NewYork, p 350–382.

LIMA, F. DE S.; NASCIMENTO, C. W. A.; ACCIOLY, A. M. DE A.; SOUSA, C. DA S.; CUNHA FILHO, F. F. DA. Bioconcentração de chumbo e micronutrientes em hortaliças cultivadas em solo contaminado. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p.234–241, 2013.

LIN, Y.; AARTS, M. G. M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3187–3206, 2012.

MARTIN, S. R., LLUGANY, M., BARCELÓ, J., POSCHENRIEDER, C. Cadmium exclusion a key factor in differential Cd-resistance in *Thlaspi arvense* ecotypes. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 729–734, 2012.

MATEOS-NARANJO, E; REDONDO-GÓMEZ, S.; CAMBROLLÉ, J.; LUQUE, T.; FIGUEROA, M. E. Growth and photosynthetic responses to zinc stress of an

invasive cordgrass *Spartina densiflora*. **Plant Biology**. v. 10, p. 754–762, 2008.

MATILLA-VÁZQUEZ, M.; MATILLA, A. (2012) Role of H₂O₂ as signaling molecule in plants. In: **Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change**, Springer, New York, p 361–380.

MAURYA, R.; PRASAD, S. M.; GOPAL, R.; LIF technique offers the potential for the detection of cadmium-induced alteration in photosynthetic activities of *Zea Mays* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 9, p. 29–35, 2008.

MAURYA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser-induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

MISHRA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

MONNET, F.; VAILLANT, N.; VERNAY, P. ; COUDRET, A.; H. SALLANON, H.; HITMI, A. Relationship between PSII activity CO₂ fixation, and Zn, Mn and Mg contents of *Lolium perenne* under zinc stress. **Journal Plant Physiology**, v. 158, p. 1137–1144, 2001.

NAKANO, Y; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068–1072, 1981.

SAFARZADEH, S.; RONAGHI, A.; KARIMIAN, N. Effect of cadmium toxicity on micronutrient concentration, uptake and partitioning in seven rice cultivars. **Archives of Agronomy and Soil Science**, v. 59, p. 231–245, 2013.

SAGARDOY, R.; MORALES, F; LÓPEZ-MILLÁN, A-F; ABADÍA, A.; ABADÍA, J.; Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biology**, v.11, p. 339–350, 2009.

SHABALA, S. Metal cations in CO₂ assimilation and conversion by plants. **Journal of the Minerals, Metals and Materials Society**, 2009, v. 61, p. 28–34, 2009.

SHI, G.; CAI, Q. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 555–561, 2009.

SIEDLECKA, A., KRUPA, Z. Rubisco activity maintenance in environmental stress conditions-how many strategies. **Cellular and Molecular Biology Letters** v. 9, p. 56–57, 2004.

SILVA JUNIOR, E. A. da. Estudo de estresse abiótico em cana-de-açúcar e pinhão manso por fluorescência de clorofila. 2011.73f. Dissertação (Mestre em Física Aplicada) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SILVA, A. J. DA; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. DA S.; SILVA-Jr, E. A. da. LED-induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 223, p. 3527–3533, 2012.

SINHA, P.; DUBE, B. K.; SRIVASTAVA, P.; CHATTERJEE, C.; Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. **Chemosphere**, v. 65, p. 651–656, 2006.

SUN, R-L.; ZHOU, Q-X.; SUN, F-H.; JIN, C-X. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Environ and Experimental Botany**, v. 60, 468–476, 2007.

USEPA - MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES. Method 3051A, CD-ROM, 1996.

VENTRELA, A.; CATUCCI, L.; PILETSKA, E.; PILETSKY, S.; AGOSTIANO, A. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 19–25, 2009.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759–776, 2009.

VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de sojas afetadas pela interação alumínio-fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.8, p.91–96, 1984.

VITOSH, M. L.; WARNCKE, D. D.; LUCAS, R. E. Secondary and micronutrients: for vegetables and field crops. 1994. Disponível em: <<https://www.msu.edu/~warncke/E0486.pdf>>. Acesso em: 10/10/2012.

YADAV, S. K.; JUWARKAR, A. A.; KUMAR, G. P.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; CHAKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L. Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, v. 100 p. 4616–4622, 2009.

WANG, C.; ZHANG, S. H.; WANG, P. F.; HOU, J.; ZHANG, W. J.; LI, W.; LIN, Z. P. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. p. 1468–1476, 2009.

ZHAO, H.; WU, L.; CHAI, T.; ZHANG, Y.; TAN, J.; MA, S. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca Americana*. **Journal of Plant Physiology**, v.169, p. 1243–1252, 2012.

CAPÍTULO V

ALTERAÇÕES METABÓLICAS E FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA PARA
DETECÇÃO PRECOCE DA TOXICIDADE DE Pb EM MAMONA (*Ricinus
communis*)

ALTERAÇÕES METABÓLICAS E FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA
PARA DETECÇÃO PRECOCE DA TOXICIDADE DE Pb EM MAMONA
(*Ricinus communis*)

RESUMO

Em áreas contaminadas por Pb, a remediação é uma prática relevante e difícil, pois este é um elemento praticamente imóvel no solo. A fitoestabilização é uma prática considerada ambientalmente atraente para manejo de áreas contaminadas por este metal. A mamona (*Ricinus communis*) é uma espécie produtora de óleo não comestível e apresenta relativa tolerância a metais pesados. O presente trabalho avaliou a toxicidade por Pb utilizando a técnica da fluorescência de clorofila e as alterações provocadas pelo metal na produção de biomassa, composição mineral, produção de pigmentos fotossintéticos, na atividade de enzimas antioxidantes e concentração de proteínas solúveis total. Para esta finalidade, plantas de pinhão-mansão foram cultivadas em solução nutritiva com cinco doses de Pb (25, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e um controle, sem adição do metal, foi adotado. Os resultados demonstraram que a fluorescência de clorofila foi eficiente para detectar precocemente alterações no fotossistema II promovidas pela toxicidade por Pb. As doses de Pb não provocaram alterações na composição mineral das plantas, nos pigmentos fotossintéticos, na atividade das enzimas antioxidantes e nas proteínas solúveis nas folhas. A mamona, por sua tolerância e capacidade de acumular Pb nas raízes, pode ser uma alternativa ambiental e economicamente atraente para fitoestabilização e fitoatenuação de áreas contaminadas por Pb. A mamona apresentar adicional vantagem econômica decorrente da utilização do óleo para produção de bioenergia e fins industriais durante o processo de remediação.

Palavras-chave: Fluorescência de clorofila. Tolerância. Oleaginosa.

METABOLIC ALTERATIONS AND X-RAY CHLOROPHYLL
FLUORESCENCE TO EARLY DETECTION OF LEAD STRESS IN CASTOR
BEAN PLANTS (*Ricinus communis*)

ABSTRACT

The remediation of lead contaminated areas poses a serious challenge to soil chemists due to the low solubility of Pb in soil. Thus Pb phytostabilization is regarded as an attractive technique to Pb contaminated areas. Castor bean (*Ricinus communis*) is an oilseed crop known for its tolerance to heavy metals. Thus the aim of this study was to assess the early detection of Pb toxicity and the Pb effects on the biomass, mineral composition, antioxidative enzymes activity, soluble proteins and photosynthetic pigments of castor bean plants. Plants were grown in a nutrient solution with five Pb doses (25, 50, 100, 150 and 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) besides a control with no Pb addition. The results showed that X-ray chlorophyll fluorescence was efficient as a technique for early detection of photosystem II alterations driven for Pb toxicity. Castor bean was tolerant to the Pb doses tested since plants presented no changes on mineral composition, photosynthetic pigments, defense-enzymes activity and soluble proteins in leaves. Given its ability to tolerate and accumulate Pb in roots, castor bean is a viable alternative to such techniques as phytostabilization and phytoattenuation of Pb contaminated areas. Castor bean is also economically attractive for industrial and biofuel oil production during the remediation.

Keywords: Chlorophyll fluorescence. Tolerance. Oilseed crop.

INTRODUÇÃO

A contaminação ambiental proveniente de fontes antropogênicas tem provocado impactos em diferentes ecossistemas. Entre estas fontes destacam-se os esgotos, a mineração, a metalúrgica, assim como os resíduos e as emissões de contaminantes das diversas atividades industriais. Essas são as principais vias de entrada de metais pesados no sistema solo-água-planta-atmosfera e, conseqüentemente, afetam o acúmulo e a transferência dos metais para os diferentes níveis tróficos, comprometendo a qualidade de vida (Gallego et al., 2012).

Paoliello et al. (2002), avaliando a exposição de crianças em área próxima a uma antiga refinaria de Pb, observaram que a proximidade da área residencial à fonte pontual de contaminação, mesmo após o fechamento da empresa, demonstrou que a bioacessibilidade à crianças, as quais apresentaram níveis médio de $11,25 \mu\text{g dL}^{-1}$ de Pb no sangue, manteve-se devido ao efeito residual do metal. Gamiño-Gutiérrez et al. (2013), estudando a contaminação por As e Pb em solo urbano no México, principalmente em locais de recreação e sua bioacessibilidade à crianças (4 a 10 anos de idade), verificaram que 50% das crianças apresentaram valores de Pb no sangue (5 a $10 \mu\text{g dL}^{-1}$ de Pb) abaixo do nível de intervenção mexicana e 25% deles estavam acima do valor de referência ($>10 \mu\text{g dL}^{-1}$ de Pb). Estes autores ressaltam a importância do monitoramento destas áreas devido ao elevado risco de contaminação nesta faixa etária, facilitado pelo contato direto com solo, pois um grande número de crianças participa de atividades recreativas diariamente nestas áreas. Além disso, citam que o Pb, mesmo em baixas concentrações, podem provocar doenças neurológicas e distúrbios na capacidade cognitiva. Ren et al., (2006) citam que a ingestão do Pb por meio do comportamento hand-to-mouth tem especial relevância para ingestão de solo por crianças de 4 a 5 anos de idade, sendo este comportamento apontado como significativo risco à exposição ao Pb em áreas industriais, parques públicos e creches.

Em áreas contaminadas por Pb, a remoção deste metal é uma prática onerosa e difícil, pois este é um elemento praticamente imóvel no solo e de baixa translocação na maioria das plantas. Práticas fitorremediadoras podem ser utilizadas para recuperação de áreas impactadas e, entre estas, a

fitoestabilização pode ser uma alternativa ambientalmente atraente. Algumas autores têm demonstrado que a mamona apresenta tolerância a metais pesados e metaloides (Romeiro et al., 2006; Niu et al., 2007; Shi e Cai, 2009; Melo et al., 2009) e por ser uma cultura não-alimentícia apresenta grande potencial para programas de remediação de áreas contaminadas com adicional vantagem de exploração econômica da área durante o período de recuperação, visto que a espécie pode ser utilizada para produção de biocombustível. De acordo com Berman et al. (2011), as especificações do óleo da mamona para mistura B2 (10% ao diesel) e B100, as propriedades viscosidade cinética e temperatura de destilação de $15,17 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$ e $398,7 \text{ C}^\circ$, respectivamente, são as características que limitam o uso do óleo para produzir biocombustível puro. No entanto, para mistura B2 não houve restrições quanto ao uso. Além disso, a extração de compostos ativos das sementes de oleaginosas para fins industriais pode ser uma alternativa favorável para projetos de fitorremediação de áreas contaminadas por metais pesados (Ginnerken et al., 2007).

Alguns estudos têm avaliado a toxicidade por metais em diferentes espécies, sendo que o conhecimento dos mecanismos de tolerância induzidos pelas plantas são de grande relevância para as práticas fitorremediadoras, assim como para os estudos na área de biotecnologia (Gallego et al., 2012). As plantas que são susceptíveis à toxicidade por Pb externam sintomas visuais de toxicidade ao metal, por outro lado, quando são tolerantes, atenuam os efeitos fitotóxicos apontando sinalizações a nível celular e metabólico como estratégias de defesa. Hamadouche et al. (2012) verificaram que a toxicidade por Pb em plantas de rabanete (*Raphanus sativus*) provocou elevação nas concentrações de clorofilas nas doses mais baixas e declínio para as plantas cultivadas na dose mais severa (750 mg L^{-1}), na qual externaram como sintomas visuais de toxicidade (clorose seguido por necrose), além da diminuição na redução assimilatória de nitrogênio. Sinha et al. (2006) e Nautiyal e Sinha (2012) apontaram o desbalanço nutricional como um dos sintomas de toxicidade por Pb em plantas de repolho (*Brassica oleracea* L.) e guandu (*Cajanus cajan* Mill), respectivamente. Karimi et al. (2012) observaram severa redução na produção de matéria seca de alcachofra (*Cynara scolymus*). Estes autores ressaltaram ainda que, embora não verificado significativa redução nas concentrações de clorofilas a e b, a dose mais elevada (1500 umol L^{-1} de Pb) comparada com o controle provocou reduções de 63 e 46% na clorofila a e b,

respectivamente. Rossato et al. (2012) não verificaram alteração na concentração de pigmentos fotossintéticos em lucera (*Pluchea sagittalis*) cultivadas sob doses de Pb até 1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e na redução da matéria seca das plantas. Alkhatib et al. (2011) observaram reduções na taxa fotossintética e diminuição da concentração de CO_2 nas folhas em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.) cultivadas sob concentrações de 100, 300 e 500 μmolL^{-1} de Pb. Alguns estudos citam que o sequestro e acúmulo de Pb na parede celular, compartimentalização e complexação no vacúolo são estratégias relevantes para restringir os danos provocados por toxicidade por este metal (Samardakiewicz e Woźny, 2000; Piechalak et al., 2002; Kopittke et al., 2008; Meyers et al.; 2008). Alterações na atividade das enzimas antioxidantes nas plantas cultivadas sob estresse de Pb, tem sido apontadas como um mecanismo relevante de defesa a toxicidade por este elemento (Kumar et al., 2012; Hamadouche et al., 2012).

O acúmulo de Pb e os mecanismos envolvidos na tolerância e toxicidade por este metal podem demonstrar respostas distintas nas diferentes espécies e até mesmo entres cultivares e variedades. Por isso, além das investigações sobre os efeitos das concentrações tóxicas de Pb nos tecidos vegetais, (sintomas visuais, desbalanço nutricional, distúrbios morfológicos, metabólicos e fisiológicos), técnicas que possibilitem identificar a toxicidade ou tolerância de forma precoce e eficiente são de grande importância para o monitoramento de contaminação ambiental. Neste sentido, a medida da fluorescência de clorofila é uma técnica que utiliza informação sobre a atividade fotoquímica das plantas, possibilitando detectar estresse ambiental (Giardi et al., 2001; Roháček et al., 2008; Corcoll et al., 2011; Silva et al., 2012). Isto ocorre porque a molécula de clorofila é fluorescente e através da dissipação de fóton pode-se detectar alterações na transferência de elétrons à nível de membranas dos cloroplastos, possibilitando elucidar informações pontuais e temporais (Lin et al., 2007). Uma relevante vantagem adicional dessa técnica é a sensibilidade para detectar distúrbios em membrana celular fotossintética sem destruir o tecido vegetal (Maurya e Gopal, 2008; Ventrella et al., 2009; Cherif et al., 2010).

O presente trabalho avaliou a toxicidade por Pb utilizando a técnica não destrutiva da fluorescência de clorofila e as alterações provocadas pelo metal na produção de biomassa, composição mineral, produção de pigmentos fotossintéticos, na atividade de enzimas antioxidantes e concentração de

proteínas solúveis totais, visando a utilização da espécie em programas de fitoestabilização ou fitoatenuação de áreas contaminadas por chumbo.

MATERIAL E MÉTODOS

Sementes de mamona (*Ricinus communis* cv. BRS Energia) foram colocadas para germinar em bandejas contendo vermiculita umedecida com solução de Ca $0,67 \text{ mmol L}^{-1}$ na forma de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Vilela e Anghinomi, 1984). Treze dias após o semeio, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos contendo seis litros de solução nutritiva (Hoagland e Arnon, 1950, modificada), contendo: 105,05; 15,5; 117,3; 100,2; 24,3; 32,1; 0,325; 0,25; 0,025; 0,01; 0,25; 0,005; $7,53 \text{ mg L}^{-1}$ de N, P, K, Ca, Mg, S, Cl, Mn, Zn, Cu, B, Mo e Fe, respectivamente, a qual foi substituída semanalmente. Foi adicionada diariamente água deionizada nos vasos para reposição da água perdida por evapotranspiração. O pH da solução foi ajustado sempre que necessário, para valores próximos de 5,6 (+/- 0,2), sendo a correção efetuada com H_2SO_4 ou NaOH 1 mmol L^{-1} . Após 14 dias de cultivo, foram acrescentadas na solução doses de 25, 50, 100, 150 e $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$]. Um controle sem adição de Pb foi adotado. O experimento foi conduzido em blocos ao acaso, (uma espécie vegetal com seis doses de Pb), com 3 repetições.

Após a adição do metal, as plantas foram mantidas em casa de vegetação por 28 dias. Posterior a esse período, procedeu-se a coleta e lavagem com água destilada das folhas, caule e raízes, sendo estes acondicionados em sacos de papel.

As amostras foram mantidas em estufa a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ com circulação forçada de ar até peso constante, obtendo-se a matéria seca das partes e, pela soma, a matéria seca total. Após secagem, as amostras foram moídas em moinho tipo Willey e acondicionadas em sacos plásticos. A digestão do material vegetal foi feita em ácidos nítrico e clorídrico em forno de microondas (MarsXpress), segundo o método 3051A (USEPA - 1996). Este material também foi submetido à digestão sulfúrica para determinação de N (Embrapa, 1999).

No extrato da digestão foram determinados os teores de Pb, Zn e Cu por espectrofotometria de absorção atômica (AAAnalyst 800). Também foram determinados os teores de Ca, Mg, Fe, Mn, Mo e B por espectrometria de emissão ótica (ICP-OES/Optima 7000, Perkin Elmer). Os teores de N, K e P,

foram determinados por titulometria, fotometria e colorimetria, respectivamente. A partir dos teores dos elementos e da matéria seca, foram calculados os conteúdos dos elementos.

As medidas de fluorescência de clorofila foram efetuadas com emissor de luz ultravioleta LED, com picos de comprimento de onda vermelho (685 nm) e vermelho distante (735 nm) obtidos pelo software do aparelho (Ocean Optics-Spectra Suite). Foram efetuadas cinco avaliações ao longo do experimento. A primeira medida foi tomada antes da adição do Pb e a última um dia antes da coleta das plantas. Estas medidas foram realizadas à noite a partir da permanência das plantas por 20 minutos no escuro, com o intuito de garantir a desativação do transporte de elétrons fotossintético. As leituras foram efetuadas no segundo par de folhas abaixo do meristema apical, sendo realizadas quatro leituras por planta, as quais foram submetendo à emissão de luz por 10 segundos cronometrados.

Os espectros obtidos foram ajustados a duas curvas Gaussianas correspondentes ao 685 nm e 735 nm. A razão entre a intensidade da fluorescência F_{685}/F_{735} (F_r/FF_r) de altura de pico foi calculada a partir da curva ajustada para cada uma das doses de Pb em solução e usadas para inferir sobre o efeito do elemento na biossíntese de clorofila e no PSII por meio do software Origin versão 6.0.

Para as análises bioquímicas, foi coletada uma amostra por planta do mesmo par de folhas utilizadas na avaliação da fluorescência de clorofila. Realizou-se a determinação dos conteúdos de clorofilas a, b, total e carotenóides mediante extração com acetona 80% e para determinação de carotenóides utilizou-se a equação segundo Lichtenthaler (1987).

O extrato bruto utilizado na determinação da atividade das enzimas e do teor de proteínas foi obtido através de homogeneização de 200 mg do material vegetal em almofariz, com N_2 líquido, e adicionado 2,0 mL de tampão fosfato de potássio (100 mmolL^{-1} , pH 7,0). O homogeneizado foi centrifugado a 14000 g por 25 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -80°C . Foram determinadas as atividade de catalase (CAT) (Havir e Mchale, 1987), polifenoloxidase (Kar e Mishra, 1976), peroxidase do ascorbato (APX) (Nakano e Asada, 1981) e teor de proteína solúvel (Bradford, 1976). Todas as determinações foram efetuadas por espectrofotometria.

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA e à análise de regressão com Software SISVAR (Ferreira, 2008).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PRODUÇÃO DE MATÉRIA SECA

A produção de matéria seca das folhas, caule, raízes e total não diminuiu com a adição das doses crescentes de Pb à solução nutritiva (Tabela 5.1) durante o período de cultivo.

Alguns autores demonstraram que a toxicidade por Pb provoca redução na taxa transpiratória, biossíntese de clorofilas e inibição da taxa fotossintética e, conseqüentemente, as plantas externam sintomas visuais como a redução do crescimento, clorose foliar, enrolamento e murcha de folhas e deformações de frutos (Zhao et al., 2011; Luo et al., 2012). No entanto, as plantas de mamona não apresentaram quaisquer desses sintomas visuais de toxicidade por Pb, sugerindo a sua tolerância à toxicidade por Pb.

Comportamento diferente foi verificado por Romeiro et al. (2006) avaliando também a tolerância da mamona a Pb. Estes autores verificaram declínio da produção de matéria seca acompanhado pelo acúmulo do metal nas plantas, com severa restrição do crescimento para a dose mais elevada ($400 \mu\text{mol L}^{-1}$). Niu et al. (2009) também verificaram significativas reduções apenas nas raízes das plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb (50, 100 e 200 mg L^{-1}) em solução. Possivelmente a diferença entre as cultivares estudadas pelos autores pode ser o motivo deste comportamento diferenciado ao verificado para a BRS energia.

Tabela 5.1. Matéria seca de plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva

Doses de Pb ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Matéria seca, g vaso ⁻¹			
	Folhas	Caule	Raízes	Total
0	28,13	17,06	17,73	62,91
25	23,44	13,61	15,32	52,37
50	29,77	18,53	17,68	65,98
100	23,04	21,45	19,97	64,46
150	27,68	16,74	19,22	63,65
200	28,53	15,88	18,45	62,85

TEORES DE Pb NAS PLANTAS

O aumento das doses de Pb foi acompanhado pelo aumento dos teores do elemento nas folhas e raízes (Figura 5.1). O incremento de Pb do controle para a maior dose (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb) foi de 52% e 48572% para folhas e raízes, respectivamente. Semelhante acúmulo do metal também foi verificado por Romeiro et al. (2006) que observaram acúmulo de aproximadamente 500 mg kg^{-1} e 24000 mg kg^{-1} nas folhas e raízes, respectivamente, para as plantas de mamona cultivadas sob a dose 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb em solução. Por outro lado, estes autores verificaram significativa redução da produção de biomassa.

Comparando o teor de Pb nas raízes para a dose 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e sua distribuição nas folhas, observou-se um acúmulo 382 vezes maior nas raízes. O sequestro do metal no vacúolo das células radiculares é um dos mecanismos de defesa das plantas, impedindo que o metal absorvido seja translocado para a parte aérea (Verbruggen et al., 2009; Kumar et al., 2012). Nota-se que o maior acúmulo verificado (13312 mg kg^{-1} de Pb) nas raízes para a dose 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Pb é uma importante estratégia de defesa pelo qual o sistema radicular pode contribuir para a tolerância de plantas a doses elevadas do metal no solo, destacando-se como característica vantajosa para fitoestabilização ou fitoatenuação de áreas contaminadas por Pb, além do benefício da cobertura vegetal atuar como barreira natural, impedindo que o metal seja transportado por meio da erosão, lixiviação e escoamento superficial (Soares et al., 2001; Melo et al. 2009).

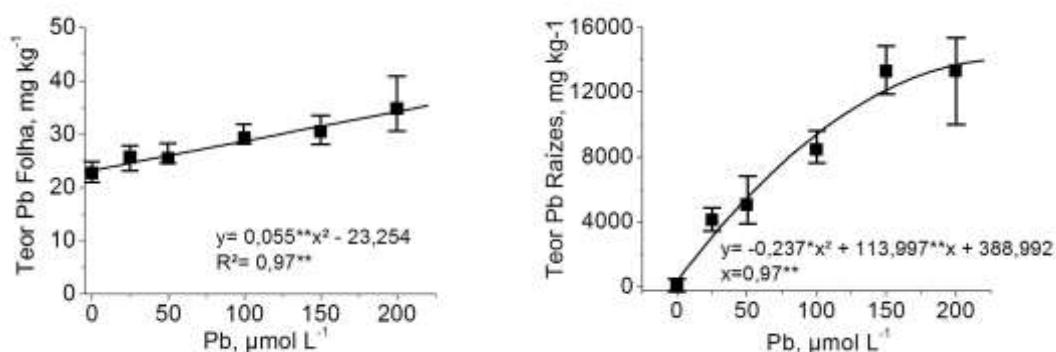


Figura 5.1. Teor de Pb em plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva. * e **: Significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente.

Peng et al. (2012), avaliando a toxicidade por Pb em três cultivares de eucalipto (*Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*) sob doses de 7 a 56 mg L⁻¹ de Pb, verificaram distintos níveis de tolerância entre as plantas, sendo que uma das cultivares (ST-9) apresentou maior potencial para tolerar elevadas concentrações de Pb no solo. As plantas cultivadas sob a maior dose (56 mg L⁻¹), além de apresentar maior acúmulo do metal nas raízes, não externaram qualquer sintoma visual de toxicidade.

Alguns autores demonstraram que o acúmulo de Pb em células radiculares pode ser observado em vários componentes celulares, os quais induzem à tolerância ou, indiretamente, provocam distúrbios no aparato fotossintético, nutricional e metabólico das plantas. Piechalak et al. (2002), avaliando o acúmulo e a distribuição de Pb em plantas de fava (*Vicia faba*), ervilha (*Pisum sativum*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*), verificaram que após 96 h de exposição à dose de 0,001 molL⁻¹ de Pb apenas 5 a 10% do metal acumulado foi translocado para parte aérea, sendo que o maior conteúdo de Pb encontrado nas raízes foi localizado na parede celular e núcleo. Estes autores também ressaltaram que o acúmulo de 1% de Pb presente no citoplasma de células radiculares foi suficiente para ativar o mecanismo de defesa e elevar a produção de fitoquelatinas. No entanto, após 2h de exposição ao metal, foi observado o declínio na síntese deste peptídeo. Samardakiewicz e Woźny (2000), avaliando o acúmulo de Pb em células radiculares de uma planta aquática (*Lemna minor* L.), verificaram após 1h de exposição ao metal (15 μmolL⁻¹) o maior acúmulo na parede celular, vesículas e pequenos vacúolos.

Kopittke et al. (2008), avaliando o acúmulo de Pb em células radiculares em plantas de braquiária (*Brachiaria decumbens* Stapf) e capim Rhodes (*Chloris gayana* Kunth), sob doses do metal até $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $5,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, verificaram inicialmente a presença do metal no citoplasma e células corticais e, posteriormente, uma maior parte foi sequestrado pelo vacúolo na forma de piromorfita [$\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$]. Estes autores sugeriram que a presença de piromorfita no complexo de Golgi pode ter sido um mecanismo de defesa adicional ao acúmulo de Pb na parede celular das raízes das plantas de braquiária, comportamento não observado para capim de Rhodes, a qual é considerada sensível a toxicidade por Pb.

Meyers et al. (2008), avaliando a distribuição do Pb no sistema radicular de plantas de mostarda da índia (*Brassica juncea*), verificaram a deposição desse metal em compartimentos extracelulares, sendo sugerido que esta complexação ocorreu devido a ligação desse metal à sítios aniônicos, aos quais cátions divalentes comumente se ligam. A ocorrência do metal também foi verificada em compartimentos do citoplasma e vacúolo. Estes autores não detectaram a presença do Pb nos tecidos internos da estria Caspary, sendo este indicativo de integridade da membrana plasmática. Małecká et al. (2008), estudando o mecanismo de defesa das plantas ervilha (*Pisum sativum*) em condições de toxicidade por Pb, verificaram alterações nas células mitocondriais radiculares tratadas com $0,5$ e $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de Pb, as quais demonstraram reduções das cristas mitocondriais, aumento do volume e forma das mitocôndrias, além da presença de grânulos dentro de peroxissomos e mitocôndrias nas quais foi detectado a presença do metal. Estes autores citam a relevância da toxicidade por Pb nestas organelas não fotossintéticas, pois são responsáveis por geração de ATP e armazenamento de enzimas antioxidantes, realizado nos peroxissomos (Mhamdi et al. 2012).

TEORES DE NUTRIENTES

Não foi verificada alteração nas concentrações de nenhum dos nutrientes avaliados (N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Mn, Mo e B). Nota-se que a integridade do *status* nutricional das plantas foi um dos responsáveis pelo crescimento normal das mesmas, corroborando os resultados verificados na matéria seca.

Capelo et al. (2012), avaliando o efeito do acúmulo de Pb em alface (*Lactuca sativa*), não verificaram desbalanço nutricional nas concentrações de P, Ca, Mg, Cu e Zn nas raízes e folhas após 15 dias de exposição ao metal (125 mg L^{-1}), por outro lado, foi observado declínio para os conteúdos de K e Fe.

Resposta similar também foi verificada por outros autores avaliando a toxicidade por metais pesados. Zhao et al. (2012) verificaram acúmulo e tolerância de *Phytolacca americana* a Mn sem desbalanço nutricional. Estes autores também apontam como mecanismo estratégico das plantas para tolerar o estresse de Mn a elevação da atividade enzimática (SOD e CAT), comportamentos não verificados avaliando a toxicidade para os metais Zn e Cu. Martínez-Peñalver et al. (2012), avaliando a toxicidade de Cd e Cu em plantas de agrião de Thale (*Arabidopsis thaliana*), verificaram declínio na concentração de pigmentos fotossintéticos e, conseqüentemente, danos na eficiência quântica sem apresentar alteração do *status* nutricional das folhas.

FLUORESCÊNCIA DE CLOROFILA

Verificou-se diferenças nos picos de absorção dos espectros da fluorescência de clorofila (Figura 5.2A). Nota-se que a menor reabsorção da fluorescência foi verificada nas plantas cultivadas sob maior dose de Pb (Figura 5.2B), demonstrando a sensibilidade da fluorescência de clorofila para detectar alterações no PSII provocada por toxicidade por Pb nas plantas.

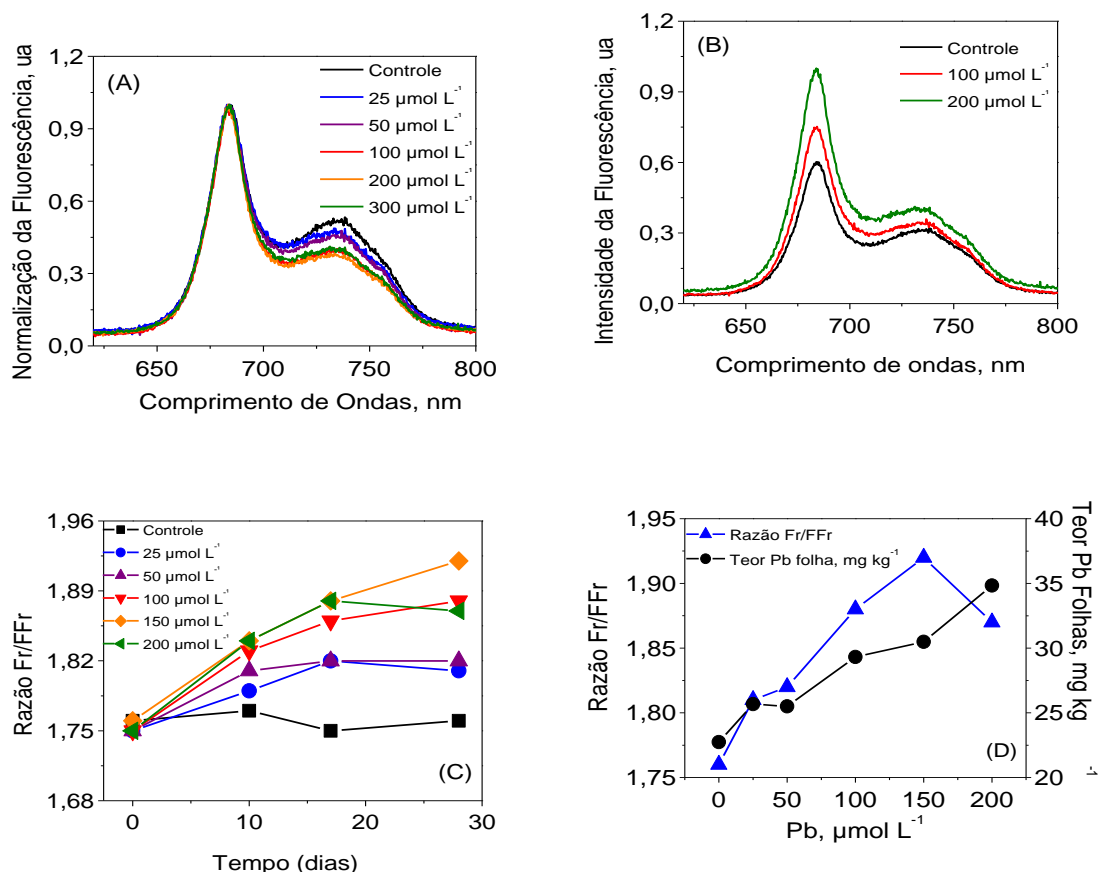


Figura 5.2. Espectros médios da fluorescência de clorofila em plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva aos 28 dias, dados normalizados (A) e não-normalizados (B). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila em função do tempo de cultivo, referente às leituras do vermelho= 685nm e vermelho distante= 735 nm (Fr/FFr) (C). Razão dos espectros de fluorescência de clorofila aos 28 dias, e teor de PN nas folhas (D).

A razão Fr/FFr demonstra que as doses de Pb promoveram alterações temporais na biossíntese fotossintética, as quais foram detectadas já a partir dos 10 dias de cultivo e se tornaram mais intensas aos 18 dias após adição das doses do metal (Figura 5.2C). É interessante ressaltar que a elevação nas razões da fluorescência de clorofila corroborou os teores de Pb nas folhas (Figura 5.2D), indicando que as plantas apresentaram estresse no aparato fotossintético mesmo sem externar qualquer sintoma visual de toxicidade ao elemento.

A medida da fluorescência de clorofila é não destrutiva e pode avaliar alterações nas membranas dos cloroplastos e elucidar danos no aparato fotossintético das plantas (Krause e Weis, 1991). Os valores da razão Fv/Fm

(máxima fluorescência/máxima variação da emissão de fluorescência) e Fr/FFr (pico máximo na região vermelho/pico máximo na região vermelho-distante) obtidos pela medida das bandas da fluorescência de clorofila podem ser utilizados para detectar estresse no PSII. O declínio na concentração de clorofila indica condição anormal no metabolismo dos fótons e, conseqüentemente, redução da razão Fv/Fm. No entanto, para a razão Fr/FFr ocorre elevação do valor em condição de distúrbio. Comportamento inverso dos valores das razões (Fv/Fm e Fr/FFr) ocorre em condição fotossintética normal (Gopal et al. 2002; Maurya et al., 2008; Silva et al, 2012).

Nota-se que a razão Fr/FFr possibilitou a detecção de alteração no PSII mesmo sem as plantas apresentarem sintomas de toxicidade. Portanto, pode-se indicar que a fluorescência de clorofila é uma ferramenta útil no monitoramento ambiental de toxicidade por Pb em plantas de mamona, corroborando estudos anteriores demonstrado para toxicidade por Cd (Maurya e Gopal, 2008; Silva, et al., 2012), As (Stoeva et al, 2004), Ni (Gopal et al., 2002; Mishra e Gopal, 2008), Cu e Hg (Ventrella et al., 2009) e Zn (Bonnet et al., 2000; Cherif et al., 2010).

PIGMENTOS, ATIVIDADE ENZIMÁTICAS E PROTEÍNA SOLÚVEL

As concentrações de pigmentos não foram influenciadas com o aumento das doses de Pb (Tabela 5.2), sendo interessante destacar que estes resultados corroboram a não visualização de qualquer sintoma de clorose nas folhas, como também ausência de desbalanço nutricional. Ademais, cabe ressaltar que, apesar do metal não ocasionar danos na biossíntese de clorofilas, observou-se notável alteração na fluorescência de clorofila, indicando a eficiência da técnica para detecção precoce em nível de membrana dos cloroplastos à toxicidade por Pb nas plantas de mamona. Segundo Bruschi (2007), a razão Fr/FFr depende principalmente do conteúdo da clorofila e, em menor relevância, da atividade fotossintética e das características ópticas e arranjos celulares do tecido foliar. De acordo com Siedlecka e Krupa (2004), a rubisco (ribulose-1,5-bifosfato carboxilase-oxigenase) é uma enzima abundante e muito importante para o ciclo de Calvin, pois participa da catalisação de reações de carboxilação e oxigenação. Em condições de estresse por metais pesados, estes podem substituir o Mg no

centro ativo ou nas subunidades da rubisco e, conseqüentemente, dificultar sua atividade normal provocando alterações no funcionamento do ciclo de Calvin. Isto resulta na inibição do transporte de elétrons no aparato fotossintético e em danos ao PSII.

Tabela 5.2. Conteúdo de pigmentos em plantas de mamona cultivadas sob doses de Pb em solução nutritiva

Doses de Pb ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila Total	Carotenóides
	mg g ⁻¹ de matéria fresca			
0	0,92	0,39	1,31	0,33
25	0,73	0,34	1,07	0,29
50	0,96	0,41	1,36	0,34
100	0,95	0,39	1,33	0,32
150	1,08	0,45	1,53	0,37
200	1,01	0,43	1,43	0,33

Não foi verificada resposta significativa para a atividade das enzimas catalase, polifenoloxidase, ascorbato peroxidase, peroxidase e concentração de proteína solúvel com o aumento das doses de Pb. A toxicidade por metais pesados pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como superóxido (O_2^-), radicais hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que ao interagir com componentes celulares provocam danos oxidativos e conseqüente deterioração celular (Gadjev et al., 2008). Em espécies de plantas tolerantes à metais pesados, o conteúdo de ROS pode ser controlado por um mecanismo eficiente de enzimas antioxidantes (Jamil et al., 2009; Lin e Aarts, 2012, Juknys et al., 2012). Este é um importante mecanismo de defesa no balanço homeostático para redução da toxicidade por metal pesado em plantas (Rellán-Álvarez et al., 2006; Sun et al., 2007; Yadav et al., 2009).

Nautiyal e Sinha (2012) não verificaram alteração na concentração de clorofila a nas folhas de guandu até a dose $0,2 \text{ mmolL}^{-1}$ de Pb, além do estímulo na produção de carotenóides na dose ($0,05 \text{ mmolL}^{-1}$) mais baixa do metal em solução. Estes autores ainda observaram que o excesso de metal até a maior dose (1 mmolL^{-1}) provocou o acúmulo de prolina e induziu elevação na atividade das enzimas ascorbato peroxidase e superóxido dismutase nas folhas, além do aumento de substâncias não-proteicas do grupo tiol nas raízes.

Alkhatib et al. (2011), avaliando a toxicidade por Pb em plantas de fumo, verificaram que as doses do metal não afetaram o conteúdo de pigmentos. Estes autores não observaram qualquer anomalia nas membranas dos tilacóides em plantas cultivadas sob a dose $10 \mu\text{molL}^{-1}$ de Pb, no entanto, os cloroplastos das plantas tratadas com $500 \mu\text{molL}^{-1}$ do metal exibiram alteração na composição e diminuição dos tilacóides. Kumar et al. (2012), avaliando a tolerância por Pb em plantas de *T. triangulare* (Jacq.), verificaram que elevação na atividade da enzima antioxidante glutathione foi uma estratégia de defesa importante para as plantas acumularem maiores teores do metal e sobreviverem por período mais longo sob a exposição do metal. Estes autores ainda verificaram a elevação do conteúdo de pigmentos fotossintéticos até adição da doses e $0,5 \text{ mmolL}^{-1}$ de Pb e posterior declínio nas doses mais elevadas. Hamadouche et al. (2012) verificaram elevação na atividade da enzima catalase nas plantas de rabanete, sendo que a maior elevação foi verificada na dose mais severa (750 mg L^{-1} de Pb).

CONCLUSÕES

A medida da fluorescência de clorofila foi eficiente para detectar alterações no fotossistema II promovidas pela toxicidade por Pb e demonstrou-se útil para o monitoramento precoce da toxicidade por este elemento em plantas de mamona.

As doses de Pb não provocaram alterações na composição mineral das plantas, e também nos pigmentos fotossintéticos, na atividade das enzimas antioxidantes e nas proteínas solúveis total nas folhas.

A mamona, por sua tolerância e capacidade de acumular Pb nas raízes, pode ser uma alternativa ambiental e economicamente atraente para fitoestabilização e fitoatenuação de áreas contaminadas por Pb, com adicional vantagem econômica decorrente da utilização do óleo para fins industriais e produção de bioenergia durante o processo de remediação.

REFERÊNCIAS

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, v. 24, p. 1-15, 1949.

ALKHATIB, R.; MARUTHAVANAN, J.; GHOSHROY, S.; STEINER, R.; TERLING, T.; CREAMER, R. Physiological and ultrastructural effects of lead on tobacco. **Biologia Plantarum**, v. 56, p.711–716, 2011.

BERMAN, P.; NIZRI, S.; WIESMAN, Z. Castor oil biodiesel and its blends as alternative fuel. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p. 2861-2866, 2011.

BONNET, M.; CAMARES, O.; VEISSEIRE, P. Effect of zinc and influence of *Acremonium lolii* on growth parameters, chlorophyll a fluorescence and antioxidant enzyme activities of ryegrass (*Lolium perenne* L. cv Apollo). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 945–953, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p.248–254, 1976.

BUSCHMANN, C. Variability and application of the chlorophyll fluorescence emission ratio red/far-red of leave. **Photosynthesis Research**, v. 92, p. 261–271, 2007.

CAPELO, A. SANTOS, C.; SUSANA LOUREIRO, S.; PEDROSA, M. A. Phytotoxicity of lead on *Lactuca sativa*: effects on growth, mineral nutrition, photosynthetic activity and oxidant metabolism. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 21, p. 450–459, 2012.

CHERIF, J.; DERBEL N. NAKKACH, M. BERGMANN, H. V.; JEMAL, F., LAKHDAR, Z. B.; Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor

physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B. Biology**, v. 101, p. 332–339, 2010.

CORCOLL, N.; BONET, B.; LEIRA, M.; GUASCH, H. Chl-a fluorescence parameters as biomarkers of metal toxicity in fluvial biofilms: an experimental study. **Hydrobiologia**, v. 673, p. 119–136, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA–EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 370p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Symposium**, v. 6, p. 36-41, 2008.

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

GALLEGO, S.; PENA, L. B.; BARCIA, R. A.; AZPILICUETA, C. E.; LANNONE, M. F.; ROSALES, E. P.; ZAWOZNIK, M. S.; GROPPA, M. D.; BENAVIDES, M. P. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms, **Environmental and Experimental Botany**, v. 83, p. 33–46, 2012.

GAMIÑO-GUTIÉRREZ, S. P.; GONZÁLEZ-PÉREZ, C.; GONSEBATT, M. E.; MONROY-FERNÁNDEZ, M. G. Arsenic and lead contamination in urban soils of Villa de la Paz (Mexico) affected by historical mine wastes and its effect on children's health studied by micronucleated exfoliated cells assay. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 35, p. 37-51, 2013.

GIARDI, M. T.; KOBLÍZEK, M.; MASOJÍDEK, J. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 1027–1033, 2001.

GINNEKEN, L. V.; MEERS, E.; GUISSON, R.; RUTTENS, A.; ELST, K.; TACK, F. M. G.; VANGRONSSVELD, J.; DIELS, L.; DEJONGHE, W. Phytoremediation for heavy metal-contaminated soils combined with bioenergy production. **Journal of Environmental Engineering and Landscape Management**, v. 15, p 227–236, 2007.

GOPAL, R.; MISHRA, K. B.; ZEESHAN, M.; PRASAD, S. M.; JOSHI, M. M. Laser-induced chlorophyll fluorescence spectra of mung plants growing under nickel stress. **Current Science**, v. 83, p. 880–884, 2002.

HAMADOUCHE, N.A.; AOUMEUR, H.; DJEDIAI, S.; SLIMANI, M.; AOUES, A. Phytoremediation potential of *Raphanus sativus* L. for lead contaminated soil. **Acta Biologica Szegediensis**, v. 56, p. 43–49, 2012.

HAVIR, E. A; MCHALE, N. A. Biochemical and development characterization of multiples forms of catalase in tabocco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450–455, 1987.

HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.L. The water culture methods for growing plants without soil. Berkeley: University of California, 1950. p. 32 (Circular, 347).

JAMIL, S.; ABHILASH, P. C.; SINGH, N.; SHARMA, P. N. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 269–275, 2009.

JUKNYS, R.; VITKAUSKAITE, G.; RAČAITE, M.; VENCLOVIENE, J.; The impacts of heavy metals on oxidative stress and growth of spring barley. **Central European Journal of Biology**, v. 7, p. 299–306, 2012.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p.315–319, 1976.

KARIMI, L. N.; KHANAHMADI, M.; MORADI, B. Accumulation and phytotoxicity of lead in *Cynara scolymus*. **Indian Journal of Science and Technology**, v. 5, p. 3634–3641, 2012.

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

KRAUSE, G. H.; WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 313–49, 1991.

KUMAR, A.; PRASAD, M. N. V.; SYTAR, O. Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically . **Chemosphere**, v. 89, p. 1056–1065, 2012.

LICHTENTHALER H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer L, Douce R (eds) **Methods in Enzymology**. Academic Press, NewYork, p 350–382.

LIN, Y.; AARTS, M. G. M. The molecular mechanism of zinc and cadmium stress response in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3187–3206, 2012.

LIN, Z.; LIU, N.; LIN, G.; PAN, X. PENG., C; Stress-induced alteration of chlorophyll fluorescence polarization and spectrum in leaves of *Alocasia macrorrhiza* L. schott. **Journal of Fluorescence**, v. 17, p. 663–669, 2007.

LOU, Y.; HUO, H.; HU, T.; LI, H.; FU, J. Toxic effects, uptake, and translocation of Cd and Pb in perennial ryegrass. **Ecotoxicology**, p.1–8, 2012.

MAŁECKA, A.; PIECHALAK, A.; IWONA MORKUNAS, I.; TOMASZEWSKA, B. Accumulation of lead in root cells of *Pisum sativum*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, p. 629–637, 2008.

MARTÍNEZ-PEÑALVER, A.; GRAÑA, E.; REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A. M. The early response of *Arabidopsis thaliana* to cadmium- and copper-induced stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 78, p. 1–9, 2012.

MAURYA, A. R., PRASAD, S. M.; GOPAL, R. LIF technique offers the potential for the detection of cadmium induced alteration in photosynthetic activities of *Zea mays* L. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 9, p. 29–35, 2008.

MAURYA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser-induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

MELO, E. E. C.; COSTA, E. T. S.; GUILHERME, L. R. G.; FAQUIN, V.; NASCIMENTO, C. W. A. Accumulation of arsenic and nutrients by castor bean plants grown on an As-enriched nutrient solution. **Journal of Hazardous Materials** v. 168 p. 479–483, 2009.

MEYERS, D. E. R.; AUCHTERLONIE, G. J.; WEBB, R. I.; WOOD, B. Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 323–332, 2008.

MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. plant catalases: Peroxisomal redox guardians. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, p. 181-194, 2012.

MISHRA, K. B.; GOPAL, R. Detection of nickel-induced stress using laser induced fluorescence signatures from leaves of wheat seedlings. **International Journal of Remote Sensing**, v. 29, p. 157–173, 2008.

NAKANO, Y; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiology**, v. 22, p. 1068–1072, 1981.

NAUTIYAL, N.; SINHA, P. Lead induced antioxidant defense system in pigeon pea and its impact on yield and quality of seeds. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, p. 977–983, 2012.

NIU Z-X.; SUN, L-N.; SUN, T-H.; LI Y.-S., WANG, H. 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.

NIU, Z.; SUN, L.; SUN, T. Response of root and aerial biomass to phytoextraction of Cd and Pb by sunflower, castor bean, alfalfa and mustard . **Advances in Environmental Biology**, v. 3 p. 255–262, 2009.

PAOLIELLO, M. M. B.; CAPITANI, E. M. DE.; CUNHA, F. G. DA; MATSUO, T.; CARVALHO, M. DE F. SAKUMA, A.; FIGUEIREDO, B. R. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. **Environmental Research Section**, v.88, p. 120–128, 2002.

PENG, X.; YANG, B.; DENG, D.; DONG, J.; CHEN, Z. Lead tolerance and accumulation in three cultivars of *Eucalyptus urophylla* X *E. grandis*: implication for phytoremediation. **Environmental Earth Sciences**, v. 67, p.1515–1520, 2012.

PIECHALAK, A.; TOMASZEWSKA, B.; BARALKIEWICZ, D.; MALECKA, A. Accumulation and detoxification of lead ions in legumes. **Phytochemistry**, v. 60, p.153–162, 2002.

RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; ORTEGA-VILLASANTE, C.; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, A.; CAMPO, F. F. D.; HERNÁNDEZ, L. E. Stress responses of *Zea mays* to cadmium and mercury. **Plant and Soil**, v. 279, p. 41–50, 2006.

REN, H. M.; WANG, J. D.; ZHANG, X. L. Assessment of soil lead exposure in children in Shenyang, China. **Environmental Pollution**, v. 144, p. 327-335, 2006.

ROHÁČEK, K.; SOUKUPOVÁ, J.; BARTÁK, M. Chlorophyll fluorescence: a wonderful tool to study plant physiology and plant stress. **Plant Cell Compartments - Selected Topics**, p. 41–104, 2008.

ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. M. A.; FURLANI, P. R.; DE ABREU, C. A.; ABREU, M. F. DE; ERISMANN, N. M. Lead uptake and tolerance of *Ricinus communis* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p. 483–489, 2006.

ROSSATO, L. V.; NICOLOSO, F. T.; FARIAS, J. G.; CARGNELLUTI, D.; TABALDI, L. A.; ANTES, F. G.; DRESSLER, V.L.; SCHETINGER, M. R. C. Effects of lead on the growth, lead accumulation and physiological responses of *Pluchea sagittalis*. **Ecotoxicology**, v. 21, p. 111–123 , 2012.

SAMARDAKIEWICZ, S.; WOŹNY, A. The distribution of lead in duckweed (*Lemna minor* L.) root tip. **Plant and Soil**, v. 226, p. 107–111, 2000.

SHI, G.; CAI, Q. Cadmium tolerance and accumulation in eight potential energy crops. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 555-561, 2009.

SIEDLECKA, A.; KRUPA, Z. Rubisco activity maintenance in environmental stress conditions-how many strategies. **Cellular and Molecular Biology Letters** v. 9, p. 56–57, 2004.

SILVA, A. J. DA; NASCIMENTO, C. W. A.; GOUVEIA-NETO, A. DA S.; SILVA-Jr, E. A. da. LED-Induced chlorophyll fluorescence spectral analysis for the early detection and monitoring of cadmium toxicity in maize plants. **Walter Air Soil Pollut**, v. 223, p. 3527–3533, 2012.

SINHA, P.; DUBE, B. K.; SRIVASTAVA, P.; CHATTERJEE, C.; Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. **Chemosphere**, v. 65, p.651–656, 2006.

SOARES, C. R. F. S.; GRAZZIOTTI, P. H.; SIQUEIRA, J. O.; CARVALHO, J. G. de C.; MOREIRA, F. M. S. Toxidez de zinco no crescimento e nutrição de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, p. 339-348, 2001.

STOEVA, N. BEROVA, M. ZLATEV, Z. Physiological response of Maize to arsenic ontamination. **Biologia Plantarum**, v. 47, p. 449–452, 2004.

SUN, R-L.; ZHOU, Q-X.; SUN, F-H.; JIN, C-X. Antioxidative defense and proline/phytochelatin accumulation in a newly discovered Cd-hyperaccumulator, *Solanum nigrum* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, 468–476, 2007.

USEPA - MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES. Method 3051A, CD-ROM, 1996.

VENTRELLA, A.; CATUCCI, L.; PILETSKA, E.; PILETSKY, S.; AGOSTIANO, A. Interactions between heavy metals and photosynthetic materials studied by optical techniques. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 19–25, 2009.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H.; Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759–776, 2009.

VILELA, L.; ANGHINONI, I. Morfologia do sistema radicular e cinética da absorção de fósforo em cultivares de sojas afetadas pela interação alumínio-fósforo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 8:9196, 1984.

YADAV, S. K.; JUWARKAR, A. A; KUMAR, G. P.; THAWALE, P. R.; SINGH, S. K.; CHAKRABARTI, T. Bioaccumulation and phyto-translocation of arsenic, chromium and zinc by *Jatropha curcas* L.: Impact of dairy sludge and biofertilizer. **Bioresource Technology**, v. 100 p. 4616–4622, 2009.

ZHAO, H.; WU, L.; CHAI, T.; ZHANG, Y.; TAN, J.; MA, S. The effects of copper, manganese and zinc on plant growth and elemental accumulation in the manganese-hyperaccumulator *Phytolacca Americana*. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 1243–1252, 2012.

ZHAO, S.; YE, X.; ZHENG, J.; Lead-induced changes in plant morphology, cell ultrastructure, growth and yields of tomato. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 10116–10124, 2011.