



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**

VITOR RESENDE DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLANTAS
JOVENS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) SUBMETIDAS À
DIFERENTES DOSES DE CÁDMIO**

**BELÉM
2019**

VITOR RESENDE DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLANTAS
JOVENS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) SUBMETIDAS À
DIFERENTES DOSES DE CÁDMIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, para obtenção de título de Mestre.

Área de concentração: Ecologia e Ecofisiologia de Árvores.

Orientador: Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto

Co-orientador: Dr. Glauco André dos Santos Nogueira

**BELÉM
2019**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D631a do Nascimento, Vitor Resende
Avaliação nutricional e sistema antioxidante em plantas jovens de Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) submetidas à diferentes doses de Cádmiio / Vitor Resende do Nascimento. - 2019.
59 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Ciências Florestais (PPGCF), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019.
Orientador: Prof. Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto
Coorientador: Prof. Dr. Glauco André dos Santos Nogueira.
- I. de Oliveira Neto, Cândido Ferreira, *orient.* II. Título

VITOR RESENDE DO NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO NUTRICIONAL E SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLANTAS
JOVENS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) SUBMETIDAS À
DIFERENTES DOSES DE CÁDMIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, para obtenção de título de Mestre. Área de concentração: Ecologia e Ecofisiologia de Árvores.

26/07/2019

Data da Aprovação

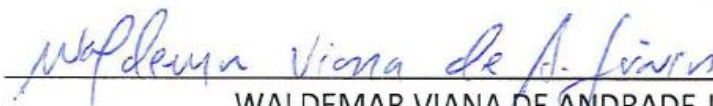
Belém, 26 de julho de 2019



CÂNDIDO FERREIRA DE OLIVEIRA NETO
Presidente



RICARDO SHIGUERU OKUMURA
1º Examinador



WALDEMAR VIANA DE ANDRADE JÚNIOR
2º Examinador



LUMA CASTRO DE SOUZA
3º Examinador

Á Deus

Aos meus pais Arlene Resende e Avelino Neto

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir chegar até aqui com saúde, harmonia e bênçãos em minha vida.

A Nossa Senhora de Nazaré por sua intercessão junto a Deus.

Aos meus pais, Avelino Neto e Arlene Resende, por todos os momentos de carinho, cuidados, orientações e investimento na minha vida pessoal e profissional.

Ao meu irmão, Rafael Resende.

A todos da minha família, principalmente minha tia Ada Resende e meus primos, por toda a confiança e apoio de sempre.

A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), pela possibilidade de realizar o Mestrado em Ciências Florestais.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio através da concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Dr. Cândido Ferreira de Oliveira Neto, pela orientação, paciência, amizade e incentivo. Meu exemplo de profissional na carreira acadêmica, pois muito do que aprendi e do que sou hoje, devo à ele. Obrigado por ter sido meu “pai” de UFRA por quase 6 anos. Sou eternamente grato.

Ao meu coorientador, Dr. Glauco André dos Santos Nogueira, pela dedicação, amizade, parceria e comprometimento neste trabalho. Um grande profissional e amigo que levarei pra vida.

Aos amigos e parceiros, Ana Ecídia Brito, Andressa Paiva e Gerson Albuquerque. Nunca mediram esforços para me ajudar em tudo que fosse necessário. Muito obrigado por tudo.

Aos queridos parceiros de trabalho do Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS), Angllysdeise Costa, Augusto Carmona, Diana Jhulia, Evelyn Fatima, Gabriel Gustavo, Jessica Suellem, Juscelino Palheta, Luciana Sousa e Valter Saldanha pelo incansável apoio físico e moral e a confiança que sempre depositaram em mim. Sem a ajuda de vocês em vários momentos, a pesquisa não seria concretizada.

Á todos que mesmo indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito OBRIGADO!

“Não confunda derrotas com fracasso nem vitórias com sucesso. Na vida de um campeão sempre haverá algumas derrotas, assim como na vida de um perdedor sempre haverá vitórias. A diferença é que, enquanto os campeões crescem nas derrotas, os perdedores se acomodam nas vitórias.”

- Roberto Shinyashiki

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

- Charles Chaplin

RESUMO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros nutricionais e o sistema antioxidante de plantas jovens de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke quando submetidas à diferentes concentrações de cádmio (Cd). O experimento foi conduzido em casa de vegetação no período de dezembro de 2017 a junho de 2018. Inicialmente foram produzidas mudas a partir de sementes de paricá. As sementes foram semeadas em vasos do tipo Leonard com capacidade de 4,6 L adaptados com garrafas pet contendo areia lavada e esterilizada (120 °C por 40 min.) Decorridos 15 dias após o semeio as plântulas receberam solução nutritiva de Sarruge. Transcorridos 60 dias após o semeio foi iniciada a aplicação das concentrações de Cd na forma de cloreto de Cd hidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos (0, 178, 356, 534 e 712 μM de CdCl_2). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) utilizando o software Statistica, e as diferenças entre os tratamentos analisadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo ajustadas por equações de regressão polinomial $P < 0,01$ ou $0,05$ usando-se o programa Sisvar. As principais variáveis nutricionais desestabilizaram-se em suas funções com o aumento das doses de cádmio, influenciando no processo fisiológico vegetal. Para o sistema antioxidante, A atividade das enzimas peroxidase do guaiacol (G-POD), peroxidase do ascorbato (APX), dismutase do superóxido (SOD) e Catalase (CAT), diminuíram com o aumento das doses de Cd . O acúmulo de Cd e as alterações dos parâmetros nutricionais e de enzimas antioxidantes, resultaram em mudanças estruturais de *S. amazonicum*. O maior acúmulo de Cd nas raízes, e a baixa translocação do metal para parte aérea pode caracterizar *S. amazonicum* Huber ex Ducke como uma espécie com potencial para fins de fitoremediação.

Palavras chave: Elementos nutricionais, enzimas antioxidativas, metal pesado

GENERAL ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the nutritional parameters and antioxidant system of young plants of *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke when submitted to different cadmium (Cd) concentrations. The experiment was carried out in a greenhouse from December 2017 to June 2018. Seedlings were initially produced from paricá seeds. The seeds were sown in 4.6L Leonard type pots adapted with pet bottles containing washed and sterilized sand (120 °C for 40 min.). After 15 days of sowing the seedlings received nutrient solution from Sarruge. After 60 days after sowing, the application of Cd concentrations as hydrated Cd chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was started. The experimental design was completely randomized with five treatments (0, 178, 356, 534 and 712 μM CdCl_2). Data were subjected to analysis of variance by the F test ($p < 0.05$) using the Statistica software, and the differences between treatments analyzed by the Tukey test ($p < 0.05$) were adjusted by polynomial regression equations $P < 0.01$ or 0.05 using the Sisvar program. The main nutritional variables were destabilized in their functions with the increase of cadmium doses, influencing the plant physiological process. For the antioxidant system, the activity of the guaiacol peroxidase (G-POD), ascorbate peroxidase (APX), superoxide dismutase (SOD) and Catalase (CAT) enzymes decreased with increasing Cd doses. Cd accumulation and changes in nutritional parameters and antioxidant enzymes resulted in structural changes of *S. amazonicum*. The higher accumulation of Cd in the roots and the low translocation of the metal to the shoot may characterize *S. amazonicum* Huber ex Ducke as a species with potential for phytoremediation purposes.

Keywords: Nutritional elements, antioxidative enzymes, heavy metal

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Contaminação por metais pesados e os efeitos da sua toxidez em micróbios, plantas e animais 15
- Figura 2** - Poluição por Cádmiu: transporte e ciclo. As setas brancas representam a emissão de Cd através da mineração e indústria. As setas azuis representam a deposição de Cd no ambiente. As setas amarelas representam a contaminação por Cd na fauna. As setas laranjas representam a deposição de cádmio na agricultura 16
- Figura 3** - Imagem do experimento implantado em casa de vegetação com plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) 28
- Figura 4** - Exemplo de vaso adaptado tipo Leonard utilizado no experimento 29
- Figura 5** - Sintomas visuais de toxidez por Cádmiu nas mudas de paricá 30
- Figura 6** – Teores de N (A), K (B), Ca (C) e Mg (D) em plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de Cádmiu (Cd) 37
- Figura 7** – Teores de Cu (A), Fe (B), Zn (C), Mn (D) e Cd (E) em plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de Cádmiu (Cd) 38
- Figura 8** - Atividade da peroxidase do guaiacol (G-POD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e dismutase do superóxido (SOD) em folhas e raízes de plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de Cádmiu (Cd). As barras verticais representam o erro padrão da média 55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva utilizada no experimento 29

Tabela 2 - Matriz com os coeficientes de correlação de Pearson entre os elementos analisados nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de Cádmio (Cd) 41

SUMÁRIO

1. ASPECTOS GERAIS DA PESQUISA	14
1.1. Contextualização	14
1.1.1. Metais pesados no meio ambiente.....	14
1.1.2. Cádmio	15
1.1.3. Efeito da toxidez por Cádmio nas plantas	16
1.1.4. Paricá (<i>Schizolobium amazonicum</i> Huber ex Ducke).....	17
REFERÊNCIAS	20
2. HIPÓTESES E OBJETIVOS DA PESQUISA	23
2.1. Hipóteses	23
2.2. Objetivos	23
2.2.1. Objetivo Geral	23
2.2.2. Objetivos Específicos	23
3. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL EM PLANTAS JOVENS DE PARICÁ (<i>Schizolobium amazonicum</i> Huber ex Ducke) SUBMETIDAS À DIFERENTES DOSES DE CÁDMIO.	24
3.1. INTRODUÇÃO	26
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.2.1. Material vegetal.....	27
3.2.2. Condições de cultivo	27
3.2.3. Exposição das plantas às dosagens de Cádmio	27
3.2.4. Coleta e armazenamento do material	29
3.2.5. Variáveis nutricionais.....	30
3.2.5.1. Macronutrientes.....	30
3.2.5.2. Micronutrientes	32
3.2.6. Delineamento experimental e Análise estatística	33
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
3.3.1. Teores de nutrientes e Cd	34

3.3.2. Correlação entre os elementos nutricionais em resposta às doses de Cádmio	39
3.4. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43
4. SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLANTAS JOVENS DE PARICÁ (<i>Schizolobium amazonicum</i> Huber ex Ducke) SUBMETIDAS À DIFERENTES DOSES DE CÁDMIO.	46
4.1. INTRODUÇÃO	48
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.2.1. Material vegetal.....	49
4.2.2. Condições de cultivo	49
4.2.3. Exposição das plantas às dosagens de Cádmio	49
4.2.4. Coleta e armazenamento do material	50
4.2.5. Sistema Antioxidante	50
4.2.5.1. Extração.....	50
4.2.5.2. Dismutase do superóxido (SOD EC 1.15.1.1).....	51
4.2.5.3. Peroxidase do ascorbato (APX EC 1.11.1.11)	51
4.2.5.4. Peroxidase do guaiacol (G-POD EC 1.11.1.9).....	51
4.2.5.5. Catalase (CAT EC 1.11.1.6).....	52
4.2.6. Delineamento experimental e análise estatística	52
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.4. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	57

1. ASPECTOS GERAIS DA PESQUISA

1.1. Contextualização

1.1.1. Metais pesados no meio ambiente

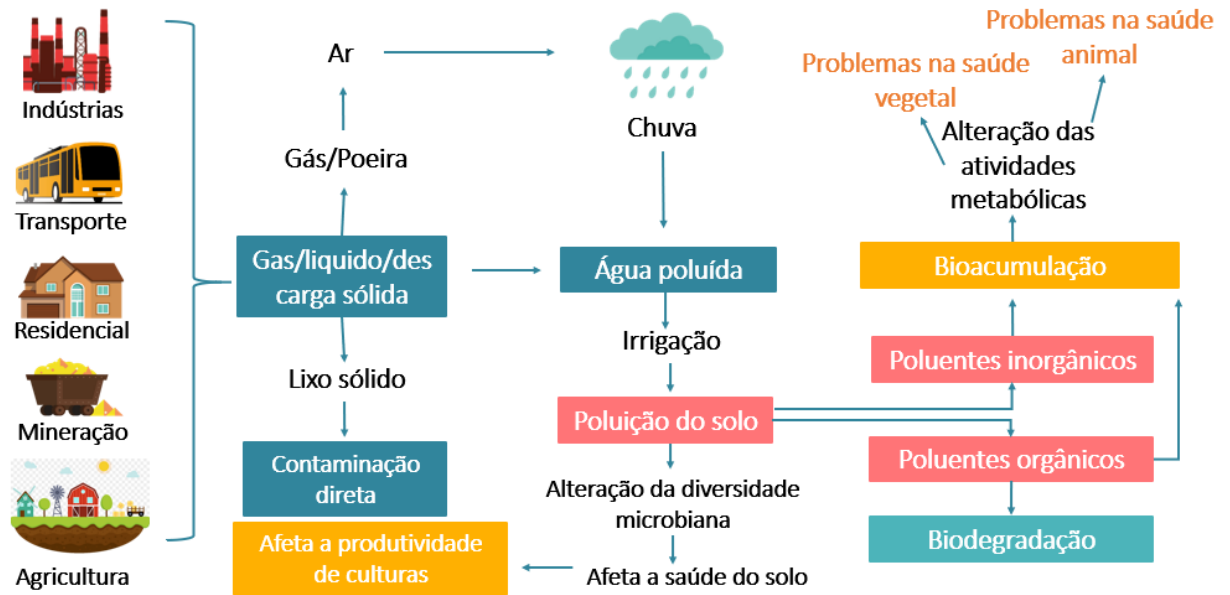
Os metais são de ocorrência natural como componentes de rochas e sua presença nos solos tem aumentado devido as atividades antropogênicas (ARAUJO e PINTO FILHO, 2010), como os resíduos de mineradoras, siderúrgicas, indústrias de cosméticos, sucata automobilística, atividades agrícolas entre outros, que geralmente expõem o solo a condições adversas de contaminação (TARLEY e ARRUDA, 2003).

Segundo Carvalho et al. (2008), os metais oriundos da contaminação ambiental são depositados no solo, principalmente na camada agricultável ou arável, muitas vezes presentes na solução dos solos e disponíveis para as plantas, tornando-se fonte de risco e via de exposição à contaminação para a população.

Metais pesados como Arsênio (As), Cádmio (Cd), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Zinco (Zn) e Cromo (Cr) são fitotóxicos e podem ser incorporados e bioacumulados através da cadeia alimentar. Os metais pesados persistem no meio ambiente, afetando as propriedades do solo, sua fertilidade, biomassa e produção agrícola e, finalmente, a saúde humana (MUDGAL; MADAAN; MUDGAL, 2010) (Figura 1).

O uso de fertilizantes fosfatados pode causar a contaminação do solo por metais pesados como Cd, Mn, Zn, Pb, Cu e Ni que estão naturalmente associados às rochas fosfáticas (SARWAR et al., 2010). Os adubos fosfatados, os esterco e o lodo de esgoto são os principais insumos agrícolas que podem conter Cd, e sua utilização constitui um risco, tanto para saúde animal, quanto para o homem (MALAVOLTA, 2006). Segundo Lopes & Albuquerque (2018), na última década, o Brasil expandiu em 190% o mercado de agrotóxicos, o que colocou o País em primeiro lugar no ranking mundial de consumo desde 2008. Isto mostra o impacto que a utilização de agrotóxicos tem causado na agricultura brasileira, refletindo na alimentação, qualidade do solo e entre outros aspectos.

Figura 1 - Contaminação por metais pesados e os efeitos da sua toxidez em micróbios, plantas e animais.



Fonte: Oves *et al.* (2016).

1.1.2. Cádmio

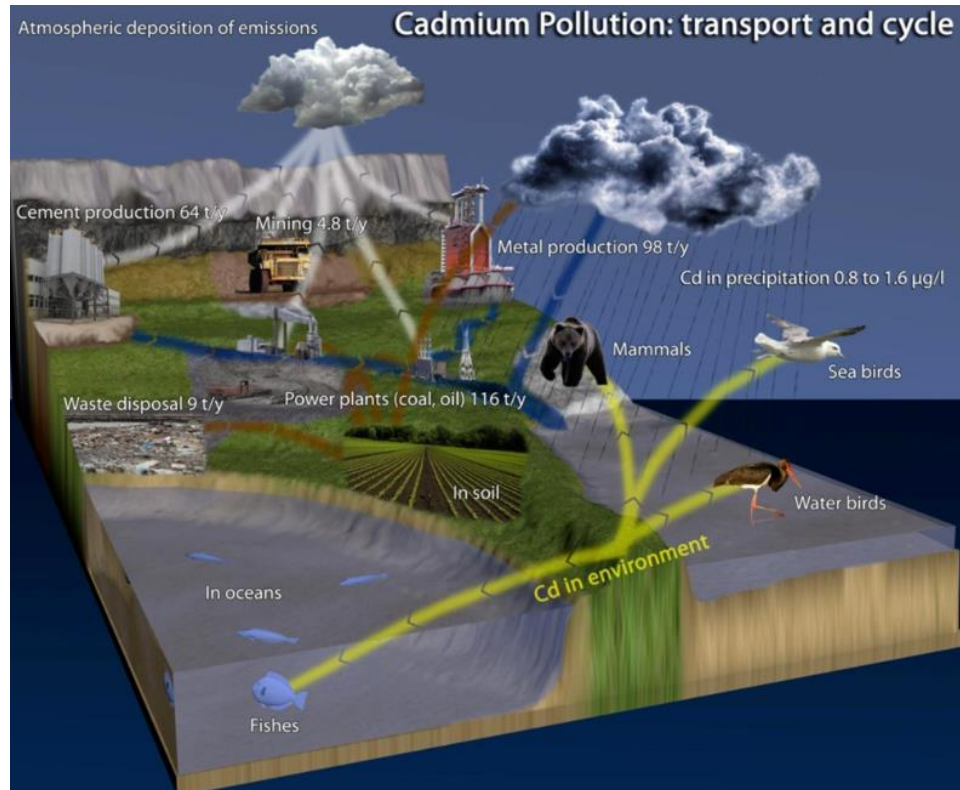
O Cd é um metal maleável, utilizado em escala industrial na composição de ligas metálicas, para a fabricação de pilhas e células fotoelétricas, corantes na indústria têxtil e especialmente na composição de pesticidas agrícolas, sua principal forma de entrada e deposição na superfície terrestre. É encontrado na natureza em forma inerte e de fácil oxidação, associado aos sulfetos dos minérios de zinco, cobre e chumbo, em baixos percentuais. Como mineral, encontra-se na forma de grenoquita, em proporções muito pequenas da litosfera (POPP, 1998; CETESB, 2012).

O Cd apresenta grande mobilidade, podendo apresentar maior risco ambiental, principalmente em solos com pouca matéria orgânica, baixos teores de óxidos de ferro e com baixa capacidade de troca catiônica (COSTA *et al.*, 2007).

A toxicidade do Cd em seres humanos ocorre via cadeia alimentar em virtude da eficiente absorção pelas plantas agricultáveis, causando envenenamento, danos aos ossos, rins, pulmões afetando o sistema nervoso, reprodutor, dentre outros órgãos (WHO *et al.*, 2012).

Todas estas características mostram a importância de compreender a poluição por Cd no ambiente, e de que forma ocorre seu ciclo e transporte (Figura 2).

Figura 2 - Poluição por Cádmiu: transporte e ciclo. As setas brancas representam a emissão de Cd através da mineração e indústria. As setas azuis representam a deposição de Cd no ambiente. As setas amarelas representam a contaminação por Cd na fauna. As setas laranjas representam a deposição de cádmio na agricultura.



Fonte: Sochor *et al.* (2011).

1.1.3. Efeito da toxidez por Cádmiu nas plantas

As plantas constituem-se o principal ponto de entrada do Cd na cadeia trófica. Em contraste com outros metais pesados tóxicos, o Cd no solo é mais facilmente absorvido pelas raízes das plantas, sendo este fenômeno mais pronunciado em solos ácidos. Acredita-se que, similarmente a outros metais pesados, o Cd entra nas células vegetais através de transportadores de cátions com ampla especificidade de substrato. (PERFUS-BARBEOCH *et al.*, 2002). No citosol, o Cd é ligado a quelantes, tais como fitoquelatinas e ácido cítrico e, posteriormente, armazenado no vacúolo (CLEMENS, 1999).

O Cd, assim como outros elementos são absorvidos pela via simplástica ou apoplástica e são transportados radialmente através do córtex da raiz até o xilema, onde seguem para a parte aérea. O cádmio pode chegar ao xilema pela via simplástica através do citoplasma de células individuais do córtex, ligadas por plasmodesmata (LUX *et al.*, 2011). A maioria dos íons Cd absorvido pelas plantas permanecem nas raízes e somente uma pequena parte desses íons é

transportada para a parte aérea. Em geral, a distribuição de cádmio nos diferentes órgãos das plantas diminui na seguinte ordem: raiz > folhas > frutos > sementes (HASAN et al., 2009).

O Cd é associado à alteração da atividade enzimática, a redução da permeabilidade de membranas, a alteração da conformação das membranas dos tilacóides e mitocôndrias, ao desacoplamento da fosforilação oxidativa, a inibição da assimilação do CO₂ para a fotossíntese, as alterações morfológicas com redução de crescimento, e a indução da redução do conteúdo pigmentar (RAI et al., 1981; MACÊDO & MORRIL, 2008).

A toxidez do Cd causa redução da atividade fotossintética (BURZYNSKI; KLOBU, 2004; DIAS et al., 2013), provoca alterações morfofisiológicas nas plantas e distúrbios metabólicos do sistema fonte e dreno (ROY et al., 2016), além de interferir na absorção, transporte e utilização de vários elementos minerais (Ca, Mg, P e K) e nas relações hídricas das plantas (DIAS et al., 2013; DAS et al., 1997). O aparelho fotossintético é um dos locais-alvo da ação do Cd nas plantas. De fato, o Cd pode direta ou indiretamente interagir com diferentes componentes do aparato fotossintético e pode diminuir a eficiência do transporte de elétrons, inibir a biossíntese da clorofila e reduzir a assimilação do carbono fotossintético (MAKSYMIEC et al., 2007).

O Cd também é um potencial causador do estresse oxidativo em plantas. A exposição ao Cd induz a superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e aumenta a peroxidação lipídica de folhas e raízes de plantas (SMEETS et al., 2005). Altos níveis de EROs podem danificar lipídios, proteínas e DNA. Assim, a célula vegetal precisa controlar completamente os níveis gerais de EROs pela ação coordenada de várias enzimas antioxidantes, incluindo a dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX) e catalase (CAT) (FOYER e NOCTOR, 2003).

1.1.4. Paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke)

Atualmente a oferta de madeira proveniente de florestas nativas não preenche a demanda do mercado florestal. Em razão da alta demanda por madeira, o setor industrial de base florestal tem aumentado a utilização de madeira de florestas plantadas. A implantação de povoamentos florestais tem-se intensificado no Brasil, com espécies arbóreas de rápido crescimento por meio de plantios homogêneos ou consorciados com culturas anuais e/ou perenes (CORDEIRO et al. 2015).

No Brasil, as plantações de *Eucalyptus* sp e *Pinus* sp são predominantes em várias regiões. Nos últimos anos espécies arbóreas nativas e exóticas vêm sendo utilizadas em maior escala alcançando 7,6% da área total de plantações florestais existentes. A área plantada com as

espécies nativas de *S. amazonicum* Huber ex Ducke e seringueira *Hevea brasiliensis* L. e as exóticas *Acacia mangium* Willd) e *Khaya ivorensis* atinge cerca de 600 mil ha (IBÁ 2016).

No Estado Pará, o paricá vem despertando interesse de produtores rurais e madeireiros, em razão do valor comercial da madeira para a produção de laminados e rápido crescimento se comparada outras espécies nativas. Essa expansão está associada também as diversas possibilidades de uso da madeira, bem como por ser uma alternativa regional para suprir a demanda de matéria-prima com madeira proveniente de florestas plantadas, como também para recuperação de áreas alteradas (THOMAZ e GONÇALVES, 2012).

A espécie *S. amazonicum* Huber ex Ducke, foi descoberta por Huber e descrita por Ducke, em 1922, sendo vulgarmente conhecida como paricá (CARVALHO, 2007). Apresenta rápido crescimento (idade de corte de aproximadamente 7 anos), e madeira com elevada cotação no mercado interno e externo, e por isso vem sendo bastante cultivado pelas empresas madeireiras das regiões Norte e Nordeste do Brasil, mostrando-se como uma alternativa mais viável e rápida que o eucalipto, pois o paricá possui fuste cilíndrico e não tem galhos nos primeiros sete metros do tronco, sendo uma madeira muito cobiçada para a produção de compensados, e considerada a melhor espécie para a fabricação de MDF (ROSA, 2011).

A espécie atende as expectativas do mercado, além de rapidez, produtividade, lucratividade e proteção ambiental, uma vez que é bastante utilizada em florestas cultivadas que substituem o extrativismo predatório, e podem ser usadas também para recuperar imensas áreas de pastagens degradadas. Caracteriza-se como uma árvore decídua. As maiores atingem alturas próximas de 40 m e 100 cm de diâmetro à altura do peito (DAP), medido a 1,30 m do solo (AMATA, 2009).

É uma espécie essencialmente heliófila (realiza todo o seu ciclo de vida à pleno sol) e não tolera baixas temperaturas. Devido á sua densidade média ($0,30 \text{ g.cm}^{-3}$ à $0,62 \text{ g.cm}^{-3}$), no estado do Pará, a maior parte da plantação de paricá é utilizada para a fabricação de compensado, e os seus resíduos e pontas de madeira são utilizados para a fabricação de MDF (ALMEIDA et al., 2013).

Entre os vegetais, as espécies arbóreas são frequentemente associadas à estratégia de fitoestabilização, sendo que a acumulação de metais nas raízes e a baixa translocação para a parte aérea têm sido relatadas como mecanismos de resistência de espécies arbóreas a metais pesados (PULFORD; WATSON, 2003). As árvores tendem a reduzir a lixiviação, controlar a

erosão e adicionar matéria orgânica ao solo, o que pode levar à complexação dos metais pesados. Por outro lado, as árvores também podem acidificar o solo e produzir matéria orgânica solúvel podendo causar a percolação de metais. Diante disso, é importante a seleção de espécies arbóreas que causem baixa acidificação do solo e menor translocação de metais pesados para a parte aérea (NEVEL et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, D.H *et al.* Caracterização completa da madeira da espécie amazônica paricá (*Schizolobium amazonicum*) em peças de dimensões estruturais. **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.6, p.1175-1181, 2013.
- AMATA. Revisão sobre paricá: *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke. 2009.
- ARAÚJO, J.B.S.; PINTO FILHO, J.L. O. Identificação de fontes poluidoras de metais pesados nos solos da bacia hidrográfica do rio Apodi-Mossoró/RN, na área urbana de Mossoró-RN. **Revista Verde**, v. 5, n. 2, p. 80-94, 2010.
- BURZYNSKI, M.; KLOBUS, G. Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd, and Pb stress. **Photosynthesis**, v. 42, p. 505–510, 2004.
- CARVALHO, A.V.S. *et al.* Produção de matéria seca e de grãos por plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas em solos tratados com metais pesados. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 949-955, 2008.
- CETESB – Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. **Valores orientadores para solos e águas subterrâneas do estado de São Paulo**. Decisão da Diretoria nº 195/2005. 2005. 4 p.
- CLEMENS, S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. **Planta**, v. 212, p. 475-486, 1999.
- CORDEIRO, I.M.C.C *et al.* Avaliação de plantios de paricá (*Schizolobium parahyba* var. *amazonicum* (Huber ex Ducke) Barneby) de diferentes idades e sistemas de cultivo no município de Aurora do Pará - PA (Brasil). **Ciência Florestal**, 25 (3): 679-687, jul.-set, 2015.
- COSTA, C.N *et al.* Fracionamento sequencial de cádmio e chumbo em solos. **Ciência Rural**, vol. 37, n.5, p. 1323-1328. 2007.
- DIAS, M.C *et al.* Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 1281-1289, 2013.
- FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. **Physiologia Plantarum**, 119: 355–364, 2003.
- HASAN, S.A.; FARIDUDDIN, Q.; ALI, B.; AHMAD U. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 30, n. 2, p. 165-174, 2009.
- Industria Brasileira de Árvores - IBÁ. **Relatório Ibá 2015**. Disponível em: http://iba.org/images/shared/iba_2015.pdf, 2015. Acesso em: 21 mar. 2016.
- LOPES, C.V.A.; ALBUQUERQUE, G.S.C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 518-534, 2018.
- LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULIK, M.; WHITE, P.J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 21-37, 2011.

- MACÊDO, L.S.; MORRIL, W.B.B. Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: revisão da literatura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v. 2, n. 2, p. 29-38, 2008.
- MAKSYMIEC, W.; WOJCIK, M.; KRUPA, Z. Variation in oxidative stress and photochemical activity in *Arabidopsis thaliana* leaves subjected to cadmium and excess copper in the presence or absence of jasmonate and ascorbate. **Chemosphere**, 3(6): 421–427, 2007.
- MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.
- NEVEL, L.V *et al.* Phytoextraction of metals from soils: How far from practice? **Environmental Pollution**, v. 150, n. 01, p. 34-40, 2007.
- OVES, M.; SAGHIR KHAN, M.; ZAIDI, A.; AHMAD, E. Soil contamination, nutritive value, and human health risk assessment of heavy metals: an overview. **Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation**. Springer-Verlag Wien, 2012.
- PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHARDT, N.; VAVASSEUR, A.; FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **The Plant Journal**, v. 32, n. 4, p. 539-548, 2002.
- POPP, J.H. **Geologia geral**. Rio de Janeiro, RJ: LTC Editora, 1998. 376 p.
- PULFORD, I.D.; WATSON, C. Phytoremediation of heavy metal-contaminated land by trees a review. **Environment International**, v. 29, n. 04, p. 529-540, 2003.
- ROSA, L.S. Características botânicas, anatômicas e tecnológicas do paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke). **Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v. 46, n. 1, p. 63-80, 2011.
- ROY, S.K *et al.* Morpho-physiological and proteome level responses to cadmium stress in sorghum. **PLoS ONE**, v. 11, n.11, p. 1-27, 2016.
- SARWAR, N *et al.* Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 90, n. 6, p. 925-937, 2010.
- SMEETS, K *et al.* Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. **Plant Physiology and Biochemistry**, 43: 437– 444, 2005.
- SOCHOR, J *et al.* Bio-sensing of Cadmium (II) ions using *Staphylococcus aureus*. **Sensors**, v. 11, n. 11, 10638-10663, 2011.
- TARLEY, C.R.T.; ARRUDA, M.A.Z. Adsorventes naturais: potencialidades e aplicações da esponja natural (*Luffa cylindrica*) na remoção de chumbo em efluentes de laboratório. **Revista Analítica**, n. 4, p. 25-32, 2003.
- THOMAZ, L.B.; GONÇALVES, E.O. (Eds.). UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. Crescimento inicial de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speg.) em diferentes doses de NPK. **Jerônimo Monteiro**: Out. 36 p, 2012.
- VIDAURRE, G *et al.* **Paricá, uma espécie promissora**. Revista da Madeira. Ed. nº 97, 2006.

WHO, UNICEF. "UNFPA, **The World Bank**. Trends in maternal mortality: 1990 to 2010."
p. 59, 2012.

2. HIPÓTESES E OBJETIVOS DA PESQUISA

2.1 Hipóteses

- Os elementos nutricionais (Cd, N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn e Zn) sofrem alterações em função das dosagens crescentes de Cd (CdCl_2 178 μM ; CdCl_2 356 μM ; CdCl_2 534 μM ; CdCl_2 712 μM) em plantas jovens de paricá.
- A atividade das enzimas antioxidantes (APX, GPOD, CAT e SOD) sofre mudanças em função das dosagens crescentes de Cd (CdCl_2 178 μM ; CdCl_2 356 μM ; CdCl_2 534 μM ; CdCl_2 712 μM) em plantas jovens de paricá.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo Geral

Avaliar os resultados nutricionais e do sistema antioxidante em plantas jovens de *S. amazonicum* Huber ex Ducke submetidas à diferentes dosagens de Cd.

2.2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o estado nutricional de folhas e raízes (Cd, N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn) de plantas jovens de paricá em condições crescentes de cloreto de Cd (CdCl_2 178 μM ; CdCl_2 356 μM ; CdCl_2 534 μM ; CdCl_2 712 μM).
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes dismutase do superóxido (SOD), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase do guaiacol (G-POD) e catalase (CAT), em folhas e raízes de plantas jovens de paricá em condições crescentes de cloreto de Cd (CdCl_2 178 μM ; CdCl_2 356 μM ; CdCl_2 534 μM ; CdCl_2 712 μM).

3. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL EM PLANTAS JOVENS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) SUBMETIDAS À DIFERENTES DOSES DE CÁDMIO.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os parâmetros nutricionais de plantas jovens de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke quando submetidas em diferentes concentrações de cádmio (Cd). Aos 60 dias após o semeio foi iniciada a aplicação das concentrações de Cd na forma de cloreto de cádmio hidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com 5 tratamentos (0, 178, 356, 534 e 712 μM de CdCl_2). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) utilizando o software Statistica, e as diferenças entre os tratamentos analisadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo ajustadas por equações de regressão polinomial $P < 0,01$ ou $0,05$ usando-se o programa Sisvar. As principais variáveis nutricionais desestabilizaram-se em suas funções com o aumento das doses de Cd, influenciando no processo fisiológico vegetal. O Cd acumulou-se principalmente nas raízes, com baixa translocação para parte aérea. Diante disso, pode-se caracterizá-la como uma espécie com potencial para fins de fitorremediação.

Palavras chave: Nutrientes, estresse, casa de vegetação

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the nutritional parameters of young plants of *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke when submitted to different cadmium (Cd) concentrations. At 60 days after sowing the application of Cd concentrations as hydrated cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was started. The experimental design was completely randomized with 5 treatments (0, 178, 356, 534 and 712 μM CdCl_2). Data were subjected to analysis of variance by the F test ($p < 0.05$) using the Statistica software, and the differences between treatments analyzed by the Tukey test ($p < 0.05$) were adjusted by polynomial regression equations $P < 0.01$ or 0.05 using the Sisvar program. The main nutritional variables were destabilized in their functions with increasing doses of Cd, influencing the plant physiological process. Cd accumulated mainly in the roots, with low translocation to the shoot. Given this, it can be characterized as a species with potential for phytoremediation purposes.

Key words: Nutrients, stress, greenhouse

3.1. INTRODUÇÃO

O paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke), espécie amazônica de grande potencial econômico, tem conquistado cada vez mais destaque entre as espécies reflorestadas no Brasil, pois possui incrementos em altura e diâmetro que possibilitam sua utilização em poucos anos. De acordo com Marques et al. (2006), a madeira de paricá apresenta facilidade em relação à remoção da casca, laminação, secagem, prensagem e excelente acabamento.

Entretanto, o uso do paricá para exploração madeireira ou recomposição florestal requer um consistente programa de formação de mudas, o que permitirá maior chance de sucesso na fase de viveiro, bem como maximizará seu crescimento ao diminuir o tempo de transplante para o campo. Isso reforça a importância de se definir protocolos e estratégias que favoreçam a produção de mudas com qualidade, em menor tempo e em condições acessíveis aos pequenos e médios produtores (CUNHA et al., 2005), uma vez que os viveiristas só terão êxito quando os métodos e sistemas empregados priorizarem a produção de mudas com qualidade e baixo custo.

Em condições de estresse por metais pesados, as plantas podem desenvolver diferentes mecanismos de tolerância. Neste sentido, as respostas das plantas aos metais variam amplamente dependendo das características intrínsecas da espécie, do tipo de metal e das condições ambientais circundantes (SOUZA et al., 2013).

Metais pesados como As, Cd, Co, Cu, Ni, Zn e Cr são fitotóxicos acima de certos níveis limiares e podem ser ampliados biologicamente através da cadeia alimentar. Os metais pesados persistem no meio ambiente, afetando as propriedades do solo, sua fertilidade, biomassa e produção agrícola e, finalmente, a saúde humana (MUDGAL; MADAAN; MUDGAL, 2010).

O cádmio (Cd) é um dos principais contaminantes ambientais e um dos mais tóxicos dentre os metais pesados (GALLEGO et al., 2012). O acúmulo de Cd em determinados tecidos da planta pode levar à rejeição comercial de certas cultivares, diminuição da produtividade, além de se tornar perigoso à saúde humana (DI BACCIO et al., 2014). Assim, o estudo do impacto do Cd sobre as culturas agrícolas tem elevada importância nas mais diversas áreas de estudo que compreendem a Agronomia, Medicina e Biologia.

A composição ideal de nutrientes minerais é essencial para o metabolismo das plantas. O excesso de metais pesados geralmente afeta negativamente o conteúdo de nutrientes minerais (KOVÁČIK et al., 2009). Na relação solo-planta, o Cd pode influenciar os processos fisiológicos e os mecanismos bioquímicos afetando principalmente a concentração e as funções dos nutrientes minerais. Khan et al. (2007) demonstrou que o Cd interage com a

disponibilidade de elementos nutricionais e também alguns desses nutrientes têm papel protetor contra os efeitos tóxicos do estresse por Cd. Tendo reconhecido a importância dos nutrientes minerais para os sistemas agrícolas e os efeitos adversos do Cd nas plantas, é necessário compreender a interação entre os nutrientes para amenizar o estresse por Cd e, conseqüentemente, otimizar a produção.

A fitoextração é uma tecnologia de limpeza promissora, eficaz, e de baixo custo, envolvendo o uso de plantas para restaurar locais contaminados (YAN et al. 2008; MARQUES, RANGEL; CASTRO, 2009). No entanto, essa tecnologia é frequentemente mais lenta do que as técnicas físicas, químicas ou térmicas tradicionais, exigindo vários anos ou mesmo décadas para a limpeza do local (SCHNOOR et al. 1995; ZHANG, 2010).

Desta forma, objetivou-se com o presente estudo determinar a concentração dos macronutrientes nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), e micronutrientes cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn), e do Cd em plantas jovens de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke submetidas à crescentes doses de Cd.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

Para a formação das mudas de Paricá foram utilizadas sementes fornecidas pela AIMEX (Associação das Indústrias Exportadoras de Madeira do Estado do Pará).

3.2.2. Condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente à UFRA (Universidade Federal Rural da Amazônia) em Belém, estado do Pará, Brasil (01° 27' 31" S, 48° 26' 04.5") no período de Dezembro de 2017 à junho de 2018. A classificação do clima, segundo Köppen e Geiger, é Af com temperatura média de 26,8 °C e umidade relativa do ar de 95%.

As sementes foram previamente escarificadas com lixa 80mm e embebidas em água destilada por 24h para a quebra da dormência. Essas sementes foram semeadas em vasos do tipo Leonard (quatro por vaso) com capacidade de 4,6L adaptados com garrafas pet, contendo areia lavada e esterilizada. Em cada vaso envolvido com papel alumínio foi colocado na superfície superior borracha de Etil Vinil Acetato (E.V.A) em forma de círculos para evitar a proliferação de algas.

3.2.3. Exposição das plantas às dosagens de Cádmi

Aos 15 dias após o semeio, a fim de completar seu crescimento antes do início da aplicação dos tratamentos, as mudas passaram a receber solução nutritiva de Sarruge (1975) (Tabela 1), renovada semanalmente. O pH foi mantido entre 5,8 a 6,0 adicionando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹. Transcorridos 60 dias após o semeio ocorreu a primeira aplicação das dosagens (Dia 0), nas concentrações de 178; 356; 534 e 712- μ M de cloreto de Cd hidratado (CdCl₂.H₂O) em solução nutritiva. Após 7 dias ocorreu a segunda aplicação das dosagens (Dia 7), assim como a terceira (Dia 14).

Figura 3 - Imagem do experimento implantado em casa de vegetação com plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke).



Fonte: O Autor.

Figura 4 - Exemplo de vaso adaptado tipo Leonard utilizado no experimento.



Fonte: O Autor

Tabela 1 - Composição da solução nutritiva utilizada no experimento.

Composição	Concentração (mM)
KNO₃	5
KH₂PO₄	1
Ca(NO₃)₂.4H₂O	5
Mg(SO₄).7H₂O	2
Fe(EDTA)	1
a) FeSO₄.7H₂O	0,09
b) Na(EDTA)	0.07
MICRONUTRIENTES	
a) H₃BO₃	0,046
b) MnCl₂.4H₂O	0,009
c) CuSO₄.5H₂O	0,003
d) ZnSO₄.7H₂O	0,007
e) Na₂MoO₄.2H₂O	0,001

Fonte: O Autor.

3.2.4. Coleta e armazenamento do material

Após 15 dias da aplicação do Cd (75 dias após o semeio) as plantas apresentaram sinais de toxidez (clorose, epinastia, senescência foliar), e portanto foram coletadas para a realização de análises nutricionais, sendo separadas em folha, caule e raiz, e armazenados em sacos de papel e levados à estufa de ventilação de ar forçada a 65°C por 48 h. Após a secagem as partes

foram moídas em moinho tipo Wiley, obtendo assim um pó fino. Sendo este devidamente armazenado em tubos de Falcon. Parte do material seco foi levado para o Museu Paraense Emílio Goeldi para análise da concentração de Cd, N, P, K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn.

Figura 5 – Sintomas visuais de toxidez por Cádmio nas mudas de paricá.



Fonte: O Autor

3.2.5. Variáveis nutricionais

As análises de Macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg) foram realizadas no laboratório de Física do Solo do campus de pesquisa do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG, Belém – PA), de acordo com metodologia preconizada por TEDESCO et al. (1995). As análises de Micronutrientes (Fe, Zn, Mn e Cu) e Cd foram realizadas no Laboratório de Análises Químicas do campus de pesquisa do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG, Belém – PA), de acordo com metodologia preconizada por Miyazawa et al. (2009).

3.2.5.1. Macronutrientes

- Digestão das amostras

Com a obtenção do material seco e moído, foram pesados 200mg de cada amostra e colocados em tubos digestores. Adicionou-se aos tubos 1mL de H₂O₂ 30%, 2mL de H₂SO₄ concentrado e 700mg da mistura de digestão (Na₂SO₄, CuSO₄.5H₂O e Selênio). Os tubos foram levados para o bloco digestor inicialmente à 160-180°C (até evaporar a água), posteriormente a temperatura foi aumentada para 350-375°C, sendo mantidos nesta temperatura após o clareamento (cor amarelo-esverdeada) por uma hora. Retirou-se os frascos do bloco digestor e após resfriamento o volume foi completado com H₂O destilada até 50mL, sendo o conteúdo dos tubos digestores transferido para tubos de Falcon de 50mL, obtendo assim o extrato em que se retiraram as alíquotas para as determinações.

- Nitrogênio (N)

10 mL do extrato de digestão foram pipetados para balão de destilação de 100 mL, adicionando-se 5mL de NaOH 10M, iniciando-se assim a destilação com destilador de arraste de vapor (micro-Kjeldahl). Destilou-se até coletar aproximadamente 35-40mL, seguindo-se titulação com H₂SO₄ 0,025M. Cada mL de H₂SO₄ 0,025M utilizado na titulação corresponde a 700µg de N. Foram feitos os cálculos a partir da fórmula: %N= (mLH⁺am – mL H⁺br) x 700 x 5 x 5/ 10.000.

- Fósforo (P)

1mL do extrato de digestão foi pipetado para tubos de ensaio comuns, adicionando-se 2mL de H₂O destilada, 3mL de solução P-B (Molibdato de amônio) e 3 gotas de solução P-C (ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfônico). Seguiu-se agitação e após 15min as leituras foram realizadas em espectrofotômetro à absorvância de 660nm. Cada 0,002 de absorvância corresponde à aproximadamente 0,0015% de P na amostra.

Cálculos: a) Curva padrão de P.

b) Fator de concentração: determinado pela curva padrão.

c) Fator de diluição: $fd = 50/0,20 \times 3/1 \times 6/3 = 1.500$

d) Teor de P:P(%) = leitura x fc x fd/10.000

- Potássio (K)

1mL do extrato de digestão foi pipetado para tubos de ensaio comuns, adicionando-se 10mL de H₂O destilada, e em seguida foi determinada a emissão de luz no fotômetro de chama.

Cálculos: a) Curva padrão de K.

b) Concentração na solução final, determinada pela curva padrão.

c) Fator de diluição: $fd = 50/0,20 \times 11/1 = 2.750$

d) Teor de K: K(%) = leitura x cs x fd/10.000

- Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg)

2,5mL do extrato de digestão foi pipetado para tubos de ensaio comuns, adicionando-se 2,5mL de H₂O destilada, e 5mL da solução de Sr (Estrôncio) 0,3% em HCl 0,2M. Determinou-se a absorvância do Ca no fotômetro de absorção.

Retirou-se 5mL do extrato utilizado para determinar a absorvância de Ca, adicionando 10mL de H₂O destilada, e seguiu-se determinação da absorvância do Mg no fotômetro de absorção.

Cálculos: a) Cálcio

a.1) Curva padrão de Ca.

a.2) fator de concentração (fc)

a.3) fator de diluição: $fd = 50/0,20 \times 5/2,5 \times 10/5 = 1.000$

a.4) Teor de Ca: $Ca(\%) = \text{leitura} \times fc \times fd/10.000$

b) Magnésio

b.1) Curva padrão de Mg

b.2) Fator de concentração (fc)

b.3) fator de diluição: $fd = 50/0,20 \times 5/2,5 \times 10/5 \times 15/5 = 3.000$

b.4) Teor de Mg: $Mg(\%) = \text{leitura} \times fc \times fd/10.000$

3.2.5.2. Micronutrientes

- Digestão das amostras

Com a obtenção do material seco e moído, foram pesados 500mg de cada amostra e colocados em tubos digestores, adicionando-se 8mL de solução HNO₃:HClO₄ (3:1) e deixando a frio durante a noite em bloco digestor. Posteriormente, elevou-se a temperatura do bloco digestor para 120°C até o total desprendimento do vapor castanho e depois a 200°C até o total desprendimento do vapor branco. Deixou-se esfriar. Após a digestão, a solução do tubo foi filtrada e aferida até a marca em balão volumétrico de 50 mL com água deionizada.

- Determinações

A composição mineral foi determinada a partir da solução obtida após a digestão das amostras, no Laboratório de Análises Químicas do Museu Paraense Emílio Goeldi utilizando-se de um espectrômetro de absorção atômica de chama da marca Thermo, modelo ICE3000. O procedimento foi realizado em duplicata e o branco analítico foi preparado pelo mesmo método sem adição da amostra.

- Cobre (Cu)

Leituras realizadas na absorvância de 324,7nm. Cálculo: $\text{Cu mg kg}^{-1} = \text{mg L}^{-1} \times 50$.

- Ferro (Fe)

Leituras realizadas na absorvância de 248,3nm. Cálculo: $\text{Fe mg kg}^{-1} = \text{mg L}^{-1} \times 50$.

- Manganês (Mn)

Leituras realizadas na absorvância de 279,5nm. Cálculo: $\text{Mn mg kg}^{-1} = \text{L}^{-1} \times 50$.

- Zinco (Zn)

Leituras realizadas na absorvância de 213,9nm. Cálculo: $\text{Zn mg kg}^{-1} = \text{mg L}^{-1} \times 50$.

- Cádmio (Cd)

Leituras realizadas na absorvância de 309,3nm. Cálculo: $\text{Cd mg kg}^{-1} = \text{L}^{-1} \times 50$.

3.2.6. Delineamento experimental e Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos (0, 178, 356, 534 e 712 μM de CdCl_2) e 7 repetições, totalizando 35 unidades experimentais (uma planta/vaso).

Os dados foram submetidos à análise da variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). As médias foram comparadas pela diferença mínima significativa do teste de Tukey ($p \leq 0,05$) e ajustadas por equações de regressão polinomial ($p \leq 0,01$ ou $0,05$) usando-se o programa SISVAR (FERREIRA, 2011).

Para criar as matrizes de correlação, os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p \leq 0,05$). Foi utilizado o software STATISTICA versão 10.0.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1. Teores de nutrientes e Cd

Nos macronutrientes, as concentrações de N (folha e raiz), e K (raízes) aumentaram com o incremento das doses de Cd (Figura 6). Nos demais macronutrientes o Cd não influenciou suas concentrações. De forma geral, N, Ca e Mg (raízes) foram os elementos que apresentaram as maiores concentrações entre todos os nutrientes observados. P não foi significativo tanto em folhas como em raízes, K não foi significativo nas raízes e Mg não mostrou significância nas folhas.

Nos micronutrientes, não se observou a influência do Cd sobre as concentrações de Fe (folhas e raízes) e Mn (raízes), já as concentrações de Cu, Zn e Mn (folhas) apresentaram-se maiores nas plantas submetidas às dosagens de Cd (Figura 7).

A concentração de Cd nas raízes aumentou de acordo com o incremento das dosagens do metal (Figura 7). A maior concentração de Cd foi na dose de 712 μM de Cd). Nas folhas, a maior concentração de Cd ocorreu na menor dose (178 μM).

Segundo Souza et al. (2013), como uma estratégia para manter o metabolismo ativo afim de aumentar o crescimento resultando em um efeito de diluição na quantidade de Cd acumulada pela planta, os teores de Mg costumam aumentar conforme a exposição das plantas ao Cd. Fato este não observado neste estudo, evidenciando a pouca influência das doses de Cd nas concentrações de Mg nas raízes das plantas. Os teores de Mg encontrados podem estar relacionados à sua função na composição da clorofila, ou seja, às porfirinas magnesianas (FAQUIN, 2005). Os teores de Mg não diferenciaram em relação ao tratamento controle e às doses de Cd. Podemos inferir um decréscimo nas maiores doses de Cd, o que pode ser atribuído à competição com os cátions do metal pesado (Mg^{2+} e Cd^{2+}).

Os teores de Ca foram maiores no tratamento controle (0 μM de Cd) do que nos tratamentos com Cd. Logo, o aumento das doses de Cd reduziu a absorção de Ca. Para Wang (1987), uma diminuição da concentração de Ca sob a toxicidade do Cd pode ser um sintoma de um sistema de defesa intercelular interferindo nesse mecanismo. Isso indica que o Cd, mesmo nas menores doses, influenciou a absorção do cálcio. Um aumento da concentração de Ca sob estresse seria um possível mecanismo para a redução dos efeitos tóxicos de Cd.

De acordo com Tolentino et al. (2014), os altos teores de N radicular (Figura 6) podem ser explicados pelos mecanismos de proteção da planta, que evitam que o contaminante seja

translocado para as partes aéreas. Portanto permanecem no sistema radicular como compostos precipitados e insolúveis.

Teores de K nas folhas foram superiores ao do tratamento controle apenas na dose mais alta de Cd (712 μM), variando de 1,75 g kg^{-1} à 1,85 g kg^{-1} . A pouca variação demonstra a baixa influência que as doses de Cd tiveram neste elemento, evidenciando que o mesmo não foi afetado pelas doses aplicadas.

Os teores de Cu foram maiores em plantas com as doses de 356 e 534 μM . De acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001), a presença de Cd provoca interação com absorção de Cu podendo, em alguns vegetais ter um efeito sinérgico e, em outros, antagônico. Neste estudo, para os teores de Cu nas folhas e nas raízes, as plantas obtiveram efeito sinérgico.

O aumento de doses de Cd não teve influência sobre as concentrações de nutrientes na parte aérea e tecido da raiz, com exceção de Mn que foi reduzido com o aumento das doses. Isto porque a disponibilidade de Mn para as plantas é parcialmente diminuída pela adição de Cd. Ramachandran e D'Souza (2002) mostraram uma interação antagônica entre Cd e Mn, enquanto Chen et al. (2007) indicou uma interação sinérgica de Mn com Cd.

Baszynski et al. (1980) sugeriu que o acúmulo de Cd nos tecidos vegetais pode ser diminuído, aumentando o nível de Mn, possivelmente devido à concorrência pelos mesmos transportadores de membrana. A adição de Mn aumenta a produção de biomassa melhorando o crescimento da raiz e reforçando a captação de NO_3 , que reduz a toxidez do Cd. O alívio da toxicidade do Cd impede a translocação e a acumulação do mesmo na planta. Porém nas raízes, os teores de Mn diminuíram conforme o aumento das doses de Cd.

A adição de doses crescentes de Cd fez com que houvesse acréscimo nos teores e, conseqüentemente, na acumulação de Cd no sistema radicular, quando comparadas com as plantas controle. O baixo transporte de metais para a parte aérea pode ser considerado um possível mecanismo pelo qual o sistema radicular contribui para a tolerância das plantas aos metais pesados (ARDUINI et al., 1996).

De modo geral, a diminuição da concentração de nutrientes em função do aumento das doses de Cd é devida à inibição da absorção ou competição de interação em proteínas carregadoras. Por outro lado, o aumento de elementos nos tecidos, como o Ca, pode ser explicado pela maior afinidade do Cd pelas cargas negativas das pectinas, podendo dessa forma ocorrer a remoção do Ca das estruturas pécicas que compõem a parede celular (MARMIROLI et al., 2005; DOMINGUEZ et al., 2009).

Como observado no presente estudo, o Cd afetou somente a concentração de N (folhas e raízes), Cu (raízes), Mn (folhas) e Zn (folhas). Os demais nutrientes não diferiram dos valores

observados no controle, portanto para estas variáveis, considera-se que a planta não foi capaz de manter a homeostase desses elementos, indicando que o transporte desses elementos não foi afetado.

Figura 6 – Teores de N (A), K (B), Ca (C) e Mg (D) em plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio.

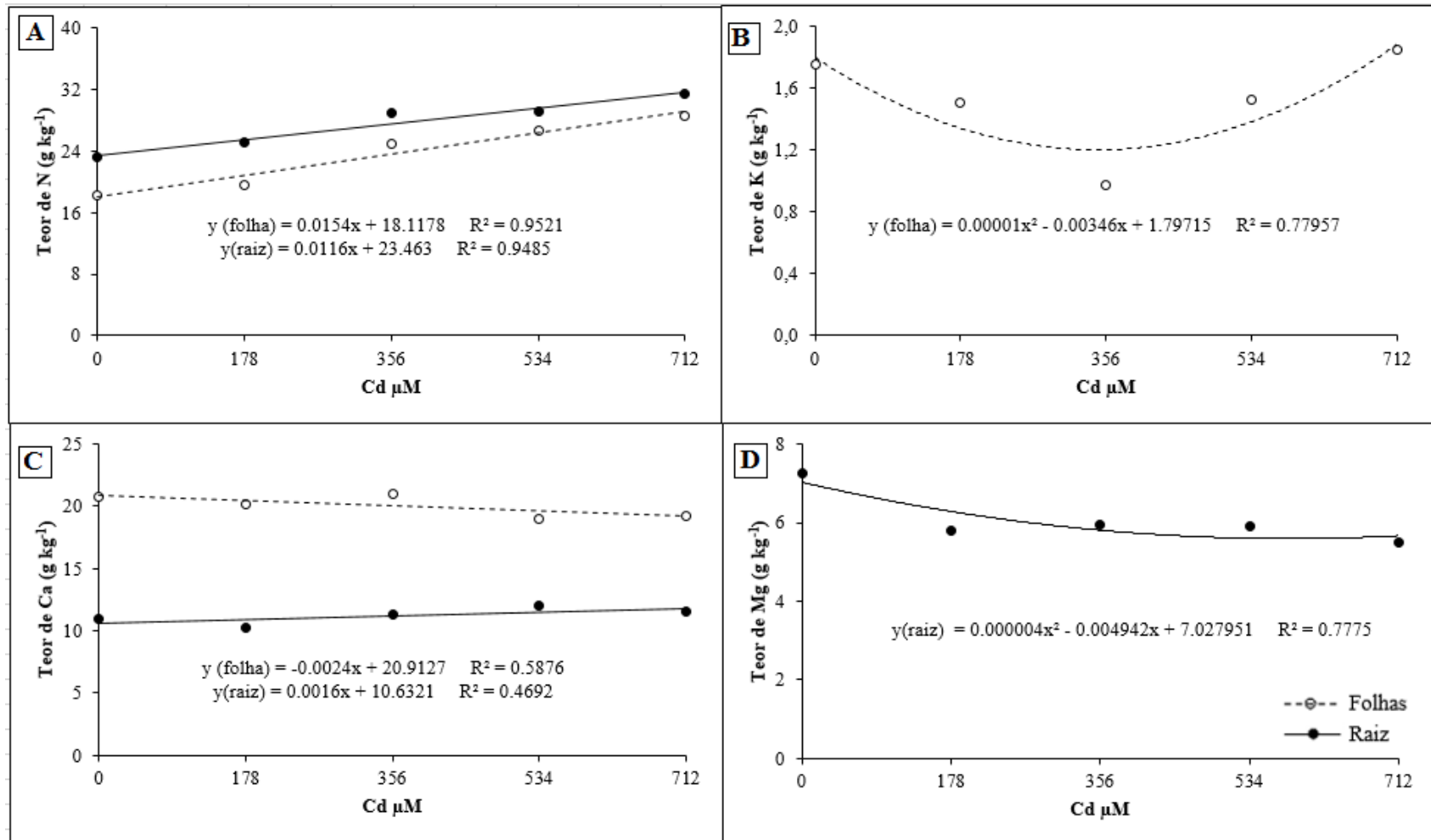
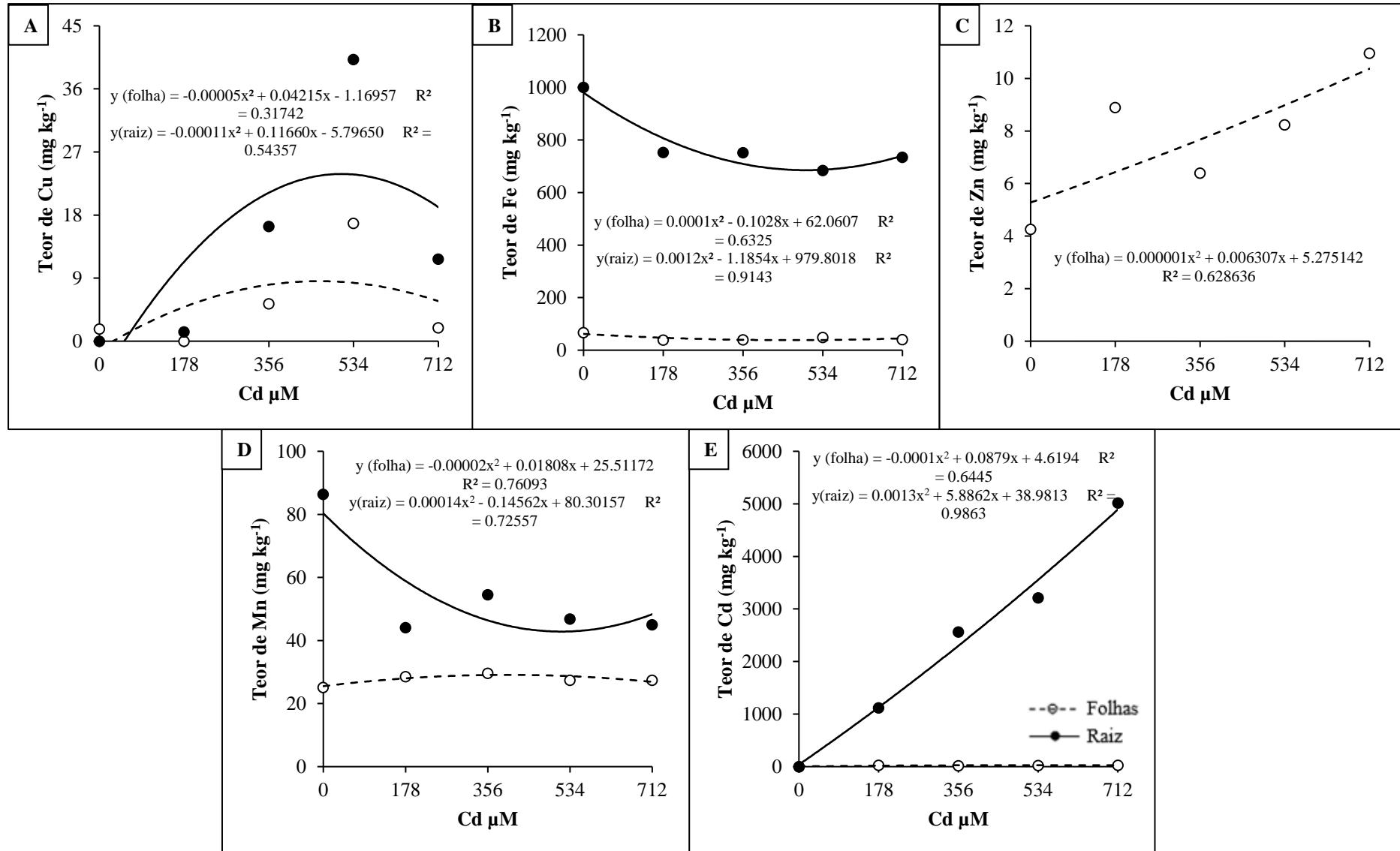


Figura 7 - Teores de Cu (A), Fe (B), Zn (C), Mn (D) e Cd (E) em plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de cádmio.



3.3.2. Correlação entre os elementos nutricionais em resposta às doses de Cádmio

A tabela 2 apresenta as correlações estimadas entre os macronutrientes e micronutrientes em folhas (Tabela 2A) e raízes (Tabela 2B).

Na interpretação de correlações, três aspectos devem ser considerados: a magnitude, a direção e a significância. Estimativas de coeficiente de correlação positivas indicam a tendência de uma variável aumentar quando o a outra aumenta, e correlações negativas indicam tendência de uma variável aumentar enquanto a outra diminui (NOGUEIRA et al. 2012).

O coeficiente de correlação de Pearson (1892) classifica as correlações em: Bem Fracas (+/- 0,00 á 0,19), Fracas (+/- 0,20 á 0,39), Moderadas (+/- 0,40 á 0,69), Fortes (+/- 0,70 á 0,89) e Muito Fortes (+/- 0,90 á 1,00).

Nos coeficientes dos elementos nas folhas, dentre as correlações observadas (em negrito e com *), não houveram correlações Bem Fracas e Muito Fortes. As correlações classificadas como Fracas foram: Fe e Mg (0,36), Cu e Cd-S (0,36), Mn e K (-0,37), Mn e Mg (0,39), Mn e Fe (-0,36), Zn e Ca (0,36). As correlações classificadas como Moderadas foram: entre K e N (0,41), Mg e Cd-S (-0,43), Fe e Cd-S (-0,51), Fe e Ca (0,49), Cu e Mg (-0,48), Zn e Cd (0,60), Zn e Mn (0,63), Cd e Cd-S (0,60), Cd e Fe (-0,61), Cd e Mn (0,53). Apenas uma correlação foi classificada como Forte: Cd e Zn (0,82).

Nos coeficientes dos elementos nas raízes, não foram observadas correlações Bem Fracas. As correlações classificadas como Fracas foram: Fe e N (-0,37), Mn e Cu (-0,38), Cd e Mg (0,39). As correlações classificadas como Moderadas foram: N e Cd-S (0,43), K e P (0,42), Ca e N (-0,47), Mg e Cd-S (0,47), Fe e Cd-S (-0,60), Fe e N (-0,37), Cu e Cd-S (0,42), Cu e Mg (0,52), Cu e Fe (-0,63), Mn e Cd-S (-0,69), Mn e Cu (-0,38), Cd e N (0,40), Cd e Mg (0,39), Cd e Fe (-0,51), Cd e Mn (-0,66). As correlações classificadas como Fortes foram: Ca e Cd-S (-0,71), Fe e Ca (0,73), Mn e Ca (0,87), Mn e Fe (0,70), Cd e Ca (-0,71), Cd e Mn (-0,66). Apenas uma correlação foi classificada como Muito Forte: Cd e Cd-S (0,99).

De modo geral, a matriz com os coeficientes de correlação de Pearson (Tabela 2) reforça o comportamento observado mais detalhadamente nas figuras 6 e 7, simplificando a ligação que há entre os elementos que manifestaram significância, ou seja, as correlações.

Pode-se observar correlação significativa nos teores dos elementos nas folhas em quase todos os micronutrientes, exceto o Zn, e em dois macronutrientes: K e Mg (Tabela 2A). Com relação aos teores dos elementos nas raízes, apenas dois elementos não apresentam correlação significativa; P e Zn. Ou seja, enquanto que nas folhas observa-se correlação em 7 elementos, na raiz observa-se em 8.

Segundo Srivastava & Gupta (1996), esta forte correlação entre Cd e Zn nas folhas (0,82) é importante, uma vez que muitos fertilizantes que apresentam em sua formulação elevadas concentrações de Zn têm altos teores de Cd. Acredita-se que a similaridade química entre Zn e Cd seja a principal causa de toxicidade de Cd em plantas superiores devido a suas interações um com o outro (SAWAR et al. 2010). No entanto, McKenna et al. (1993) identificaram um forte efeito antagônico de Zn na acumulação de Cd em vegetais folhosos em baixas concentrações de Cd.

A correlação moderada entre Zn e Mn (0,63); Cd e Mn (0,53) nas folhas evidenciam o que foi observado nos resultados na Figura 7, em que a disponibilidade de Mn para as plantas é maior nas folhas do que nas raízes, observando então correlação maior nestes elementos em folhas.

O efeito antagônico entre Cd e Ca nas raízes (-0,71) já foi comprovado em vários estudos e segundo Gárate et al. (1992) seria devido à competição entre esses elementos pelos mesmos sítios de absorção da membrana plasmática existente nas raízes devido à similaridade existente entre os raios iônicos do Ca^{2+} (0,99 Å) e do Cd^{2+} (0,97 Å). De acordo com esses autores, os mecanismos utilizados pela planta para reduzir a toxicidade do cádmio seriam a competição existente entre o Cd e o Ca pelo transporte através das membranas plasmáticas e a proteção, pelo Ca, dos espaços livres no interior da célula.

A correlação forte entre Mn e Ca nas raízes (0,87) corrobora com a Figura 6, em que o Ca obteve teores muito maiores que o Mn em todas as doses, porém mesmo comportamento de queda nas três últimas doses.

Tabela 2 – Matriz com os coeficientes de correlação de Pearson entre os elementos analisados nas folhas (A) e nas raízes (B) de plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de Cádmio (Cd).

Coeficiente de correlação de Pearson dos elementos nas folhas (A)

Fator	Cd - S	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	Cd - F
Cd - S	1.00										
N	0.20	1.00									
P	-0.04	0.18	1.00								
K	0.02	0.41*	0.14	1.00							
Ca	-0.21	0.21	0.17	0.05	1.00						
Mg	-0.53*	-0.24	-0.10	-0.29	0.33	1.00					
Fe	-0.51*	-0.09	-0.17	0.17	0.49*	0.36*	1.00				
Cu	0.36*	0.16	-0.14	0.04	-0.27	-0.48*	-0.10	1.00			
Mn	0.18	-0.14	0.08	-0.37*	0.12	0.39*	-0.36*	-0.17	1.00		
Zn	0.60*	0.12	0.19	-0.10	0.36*	-0.10	-0.31	-0.17	0.63*	1.00	
Cd	0.60*	0.23	0.22	0.02	0.16	-0.31	-0.61*	-0.03	0.53*	0.82*	1.00

Coeficiente de correlação de Pearson dos elementos nas raízes (B)

Fator	Cd - S	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Mn	Zn	Cd - R
Cd - S	1.00										
N	0.43*	1.00									
P	-0.20	-0.10	1.00								
K	-0.10	-0.22	0.42*	1.00							
Ca	-0.71*	-0.47*	0.03	0.14	1.00						
Mg	0.47*	0.26	-0.33	-0.06	0.02	1.00					
Fe	-0.60*	-0.37*	0.05	0.07	0.73*	-0.23	1.00				
Cu	0.42*	0.10	-0.15	0.06	-0.22	0.52*	-0.63*	1.00			
Mn	-0.69*	-0.32	-0.02	-0.01	0.87*	-0.05	0.70*	-0.38*	1.00		
Zn	0.08	0.16	0.04	-0.17	-0.30	-0.16	0.24	-0.26	-0.27	1.00	
Cd	0.99*	0.40*	-0.19	-0.10	-0.71*	0.39*	-0.51*	0.31	-0.66*	0.17	1.00

* A correlação é significativa à 5% de probabilidade de erro, respectivamente, pelo teste t. Cd-S: Concentração de Cd na solução nutritiva. Cd-F: Concentração de Cd nas folhas. Cd-R: Concentração de Cd nas raízes.

3.4. CONCLUSÃO

O Cd, interferiu nas concentrações dos elementos nutricionais nas folhas e nas raízes de paricá, alterando a translocação dos nutrientes.

A alteração nos parâmetros nutricionais foi manifestada em 14 dias após o início da aplicação das concentrações de Cádmiio.

O paricá mostrou-se uma espécie com potencial para fins de fitoremediação.

REFERÊNCIAS

- ARDUINI, I.; GODBOLD, D.L. e ONNIS, A. Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. **Physiologia Plantarum**, vol. 97, n. 1, p. 111-117, 1996.
- BASZYNSKI, T *et al.* Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. **Physiol Plant**, 48:365–370, 1980.
- CHEN, F *et al.* Identification of barley genotypes with low grain Cd accumulation and its interaction with four microelements. **Chemosphere**, 67:2082–2088, 2007.
- CUNHA, A.O *et al.* Efeitos de substratos e das dimensões dos recipientes na qualidade das mudas de *Tabebuia impetiginosa* (Mart. Ex D.C.) Standl. **Revista Árvore**, v. 29, n. 4, p. 507-516, 2005.
- DI BACCIO, D *et al.* Early responses to cadmium of two poplar clones that differ in stress tolerance. **Journal of Plant Physiology**, v. 171, n. 18, p. 1693–1705, 15 nov. 2014.
- DOMINGUEZ, M.T.; MADRID, F.; MARANON, T. & MURILLO, J.M. Cadmium availability in soil and retention in oak roots: Potential for phytostabilization. **Chemosphere** 76: 480-486, 2009.
- FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras, Brasil: Centro de Editoração/FAEPE, 2005.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFPA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- GALLEGO, S.M *et al.* Unraveling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 83, p. 33–46, 2012.
- GÁRATE, A.; RAMOS, I.; LUCENA, J.J. Efecto del cadmio sobre la absorcion y distribución de manganêso en distintas variedades de *Lactuca*. **Suelo Planta**, v.2, p.581-591, 1992.
- JIANG, X.J *et al.* Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by Indian Mustard. **Environmental Geochemistry and Health**, vol. 26, n. 2-3, p. 319-324. 2004.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. **Boca Raton**, 315 p. 2001.
- KHAN, N.A *et al.* Activities of Antioxidative Enzymes, Sulphur Assimilation, Photosynthetic Activity and Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars Differing in Yield Potential Under Cadmium Stress. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 193, n. 6, p. 435–444, 1 dez. 2007.
- KOVÁČIK, J *et al.* Comparison of cadmium and copper effect on phenolic metabolism, mineral nutrients and stress-related parameters in *Matricaria chamomilla* plants. **Plant and Soil**, v. 320, n. 1–2, p. 231–242, 24 jul. 2009.

KUMAR, G.P *et al.* Growth of *Jatropha curcus* on heavy metal contaminated soil amended with industrial wastes and *Azotobacter* – a greenhouse study. **Bioresour Technol**, 99 (6), pp. 2078-2082, 2008.

MARMIROLI, M.; ANTONIOLI, G.; MAESTRI, E. & MARMIROLI, N. Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. **Environmental Pollution** 134: 217-227, 2005.

MARQUES, L.C.T.; YARED, J.A.G.; SIVIERO, M.A. A evolução do conhecimento sobre Paricá para o reflorestamento no estado do Pará. **Embrapa Pará**, 2006.

MCKENNA, I.M.; CHANEY, R.L.; WILLIAMS, F.M. The effects of cadmium and zinc interactions on the accumulation and tissue distribution of zinc and cadmium in lettuce and spinach. **Environ Pollut**, 79:113–120, 1993.

MIYAZAWA, M *et al.* Análise química de tecido vegetal. In: Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes / editor técnico, Fábio Cesar da Silva. – 2. ed. **rev.ampl.** – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2009.

MUDGAL, V.; MADAAN, N.; MUDGAL, A. Heavy metals in plants: phytoremediation: Plants used to remediate heavy metal pollution. **Agriculture and Biology Journal of North America**, 2010.

NOGUEIRA, A.P.O *et al.* Análise de trilha e correlações entre caracteres em soja cultivada em duas épocas de semeadura. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 28, n. 6, p. 877-888, 2012.

PEARSON, K. The grammar of science. London, J. M. **Dent and Company**, 1892.

RAMACHANDRAN, V.; D'SOUZA, T.J. Plant uptake of cadmium, zinc and manganese from four contrasting soils amended with Cd-enriched sewage sludge. **J Environ Sci Health Toxic Hazard Subst Environ Eng**, 37:1337–1346, 2002.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.1, n.3, p.231-233, 1975. (Nota técnica).

SARWAR, N *et al.* Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. **J Sci Food Agric**. 90: 925–937, 2010.

SCHNOOR, J.L *et al.* Phytoremediation: an emerging technology for contaminated soils. **Environ Sci Technol**, 29 (7), pp. 318-323, 1995.

SOUZA, E *et al.* Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 17, n. 2, 25 fev, 2013.

SOUZA, L.A.; LÓPEZ ANDRADE, S.A.; RIBEIRO SOUZA, S.C. & SCHIAVINATO, M.A. Evaluation of mycorrhizal influence on the development and phytoremediation potential of *Canavalia gladiata* in Pb-contaminated soils. **International Journal of Phytoremediation** 15: 465-476, 2013.

SRIVASTAVA, P.C.; GUPTA, U.C. Trace elements in crop production. New Delhi: **Science Publishers**, 356p, 1996.

TEDESCO, M.J *et al.* Análises de solo, plantas e outros materiais. **Boletim técnico N° 5**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1995.

TOLENTINO, T *et al.* Especificação do cádmio em *Brachiaria brizanthae* biodisponibilidade dos macro e micronutrientes. **Revista de Ciências Agrárias**, 37(3): 292-298, 2014.

WANG, W.C. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, vol. 6, n. 5, p. 409-414, 1987.

YAN, X.L *et al.* Arsenic transformation and volatilization during incineration of the hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Environ Sci Technol**, 42 (5), pp. 1479-1484, 2008.

ZHANG, X.F.; XIA, H.P.; ZHUANG, L.I.; GAO, B. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technol**, 101 (6), pp. 2063-2066, 2010.

4. SISTEMA ANTIOXIDANTE EM PLANTAS JOVENS DE PARICÁ (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) SUBMETIDAS À DIFERENTES DOSES DE CÁDMIO.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o sistema antioxidante de plantas jovens de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke quando submetidas em diferentes concentrações de cádmio. Aos 60 dias após o semeio foi iniciada a aplicação das concentrações de cádmio na forma de cloreto de cádmio hidratado ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos (0, 178, 356, 534 e 712 μM de CdCl_2). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F ($p < 0,05$) utilizando o software Statistica, e as diferenças entre os tratamentos analisadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), sendo ajustadas por equações de regressão polinomial $P < 0,01$ ou $0,05$ usando-se o programa Sisvar. As enzimas (G-POD, APX, SOD e CAT), proporcionaram uma diminuição à medida que as doses eram aumentadas. As alterações dos parâmetros de enzimas antioxidantes, conseqüentemente levaram a mudanças estruturais dessas plantas, evidenciando baixa atividade para a reversão do estresse nas folhas e maior atividade nas raízes. Portanto, o cádmio acumulou-se principalmente nas raízes, porém houve translocação para parte aérea. Diante disso, pode-se caracteriza-lá como uma espécie para fins de fitorremediação.

Palavras chave: Metal pesado, enzimas antioxidativas, concentrações

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the antioxidant system of young plants of *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke when submitted to different cadmium concentrations. At 60 days after sowing, the application of cadmium concentrations as hydrated cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) was started. The experimental design was completely randomized with five treatments (0, 178, 356, 534 and 712 μM CdCl_2). Data were subjected to analysis of variance by the F test ($p < 0.05$) using the Statistica software, and the differences between treatments analyzed by the Tukey test ($p < 0.05$) were adjusted by polynomial regression equations $P < 0.01$ or 0.05 using the Sisvar program. Enzymes (G-POD, APX, SOD and CAT) provided a decrease as doses were increased. The alterations of the antioxidant enzyme parameters, consequently led to structural changes of these plants, evidencing low activity for leaf stress reversal and higher root activity. Therefore, cadmium accumulated mainly in the roots, but there was translocation to the shoot. Given this, it can be characterized as a species for phytoremediation purposes.

Keywords: Heavy metal, antioxidative enzymes, concentrations

4.1. INTRODUÇÃO

A geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) é um inevitável aspecto da vida em condições aeróbicas. EROs são continuamente produzidos como produtos secundários de certas vias metabólicas, e também por alguns sistemas específicos sob controle celular, e ao mesmo tempo são degradadas através de vários mecanismos específicos e inespecíficos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Sabe-se também que as plantas resistem ao estresse induzido com a produção de ERO, aumentando as quantidades de componentes em seu sistema defensivo (FOYER et al. 1994; ZABALZA et al. 2008). Segundo Sies (1991), as espécies reativas de oxigênio (ERO) são: $O_2^{\bullet-}$ (Radical superóxido), HO_2^{\bullet} (Radical perhidroxil), H_2O_2 (Peróxido de hidrogênio), OH^{\bullet} (Radical hidroxila), RO^{\bullet} (Radical alcoxil), ROO^{\bullet} (Radical peroxil), $ROOH$ (Hidroperóxido orgânico), e 1O_2 (Oxigênio singleto).

Com relação á produção de ERO, o Cd não participa de reações do tipo Fenton (STOCH e BAGCHI, 1995), mas pode indiretamente favorecer a produção de diferentes ROS, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila (OH^{\bullet}), por mecanismos desconhecidos, dando origem a um surto oxidativo (OLMOS et al., 2003; ROMERO-PUERTAS et al., 2004; GARNIER et al., 2006).

Dentre as enzimas antioxidantes, CAT e SOD são as mais eficientes pois sua ação combinada neutraliza o potencialmente perigoso $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 em H_2O e molécula de oxigênio (O_2), portanto convertendo o dano celular (SCANDALIOS, 1997). Diversos fatores estressantes como exposição à radiação UV, exposição ao ozônio, estresse hídrico, senescência e metais pesados indicam o aumento da atividade enzimática de peroxidases (FOYER et al., 1994; GRATÃO et al., 2008; CRUZ et al., 2013).

O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO pode ser perturbado por vários fatores de estresse biótico e abiótico como salinidade, seca, altas temperaturas, metais pesados e entre outros. Esses distúrbios podem aumentar em níveis intracelulares as ERO, o que pode causar danos significativos às estruturas celulares (GILL & TUTEJA, 2010). Portanto, é claro porque a investigação do estresse oxidativo tornou-se cada vez mais popular em diferentes aspectos aplicados, como medicina, toxicologia e ciência ambiental. O desafio da sobrevivência celular em meio ao estresse oxidativo depende do estado fisiológico, intensidade e natureza do estresse. A possibilidade de aumentar o potencial de proteção é uma das questões mais críticas (LUSHCHAK, 2011).

Modificações em características fisiológicas e anatômicas têm sido observadas em muitos estudos de fitorremediação, como consequência da capacidade da espécie vegetal em se adaptar ao ambiente estressante (BARCELÓ; POSCHENREIDER, 1990; CHUGH; SAWHNEY, 1999; MONNI et al., 2001). As espécies reativas de oxigênio (ERO) produzidas pelas plantas quando expostas à metais pesados como por exemplo, o Cd, causam danos de membrana. Entretanto, espécies vegetais são capazes de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como forma de reduzir os danos causados pelas ERO, aumentando assim a tolerância ao Cd em seus tecidos (SINGH et al., 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito dos tratamentos com Cd na eficiência do sistema antioxidante, determinando a atividade das enzimas antioxidativas.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Para a formação das mudas de paricá foram utilizadas sementes fornecidas pela AIMEX (Associação das Indústrias Exportadoras de Madeira do Estado do Pará).

4.2.2. Condições de cultivo

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente à UFRA (Universidade Federal Rural da Amazônia) em Belém, estado do Pará, Brasil (01° 27' 31" S, 48° 26' 04.5") no período de Dezembro de 2017 à junho de 2018. . A classificação do clima, segundo Köppen e Geiger, é Af com temperatura média de 26,8 °C e umidade relativa do ar de 95%.

As sementes foram previamente escarificadas com lixa 80mm e embebidas em água destilada por 24h para a quebra da dormência. Essas sementes foram semeadas em vasos do tipo Leonard com capacidade de 4,6-L adaptados com garrafas pet, contendo areia lavada e esterilizada. Em cada vaso envolvido com papel alumínio foi colocado na superfície superior borracha de Etil Vinil Acetato (E.V.A) em forma de círculos para evitar a proliferação de algas.

4.2.3. Exposição das plantas às dosagens de Cádmio

Aos 15 dias após o semeio, a fim de completar seu crescimento antes do início da aplicação dos tratamentos, as mudas passaram a receber solução nutritiva de Sarruge (1975) (Tabela 1), renovada semanalmente. O pH foi mantido entre 5,8 a 6,0

adicionando hidróxido de sódio (NaOH) ou ácido clorídrico (HCl) 0,1 mol L⁻¹. Transcorridos 60 dias após o semeio ocorreu a primeira aplicação das dosagens (Dia 0), nas concentrações de 178; 356; 534 e 712 µM de cloreto de Cd hidratado (CdCl₂.H₂O) em solução nutritiva. Após 7 dias ocorreu a segunda aplicação das dosagens (Dia 7), assim como a terceira (Dia 14).

4.2.4. Coleta e armazenamento do material

Após 15 dias da aplicação do Cd (75 DAS) as plantas apresentaram sinais de toxidez (clorose, epinastia, senescência foliar), e portanto foram coletadas para a realização de análises enzimáticas, sendo separadas em folha, caule e raiz, e armazenados em envelopes de alumínio e sacos plásticos e então levados ao freezer para armazenamento. Posteriormente as amostras de folhas e raízes foram liofilizadas em liofilizador do modelo L108 Liotop por aproximadamente 20 horas. O material liofilizado foi levado para o Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS), na UFRA em Belém-PA para análise da concentração de enzimas antioxidantes.

4.2.5. Sistema Antioxidante

As análises de enzimas antioxidantes foram realizadas no Laboratório de Estudos da Biodiversidade em Plantas Superiores (EBPS) da UFRA. As variáveis analisadas foram: dismutase do superóxido (SOD, EC 1.15.1.1) (Gianopolitis e Ries 1977); peroxidase do ascorbato (APX, EC 1.11.1.11) (Nakano e Asada 1981); peroxidase do guaiacol (G-POD, EC 1.11.1.9) (Kar e Mishra 1976) e catalase (CAT, EC 1.11.1.6) (Havir e McHale 1987).

4.2.5.1. Extração

O extrato para a determinação da atividade das enzimas SOD, APX, G-POD e CAT foi obtido a partir da homogeneização em almofariz, a 4°C, de 0,1g do pó liofilizado de folha e raiz com 5 mL de solução-tampão fosfato de potássio (a 4 °C) a 0,1 mM, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM, seguido de homogeneização por 4 min. As adições do tampão fosfato foram feitas de forma fragmentada, sendo 50% do volume total desta solução (2,5 mL) utilizada na homogeneização durante 2 min, após isto, imediatamente adicionaram-se os outros 50%, sendo a mistura homogeneizada em tempo equivalente ao anterior. O homogeneizado foi filtrado em tecido de nylon e transferido para tubos de ensaio, sendo mantidos a 4°C por duas horas, realizando-se agitações ocasionais. O

homogeneizado filtrado foi centrifugado à 12.000 x g, durante 15 min, a 4°C. O sobrenadante (o extrato bruto) foi armazenado em freezer a -80°C até ser utilizado nos ensaios de atividade enzimática.

4.2.5.2. Dismutase do superóxido (SOD EC 1.15.1.1)

O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 7,8, EDTA a 0,1 mM, metionina a 19,5 mM, nitrocloreto de tetrazólio azul (NBT) a 75 µM, riboflavina a 2 µM e 50 µL do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A reação foi conduzida em uma câmara e iluminada com duas lâmpadas fluorescentes de 20 W, por 15 min. A atividade da SOD foi estimada através do aumento da absorbância a 560 nm, devido à produção de formazana azul, resultante da fotorredução do NBT, avaliando-se a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT). Os resultados foram expressos em UA g⁻¹MS, sendo UA (unidade de atividade enzimática) definida como a quantidade de enzima necessária para causar 50% de inibição da fotorredução do NBT, no período de 15 min.

4.2.5.3. Peroxidase do ascorbato (APX EC 1.11.1.11)

O meio reacional foi composto por uma mistura contendo tampão fosfato de potássio a 50 mM, pH 6,0, EDTA a 0,05 mM, ascorbato a 0,015 M, H₂O₂ a 0,03 M e 300µL do extrato enzimático convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade da APX foi estimada pela oxidação do ascorbato, mensurada pelo decréscimo de absorbância a 290 nm. Os resultados foram calculados usando o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($\epsilon = 0,0028 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressos em µmol de H₂O₂ min⁻¹. g⁻¹de MS.

4.2.5.4. Peroxidase do guaiacol (G-POD EC 1.11.1.9)

A mistura de reação foi composta por 50µL do extrato convenientemente diluído, 950µL de tampão fosfato de potássio a 0,1M, pH 7,0, contendo EDTA a 0,1 mM, 500µL de guaiacol a 20 mM e 500µL de H₂O₂ a 60 mM. A atividade da GPOD foi acompanhada pela formação do tetraguaiacol, monitorado pelo aumento da absorbância a 470 nm. Os resultados foram expressos em µmol de H₂O₂ min⁻¹.g⁻¹de MS, usando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do tetraguaiacol ($\epsilon = 0,266 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.2.5.5. Catalase (CAT EC 1.11.1.6)

O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio a 86 mM, pH 7,0, EDTA a 86 μ M, H₂O₂ a 20mM e 150 μ L do extrato bruto convenientemente diluído, em um volume final de 1,5 mL. A atividade enzimática foi determinada pelo decréscimo da absorvância a 240 nm, resultado da decomposição do H₂O₂, durante 1 min. Os resultados foram calculados usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e expressos em $\mu\text{mol de H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de MS.

4.2.6. Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com cinco tratamentos (0, 178, 356, 534 e 712 μ M de CdCl₂) e 7 repetições, totalizando 35 unidades experimentais (uma planta/vaso). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando-se análise de variância com probabilidade de erro de 5% ($p \leq 0,05$), e foram ajustadas equações de regressão através do programa estatístico SISVAR versão 5.6 (FERREIRA, 2011).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De forma geral, o aumento da concentração de Cd causou diminuição na atividade das enzimas antioxidantes nas raízes, enquanto nas folhas houve aumento na atividade das enzimas APX e SOD, e ligeiro crescimento da atividade de GPOD e CAT nas doses de 178, 356 e 534 μ M. Os resultados mostraram que a G-POD foi a principal enzima atuante na eliminação do peróxido de hidrogênio, tanto em tecido foliar como em radicular (Figura 8A). A atividade das enzimas aumentou nas folhas e raízes (G-POD>APX>CAT). Nadgorska-Socha et al. (2013) também observaram aumento da atividade de G-POD em folhas de plantas submetidas a altas doses de Cd, sugerindo que o padrão de resposta nesse órgão pode ser comum.

Por outro lado, neste estudo, a resposta da G-POD em raízes ocorreu de forma contrária. Ou seja, a diminuição da atividade da G-POD na raiz, indica que o Cd pode influenciar o padrão de resposta de uma mesma enzima em tecidos diferentes. Outro fator que poderia explicar o declínio da atividade de G-POD em raízes seria a alta atividade de APX observada nesse órgão. Similarmente Wang et al. (2008), verificaram que a diminuição da atividade de CAT foi acompanhada do aumento da atividade de peroxidases genéricas (Figura 8C).

A SOD é a primeira enzima da via antioxidante e pode apresentar respostas diferentes de acordo com o órgão e espécie estudada, além do tipo de metal causador do estresse (ANDRADE et al. 2010). Nas folhas foi observado que com o aumento das dosagens de Cd, ocorreu maior atividade da SOD em todos os tratamentos. Variando de 7,89 UA g⁻¹ MS nas plantas controle para 12,97 UA g⁻¹ MS nas plantas com 712 µM de Cd. Nas raízes a SOD diminuiu apenas no último tratamento (712 µM de Cd), permanecendo durante todo período de avaliação com atividade próxima à observada nas plantas-controle (Figura 8D).

A atividade da SOD (Figura 8D) mostra que de fato essa enzima apresenta resposta diferente entre folha e raiz, ocorrendo uma inversão de valores nos dois últimos tratamentos. A SOD é a única enzima cuja atividade pode afetar a concentração celular de O₂⁻ e H₂O₂, fazendo parte do primeiro ajuste de tolerância das plantas ao estresse oxidativo. Porém o H₂O₂, produto da ação dessa enzima, é também uma ERO e seu acúmulo é tão prejudicial quanto ao do superóxido (GRATÃO et al., 2005). Uma vez que a ação da SOD resulta na formação de H₂O₂, ela está também intimamente ligada com a atividade da catalase e peroxidases, as quais eliminam o H₂O₂, mantendo, portanto, a interação com essas e outras enzimas antioxidantes para garantir um balanço altamente otimizado, de forma a reduzir o risco de danos oxidativos (GOMES-JUNIOR, 2006).

Yu et al. (2013) reportaram que o aumento significativo da atividade de diversas enzimas do sistema antioxidante, está ligado com o excesso de peróxido de hidrogênio, induzido pelo Cd, que é combatido por várias enzimas dessa via.

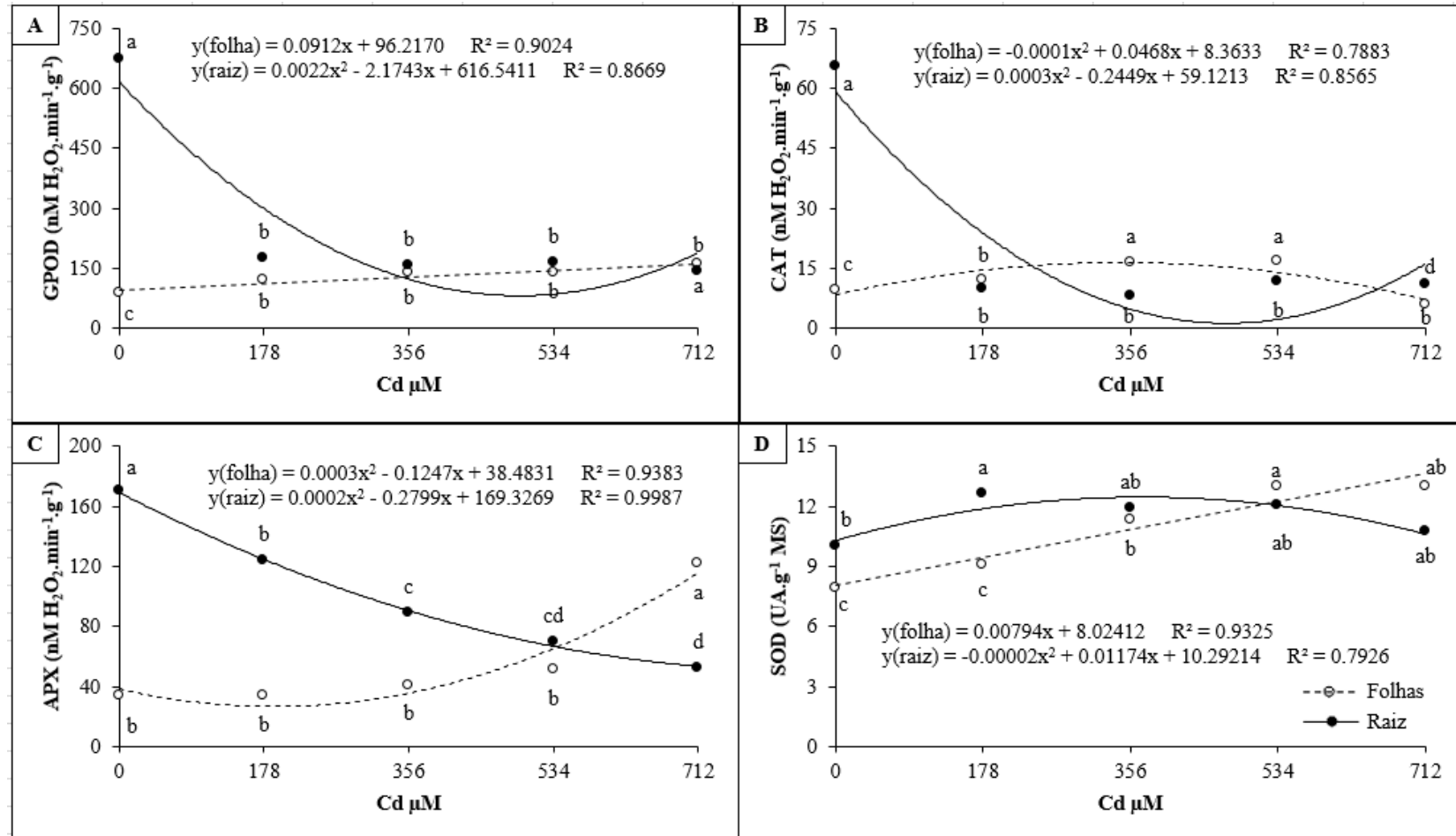
A principal enzima responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio é a APX, porém apresentou menor atividade em raiz (Figura 8C). E de acordo com os resultados deste trabalho, as peroxidases (GPOD e APX) atuam fortemente na eliminação do peróxido de hidrogênio, além de apresentar padrão de resposta diferencial entre tecidos. Essas diferenças de padrão de resposta podem ser explicadas pela quantidade de isoformas que cada enzima apresenta e também pela disponibilidade de substratos (MITTLER & POULOS, 2007).

Em folhas, foi observado que a CAT apresentou maior atividade na segunda maior dosagem (534 µM de Cd), enquanto no tratamento de maior dose de Cd (712 µM) a atividade dessa enzima diminuiu (Figura 8C). A variação entre os dois tratamentos foi

de $16,63 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para a dose de $534 \mu\text{M}$ e $5,87 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para a dose de $712 \mu\text{M}$. A atividade da CAT nas raízes, apresentou maior valor no tratamento controle ($65,42 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) e por volta de 5 a $15 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ nas plantas aplicadas com doses de cádmio.

O efeito do estresse oxidativo induzido por metais sobre a atividade da CAT possui uma resposta que pode ser bastante variável, pois o padrão de resposta é, também, dependente do organismo. Segundo Caverzan et al. (2012), a eliminação do peróxido de hidrogênio pode ocorrer também pela atividade das enzimas GPOD e APX, sendo muitas vezes mais eficientes que a CAT, fato observado neste estudo, em que as peroxidases apresentaram maiores concentrações que a CAT tanto em folhas como em raízes.

Figura 8 - Atividade da peroxidase do guaiacol (G-POD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e dismutase do superóxido (SOD) em folhas e raízes de plantas jovens de paricá (*Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke) cultivadas em solução nutritiva, em função de concentrações crescentes de Cádmio. As barras verticais representam o erro padrão da média.



4.4. CONCLUSÃO

O Cd₂ induziu a expressão diferencial de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, APX e GPOD) na raiz e parte aérea de *Schizolobium amazonicum*.

As peroxidase (GPOD e APX) parecem ter sido os mais importantes componentes do sistema de defesa antioxidante da planta.

A atividade das enzimas antioxidativas não foi eficiente para mitigar o estresse provocado pelas doses de cádmio, mostrando-se mais sensível nas doses mais altas de cádmio, em que a atividade das enzimas diminuiu principalmente nas raízes.

REFERÊNCIAS

- ALI, B *et al.* A role for brassinosteroids in the amelioration of aluminium stress through antioxidant system in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Environ Exp Bot** 62:153–159. doi: 10.1016/j.envexpbot.2007.07.014. 2008
- ANDRADE, S.A.L *et al.* Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. **Environmental and Experimental Botany** 68: 198-207. 2010
- CAVERZAN, A *et al.* Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and Molecular Biology** 35: 1011-1019. 2012
- CRUZ, F.J.R *et al.* Exogenous glycine betaine modulates ascorbate peroxidase and catalase activities and prevent lipid peroxidation in mild water-stressed *Carapa guianensis* plants. **Photosynthetica** 51: 102-108. 2013.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia (UFLA)**, v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.
- FOYER, C.H.; HARBINSON, J. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In: Foyer CH, Mullineaux PM (eds) Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants. **CRC**, Boca Raton, pp 1–42. 1994.
- FOYER, C.H.; LELANDAIS, M. & KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum** 92: 696-717. 1994.
- GARNIER, L *et al.* Cd affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. **Plant Cell Environ.** 29: 1956–1969, 2006.
- GIANOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GILL, S. S., & TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 2010. 48(12), 909–930. doi:10.1016/j.plaphy.2010.08.016
- GOMES-JUNIOR, R.A *et al.* Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, 65:1330-1337. 2006
- GRATÃO, P.L.; POLLE, A.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, 32:481-494. 2005
- GRATÃO, P.L *et al.* Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. bright yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. **Plant Cell Tissue and Organ Culture** 94: 73-83. 2008.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Clarendon Press**, Oxford. 1989.

- HAVIR, E.; McHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalases in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450-455, 1987.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**.57: 315-319. 1976.
- KARPINSKI, S.; MUHLENBOCK, P. Genetic, molecular and physiological mechanisms controlling cell death, defenses, and antioxidant network in response to abiotic and biotic stresses in plants. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. 146:60–66. 2007.
- LUSHCHAK, V.I. Adaptative response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comparative biochemistry and physiology, part C**. 2011.
- MITTLER, R. & POULOS, T.L. Ascorbate Peroxidase. In: Smirnoff N (ed) Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants. **Blackwell Publishing Ltd**, pp 87-100. 2007.
- NADGORSKA-SOCHA, A *et al.* Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in Vicia faba plants grown on monometallic contaminated soil. **Environmental Science and Pollution Research** 20: 1124-1134. 2013.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, v. 22, p. 867-880, 1981.
- OLMOS, E.; MARTINEZ-SOLANO, J.R.; PIQUERAS, A.; HELLIN, E. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). **J Exp Bot**, 54: 291–301, 2003.
- ROMERO-PUERTAS, M.C *et al.* Cd-induced subcellular accumulation of O₂² and H₂O₂ in pea leaves. **Plant Cell Environ**, 27: 1122–1134, 2004.
- SANG, H.L *et al.* Simultaneous overexpression of both CuZn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in transgenic tall fescue plants confers increased tolerance to a wide range of abiotic stresses. **J Plant Physiol**, 64:1626–1638. 2007.
- SCANDALIOS, J.G. Molecular genetics of SOD in plants. In: Scandalios JG (ed) Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defense. Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Cold Spring Harbor**, pp 527–568. 1997.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am. J. Med.**, v.91 (suppl 3C): p.31S38S. 1991.
- SMIRNOFF, N. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Smirnoff V (ed) Environment and plant metabolism: flexibility and acclimation. **BIOS Scientific Publishers**, Oxford, pp 217–243. 1995
- STOCH, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanism in the toxicity of metal ions. **Free Radic Biol Med**, 18: 321–336, 1995.

WANG, Z.; ZHANG, Y.; HUANG, Z. & HUANG, L. Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. **Plant and Soil**, 310: 137-149. 2008.

ZABALZA, A *et al.* The application of ascorbate or its immediate precursor, galactono-1, 4-lactone, does not affect the response of nitrogen-fixing pea nodules to water stress. **J Plant Physiol**, 165:805–812. doi:10.1016/j.jplph.2007.08.005, 2008.