

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Enxofre na atenuação dos efeitos tóxicos do cádmio no capim-tanzânia**

**Flávio Henrique Silveira Rabêlo**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em  
Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba  
2014**

Flávio Henrique Silveira Rabêlo  
Engenheiro Agrônomo

**Enxofre na atenuação dos efeitos tóxicos do cádmio no capim-tanzânia**

Orientador:  
Prof. Dr. **FRANCISCO ANTONIO MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em  
Ciências. Área de concentração: Solos e Nutrição de Plantas

**Piracicaba  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Rabêlo, Flávio Henrique Silveira  
Enxofre na atenuação dos efeitos tóxicos do cádmio no capim-tanzânia / Flávio Henrique  
Silveira Rabêlo. - - Piracicaba, 2014.  
103 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.  
Bibliografia.

1. Antioxidantes enzimáticos 2. Área foliar 3. Estresse oxidativo 4. Glutathione  
5. Micronutrientes catiônico 6. *Panicum maximum* 7. Perfilhamento 8. Peroxidação  
lipídica 9. Valor SPAD I. Título

CDD 633.2  
R114e

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"**

Aos meus pais Carlos Henrique Rabelo e Maria Ambrosina da Silveira Rabelo,  
aos meus irmãos Ana Carolina Silveira Rabelo e Carlos Henrique Silveira Rabelo,  
às minhas tias Áurea Maria Silveira, Guiomar Augusta Silveira da Paixão e Maria  
Auxiliadora da Silveira e Pereira Neves e  
à minha namorada Lucélia Borgo,  
pelo amor, carinho e incentivo

**OFEREÇO E DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho, direcionar meus passos e confortar-me em todos os momentos.

A Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e Departamento de Ciência do Solo pela oportunidade concedida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão das bolsas de estudos ao longo do mestrado.

Ao Professor Dr. Francisco Antonio Monteiro, pela orientação, amizade, ensinamentos, compreensão e paciência dispensados e ao Professor Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pelas contribuições.

Às funcionárias do Laboratório de Tecidos Vegetais Edinéia Cristina Scervino Mondoni, Lúcia Helena Spessotto Pavan Forti, Lurdes Aparecida Dário de Gonzalez e Nivanda Maria de Moura Ruiz e do Laboratório de Genética Bioquímica de Plantas Dr<sup>a</sup>. Salete Aparecida Gaziola, pela ajuda dispensada.

Aos estagiários, colegas e ex-colegas de pós-graduação Berenice Kussomoto de Alcântara, Elisângela Dupas, Giselle de Carvalho, Gustavo Pandolfé, Lucas Anjos de Souza, Lucas Sartor, Márcio Mahmoud Megda, Michelly Silva, Mônica Regina Franco, Raul Alfonso Filho, Roberta Corrêa Nogueirol, Tiago Barreto Garcez, Uli Birgit Flechtmann Suadicaní e Vanessa Rizzi pelas contribuições.

Aos amigos Ana Paula Bettoni Teles, Emanuel Junior Da Silva Nunes, Elizeu Merizio Munhoz, Fernando Angelo Piotto, Hugo Abelardo Gonzalez Villalba, Ioná Rech, Lucas Rocha Carvalho e Marcos Rodrigues pelos momentos vividos, ajuda dispensada e ensinamentos compartilhados.



"Obstáculo é aquilo que você enxerga quando tira os olhos do seu objetivo."

Claudia Abbud





## SUMÁRIO

RESUMO .....	13
ABSTRACT .....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Caracterização e contextualização do capim-tanzânia no Brasil.....	19
2.2 Cádmiio .....	20
2.2.1 Fontes de contaminação, concentrações no solo e conseqüências a seres vivos.....	20
2.2.2 Absorção, transporte e distribuição em plantas .....	21
2.2.3 Efeito em plantas .....	22
2.3 Enxofre .....	23
2.3.1 Disponibilidade no solo e concentração na planta .....	23
2.3.2 Funções nutricionais.....	24
2.3.3 Absorção e assimilação pela planta.....	24
2.3.4 Enxofre e tolerância a metais pesados.....	26
2.3.5 Enxofre em plantas forrageiras.....	27
Referências .....	29
3 CÁDMIO DIMINUI A PRODUÇÃO DE MASSA DO CAPIM-TANZÂNIA E ENXOFRE ATENUA A TAXA DE MORTALIDADE DE PERFILHOS NA REBROTAÇÃO DA GRAMÍNEA.....	37
Resumo .....	37
Abstract.....	37
3.1 Introdução.....	38
3.2 Material e Métodos.....	39
3.2.1 Tratamentos, delineamento experimental e solução nutritiva .....	39
3.2.2 Instalação, condução do experimento e coleta do material vegetal.....	39
3.2.3 Avaliações .....	40
3.2.3.1 Parâmetros morfológicos.....	40
3.2.3.2 Parâmetros morfogênicos .....	41
3.2.3.3 Parâmetros produtivos .....	41
3.2.4 Análise estatística .....	42
3.3 Resultados e Discussão.....	42
3.3.1 Teor de água na parte aérea .....	42
3.3.2 Perfilhos.....	43

3.3.3 Folhas .....	45
3.3.4 Produção de massa seca .....	47
3.3.5 Correlações.....	48
3.4 Conclusões .....	49
Referências.....	49
4 CÁDMIO, NUTRIENTES MINERAIS E VALOR SPAD DO CAPIM-TANZÂNIA CULTIVADO COM DOSES DE ENXOFRE E CÁDMIO .....	53
Resumo.....	53
Abstract .....	53
4.1 Introdução .....	54
4.2 Material e Métodos .....	55
4.2.1 Tratamentos, delineamento experimental e solução nutritiva.....	55
4.2.2 Instalação, condução do experimento e coleta do material vegetal .....	56
4.2.3 Avaliações.....	57
4.2.3.1 Valor SPAD .....	57
4.2.3.2 Macronutrientes, micronutrientes e cádmio.....	57
4.2.3.3 Fator de transporte do cádmio.....	58
4.2.4 Análise estatística.....	58
4.3 Resultados e Discussão .....	58
4.3.1 Valor SPAD .....	58
4.3.2 Macronutrientes .....	59
4.3.3 Micronutrientes .....	63
4.3.4 Cádmio.....	65
4.3.5 Correlações.....	67
4.4 Conclusões .....	69
Referências.....	69
5 ENXOFRE AUMENTA A CONCENTRAÇÃO DE CISTEÍNA E A ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE NO CAPIM-TANZÂNIA CULTIVADO COM CÁDMIO .	73
Resumo.....	73
Abstract .....	73
5.1 Introdução .....	74
5.2 Material e Métodos .....	75
5.2.1 Tratamentos, delineamento experimental e solução nutritiva.....	75
5.2.2 Instalação, condução do experimento e coleta do material vegetal .....	76

5.2.3 Avaliações .....	77
5.2.3.1 Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) e malondialdeído (MDA).....	77
5.2.3.2 Extração e quantificação de proteínas .....	78
5.2.3.3 Cisteína e metionina .....	78
5.2.3.4 Glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona.....	79
5.2.3.5 Atividade enzimática .....	80
5.2.3.5.1 Superóxido dismutase (SOD).....	80
5.2.3.5.2 Catalase (CAT).....	80
5.2.3.5.3 Ascorbato peroxidase (APX).....	81
5.2.3.5.4 Glutathiona redutase (GR).....	81
5.2.4 Análise estatística .....	82
5.3 Resultados e Discussão.....	82
5.3.1 Malondialdeído (MDA).....	82
5.3.2 Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	83
5.3.3 Proteína solúvel .....	84
5.3.4 Cisteína e metionina .....	85
5.3.5 Glutathiona reduzida (GSH).....	86
5.3.6 Glutathiona oxidada (GSSG).....	87
5.3.7 Glutathiona (GSH+GSSG) .....	88
5.3.8 Catalase (CAT).....	88
5.3.9 Ascorbato peroxidase (APX).....	89
5.3.10 Atividades enzimáticas em PAGE.....	90
5.3.11 Correlações .....	97
5.4 Conclusões.....	98
Referências .....	98



## RESUMO

### Enxofre na atenuação dos efeitos tóxicos do cádmio no capim-tanzânia

Plantas cultivadas em ambientes com média e alta disponibilidade de cádmio apresentam menor produção de folhas e perfilhos devido à maior quantidade de cádmio absorvido, resultando em menor produção de biomassa. O fornecimento de enxofre às plantas pode minimizar os efeitos negativos causados pelo cádmio, uma vez que esse nutriente participa de compostos que atuam no sistema antioxidante, conferindo maior tolerância aos metais pesados. Objetivou-se avaliar as modificações ocorridas: i) nos aspectos morfológicos, morfogênicos e produtivos; ii) no estado nutricional e iii) na resposta do sistema antioxidante do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) cultivado com combinações de doses de enxofre (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup>) e de cádmio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva. O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação, utilizando o esquema fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, em blocos ao acaso, com seis repetições. O primeiro corte do capim-tanzânia foi realizado 40 dias após o transplântio das mudas para os vasos e o segundo corte 18 dias após o primeiro. Para a taxa de mortalidade de perfilhos, valor SPAD, concentração de cádmio e a atividade da APX (segundo corte) do capim-tanzânia foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio, de forma que o suprimento de enxofre atenuou a taxa de mortalidade, diminuiu a quantidade de cádmio absorvida, aumentou o valor SPAD e a atividade da APX. O teor de água, número de perfilhos, taxa de aparecimento de perfilhos, número de folhas, área foliar, taxa de aparecimento foliar, razão de área foliar, produção de massa seca da parte aérea e das raízes, valor SPAD, concentração de potássio, teor de GSH e a atividade da CAT foram menores com o fornecimento de cádmio na solução nutritiva. De forma contrária, as concentrações de nitrogênio, fósforo, zinco e cádmio, o fator de transporte do cádmio, os teores de GSSG e glutatona, e a atividade da APX aumentaram. O fornecimento de enxofre aumentou a concentração de enxofre na parte aérea do capim-tanzânia. Os efeitos causados pelo cádmio são mais acentuados durante a rebrotação, principalmente, em condições de alta disponibilidade do metal pesado. As enzimas CAT e GR apresentaram mais isoformas na parte aérea do que nas raízes do capim-tanzânia, sugerindo que esse tecido é mais eficaz no combate aos danos oxidativos causados pelas altas concentrações de cádmio. O suprimento de enxofre ao capim-tanzânia cultivado em ambientes com alta disponibilidade de cádmio é indicado para aumentar a tolerância da gramínea ao metal pesado.

Palavras-chave: Antioxidantes enzimáticos; Área foliar; Estresse oxidativo; Glutaciona; Micronutrientes catiônicos; *Panicum maximum*; Perfilhamento; Peroxidação lipídica; Valor SPAD



## ABSTRACT

### **Sulfur in mitigating the toxic effects of cadmium in Tanzania guineagrass**

Plants grown at medium and high cadmium availability has produced low number of leaves and tillers due to the great amount of cadmium absorbed, resulting in lower biomass production. Sulfur supply to plants may mitigate negative effects caused by cadmium, since compounds containing sulfur participate of the antioxidative plant system, resulting in greater tolerance to heavy metals. This study evaluated changes in: i) morphological, morphogenesis and productive aspects, ii) nutritional status, and iii) response of the antioxidative system of Tanzania guineagrass (*Panicum maximum*) grown under combined sulfur rates (0.1; 1.0, 1.9, 2.8 and 3.7 mmol L<sup>-1</sup>) and cadmium rates (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mmol L<sup>-1</sup>) in nutrient solution. The experiment was conducted in greenhouse, by using a fractionated factorial 5<sup>2</sup>, in randomized block design, with six replications. The first harvest of Tanzania guineagrass was performed at 40 days after seedlings transplanting to the pots, and the second at 18 days after the first harvest. Mortality rate of tillers, SPAD value, cadmium concentration and APX activity (second harvest) of Tanzania guineagrass had statistically significant sulfur rates x cadmium rates interaction, since that sulfur supply mitigate the mortality rate, decreased the amount of cadmium absorbed and increased SPAD value and the APX activity. The water content, number of tillers, tiller emergence rate, number of leaf, leaf area, leaf emergence rate, ratio of leaf area, dry mass of shoots and roots, SPAD value, potassium concentration, GSH content and CAT activity decreased with the cadmium supply in the nutrient solution. Contrary to that, nitrogen, phosphorus, zinc and cadmium concentrations were increased as well as the transporting factor of cadmium, GSSG and glutathione contents and APX activity. Sulfur supply increased sulfur concentration in shoots of Tanzania guineagrass and the effects of cadmium were more pronounced during the plant regrowth period, especially under high availability of the heavy metal. Isoforms of CAT and GR showed higher abundance in shoots compared to roots, suggesting higher effectiveness of such tissue in avoiding oxidative damage caused by high concentrations of cadmium. Thus, sulfur supply to the Tanzania guineagrass grown in environment with high cadmium availability is indicated to increase tolerance to this heavy metal.

**Keywords:** Cationic micronutrients; Enzymatic antioxidants; Glutathione; Leaf area; Lipid peroxidation; Oxidative stress; *Panicum maximum*; SPAD value; Tillering





## 1 INTRODUÇÃO

A concentração de cádmio no ambiente aumentou consideravelmente em décadas recentes, principalmente por atividades antrópicas. Em muitos países isto tem ocasionado sérios problemas ambientais, uma vez que plantas cultivadas em ambientes com altas concentrações de cádmio têm os aspectos morfológicos, morfogênicos, nutricionais e antioxidantes alterados, causando menor produção de biomassa, o que pode resultar na degradação ambiental.

No Brasil, a reposição de nutrientes por meio de fertilizantes fosfatados e produtos alternativos no suprimento de nutrientes, como o lodo de esgoto, tem contribuído para a inserção de cádmio em áreas ocupadas por pastagens. Esse fato representa grande problema, uma vez que as plantas constituem a principal rota de entrada de metais pesados na cadeia alimentar, o que pode causar sérios problemas de saúde a animais e seres humanos.

O cultivo de plantas que apresentam sistema radicular extenso e adaptação a variadas condições edafoclimáticas é indicado para ambientes contaminados por metais pesados, uma vez que as plantas podem promover a recuperação desses ambientes após certo período de tempo. Dessa maneira, o cultivo do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) nessas condições pode ser promissor, por apresentar essas características.

O fornecimento de enxofre às plantas cultivadas em ambientes contaminados por cádmio é outra alternativa interessante, uma vez que esse nutriente é essencial às plantas e participa de compostos que atuam no sistema antioxidante, como a glutatona. Esse metabólito combate os radicais livres e também pode controlar a expressão de enzimas antioxidantes, conferindo maior tolerância das plantas aos metais pesados. Dessa maneira, a utilização de gramíneas forrageiras em associação à adubação sulfatada pode ser uma alternativa eficaz para o cultivo em ambientes contaminados por cádmio.

A hipótese testada foi que o suprimento de enxofre para plantas expostas ao cádmio ocasiona alterações nos: i) aspectos morfológicos, morfogênicos e produtivos, aumentando a produção de perfilhos e folhas; ii) no estado nutricional, aumentando o teor de clorofila e a concentração de enxofre e iii) na resposta do sistema antioxidante, aumentando a tolerância do capim-tanzânia ao estresse causado pelo cádmio. Portanto, objetivou-se avaliar as modificações ocorridas no capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e cádmio em solução nutritiva em relação aos aspectos: i) morfológicos, morfogênicos e produtivos; ii) nutricionais e iii) do sistema antioxidante.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Caracterização e contextualização do capim-tanzânia no Brasil

O Brasil possui aproximadamente 196 milhões de hectares ocupados por pastagens, o que representa aproximadamente 22% do total do território nacional (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO, 2011). Extensas áreas são ocupadas no País por gramíneas do gênero *Panicum* (BARBOSA; NASCIMENTO JUNIOR; CECATO, 2006), por adaptarem-se a variadas condições edafoclimáticas e apresentarem alta produção de biomassa, quando manejadas e fertilizadas adequadamente (JANK et al., 2010).

A introdução da espécie forrageira *Panicum maximum* cv. Tanzânia ocorreu após ser coletada pelos franceses do Office de la Recherche Scientifique et Technique d'Outre-Mer (ORSTOM) em 1969, entre Korogwe e Kilosa, na Tanzânia. Essa forrageira foi identificada como ORSTOM T58 e introduzida no Brasil em 1984, e posteriormente registrada como BRA-007218. Em 1991, o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC) lançou comercialmente o cultivar Tanzânia-1 (JANK et al., 2010).

O capim-tanzânia apresenta crescimento cespitoso, porte médio, que pode atingir 1,2 m de altura quando em crescimento livre, e apresenta folhas decumbentes com largura que atinge 2,6 cm, manchas roxas nas espiguetas e ausência de pilosidade nas folhas e colmos e cerosidade nos colmos. As inflorescências são do tipo panícula (JANK et al., 2010). Essa forrageira apresenta metabolismo fisiológico C<sub>4</sub>, o que lhe confere alta eficiência no uso da radiação solar, nutrientes e água (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Historicamente o capim-tanzânia tem sido cultivado com a finalidade de pastejo no Brasil, uma vez que apresenta alta produção de biomassa quando manejado e fertilizado adequadamente, e também apresenta alta aceitabilidade pelos animais, especialmente ruminantes (JANK et al., 2010). Recentemente, o capim-tanzânia também tem sido utilizado na recuperação de áreas contaminadas por metais pesados (MIRANDA et al., 2012).

Essa gramínea apresenta potencial para se desenvolver em solos contaminados por metais pesados por adaptar-se a variadas condições edafoclimáticas (JANK et al., 2010) e apresentar sistema radicular bem desenvolvido quando há adequado suprimento de nutrientes (DECHEN; NACHTIGALL, 2007; MONTEIRO; CONSOLMAGNO NETO, 2008; NASCIMENTO; XING, 2006).

## 2.2 Cádmio

### 2.2.1 Fontes de contaminação, concentrações no solo e conseqüências a seres vivos

Em décadas recentes a concentração de cádmio no ambiente aumentou consideravelmente em muitos países, devido às atividades antrópicas (GALLEGO et al., 2012). Atividades de mineração, fundição, fabricação de fertilizantes fosfatados, descarte de baterias usadas, deposição de resíduos de esgotos municipais e processos industriais estão entre as principais atividades que resultam na contaminação do ambiente por cádmio (CHOU et al., 2011; CUI; WANG, 2006). Também existem as fontes naturais de contaminação, como emissão de gases na atividade vulcânica, queima de florestas e transporte de partículas de fuligem e solo pelo vento (FISHBEIN, 1993), além do próprio material de origem do solo (KABATA-PENDIAS, 2001).

Em solos não contaminados, a concentração de cádmio normalmente se encontra na faixa de 15 a 30 mg kg<sup>-1</sup>, mas existem variações decorrentes do material de origem. Nos solos originados de rochas ígneas a concentração de cádmio varia de 0,1 a 3,0 mg kg<sup>-1</sup>, solos de origem metamórfica apresentam concentração entre 0,1 e 1,0 mg kg<sup>-1</sup> e em solos originados de rochas sedimentares a concentração de cádmio pode atingir 10,0 mg kg<sup>-1</sup> (KABATA-PENDIAS, 2001). Na solução do solo concentrações entre 0,04 e 0,32 mmol L<sup>-1</sup> são consideradas normais (WAGNER, 1993), enquanto concentrações variando de 0,32 a 1,00 mmol L<sup>-1</sup> são indicativas de poluição moderada (SANITÁ DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999).

No Brasil, a reposição de nutrientes por meio de fertilizantes fosfatados e produtos alternativos no suprimento de nutrientes, como o lodo de esgoto, são as principais fontes de contaminação do solo (DOMINGUES, 2009), e tem contribuído para a inserção de cádmio em áreas ocupadas por pastagens.

As plantas constituem a principal rota de entrada de cádmio na cadeia alimentar animal e humana (SATARUG et al., 2002), o que pode causar sérios problemas de saúde a ambos (BENZARTI; HAMDI; MOHRI, 2010). Dependendo da concentração no organismo o cádmio pode causar anemia, hipertensão, enfisema pulmonar, disfunções gástricas, disfunções intestinais e câncer em seres humanos (WAGNER, 1993).

## 2.2.2 Absorção, transporte e distribuição em plantas

O cádmio ocorre em baixas concentrações na solução do solo, sendo predominante a forma  $\text{Cd}^{2+}$  (VERBRUGGEN; HERMANS; SCHAT, 2009). A baixa concentração combinada ao baixo coeficiente de difusão do  $\text{Cd}^{2+}$  na solução do solo sugere que o fluxo de massa é o mecanismo predominante de absorção de cádmio pelas raízes das plantas (LUX et al., 2011).

Os íons de cádmio presentes na solução do solo são facilmente absorvidos pelas raízes (WAGNER, 1993), e em algumas espécies vegetais, o cádmio é transportado rapidamente para a parte aérea (CLEMENS, 2006). A absorção de cádmio pelas raízes é controlada por uma proteína de transporte localizada no plasmalema (KOCHIAN, 1991), e algumas proteínas transportadoras localizadas nos feixes vasculares são responsáveis pelo transporte do cádmio das raízes à parte aérea (KUPPELWIESER; FELLER, 1991; PRASAD, 1995). Jarvis, Jones e Hopper (1976) destacaram que a absorção do cádmio pelas raízes da planta geralmente envolve a competição por sítios de absorção de nutrientes com propriedades químicas semelhantes, como o zinco. Todavia, muitos mecanismos envolvidos na absorção e transporte de cádmio em plantas ainda são desconhecidos (HASAN et al., 2009; REDJALA; STERCKEMAN; MOREL, 2009).

A distribuição do cádmio varia entre tecidos e espécies de plantas (WAGNER, 1993), e quando comparado a outros metais pesados e metalóides, o cádmio apresenta maior propensão para se acumular em tecidos da parte aérea (CLEMENS, 2006). Ainda assim, normalmente, as concentrações de cádmio são mais elevadas nas raízes do que na parte aérea (WAGNER, 1993). Safarzadeh, Ronaghi e Karimian (2013) avaliaram o efeito do cádmio (0,4 e 0,8  $\text{mmol kg}^{-1}$  de solo) em sete cultivares de arroz (*Oryza sativa*) e relataram que as concentrações de cádmio na parte aérea foram menores do que nas raízes.

Em princípio, a distribuição de cádmio na planta está condicionada à retenção do metal pelas raízes (CLEMENS, 2006). A atividade de vias sequestradoras de metais pesados nas células das raízes provavelmente desempenha papel fundamental na determinação da taxa de transporte do cádmio para a parte aérea. Outros fatores como o grau de acessibilidade e mobilização do metal sequestrado, a eficiência de passagem do metal absorvido pelas raízes e a atividade de carregamento do xilema também alteram a distribuição do cádmio nos tecidos da planta (CLEMENS; PALMGREN; KRÄMER, 2002).

### 2.2.3 Efeito em plantas

A presença de cádmio nos tecidos vegetais ocasiona alterações bioquímicas, morfofisiológicas e genéticas (SCHUTZENDUBEL et al., 2001). Dependendo da concentração de cádmio nos tecidos, a planta apresenta folhas enroladas e clorose pela alteração no equilíbrio da água e abertura estomática (CLEMENS, 2006). Posteriormente, o cádmio danifica o aparato fotossintético e provoca diminuição dos teores de clorofila e carotenóides (SANITÁ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999). Esses efeitos resultam em menor rendimento quântico da fotossíntese (DAL CORSO; FARINATI; FURINI, 2010). O cádmio também diminui a assimilação de carbono pela inibição da atividade da enzima ribulose 1,5-bifosfato carboxilase (Rubisco), envolvida na fixação de CO<sub>2</sub> (PERFUS-BARBEOCH et al., 2002), determinando menor produção de biomassa.

Anjum et al. (2008) avaliaram o efeito do cádmio (0,22; 0,44 e 0,88 mmol kg<sup>-1</sup> de solo) e do enxofre (1,25 mmol kg<sup>-1</sup> de solo) em *Brassica campestris* e relataram que o aumento da dose de cádmio resultou em menor teor de clorofila, área foliar e produção de massa, mas o fornecimento de enxofre atenuou os efeitos negativos causados na planta. Goel et al. (2012) descreveram que o cádmio (5 e 10 μmol L<sup>-1</sup>) diminuiu a atividade da enzima Rubisco em plantas de milho (*Zea mays*).

Em muitas espécies vegetais, a toxicidade causada pelo cádmio se manifesta ao nível celular, induzindo aberrações cromossômicas e alterações na divisão celular (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005). A presença desse metal pesado na planta inibe a germinação e o crescimento do tubo polínico, altera o metabolismo de enxofre e nitrogênio (MÁRQUEZ-GARCIA et al., 2011), fósforo (SHARMA; DUBEY, 2006), micronutrientes catiônicos e carboidratos (SANITÁ DI TOPPI; GABRIELLI, 1999).

O excesso de cádmio pode estimular a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs) (AIBIBU et al., 2010; GALLEGO et al., 2012). Esses compostos causam a peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e danificam o DNA. A peroxidação lipídica é considerada o processo mais prejudicial às células vegetais (GILL; TUTEJA, 2010). Ghezzi e Bonetto (2003) relataram que a maioria dos tipos de oxidações protéicas é essencialmente irreversível, com exceção de alguns aminoácidos que contém enxofre.

Hassan, Shao e Zhang (2005a) avaliaram o efeito do cádmio (0,1; 1,0 e 5,0 μmol L<sup>-1</sup>) em genótipos de arroz e observaram que o teor de malondialdeído (MDA) aumentou com a elevação das doses de cádmio, indicando que houve peroxidação lipídica na membrana (DIXIT; PANDEY; SHYAM, 2001). Hassan, Wang e Zhang (2005b) relataram que o

fornecimento de enxofre (0,2; 0,4 e 0,8 mmol L<sup>-1</sup>) diminuiu o teor de MDA em genótipos de arroz cultivados na presença de cádmio (1 µmol L<sup>-1</sup>), demonstrando que o fornecimento de enxofre diminui a peroxidação lipídica causada pelo cádmio, por participar de compostos do sistema antioxidante das plantas.

Para protegerem-se da ação dos intermediários tóxicos de oxigênio (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH), células e organelas vegetais, como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos empregam sistemas de defesa antioxidante (GILL; TUTEJA, 2010). O sistema de defesa antioxidante das plantas é formado por antioxidantes não enzimáticos e antioxidantes enzimáticos. Os antioxidantes não enzimáticos incluem a glutatona reduzida (GSH), ácido ascórbico, carotenóides, flavonóides, prolina e tocoferóis, enquanto os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPX), glutatona sulfo-transferase (GST), guaiacol peroxidase (GPOX), monodeidroascorbato redutase (MDHAR) e deidroascorbato redutase (DHAR) (GILL; TUTEJA, 2010; KHAN; SINGH; NAZAR, 2007; MITLLER et al., 2004; ROUHIER; LEMAIRE; JACQUOT, 2008).

Lin et al. (2007) relataram que o teor de GSH do trigo (*Triticum aestivum*) cultivado na presença de cádmio (2,67; 8,92; 29,43; 89,20 e 294,36 µmol kg<sup>-1</sup> de solo) diminuiu com a elevação das doses, enquanto os teores de glutatona oxidada (GSSG) e glutatona (GSH+GSSG) aumentaram. Khan, Singh e Nazar (2007) avaliaram as respostas antioxidantes do trigo cultivado na ausência e presença de cádmio (100 µmol L<sup>-1</sup>) e reportaram que as atividades das enzimas SOD, CAT, APX e GR aumentaram na presença de cádmio.

## **2.3 Enxofre**

### **2.3.1 Disponibilidade no solo e concentração na planta**

Em média, a crosta terrestre contém entre 0,6 e 1,0 g kg<sup>-1</sup> de enxofre (HAVLIN et al., 2005), mas solos mais intemperizados, como os Latossolos e Argissolos apresentam baixa disponibilidade de enxofre (SCHERER, 2001), uma vez que a disponibilidade de enxofre na solução do solo depende dos processos de adsorção/dessorção, mineralização/imobilização e lixiviação, entre outros (ALVAREZ et al., 2007).

A concentração de enxofre na massa seca das plantas varia de 1 a 5 g kg<sup>-1</sup>, e considera-se a faixa entre 1 e 3 g kg<sup>-1</sup> como adequada para o crescimento normal da maioria das espécies vegetais (DECHEN; NACHTIGALL, 2007).



### 2.3.2 Funções nutricionais

O enxofre tem uma série apreciável de funções nas plantas, como síntese de cistina, cisteína e metionina, que são base de proteínas e perfazem mais de 90% do enxofre contido na planta; ativação de enzimas proteolíticas; síntese das vitaminas biotina, tiamina e vitamina B1; formação de lipídios glicosídeos; formação de ligações dissulfídricas, que conferem resistência ao estresse térmico; síntese da clorofila e formação da ferredoxina, que funciona como transportador de elétrons na fotossíntese e na fixação simbiótica de nitrogênio e ativação das enzimas ATP-sulfurilase e APS-sulfotransferase envolvidas no metabolismo de enxofre pela planta (MARSCHNER, 1995). Além disso, o enxofre é componente de alguns hormônios em plantas e participa como ligante em grande número de metalo-proteínas (DECHEN; NACHTIGALL, 2007).

O enxofre também influencia o processo de redução do nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) na planta, o qual é necessário para a incorporação do nitrogênio mineral em esqueletos de carbono para formação de aminoácidos. A enzima responsável pela redução do nitrato (redutase do nitrato) contém grupos tiol ( $-\text{SH}$ ) e, por conseguinte, sua atividade é limitada em condições de deficiência de enxofre, resultando em acúmulo de nitrato na planta (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

### 2.3.3 Absorção e assimilação pela planta

O enxofre é absorvido pelas plantas predominantemente via sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), mas também pode ser absorvido pelas folhas na forma oxidada ( $\text{SO}_2$ ) e reduzida ( $\text{H}_2\text{S}$ ), por meio dos estômatos, assim como outros gases, como o sulfeto de carbonila ( $\text{COS}$ ), dissulfeto de carbono ( $\text{CS}_2$ ), sulfeto de dimetila ( $\text{CH}_3\text{SCH}_3$ ) e metil-mercaptano ( $\text{CH}_3\text{SH}$ ) (EPSTEIN; BLOOM, 2006).

A absorção e o transporte de sulfato em plantas são mediados por proteínas transportadoras de sulfato dependentes do consumo de energia (CLARKSON; HAWKESFORD; DAVIDIAN, 1993). Existem várias etapas envolvidas na assimilação do enxofre, incluindo transportadores de membrana plasmática presentes nas camadas das células ultraperiféricas da raiz, absorção do sulfato pelos tecidos vasculares para transporte a longa distância e assimilação desse nutriente pelas células do mesófilo das folhas (HAWKESFORD, 2003).

A absorção do sulfato nas raízes apresenta cotransportadores  $H^+$  de alta afinidade. Os transportadores de baixa afinidade estão envolvidos na distribuição do sulfato entre as células por meio das membranas plasmáticas e no armazenamento e remobilização de sulfato dos vacúolos através do tonoplasto (HAWKESFORD et al., 2012).

O sulfato absorvido é transportado pelo xilema em direção às folhas, onde ocorre a redução e incorporação do sulfato em esqueletos carbônicos (HERSCHBACH; RENNENBERG, 1991). A assimilação de enxofre em plantas ocorre inicialmente pela ativação de íons sulfato pelo trifosfato de adenosina (ATP). Nessa reação, a enzima ATP-sulfurilase catalisa a substituição de dois grupos fosfato do ATP pelo grupo sulfurilo, resultando na formação de fosfosulfato de adenosina (APS) e pirofosfato (HAWKESFORD et al., 2012).

O sulfato ativado e a APS podem servir como substrato para a síntese de ésteres de sulfato ou para a redução de sulfato. Para a síntese de ésteres de sulfato como sulfolipídeos a enzima APS-quinase catalisa a formação de fosfosulfato de fosfoadenosina (PAPS) em uma reação dependente de ATP. De PAPS, o sulfato ativado pode ser transferido para um grupo hidroxila formando um éster sulfato (MARSCHNER, 1995; SCHMIDT; JAGER, 1992).

O sulfato ativado de APS é reduzido a sulfito ( $SO_3^{2-}$ ) pela APS-redutase, exigindo dois elétrons fornecidos a partir da glutatona. Posteriormente, seis elétrons da ferredoxina são necessários para redução do sulfito a sulfeto ( $S^{2-}$ ), catalisados pela redutase do sulfito, que é a única reação da via que ocorre no cloroplasto (HAWKESFORD et al., 2012). No cloroplasto as enzimas utilizam a ferredoxina reduzida como doadora de elétrons (MARSCHNER, 1995).

O sulfeto resultante reage com a O-acetilcerina (OAS) para formar cisteína e acetato, catalisado pela serina acetiltransferase e OAS tiol-liase (EPSTEIN; BLOOM, 2006). A cisteína é o primeiro produto estável da assimilação da redução do sulfato e atua como um precursor para a síntese de todos os outros compostos contendo enxofre reduzido, bem como para outras vias biossintéticas, tal como a formação de etileno (MIYAZAKI; YANG, 1987).

A sulfatação da APS é a via alternativa que ocorre no citoplasma. Primeiro a APS-quinase catalisa uma reação de APS com ATP para formar PAPS. As sulfotransferases, então, podem transferir o grupo sulfato da PAPS para vários compostos, incluindo colina, brassinosteróides, flavanol, glucosídeo de ácido gálico, glucosinatos, peptídeos e polissacarídeos (LEUSTEK; SAITO, 1999).

A metionina, que é o outro aminoácido que contém enxofre, é sintetizada em plastídios a partir da cisteína. Após ocorrer a síntese de cisteína e metionina, o enxofre pode ser incorporado a proteínas e uma variedade de outros compostos, como acetil coenzima A e S-

adenosilmetionina (EPSTEIN; BLOOM, 2006). A síntese de cistina ocorre em condições oxidantes, a partir da união de duas cisteínas (GILL; TUTEJA, 2011).

#### 2.3.4 Enxofre e tolerância a metais pesados

Dependendo da concentração nos tecidos vegetais, o cádmio altera o crescimento e o desenvolvimento das plantas e induz a utilização de várias estratégias de defesa pelas plantas para neutralizar o dano oxidativo causado pela produção de EROs (GILL; TUTEJA, 2011). Plantas sob estresse causado por metais pesados alteram significativamente o metabolismo de enxofre (TUKENDORF; RAUSER, 1990) e, conseqüentemente, o conteúdo de cisteína, metionina e glutatona.

O metabólito glutatona pode estar presente no vegetal nas formas reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG) (ROUHIER; LEMAIRE; JACQUOT, 2008). A GSH é agente antioxidante (DROUX, 2004) e atua benéficamente no combate ao estresse causado por metais pesados (GILL, TUTEJA, 2011). A GSH combate os radicais livres e está ligada ao ciclo ascorbato-glutatona, o qual remove peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) da célula vegetal (NOCTOR; FOYER, 1998). Em um primeiro momento a GSH é oxidada (GSSG), sendo necessária a sua restituição a GSH para a realização das atividades fisiológicas de modo normal pelas células vegetais (GILL; TUTEJA, 2011). A enzima GR controla essa restituição, que é fundamental para manter a capacidade antioxidante e desintoxicante da célula (FOYER; THEODOULOU; DELROT, 2001).

Anjum et al. (2008) avaliaram o efeito do enxofre ( $0,35 \text{ mmol kg}^{-1}$  de solo) em *Brassica campestris* cultivada sob estresse causado por cádmio ( $0,22$ ;  $0,44$  e  $0,88 \text{ mmol kg}^{-1}$  de solo) e relataram que o teor de GSH aumentou significativamente com o fornecimento de enxofre, atenuando os danos causados pelo cádmio. Hatata e Abdel-Aal (2008) estudaram o efeito da aplicação de cádmio ( $0$ ,  $10$ ,  $50$  e  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) em plantas de girassol (*Helianthus annuus*) e verificaram aumento no teor de GSH e na atividade da enzima GR e redução no teor de GSSG com a elevação das doses de cádmio.

A glutatona também pode controlar a expressão de outras enzimas antioxidantes, como SOD e CAT (ROMERO-PUERTAS et al., 2007). A SOD remove radicais superóxidos ( $O_2^-$ ), catalisando a sua dismutação, de forma que um  $O_2^-$  é reduzido a  $H_2O_2$  e o outro é oxidado a  $O_2$ . A remoção de  $O_2^-$  diminui o risco da formação de radicais hidroxilas ( $OH^\cdot$ ) via catálise do metal em reações do tipo Habere-Weiss (GILL; KHAN; TUTEJA, 2012). Por sua vez a CAT

decompõe  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , e é enzima-chave envolvida na remoção de peróxidos tóxicos às células vegetais (CUI; WANG, 2006; GILL; KHAN; TUTEJA, 2012).

Hassan, Wang e Zhang (2005b) avaliaram o efeito do enxofre (0,2; 0,4 e 0,8  $\text{mmol L}^{-1}$ ) em genótipos de arroz cultivados na ausência e presença de cádmio (1  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e relataram que a atividade da enzima SOD aumentou na presença de cádmio e diminuiu linearmente com a elevação das doses de enxofre, demonstrando que plantas supridas com enxofre tem menor produção de EROs. Cui e Wang (2006) reportaram que a atividade da enzima CAT foi menor em plantas de milho cultivadas na presença de cádmio quando houve fornecimento de enxofre (50  $\text{mmol kg}^{-1}$  de solo).

### 2.3.5 Enxofre em plantas forrageiras

Nas décadas mais recentes estudos têm sido desenvolvidos para avaliar o efeito da aplicação de enxofre em pastagens. Lavres Junior, Monteiro e Schiavuzzo (2008) avaliaram o efeito do enxofre (0,62; 1,25; 1,87 e 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) no capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) e relataram que a concentração de enxofre, valor SPAD, número de perfilhos e produção de massa aumentaram quando houve maior disponibilidade do nutriente. Santos e Monteiro (1999) verificaram que a produção de massa seca da parte aérea do capim-braquiária (*Brachiaria decumbens*) aumentou em 19 e 48%, no primeiro e segundo cortes, respectivamente, quando houve fornecimento da maior dose de enxofre (2,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) em relação ao não fornecimento de enxofre.

O enxofre promove melhorias nos aspectos produtivos das forrageiras, principalmente se aplicado em conjunto com o nitrogênio. Batista e Monteiro (2006a) avaliaram as respostas morfológicas e produtivas do capim-marandu recebendo combinações de doses de nitrogênio (1, 9, 17, 25 e 33  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e enxofre (0,1; 0,7; 1,3; 1,9 e 2,5  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e relataram maior perfilhamento e produção de massa de folhas e colmos com a adição de enxofre ao sistema, demonstrando que o aumento no suprimento de enxofre é necessário para a maior resposta do capim ao fornecimento de nitrogênio. Bonfim-Silva e Monteiro (2010) analisaram os efeitos da combinação de doses de nitrogênio (0,00; 7,14; 14,28; 21,42 e 28,57  $\text{mmol dm}^{-3}$  de solo) e enxofre (0,00; 0,31; 0,62; 0,93 e 1,25  $\text{mmol dm}^{-3}$  de solo) no capim-braquiária em estágio de degradação e notaram que o valor SPAD das folhas recém-expandidas aumentou com o fornecimento desses nutrientes. Batista e Monteiro (2006b) relataram aumento no comprimento, superfície e massa seca do sistema radicular do capim-marandu suprido com

combinações de doses de nitrogênio (1, 9, 17, 25 e 33 mmol L<sup>-1</sup>) e enxofre (0,1; 0,7; 1,3; 1,9 e 2,5 mmol L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva.

Schmidt et al. (2013) avaliaram o efeito do enxofre (0,1; 0,7; 1,3; 1,9 e 2,5 mmol L<sup>-1</sup>) em *Stylosanthes guianensis* cv. Mineirão e relataram que a produção de massa seca aumentou de forma linear no primeiro corte, e no segundo corte, o fornecimento das maiores doses de enxofre aumentaram em mais de 100% a produção de massa em relação ao fornecimento de 0,1 mmol L<sup>-1</sup>. A concentração de enxofre na parte aérea da forrageira também aumentou. Malhi et al. (2011) avaliaram a produção de massa de gramíneas forrageiras (*Bromus inermis*, *Poa pratensis* e *Agrostis scabra*) em resposta a adubação nitrogenada, potássica e sulfatada pelo período de 23 anos e reportaram que o fornecimento de enxofre foi essencial para aumentar a produção de massa, uma vez que maximizou a resposta das gramíneas à adubação nitrogenada e potássica.

O suprimento de enxofre também pode maximizar a resposta de algumas espécies ao fósforo, como reportado por Noble e Kleinig (1971) na cultura do sorgo (*Sorghum vulgare*) e por Naphada e Mutalka (1984) na cultura do milho. Kowalenko (2004) reportou que a concentração de enxofre nos tecidos da parte aérea das espécies forrageiras *Dactylis glomerata* e *Lolium perenne* aumentou com o fornecimento de enxofre (0, 17, 34, 67 e 134 kg ha<sup>-1</sup>). A elevação da concentração de enxofre nos tecidos vegetais permite que a planta aumente a produção do metabólito glutatona, que é necessário para aumentar a tolerância das plantas aos metais pesados (GILL; TUTEJA, 2011). Schmidt (2012) relatou que o suprimento de enxofre (0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L<sup>-1</sup>) aumentou as concentrações de enxofre e de glutatona (GSH+GSSG) e diminuiu a atividade da enzima GR nos tecidos da parte aérea e das raízes do capim-tanzânia. A relação GSH/GSSG, que é fundamental para manter a capacidade antioxidante e desintoxicante da célula (FOYER; THEODOULOU; DELROT, 2001), também foi alterada pelo fornecimento de enxofre, de forma que a relação diminuiu com a elevação das doses, exceto quando houve fornecimento de enxofre de 1,9 mmol L<sup>-1</sup>.

Esses resultados demonstram claramente que o enxofre eleva a produção de massa seca da parte aérea e das raízes, aumenta o comprimento radicular de gramíneas e o teor de glutatona nos tecidos da parte aérea e das raízes, conferindo aos capins características desejáveis para o cultivo em ambientes contaminados por metais pesados (CHEN; LI; SHEN, 2004; NASCIMENTO; XING, 2006).

## Referências

- AIBIBU, N.; LIU, Y.; ZENG, G.; WANG, X.; CHEN, B.; SONG, H.; XU, L. Cadmium accumulation in *Vetiveria zizanioides* and its effects on growth, physiological and biochemical characters. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 6297-6303, 2010.
- ALVAREZ V., V.H.; ROSCOE, R.; KURIHARA, H.; PEREIRA, N.F. Enxofre. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. cap. 10, p. 596-644.
- ANJUM, N.A.; UMAR, S.; AHMAD, A.; IQBAL, M.; NAFEES, N.A. Sulphur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 54, p. 271-279, 2008.
- BARBOSA, M.A.A.F.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.; CECATO, U. Dinâmica da pastagem e desempenho de novilhos em pastagem de capim-tanzânia sob diferentes ofertas de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 1594-1600, 2006.
- BATISTA, K.; MONTEIRO, F.A. Respostas morfológicas e produtivas do capim-marandu adubado com doses combinadas de nitrogênio e enxofre. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, p. 1281-1288, 2006a.
- BATISTA, K.; MONTEIRO, F.A. Sistema radicular do capim-marandu, considerando as combinações de doses de nitrogênio e de enxofre. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p. 821-828, 2006b.
- BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, p. 21-34, 2005.
- BENZARTI, S.; HAMDY, H.; MOHRI, S. Response of antioxidative enzymes and apoplastic bypass transport in *Thlaspi caerulescens* and *Raphanus sativus* to cadmium stress. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 12, p. 733-744, 2010.
- BONFIM-SILVA, E.M.; MONTEIRO, F.A. Nitrogênio e enxofre na adubação e em folhas diagnósticas e raízes do capim-braquiária em degradação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 1641-1649, 2010.
- CHEN, Y.; LI, X.D.; SHEN, Z.G. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 187-196, 2004.
- CHOU, T.; CHAO, Y.; HUANG, W.; HONG, C.; KAO, C.H. Effect of magnesium deficiency on antioxidant status and cadmium toxicity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 168, p. 1021-1030, 2011.
- CLARKSON, D.T.; HAWKESFORD, M.J.; DAVIDIAN, J.C. Membrane and long-distance transport of sulfate. In: DE KOK, L.J.; STULEN, I.; RENNENBERG, H.; BRUNOLD, C.; RAUSER, W. (Ed.). **Sulfur nutrition and sulfur assimilation in higher plants: regulatory, agricultural and environmental aspects**. The Hague: SPB Academic Publishing, 1993. chap. 1, p. 3-19.

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

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

CUI, Y.; WANG, Q. Physiological responses of maize to elemental sulphur and cadmium stress. **Plant, Soil and Environment**, Praha, v. 52, p. 523-529, 2006.

DAL CORSO, G.; FARINATI, S.; FURINI, A. Regulatory networks of cadmium stress in plants. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 5, p. 663-667, 2010.

DECHEN, A.R.; NACHTIGALL, G.R. Elementos requeridos à nutrição das plantas. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do Solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. cap. 4, p. 91-132.

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

DOMINGUES, T.C.G. **Teor de metais pesados em solo contaminado com resíduo de sucata metálica, em função de sua acidificação**. 2009. 75p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico de Campinas, Campinas, 2009.

DROUX, M. Sulfur assimilation and the role of sulfur in plant metabolism: a survey. **Photosynthesis Research**, Wageningen, v. 79, p. 331-348, 2004.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A.J. **Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas**. Londrina: Editora Planta, 2006. 403p.

FISHBEIN, L. Sources, nature and levels of air pollutants. In: TOMATIS, L. (Ed.). **Indoor and outdoor air pollution and human cancer**. Berlin: Springer-Verlag, 1993. chap. 1, p. 17-66.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Disponível em: <<http://www.fao.org>> Acesso em: 12 fev. 2011.

FOYER, C.H.; THEODOULOU, F.L.; DELROT, S. The functions of inter and intracellular glutathione transport systems in plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, p. 486-492, 2001.

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E.; IANNONE, 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**, Oxford, v. 83, p. 33-46, 2012.

GHEZZI, P.; BONETTO, V. Redox proteomics: identification of oxidatively modified proteins. **Proteomics**, Malden, v. 3, p. 1145-1153, 2003.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Cadmium stress tolerance in crop plants probing the role of sulfur. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 6, p. 215-222, 2011.

GILL, S.S.; KHAN, N.A.; TUTEJA, N. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 182, p. 112-120, 2012.

GOEL, S.; MALIK, J.A.; AWASTHI, R.; SANDHIR, R.; NAYYAR, H. Growth and metabolic responses of maize (C<sub>4</sub> species) and rice (C<sub>3</sub> species) genotypes to cadmium toxicity. **Cereal Research Communications**, Budapest, v. 40, p. 225-234, 2012.

HASAN, S.A.; FARIDUDDIN, Q.; ALI, B.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Cadmium: toxicity and tolerance in plants. **Journal of Environmental Biology**, Lucknow, v. 30, p. 165-174, 2009.

HASSAN, M.J.; SHAO, G.; ZHANG, G. Influence of cadmium toxicity on growth and antioxidant enzyme activity in rice cultivars with different grain cadmium accumulation. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, p. 1259-1270, 2005a.

HASSAN, M.J.; WANG, Z.; ZHANG, G. Sulfur alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium toxicity in rice. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, p. 1785-1800, 2005b.

HATATA, M.M.; ABDEL-AAL, E.A. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Dubai, v. 4, p. 655-669, 2008.

HAVLIN, J.L.; BEATON, J.D.; TISDALE, S.L.; NELSON, W.L. **Soil fertility and fertilizers: An introduction to nutrient management**. 7<sup>th</sup> ed. New Jersey: Pearson Prentice Hall, 2005. 528 p.

HAWKESFORD, M.J. Transporter gene families in plants: the sulphate transporter gene family: redundancy or specialization? **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 117, p. 155-163, 2003.

HAWKESFORD, M.J.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MOLLER, I. S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.) **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Elsevier, 2012. chap. 6, p. 135-189.

HERSCHBACH, C.; RENNENBERG, H. Influence of glutathione (GSH) on sulphate influx, xylem loading and exudation in excised tobacco roots. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, p. 1021-1029, 1991.



JANK, L.; MARTUSCELLO, J.A.; EUCLIDES, V.P.B.; VALLE, C.B.; RESENDE, R.M.S. *Panicum maximum*. In: FONSECA, D.M.; MARTUSCELLO, J.A. (Ed.). **Plantas forrageiras**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2010. cap. 5, p. 166-196.

JARVIS, C.; JONES, L.H.P.; HOPPER, M.J. Cadmium uptake from solution by plants and its transport from roots to shoots. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 44, p. 179-191, 1976.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 3<sup>rd</sup> ed. Flórida: CRC Press, 2001. 315 p.

KHAN, N.A.; SINGH, S.S.; NAZAR, R. 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**, Malden, v. 193, p. 435-444, 2007.

KOCHIAN, L.V. Mechanisms of micronutrients uptake and translocation in plants. In: MORTVEDT, J.J.; COX, S.R.; SHUMAN, L.M. (Ed.). **Micronutrients in Agriculture**. 2<sup>nd</sup> ed. Madison: Soil Science Society of America, 1991. chap. 5, p. 229-296.

KOWALENKO, C.G. Response of forage grass to sulphur applications on coastal British Columbia soils. **Canadian Journal of Soil Science**, Ontario, v. 84, p. 227-236, 2004.

KUPPELWIESER, H.; FELLER, U. Transport of Rb and Sr to the ear in mature, excised shoots of wheat: effects of temperature and stem length on Rb removal from the xylem. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 132, p. 281-299, 1991.

LAVRES JUNIOR, J.; MONTEIRO, F.A.; SCHIAVUZZO, P.F. Concentração de enxofre, valor SPAD e produção do capim-Marandu em resposta ao enxofre. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 3, p. 225-231, 2008.

LEUSTEK, T.; SAITO, K. Sulfate transport and assimilation in plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 637-643, 1999.

LIN, R.; WANG, X.; LUO, Y.; DU, W.; GUO, H.; YIN, D. Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). **Chemosphere**, Oxford, v. 69, p. 89-98, 2007.

LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULÍK, M.; WHITE, P.J. Root responses to cadmium in rhizosphere: a review. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 21-37, 2011.

MALHI, S.S.; NYBORG, M.; SOLBERG, E.; WANG, Z.; HENRIQUEZ, B. Influence of twenty-three annual applications of nitrogen and sulfur fertilizers, and one-time liming on dry matter yield of grass and some soil properties on a dark gray chernozem soil. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 34, p. 1567-1578, 2011.

MÁRQUEZ-GARCIA, B.; HOREMANS, N.; CUYPERS, A.; GUISEZ, Y.; CÓRDOB, F. Antioxidants in *Erica andevalensis*: A comparative study between wild plants and cadmium-exposed plants under controlled conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, p. 110-115, 2011.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1995. 889p.

MIRANDA, V.S.; RIBEIRO, K.G.; SILVA, A.C.; PEREIRA, R.C.; PEREIRA, O.G.; VIDAL-TORRADO, P.; FERNANDES, J.S.C.; OLIVEIRA, M.C. Rehabilitation with forage grasses of an area degraded by urban solid waste deposits. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, p. 18-23, 2012.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, p. 490-498, 2004.

MIYAZAKI, J.H.; YANG, S.F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine synthesis. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 69, p. 366-370, 1987.

MONTEIRO, F.A.; CONSOLMAGNO NETO, D. Sistema radicular do capim-tanzânia adubado com potássio e magnésio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, p. 810-818, 2008.

NAPHADA, G.D.; MUTALKA, V.K. Effect of phosphorus fertilizer in Saurashtra soil. Effect of sulphur and phosphatic fertilizers on the growth of groundnut and maize. **Saurashtra Journal of Agricultural Soil**, Rajkot, v. 7, p. 5-10, 1984.

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

NOBLE, J.C.; KLEINIG, C.R. Response by irrigated grain sorghum to broadcast gypsum and phosphorus on a heavy clay soil. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Melbourne, v. 11, p. 53-58, 1971.

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

PERFUS-BARBEOCH, L.; LEONHARDT, N.; VAVADDEUR, A.; FORESTIER, C. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. **Plant Journal**, Malden, v. 32, p. 539-548, 2002.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, p. 525-545, 1995.

REDJALA, T.; STERCKEMAN, T.; MOREL, J.L. Cadmium uptake by roots: contribution of apoplast and of high- and low-affinity membrane transport systems. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 67, p. 235-242, 2009.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; CORPAS, F.J.; RODRIGUEZ-SERRANO, M.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, p. 1346-1357, 2007.

ROUHIER, N.; LEMAIRE, S.D.; JACQUOT, J.P. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 143-166, 2008.

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**, Berlin, v. 59, p. 231-245, 2013.

SANITÁ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 105-130, 1999.

SANTOS, A.R.; MONTEIRO, F.A. Produção e perfilhamento de *Brachiaria decumbens* Stapf. em função de doses de enxofre. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, p. 689-692, 1999.

SATARUG, S.; BAKER, J.R.; REILLY, P.E.B.; MOORE, M.R.; WILLIAMS, D.J. Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex and urine samples from Australians without occupational exposure to metals. **Archives of Environmental Health**, Rockville, v. 57, p. 69-77, 2002.

SCHERER, H.W. Sulfur in crop production- invited paper. **European Journal of Agronomy**, Amsterdam, v. 14, p. 81-111, 2001.

SCHMIDT, A.; JAGER, K. Open questions about sulfur metabolism in plants. **Annual Review in Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 325-349, 1992.

SCHMIDT, F. **Modificações morfológicas e metabólicas em gramínea e leguminosa forrageiras tropicais relativas ao suprimento de enxofre**. 2012. 164p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012.

SCHMIDT, F.; DE BONA, F.D.; MONTEIRO, F.A. Sulfur limitation increases nitrate and amino acid pools in tropical forages. **Crop & Pasture Science**, Victoria, v. 64, p. 51-60, 2013.

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 Scot Pine roots. **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 887-898, 2001.

SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Cadmium uptake and its toxicity in higher plants. In: KHAN, N.A.; SAMIULLAH, N. (Ed.). **Cadmium toxicity and tolerance in plants**. New Delhi: Publishing House, 2006. chap. 4, p. 64-86.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TUKENDORF, A.; RAUSER, W.E. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Science**, Shannon, v. 70, p. 155-166, 1990.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Mechanisms to cope with arsenic or cadmium excess in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 12, p. 364-372, 2009.

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



### 3 CÁDMIO DIMINUI A PRODUÇÃO DE MASSA DO CAPIM-TANZÂNIA E ENXOFRE ATENUA A TAXA DE MORTALIDADE DE PERFILHOS NA REBROTAÇÃO DA GRAMÍNEA

#### Resumo

Dependendo da concentração no tecido vegetal, o cádmio ocasiona alterações morfológicas, morfogênicas e produtivas nas plantas. Uma alternativa para aumentar a tolerância das plantas ao cádmio é o fornecimento de enxofre, uma vez que esse nutriente participa de compostos do sistema antioxidante das plantas. Objetivou-se avaliar a variação nos aspectos morfológicos, morfogênicos e produtivos do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) cultivado com combinações de doses de enxofre (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup>) e de cádmio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva, em esquema fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, em blocos ao acaso, com seis repetições. Em cada vaso foram cultivadas seis plantas. O primeiro corte foi realizado 40 dias após o transplântio das mudas para os vasos e o segundo corte 18 dias após o primeiro. No segundo crescimento do capim-tanzânia o fornecimento de cádmio aumentou a taxa de mortalidade de perfilhos do capim-tanzânia, enquanto o enxofre atenuou a mortalidade causada pelo cádmio. O teor de água, número de perfilhos, taxa de aparecimento de perfilhos, número de folhas, área foliar, taxa de aparecimento foliar, razão de área foliar e produção de massa seca da parte aérea e raízes foram menores com o incremento da concentração de cádmio em solução nutritiva. Em condições de alta disponibilidade de cádmio, o crescimento e a produtividade do capim-tanzânia são prejudicados.

Palavras-chave: Ambiente contaminado; Área foliar; *Panicum maximum*; Perfilhamento

#### Abstract

Depending on the concentration in plant tissue, cadmium causes morphological, morphogenesis and productive changes. Alternatively, sulfur supply may increase cadmium plant tolerance as this nutrient is part of important compounds that are involved in plant antioxidative system. Thus, it was aimed to evaluate variations in morphological, morphogenesis and productive aspects in Tanzania guineagrass (*Panicum maximum*) grown in nutrient solution with combinations of sulfur rates (0.1, 1.0, 1.9, 2.8 and 3.7 mmol L<sup>-1</sup>) and cadmium rates (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mmol L<sup>-1</sup>) by using a fractionated factorial 5<sup>2</sup>, in randomized block design, with six replications. The first harvest of Tanzania guineagrass was performed at 40 days after seedlings transplanting to the pots, and the second at 18 days after the first harvest. After the first harvest, the cadmium increased the mortality of tillers while sulfur has attenuated. Water content, number of tillers, tiller emergence rate, number of leaves, leaf area, leaf emergence rate, ratio of leaf area and dry mass of shoots and roots were lower with increased cadmium supply in nutrient solution. Under conditions of high availability of cadmium, growth and productivity of Tanzania guineagrass are damaged.

Keywords: Contaminated environment; Leaf area; *Panicum maximum*; Tillering

### 3.1 Introdução

Nas décadas mais recentes a concentração de cádmio no ambiente aumentou consideravelmente em razão das atividades antrópicas (SANITÁ DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999), com destaque para o descarte de resíduos gerados em processos industriais e a aplicação de fertilizantes fosfatados (CHOU et al., 2011). Em concentrações elevadas nas células vegetais o cádmio pode exercer efeitos adversos no metabolismo e crescimento de plantas (HEGEDÜS; ERDEI; HORVÁTH, 2001), bem como causar sérios problemas de saúde (BENZARTI; HAMDI; MOHRI, 2010) em animais e seres humanos (GRYTZYUK et al., 2006). Esse fato motiva a busca por tecnologias ou processos que minimizem os efeitos negativos desse elemento no ambiente (GALLEGO et al., 2012).

Recentemente, o cultivo de espécies forrageiras em ambientes contaminados por metais pesados tem sido avaliado na reabilitação desses ambientes (MIRANDA et al., 2012), uma vez que esse grupo de plantas é caracterizado pela facilidade de cultivo, adaptação a diversos ambientes (ZHANG et al., 2010) e por possuir sistema radicular normalmente extenso, o que é extremamente desejável (NASCIMENTO; XING, 2006). Outra alternativa é a fertilização do solo com enxofre como meio de fornecer esse nutriente às plantas (GILL; TUTEJA, 2011), visto que esse nutriente participa de compostos do sistema antioxidante que aumentam a tolerância das plantas aos metais pesados (GILL; TUTEJA, 2011; GILL; KHAN; TUTEJA, 2012).

A absorção de cádmio pelas plantas resulta em alterações morfológicas, morfogênicas e produtivas (CHEN et al., 2012). Normalmente, a aplicação de cádmio diminui o número de perfilhos (ZHANG; FUKAMI; SEKIMOTO, 2000), a área foliar (SANDALIO et al., 2001) e a produção de massa da parte aérea (CUI; WANG, 2006; KHAN; SINGH; NAZAR, 2007) e das raízes (HATATA; ABDEL-AAL, 2008) das plantas. Todavia, não existem estudos que mostrem o efeito da aplicação de enxofre em plantas forrageiras cultivadas em ambientes com variada disponibilidade de cádmio. Assim, objetivou-se avaliar a variação nos aspectos morfológicos, morfogênicos e produtivos do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) cultivado com combinações de doses de enxofre e cádmio em solução nutritiva.

### 3.2 Material e Métodos

#### 3.2.1 Tratamentos, delineamento experimental e solução nutritiva

O experimento foi desenvolvido em casa de vegetação (latitude 22° 43" S e longitude 47° 38" O), no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013, cultivando-se a gramínea forrageira *Panicum maximum* cv. Tanzânia. Foram testadas cinco doses de enxofre (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup>) e cinco doses de cádmio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>), combinadas e fornecidas em solução nutritiva (Tabela 1), em conformidade com o esquema fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, como descrito por Littell e Mott (1975). Os vasos foram distribuídos em blocos ao acaso, com seis repetições.

Tabela 1 - Volumes das soluções estoque empregadas no preparo das soluções nutritivas para as combinações de doses de enxofre e cádmio

<b>Enxofre (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>0,1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1,9</b>	<b>1,9</b>	<b>1,9</b>	<b>2,8</b>	<b>2,8</b>	<b>3,7</b>	<b>3,7</b>	<b>3,7</b>
<b>Cádmio (mmol L<sup>-1</sup>)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>1,5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>0,5</b>	<b>1,5</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>Solução estoque</b>	<b>Volume (mL L<sup>-1</sup>)</b>												
CdCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
KNO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
KCl (1 mol L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1 mol L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	1	1	1,9	1,9	1,9	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	1,9	1,9	1,9	1	1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (0,01 mol L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-	-	-	-	80	80	170	170	170
CaCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	5	5	5	5	5	5	5	5	4,2	4,2	3,3	3,3	3,3
Micronutrientes - Fe*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe(III) - EDTA**	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

\*Composição da solução estoque de micronutrientes (μmol L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 46; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O = 9; ZnCl<sub>2</sub> = 0,73; CuCl<sub>2</sub> = 0,30 e H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O = 0,11.

\*\*Fe(III) - EDTA = 100 μmol L<sup>-1</sup>.

#### 3.2.2 Instalação, condução do experimento e coleta do material vegetal

As sementes da forrageira foram germinadas em bandejas contendo areia lavada em água corrente e desionizada, com fornecimento diário de água desionizada. Decorridos 11 dias da semeadura, 15 plântulas foram transplantadas para vasos plásticos, com capacidade de



3,8 L (20 cm de altura e 15,5 cm de diâmetro) contendo quartzo moído como substrato. Foram realizados desbastes periódicos até permanecerem seis plantas por vaso.

Um dia após o transplântio e pelo período de sete dias, cada vaso recebeu um litro das soluções nutritivas preparadas a partir da solução de Hoagland e Arnon (1950), diluídas a 25% da força iônica e modificadas para atender as doses de enxofre. Entre o oitavo e vigésimo oitavo dia foram fornecidas as soluções não diluídas e modificadas para atender as doses de enxofre. A partir do vigésimo nono dia foram disponibilizadas as soluções não diluídas, modificadas para atender as doses de enxofre e cádmio, pelo período de 11 dias.

Inicialmente, as soluções permaneceram nos vasos durante o dia e a noite, sendo circuladas pelo substrato quatro vezes ao dia durante uma semana. Posteriormente, foram drenadas à noite, fornecidas pela manhã e circuladas pelo substrato três vezes ao dia. As soluções modificadas para atender as doses de enxofre foram trocadas a cada sete dias.

O primeiro corte do capim-tanzânia foi realizado 40 dias após o transplântio, 5 cm acima da superfície do substrato, adotando como critério o início do processo de senescência das folhas maduras das plantas que estavam em estado fisiológico mais avançado.

Durante a condução do segundo crescimento houve fornecimento apenas das soluções não diluídas e modificadas para atender as doses de enxofre, devido a menor produção de biomassa causada pelo efeito residual do cádmio. As soluções modificadas para atender as doses de enxofre também foram trocadas a cada sete dias. O segundo corte foi realizado 18 dias após o primeiro corte, ao nível do substrato, quando as folhas maduras das plantas que estavam em estado fisiológico mais avançado iniciaram o processo de senescência.

### **3.2.3 Avaliações**

#### **3.2.3.1 Parâmetros morfológicos**

Os números de perfilhos e de folhas do capim-tanzânia foram quantificados na ocasião das duas colheitas. As avaliações de área foliar foram realizadas em seis blocos ao final do primeiro corte e em três blocos ao final do segundo corte devido à menor produção de material vegetal e necessidade de realização das análises envolvendo o sistema antioxidante. A área foliar foi determinada por meio do aparelho integrador de área foliar LICOR<sup>®</sup>, modelo LI 3100. A razão de área foliar foi calculada pelo quociente entre a área foliar e a produção de massa seca da parte aérea, conforme reportado por Benincasa (2003).

Após a segunda colheita da parte aérea, as raízes foram separadas do substrato com o auxílio de peneira de malha de 0,25 mm e lavadas com água corrente e água desionizada. Uma subamostra do sistema radicular próximo a 20% da massa fresca total foi coletada para determinar o comprimento e a superfície total das raízes de cada vaso, conforme proposto por Rossiello et al. (1995). Essas subamostras foram colocadas em solução de violeta genciana a 50 mg L<sup>-1</sup> durante 24 horas, para que todas as raízes ficassem tingidas. Posteriormente, as raízes foram digitalizadas em *scanner* HP® Scanjet 3670 (Hewlett-Packard Development Company, Houston, Texas, EUA) e submetidas ao aplicativo SIARCS (Sistema Integrado para Análise de Raízes e Cobertura do Solo) versão 3.0.

O comprimento específico foi calculado pela razão entre o comprimento total e a produção de massa seca de raízes e a superfície específica foi calculada pela razão entre a superfície e a produção de massa seca de raízes, conforme descrito por Crestana et al. (1994).

### **3.2.3.2 Parâmetros morfogênicos**

A taxa de aparecimento de perfilhos foi obtida pelo quociente entre o número de perfilhos surgidos a cada três dias e o número total de perfilhos existentes. A taxa de mortalidade foi obtida pela subtração do número de perfilhos surgidos a cada três dias pelo número de perfilhos sobreviventes, em relação ao número de perfilhos marcados nas contagens anteriores. Os perfilhos de cada contagem foram marcados com fios plásticos de cores distintas (CARVALHO et al., 2000).

A taxa de aparecimento foliar (folhas surgidas por perfilho em um dia) foi calculada pelo quociente entre o número de folhas surgidas por perfilho e o intervalo de tempo de avaliação (intervalos de três dias). O filocrono (número de dias necessários para o surgimento de uma folha) foi obtido pelo inverso da taxa de aparecimento foliar (BENINCASA, 2003).

### **3.2.3.3 Parâmetros produtivos**

Todo material vegetal colhido foi colocado em estufa de ventilação forçada a 60°C durante 72 horas, com posterior pesagem em balança de precisão para a obtenção dos resultados do teor de água e produções de massa seca da parte aérea e das raízes do capim-tanzânia. O teor de água do capim-tanzânia foi calculado a partir da massa da parte aérea no momento dos cortes e a massa após secagem em estufa, conforme descrito por Fernández et al. (2013).

### 3.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa “SAS” (SAS Institute, 2008). Inicialmente utilizou-se o teste F e, nos casos de significância da interação doses de enxofre x doses de cádmio, efetuou-se a análise de regressão polinomial (superfície de resposta) por meio do procedimento RSREG. Nos casos em que a interação doses de enxofre x doses de cádmio não foi significativa, efetuou-se o estudo de regressão de primeiro e segundo graus pelo programa gráfico estatístico SigmaPlot (SIGMAPLOT, 2004). Também foram realizados estudos de correlação entre as variáveis analisadas. Os símbolos (\*) e (\*\*) nas equações de regressão e nos coeficientes de correlação de Pearson indicam os níveis de significância de 5 e 1%, respectivamente.

## 3.3 Resultados e Discussão

### 3.3.1 Teor de água na parte aérea

O teor de água da parte aérea do capim-tanzânia coletada no primeiro corte não mostrou significância para a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Todavia, na parte aérea coletada no segundo corte, o teor de água do capim-tanzânia foi alterado significativamente pelas doses de cádmio, com os resultados ajustando-se ao modelo de segundo grau. O maior teor de água foi verificado na ausência de cádmio em solução nutritiva, enquanto o menor teor de água foi verificado com o fornecimento de cádmio de  $1,45 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 1).

O balanço hídrico das plantas é modificado pela presença de metais pesados, uma vez que são alteradas a permeabilidade da membrana plasmática (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005) e a abertura estomática (SANITÁ DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999), o que usualmente proporciona reduções no teor de água da planta (DAS; SAMANTARAY; ROUT, 1997). Fernández et al. (2013) avaliaram duas populações de *Dittrichia viscosa* cultivadas com doses de cádmio (44,6; 89,2 e  $133,8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e verificaram redução média de 4,25% no teor de água das plantas, com a elevação das doses de cádmio.

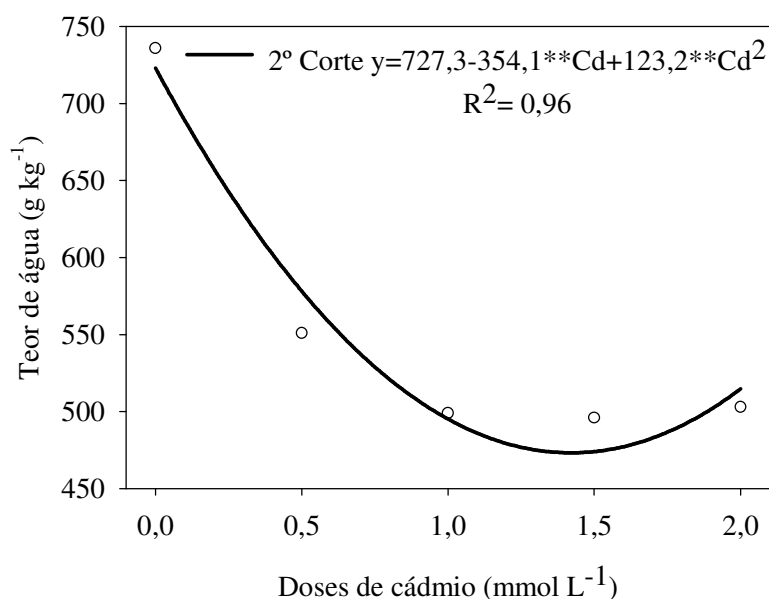


Figura 1 - Teor de água na parte aérea do capim-tanzânia em função de doses de cádmio em solução nutritiva

### 3.3.2 Perfилhos

Para o número de perfilhos, a taxa de aparecimento e a taxa de mortalidade de perfilhos do capim-tanzânia na ocasião do primeiro corte não foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Todavia, no segundo corte, o número de perfilhos (Figura 2A) e a taxa de aparecimento de perfilhos (Figura 2B) diminuíram linearmente com a elevação das doses de cádmio.

Em condições de alta disponibilidade de cádmio, algumas espécies vegetais absorvem e alocam o cádmio na base da planta, especificamente nas gemas que originam novos perfilhos (FUJIMAKI et al., 2010), ocasionando alterações fisiológicas (PRASAD, 1995) que determinam redução na taxa de aparecimento de perfilhos, e conseqüentemente, no número de perfilhos. Reed et al. (1999) analisaram o efeito de doses de cádmio (8,92; 17,84; 26,76; 35,68; 71,36 e 142,72  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em parâmetros morfológicos de quatro cultivares (Alamo, Blackwell, Cave-in-Rock e Trailblazer) de *Panicum virgatum* e relataram menor perfilhamento das forrageiras com a elevação das doses de cádmio.

Na taxa de mortalidade de perfilhos verificada durante o segundo período de crescimento do capim-tanzânia foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Aproximadamente 60% dos perfilhos morreram em condições de baixo suprimento de enxofre (0,1  $\text{mmol L}^{-1}$ ) e alta disponibilidade de cádmio (2  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Porém, em

condições de alto suprimento de enxofre ( $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e alta disponibilidade de cádmio a taxa de mortalidade de perfilhos foi de 35% (Figura 2C).

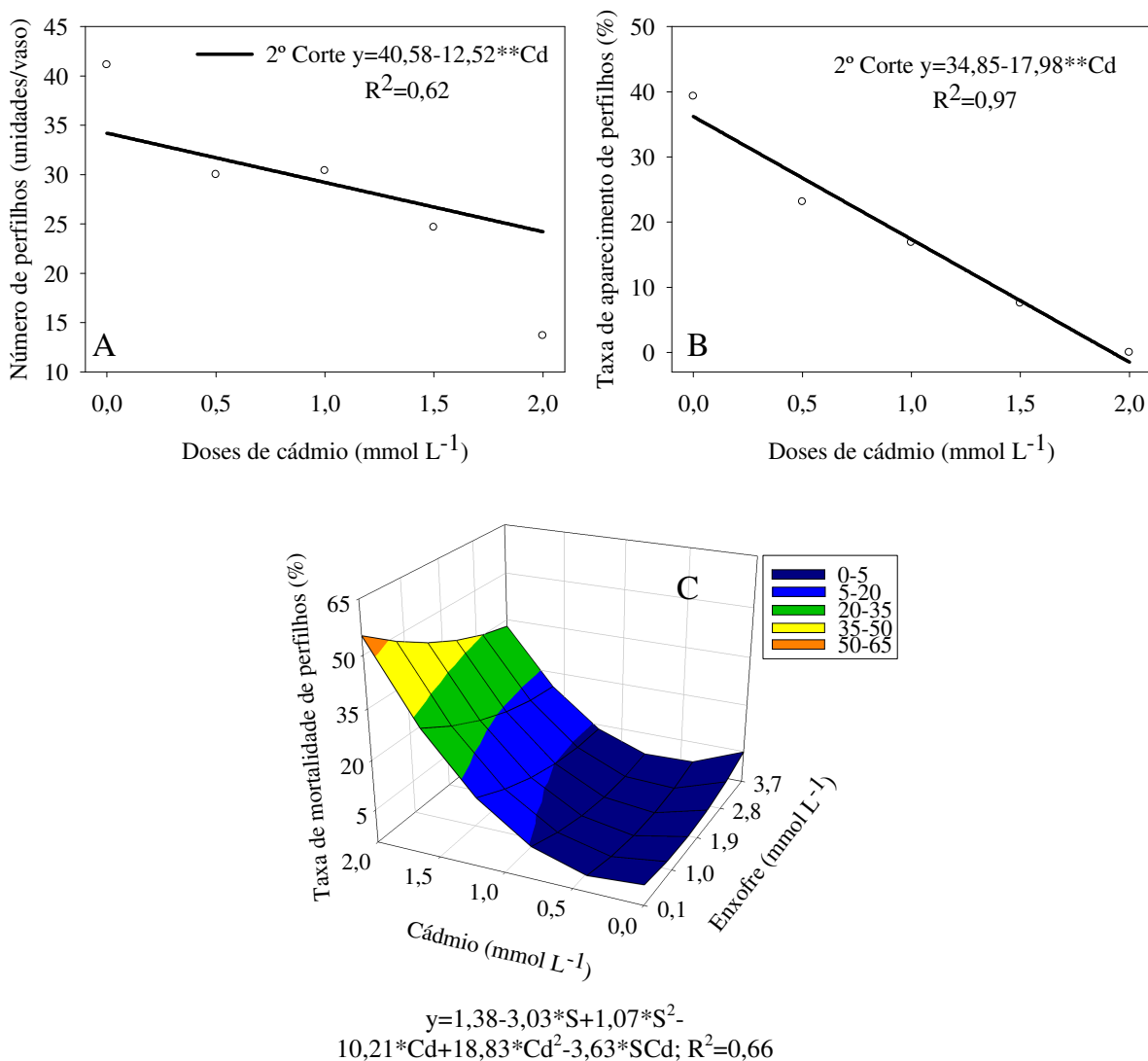


Figura 2 - Número de perfilhos (A) e taxa de aparecimento de perfilhos (B) em função de doses de cádmio e taxa de mortalidade de perfilhos no segundo corte (C) do capim-tanzânia em função das combinações de doses de enxofre e de cádmio em solução nutritiva

Esse resultado demonstra que quando há maior fornecimento de enxofre, ocorre maior biossíntese de cisteína, metionina, glutatona reduzida (GSH) e fitoquelatinas, que atuam diretamente na desintoxicação de cádmio (CLEMENS, 2006; HALL, 2002), atenuando os efeitos negativos causados pelo metal pesado à planta. Hassan et al. (2005) avaliaram o efeito da aplicação de enxofre ( $0,2$ ;  $0,4$  e  $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) em arroz (*Oryza sativa*) cultivado na ausência e presença de cádmio ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e relataram que o fornecimento das mais elevadas

doses de enxofre proporcionou maior perfilhamento das plantas cultivadas na presença de cádmio.

### 3.3.3 Folhas

Para o número de folhas no primeiro corte da parte aérea do capim-tanzânia não foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Entretanto, no segundo corte das plantas, o número de folhas diminuiu linearmente com o aumento das doses de cádmio, de forma que, comparando a ausência de aplicação com a dose de cádmio de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , nota-se redução de 89% no número de folhas do capim-tanzânia por vaso (Figura 3A). A área foliar no primeiro e segundo cortes da parte aérea do capim-tanzânia também foi alterada significativamente pelas doses de cádmio em solução nutritiva. No primeiro corte, a menor área foliar foi verificada com o fornecimento de cádmio de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e no segundo corte o fornecimento de  $1,55 \text{ mmol L}^{-1}$  resultou em área foliar próximo a zero. Invariavelmente a área foliar obtida no segundo corte das plantas foi menor do que no primeiro corte (Figura 3B).

A concentração de cádmio em organelas da planta normalmente aumenta em condições de alta disponibilidade desse elemento no meio de crescimento, interferindo negativamente em processos fisiológicos essenciais (SANITÁ DI TOPPI; GABBRIELLI, 1999). O cádmio proporciona aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) nos tecidos vegetais, inibe a biossíntese de clorofila e reduz a atividade de enzimas que atuam na fixação do  $\text{CO}_2$  (DE FILIPPIS; ZIEGLER, 1993; STOBART et al., 1985), diminuindo o número de folhas e a área foliar. Khan, Samiullah e Nazar (2007) avaliaram o efeito do cádmio ( $0,89 \text{ mmol kg}^{-1}$  de solo) em genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) e relataram reduções médias de 36 e 44% no número de folhas e na área foliar, em relação ao tratamento sem aplicação de cádmio, respectivamente.

A taxa de aparecimento foliar e o filocrono durante o primeiro crescimento da parte aérea do capim-tanzânia foram alterados significativamente pelas doses de cádmio em solução nutritiva. A menor taxa de aparecimento foliar foi obtida quando houve fornecimento de cádmio de  $1,39 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 3C) e o maior filocrono foi verificado com o fornecimento de  $0,92 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 3D). Ao comparar a ausência de fornecimento de cádmio com as doses de  $1,39$  e  $0,92 \text{ mmol L}^{-1}$  nota-se redução de 69% na taxa de aparecimento foliar e aumento de 109% no filocrono, respectivamente. No segundo crescimento do capim-tanzânia, a taxa de aparecimento foliar e o filocrono não mostraram significância para a interação doses de enxofre x doses de cádmio, bem como para doses de enxofre e doses de cádmio.

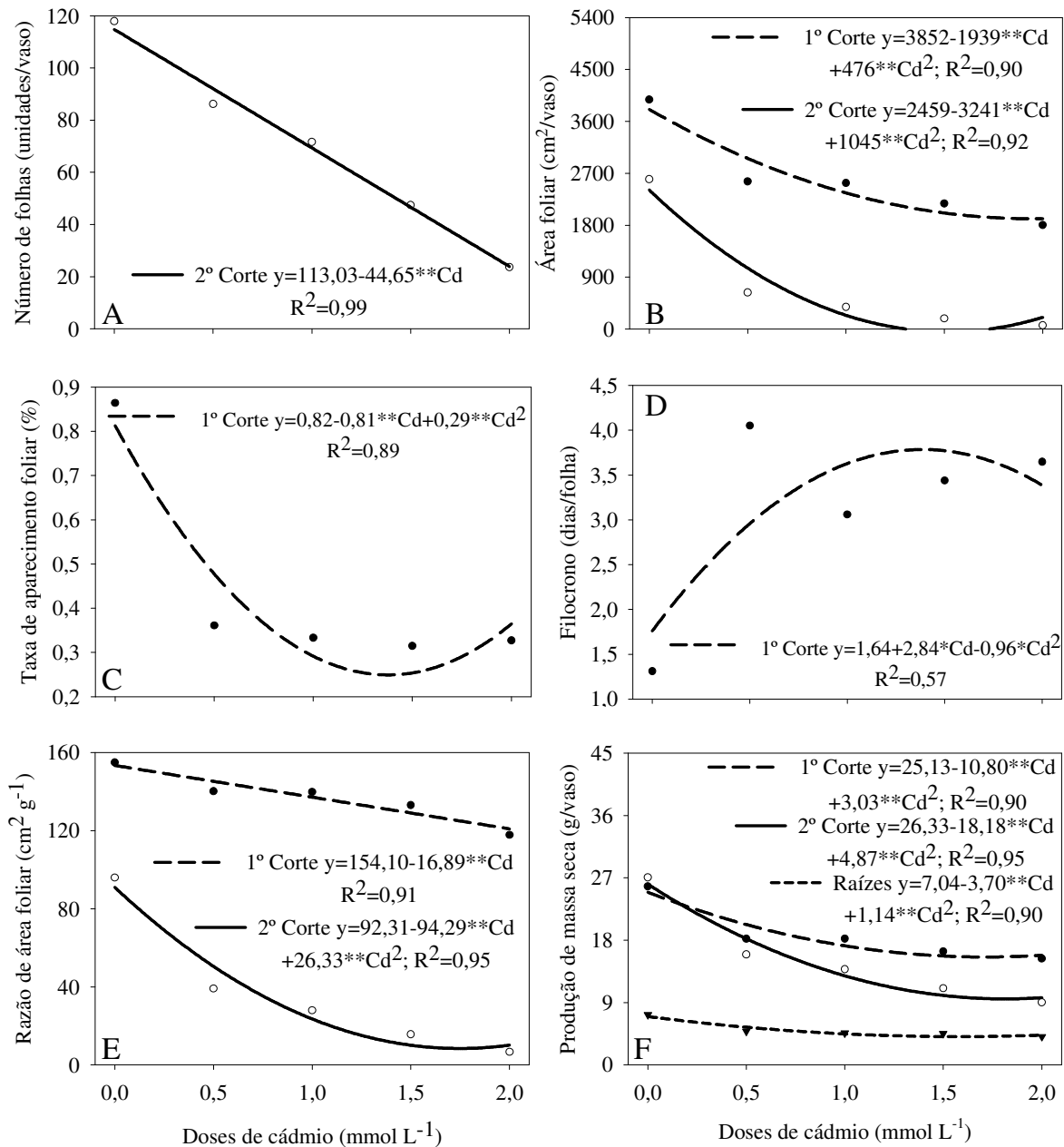


Figura 3 - Número de folhas (A), área foliar (B), filocrono (C), taxa de aparecimento foliar (D), razão de área foliar (E) e produção de massa seca (F) do capim-tanzânia ao final do primeiro e segundo crescimentos, em função de doses de cádmio em solução nutritiva

Em plantas forrageiras a taxa de aparecimento foliar é influenciada pela taxa fotossintética e pelo uso do nitrogênio, uma vez que esse nutriente interfere na ativação dos tecidos meristemáticos, estimulando o crescimento da planta (NABINGER, 1996). O cádmio altera o metabolismo do nitrogênio (MÁRQUEZ-GARCIA et al., 2011) e modifica o aparato fotossintético (STOBART et al., 1985), repercutindo de maneira negativa na taxa de

aparecimento foliar e filocrono, por aumentar o tempo necessário para a folha crescer entre o meristema apical e a extremidade do pseudocolmo formado pelas bainhas das folhas mais velhas (SKINNER; NELSON, 1994).

A razão de área foliar no primeiro corte da parte aérea do capim-tanzânia diminuiu linearmente com o aumento das doses de cádmio em solução nutritiva, de forma que o fornecimento de cádmio de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  diminuiu a razão de área foliar em 22% em relação à ausência de cádmio. No segundo corte da parte aérea a razão de área foliar ajustou-se ao modelo de segundo grau, onde o fornecimento de cádmio de  $1,79 \text{ mmol L}^{-1}$  diminuiu em 91,45% a razão de área foliar em relação à ausência de fornecimento de cádmio (Figura 3E).

O cádmio diminui o teor de água da planta, a pressão de turgor celular (BENAVIDES; GALLEG0; TOMARO, 2005), inibe a atividade de enzimas da membrana plasmática, como a  $\text{H}^+$ -ATPase, e altera a composição de lipídeos da membrana plasmática (MEHARG, 1993; QUARTACCI; COSI; NAVARI-IZZO, 2001). Esses efeitos diminuem a expansividade da parede celular, os quais associados aos efeitos negativos causados pelo cádmio ao aparato fotossintético das plantas resultam em menor produção de folhas, geralmente necrosadas (BENAVIDES; GALLEG0; TOMARO, 2005) e diminuem a razão de área foliar.

### 3.3.4 Produção de massa seca

Os resultados de produção de massa seca no primeiro e segundo cortes da parte aérea do capim-tanzânia ajustaram-se ao modelo de segundo grau, revelando que a produção de massa diminuiu em 39% no primeiro crescimento e 65% no segundo crescimento, com o fornecimento de cádmio de 1,78 e  $1,86 \text{ mmol L}^{-1}$  em solução nutritiva, respectivamente (Figura 3F). A menor produção de massa seca da parte aérea ocasionada pelo fornecimento de cádmio ocorreu em função do menor perfilhamento e produção de folhas quando houve maior disponibilidade de cádmio para as raízes do capim-tanzânia.

A produção de massa seca das raízes também se ajustou ao modelo de segundo grau, diminuindo em 43% com o fornecimento de cádmio de  $1,62 \text{ mmol L}^{-1}$  em relação à ausência de aplicação de cádmio (Figura 3F). O cádmio é facilmente absorvido pelas raízes das plantas (BENAVIDES; GALLEG0; TOMARO, 2005) e, em condições de alta disponibilidade desse elemento, ocorre a morte de células da raiz, impossibilitando o desenvolvimento radicular (FERNÁNDEZ et al., 2013). Reed et al. (2002) avaliaram o efeito do cádmio (0,44; 0,88 e  $1,78 \text{ mmol kg}^{-1}$  de solo) em *Panicum virgatum* e relataram que a produção de massa seca da parte aérea e das raízes diminuiu com a elevação das doses de cádmio.



### 3.3.5 Correlações

O número de perfilhos correlacionou-se negativamente com a taxa de mortalidade de perfilhos e filocrono do capim-tanzânia no primeiro crescimento, porém, correlacionou-se de forma positiva com a produção de massa seca da parte aérea no primeiro e segundo cortes. O número de folhas também se correlacionou negativamente com o filocrono, mas apresentou correlação positiva com a taxa de aparecimento foliar e produção de massa seca no primeiro corte das plantas. O maior valor de coeficiente de correlação no primeiro corte foi obtido entre a área foliar e a produção de massa seca da parte aérea do capim-tanzânia (Tabela 2).

Tabela 2 - Coeficiente de correlação de Pearson entre parâmetros morfológicos, morfogênicos e produtivos do capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e cádmio em solução nutritiva

<b>Primeiro corte (n=78)</b>						
	<i>TAP</i>	<i>TMP</i>	<i>TAF</i>	<i>FIL</i>	<i>RAF</i>	<i>PMS</i>
<i>NP</i>	0,20 <sup>ns</sup>	-0,40**	0,15 <sup>ns</sup>	-0,31**	0,02 <sup>ns</sup>	0,28*
<i>NF</i>	-0,15 <sup>ns</sup>	-0,20 <sup>ns</sup>	0,28*	-0,33**	-0,02 <sup>ns</sup>	0,40**
<i>AF</i>	0,00 <sup>ns</sup>	-0,05 <sup>ns</sup>	0,69**	-0,48**	0,68**	0,92**
<b>Segundo corte (n=39)</b>						
	<i>TAP</i>	<i>TMP</i>	...	...	<i>RAF</i>	<i>PMS</i>
<i>TA</i>	-0,27 <sup>ns</sup>	-0,00 <sup>ns</sup>	...	...	0,18 <sup>ns</sup>	0,88**
<i>NP</i>	0,86**	-0,84**	...	...	0,36*	-0,07 <sup>ns</sup>
<i>NF</i>	0,85**	-0,78**	...	...	0,34 <sup>ns</sup>	-0,16 <sup>ns</sup>
<i>AF</i>	0,02 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	...	...	-0,56**	-0,05 <sup>ns</sup>
<b>Raízes (n=78)</b>						
	...	...	...	...	...	<i>PMS</i>
<i>SR</i>	...	...	...	...	...	0,00 <sup>ns</sup>
<i>CR</i>	...	...	...	...	...	0,08 <sup>ns</sup>
<i>SRE</i>	...	...	...	...	...	-0,30*
<i>CRE</i>	...	...	...	...	...	-0,32*

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns - não significativo. NP - número de perfilhos; TAP - taxa de aparecimento de perfilhos; TMP - taxa de mortalidade de perfilhos; NF - número de folhas; TAF - taxa de aparecimento foliar; FIL - filocrono; RAF - razão de área foliar; AF - área foliar; PMS - produção de massa seca; TA - teor de água; SR; superfície radicular; CR - comprimento radicular; SRE - superfície radicular específica; CRE - comprimento radicular específico.

No segundo crescimento, o maior valor do coeficiente de correlação foi verificado entre o teor de água e a produção de massa seca da parte aérea do capim-tanzânia. Isto poderia ser esperado, uma vez que o teor de água altera processos fisiológicos essenciais na planta, repercutindo em aspectos morfológicos determinantes para a produção de biomassa

(BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005; PRASAD, 1995). O número de perfilhos e de folhas correlacionou-se positivamente com a taxa de aparecimento de perfilhos e de forma negativa com a taxa de mortalidade de perfilhos no segundo crescimento do capim-tanzânia (Tabela 2). Pedreira, Mello e Otani (2001) destacaram que o número de folhas e a taxa de aparecimento foliar determinam o número potencial de pontos de aparecimento de perfilhos, alterando a taxa de aparecimento e taxa de mortalidade de perfilhos.

A superfície e o comprimento radiculares específicos apresentaram correlação negativa com a produção de massa seca radicular do capim-tanzânia (Tabela 2), uma vez que são obtidos, respectivamente, pelo quociente entre a superfície radicular e a produção de massa seca radicular e o comprimento radicular e a produção de massa seca radicular.

### 3.4 Conclusões

Em condições de alta disponibilidade, o cádmio diminui o teor de água, o perfilhamento, a taxa de perfilhamento, o número de folhas e a taxa de aparecimento foliar do capim-tanzânia, o que repercute de maneira negativa no crescimento da planta, resultando em menor produção de massa pelo capim-tanzânia. O fornecimento de enxofre atenua a taxa de mortalidade de perfilhos do capim-tanzânia.

### Referências

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

BENINCASA, M.M.P. **Análise de crescimento de plantas**: noções básicas. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2003. 41p.

BENZARTI, S.; HAMDI, H.; MOHRI, S. Response of antioxidative enzymes and apoplastic bypass transport in *Thlaspi caerulescens* and *Raphanus sativus* to cadmium stress. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 12, p. 733-744, 2010.

CARVALHO, C.A.B.; DA SILVA, S.C.; SBRISIA, A.F.; PINTO, L.F.M.; CARNEVALLI, R.A.; FAGUNDES, J.L.; PEDREIRA, C.G.S. Demografia do perfilhamento e taxas de acúmulo de matéria seca em capim 'Tifton 85' sob pastejo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, p. 591-600, 2000.

CHEN, Z.; ZHANG, H.; GUO, W.; ZHANG, L.; TIAN, Y.; WEI, X. Cadmium stress on wheat morphology: germination and growth. **Advanced Materials Research**, Zurich, v. 356-360, p. 1075-1078, 2012.

- CHOU, T.; CHAO, Y.; HUANG, W.; HONG, C.; KAO, C.H. Effect of magnesium deficiency on antioxidant status and cadmium toxicity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 168, p. 1021-1030, 2011.
- CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, Paris, v. 88, p. 1707-1719, 2006.
- CRESTANA, S.; GUIMARÃES, M.S.; JORGE, L.A.C.; RALISCH, R., TOZZI, C.L.; TORRE, A.; VAZ, C.M.P. Avaliação da distribuição de raízes no solo auxiliada por processamento de imagens digitais. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, p. 365-371, 1994.
- CUI, Y.; WANG, Q. Physiological responses of maize to elemental sulphur and cadmium stress. **Plant, Soil and Environment**, Praha, v. 52, p. 523-529, 2006.
- DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R. Studies on cadmium toxicity in plants: a review. **Environmental Pollution**, Oxford, v. 98, p. 29-36, 1997.
- DE FILIPPIS, L.F.; ZIEGLER, H. Effect of sublethal concentrations of zinc, cadmium and mercury on the photosynthetic carbon reduction cycle of *Eugena*. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 142, p. 167-172, 1993.
- FERNÁNDEZ, R.; BERTRAND, A.; REIS, R.; MOURATO, M.P.; MARTINS, L.L.; GONZÁLEZ, A. Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 244-245, p. 555-562, 2013.
- FUJIMAKI, S.; SUZUI, N.; ISHIOKA, N.S.; KAWACHI, N.; ITO, S.; CHINO, M.; NAKAMURA, S. Tracing cadmium from culture to spikelet: noninvasive imaging and quantitative characterization of absorption, transport and accumulation of cadmium in an intact rice plant. **Plant Physiology**, Jena, v. 152, p. 1796-1806, 2010.
- GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E.; IANNONE, 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**, Oxford, v. 83, p. 33-46, 2012.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Cadmium stress tolerance in crop plants probing the role of sulfur. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 6, p. 215-222, 2011.
- GILL, S.S.; KHAN, N.A.; TUTEJA, N. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 182, p. 112-120, 2012.
- GRYTSYUK, N.; ARAPIS, G.; PEREPELYATNIKOVA, L.; IVANOVA, T.; VYNOGRADS'KA, V. Heavy metals effects on forage crops yields and estimation of elements accumulation in plants as affected by soil. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 354, p. 224-231, 2006.

HEGEDÜS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Shannon, v. 160, p. 1085-1093, 2001.

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

HASSAN, M.J.; WANG, Z.; ZHANG, G. Sulfur alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium toxicity in rice. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, p. 1785-1800, 2005.

HATATA, M.M.; ABDEL-AAL, E.A. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Dubai, v. 4, p. 655-669, 2008.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experimental Station, 1950. 347 p. (Circular, 347)

KHAN, N.A.; SINGH, S.S.; NAZAR, R. 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**, Malden, v. 193, p. 435-444, 2007.

LITTELL, R.C.; MOTT, G.O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Soil and Crop Society of Florida Proceedings**, Ona, v. 34, p. 94-97, 1975.

MÁRQUEZ-GARCIA, B.; HOREMANS, N.; CUYPERS, A.; GUISEZ, Y.; CÓRDOB, F. Antioxidants in *Erica andevalensis*: A comparative study between wild plants and cadmium-exposed plants under controlled conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, p. 110-115, 2011.

MEHARG, A.A. The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, p. 191-198, 1993.

MIRANDA, V.S.; RIBEIRO, K.G.; SILVA, A.C.; PEREIRA, R.C.; PEREIRA, O.G.; VIDAL-TORRADO, P.; FERNANDES, J.S.C.; OLIVEIRA, M.C. Rehabilitation with forage grasses of an area degraded by urban solid waste deposits. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, p. 18-23, 2012.

NABINGER, C. Princípios da exploração intensiva de pastagens. In.: PEIXOTO, M.; MOURA, J.C.; FARIA, V.P. (Ed.). **Produção de bovinos a pasto**. Piracicaba: FEALQ, 1996. cap. 2, p. 15-95.

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

PEDREIRA, C.G.S.; MELLO, A.C.L.; OTANI, L. O processo de produção de forragem em pastagens brasileiras. In: MATTOS, W.R.S. (Ed.). **Produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001, cap. 12, p. 772-807.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, p. 525-545, 1995.

QUARTACCI, M.F.; COSI, E.; NAVARI-IZZO, F. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membranes vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 77-84, 2001.

REED, R.L.; SANDERSON, M.A.; ALLEN, V.G.; MATCHES, A.G. Growth and cadmium accumulation in selected switchgrass cultivars. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 30, p. 2655-2667, 1999.

REED, R.L.; SANDERSON, M.A.; ALLEN, V.G.; ZARTMAN, R.E. Cadmium application and pH effects on growth and cadmium accumulation in switchgrass. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 33, p. 1187-1203, 2002.

ROSSIELLO, R.O.P.; ARAÚJO, A.P.; MANZATTO, C.V.; FERNANDES, M.S. Comparação dos métodos fotoelétricos e da interseção na determinação de área, comprimento e raio médio radicular. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 633-638, 1995.

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

SANITÁ DI TOPPI, L.; GABBRIELLI, R. Response to cadmium in higher plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 105-130, 1999.

SAS Institute. **SAS User's guide: Statistics**. Version 9.2. Cary, NC, 2008.

SIGMAPLOT. **For windows, version 9.01**. Systat Software, 2004.

SKINNER, R.H.; NELSON, C.J. Role of leaf appearance rate and coleoptile tiller in regulating tiller production. **Crop Science**, Madison, v. 34, p. 71-75, 1994.

STOBART, A.K.; GRIFFITS, W.; BUKHARI, I.A.; SHERWOOD, R.P. The effect of Cd<sup>2+</sup> on the biosynthesis of chlorophyll in leaves of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 63, p. 293-298, 1985.

ZHANG, G.; FUKAMI, M.; SEKIMOTO, H. Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 23, p. 1337-1350, 2000.

ZHANG, X.; XIA, H.; LI, Z.; ZHUANG, P.; GAO, B. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 2063-2066, 2010.

#### 4 CÁDMIO, NUTRIENTES MINERAIS E VALOR SPAD DO CAPIM-TANZÂNIA CULTIVADO COM DOSES DE ENXOFRE E CÁDMIO

##### Resumo

O cádmio pode degradar a clorofila e alterar a concentração de nutrientes nas plantas, o que pode dificultar o cultivo de determinadas espécies em ambientes com alta disponibilidade desse metal pesado. Uma alternativa para aumentar a tolerância da planta ao cádmio é o fornecimento de enxofre, uma vez que esse nutriente participa de compostos do sistema antioxidante das plantas. Objetivou-se avaliar as variações no valor SPAD e nas concentrações de cádmio e de nutrientes minerais do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) cultivado com combinações de doses de enxofre (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup>) e de cádmio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva, em esquema fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, em delineamento de blocos ao acaso, com seis repetições. A interação doses de enxofre x doses de cádmio foi significativa para valor SPAD e concentração de cádmio na parte aérea do segundo corte do capim. O suprimento de enxofre aumentou o valor SPAD e diminuiu a concentração de cádmio. Ocorreram menores valores na leitura SPAD e nas concentrações de nitrogênio, potássio e ferro com o fornecimento de cádmio. As concentrações de fósforo, zinco e cádmio, bem como o fator de transporte do cádmio aumentaram com o fornecimento de cádmio. Nos tecidos vegetais do capim-tanzânia, o fornecimento de cádmio altera as concentrações de nutrientes, e o suprimento de enxofre aumenta a concentração de enxofre, o valor SPAD e diminui a concentração de cádmio.

Palavras-chave: Micronutrientes catiônicos; *Panicum maximum*; Valor SPAD

##### Abstract

Cadmium can degrade chlorophyll and change concentrations of nutrients in plants, interfering on cultivation of important species in environments with high availability of such heavy metal. Alternatively, sulfur supply may increase cadmium plant tolerance as this nutrient is part of important compounds that are involved in plant antioxidative system. Thus, it was aimed to evaluate changes in SPAD value, concentrations of cadmium and mineral nutrients in Tanzania guineagrass (*Panicum maximum*) grown in nutrient solution with combinations of sulfur rates (0.1, 1.0, 1.9, 2.8 and 3.7 mmol L<sup>-1</sup>) and cadmium rates (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mmol L<sup>-1</sup>), by using a fractionated factorial 5<sup>2</sup>, in randomized block design, with six replications. The interaction of sulfur rates x cadmium rates was statistically significant for SPAD value and cadmium concentration in plant shoots at the second harvest. The sulfur supply increased SPAD value and decreased cadmium concentration. Lower values of SPAD readings and concentrations of nitrogen, potassium and iron were observed with cadmium supply. Concentrations of phosphorus, zinc and cadmium, as well as the transporting factor of cadmium were increased with cadmium supply. Cadmium alters nutrient concentrations in plant tissues of Tanzania guineagrass and sulfur supply increases sulfur concentration and SPAD value, but decreases cadmium concentration.

Keywords: cationic micronutrients; *Panicum maximum*; SPAD value

## 4.1 Introdução

A concentração de cádmio no ambiente aumentou consideravelmente em função de atividades antrópicas nas décadas mais recentes, dificultando o cultivo de plantas em extensas áreas agrícolas (FAN et al., 2010). Esse fato tem motivado a busca por alternativas que possibilitem o cultivo em ambientes contaminados por esse metal pesado, uma vez que as plantas não toleram altas concentrações de cádmio nos tecidos vegetais (GILL; TUTEJA, 2011). Nesses ambientes, as plantas apresentam menor produção de biomassa, o que pode iniciar o processo de degradação do solo (BENZARTI; HAMDI; MOHRI, 2010).

A utilização de gramíneas forrageiras para o cultivo em ambientes contaminados por metais pesados pode ser promissora, pois, essas plantas apresentam rápido crescimento, sistema radicular extenso, elevada tolerância a condições adversas e facilidade de cultivo (NASCIMENTO; XING, 2006; ZHANG et al., 2010). O fornecimento de enxofre às plantas forrageiras cultivadas em ambientes contaminados por cádmio também é uma alternativa interessante (GILL; KHAN; TUTEJA, 2012), uma vez que o enxofre é essencial para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas (KAUR et al., 2010) e participa de compostos que atuam no sistema antioxidante, conferindo maior tolerância ao cádmio (ANJUM et al., 2008; CARFAGNA et al., 2010; GILL; KHAN; TUTEJA, 2012).

O suprimento de enxofre também aumenta a síntese de clorofila, que é essencial para o crescimento normal das plantas, principalmente em ambientes contaminados por cádmio, uma vez que esse metal degrada a clorofila (GILL; TUTEJA, 2010). Hassan, Wang e Zhang (2005) verificaram que o teor de clorofila (expresso em valor SPAD) da cultura do arroz (*Oryza sativa*) submetida ao estresse causado pela aplicação de cádmio ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) aumentou linearmente com o fornecimento de enxofre (0,2; 0,4 e  $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ).

Dependendo da concentração nas células vegetais, o cádmio altera o metabolismo de nutrientes, principalmente dos micronutrientes catiônicos cobre, ferro, manganês e zinco (ZHANG; FUKAMI; SEKIMOTO, 2002). Existem resultados demonstrando que o cádmio aumenta a absorção de nutrientes em algumas plantas e diminui a absorção em outras. Isso tem sido atribuído às diferenças existentes entre plantas e a concentração de nutrientes disponível no meio de crescimento (SAFARZADEH; RONAGHI; KARIMIAN, 2013). Zhang, Fukami e Sekimoto (2000) avaliaram 16 genótipos de trigo (*Triticum aestivum*) e reportaram redução nas concentrações de enxofre, fósforo, magnésio e manganês e aumento na concentração de ferro na parte aérea e nas raízes quando forneceram cádmio na dose de  $8,92 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Embora existam relatos do efeito da aplicação de cádmio no estado nutricional de gramíneas, poucos estudos mostram o efeito do enxofre em gramíneas cultivadas em ambientes com variada disponibilidade de cádmio, principalmente, gramíneas forrageiras. Assim, objetivou-se avaliar as variações no valor SPAD, na concentração de cádmio e nutrientes minerais do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) cultivado com combinações de doses de enxofre e cádmio em solução nutritiva.

## 4.2 Material e Métodos

### 4.2.1 Tratamentos, delineamento experimental e solução nutritiva

Entre dezembro de 2012 e fevereiro de 2013, plantas de *Panicum maximum* cv. Tanzânia foram cultivadas em casa de vegetação (latitude 22° 43" S e longitude 47° 38" O), em solução nutritiva, combinando cinco doses de enxofre (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup>) e cinco doses de cádmio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>) (Tabela 1), em esquema fatorial 5<sup>2</sup> fracionado (LITTELL; MOTT, 1975). O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com seis repetições.

Tabela 1 - Volumes das soluções estoque empregadas no preparo das soluções nutritivas para as combinações de doses de enxofre e cádmio

Enxofre (mmol L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	1	1	1,9	1,9	1,9	2,8	2,8	3,7	3,7	3,7
Cádmio (mmol L <sup>-1</sup> )	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2
Solução estoque	Volume (mL L <sup>-1</sup> )												
CdCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
KNO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
KCl (1 mol L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1 mol L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	1	1	1,9	1,9	1,9	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	1,9	1,9	1,9	1	1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (0,01 mol L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-	-	-	-	80	80	170	170	170
CaCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	5	5	5	5	5	5	5	5	4,2	4,2	3,3	3,3	3,3
Micronutrientes - Fe*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe(III) - EDTA**	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

\*Composição da solução estoque de micronutrientes (μmol L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 46; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O = 9; ZnCl<sub>2</sub> = 0,73; CuCl<sub>2</sub> = 0,30 e H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O = 0,11.

\*\*Fe(III) - EDTA = 100 μmol L<sup>-1</sup>.



#### 4.2.2 Instalação, condução do experimento e coleta do material vegetal

Inicialmente, as sementes da forrageira foram colocadas para germinar em bandejas contendo areia lavada em água corrente e desionizada, com fornecimento diário de água desionizada. Quinze plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com capacidade de 3,8 L (20 cm de altura e 15,5 cm de diâmetro) contendo quartzo moído como substrato, aos 11 dias após a semeadura. Após o transplântio, iniciaram-se desbastes periódicos até permanecerem seis plantas por vaso.

Imediatamente após o transplântio iniciou-se o fornecimento das soluções nutritivas. Cada vaso recebeu um litro da respectiva solução nutritiva preparada a partir da solução de Hoagland e Arnon (1950), diluída a 25% da força iônica e modificada para atender as doses de enxofre, durante os primeiros sete dias. Decorridos oito dias do transplântio iniciou-se o fornecimento das soluções não diluídas e modificadas para atender as doses de enxofre, o que se realizou até o vigésimo oitavo dia. A partir do vigésimo nono dia foram utilizadas as soluções não diluídas, modificadas para atender as doses de enxofre e de cádmio, pelo período de 11 dias. As soluções relacionadas às doses de enxofre foram trocadas em intervalos de sete dias.

As soluções permaneceram nos vasos durante o dia e a noite pelo período de uma semana, sendo circuladas pelo substrato quatro vezes ao dia para aeração do sistema radicular do capim-tanzânia. Posteriormente, as soluções foram drenadas à noite, fornecidas pela manhã e circuladas pelo substrato três vezes ao dia. Quarenta dias após o transplântio ocorreu o primeiro corte do capim-tanzânia, 5 cm acima da superfície do substrato, no início do processo de senescência das folhas maduras das plantas que estavam em estado fisiológico mais avançado.

Houve fornecimento apenas das soluções não diluídas e modificadas para atender somente as doses de enxofre durante a condução do segundo crescimento, devido a menor produção de biomassa causada pelo efeito residual do cádmio. Nesse período, as soluções modificadas para atender as doses de enxofre também foram trocadas a cada sete dias. O segundo corte foi realizado 18 dias após a realização do primeiro corte, ao nível do substrato, também no início de senescência das folhas mais maduras.

### 4.2.3 Avaliações

#### 4.2.3.1 Valor SPAD

A determinação indireta da concentração de clorofila em valor SPAD ocorreu por meio do uso do clorofilômetro *Chlorophyll Meter* SPAD-502 (Soil-Plant Analysis Development Section, Minolta Camera Co., Osaka, Japão) no primeiro crescimento aos 35 dias após o transplântio das mudas de capim-tanzânia. No segundo período de crescimento as leituras do clorofilômetro foram efetuadas 14 dias após a realização do primeiro corte. Os valores utilizados para análise estatística foram resultantes da média de dez leituras realizadas em cada vaso, no terço médio das lâminas das folhas recém-expandidas (segunda folha no sentido do ápice para a base da planta).

#### 4.2.3.2 Macronutrientes, micronutrientes e cádmio

Todo material vegetal coletado no primeiro corte da parte aérea do capim-tanzânia foi colocado em estufa de ventilação forçada a 60°C durante 72 horas, e posteriormente moído em moinho tipo *Wiley* para determinação das concentrações de nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, ferro, manganês, zinco e cádmio na parte aérea e nas raízes do capim-tanzânia. Devido a necessidade de material vegetal para a realização de análises do sistema antioxidante, no segundo corte da parte aérea do capim-tanzânia as determinações foram realizadas em amostras de plantas de três blocos devido à menor produção de biomassa.

Para a determinação da concentração de nitrogênio, o material vegetal foi inicialmente submetido à digestão sulfúrica, enquanto para a determinação da concentração de fósforo, cálcio, magnésio, potássio, enxofre, cobre, ferro, manganês, zinco e cádmio foi empregada a digestão nítrico-perclórica. A determinação do nitrogênio foi completada com destilação e titulação, enquanto para cálcio, magnésio, cobre, ferro, manganês e zinco empregou-se a espectrofotometria de absorção atômica e para potássio efetuou-se a leitura em fotômetro de chama. A concentração de fósforo foi determinada por colorimetria e a concentração de enxofre por turbidimetria (SARRUGE; HAAG, 1974). A concentração de cádmio foi determinada por espectrometria de emissão ótica em plasma induzido (ICP-OES).

#### 4.2.3.3 Fator de transporte do cádmio

O fator de transporte do cádmio foi obtido pelo quociente entre a concentração de cádmio na parte aérea e a concentração de cádmio nas raízes, conforme proposto por Kabata-Pendias (2001).

#### 4.2.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa “SAS” (SAS Institute, 2008) utilizando-se inicialmente o teste F. Nos casos de significância da interação doses de enxofre x doses de cádmio foi efetuada a análise de regressão polinomial (superfície de resposta) por meio do procedimento RSREG e nos casos em que a interação doses de enxofre x doses de cádmio não foi significativa, foi efetuado o estudo de regressão de primeiro e segundo graus com auxílio do programa gráfico estatístico SigmaPlot (SIGMAPLOT, 2004). Também foram realizados estudos de correlação entre as variáveis analisadas. Os símbolos (\*) e (\*\*) nas equações de regressão e nos coeficientes de correlação de Pearson indicam os níveis de significância de 5 e 1%, respectivamente.

### 4.3 Resultados e Discussão

#### 4.3.1 Valor SPAD

O valor SPAD obtido durante o primeiro crescimento do capim-tanzânia diminuiu linearmente com o aumento das doses de cádmio, verificando-se redução de aproximadamente 9% ao comparar a dose de cádmio de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  com a ausência de aplicação de cádmio (Figura 1A). No segundo período de crescimento do capim-tanzânia, foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio para o valor SPAD. Em condições de baixo suprimento de enxofre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e alta disponibilidade de cádmio ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), a média do valor SPAD foi inferior a 18, mas com alta disponibilidade de enxofre ( $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e ausência de cádmio, essa média foi superior a 36 (Figura 1B).

O cádmio altera o sistema de transporte de elétrons (PRASAD, 1995) e a concentração de compostos responsáveis pela oligomerização do complexo de proteína da clorofila (KRUPA; OQUIST; HUNER, 1993), resultando na degradação da clorofila (GILL; TUTEJA,

2010). Por sua vez, o fornecimento de enxofre aumenta a síntese de clorofila (MARSCHNER, 1995), resultando em aumento do valor SPAD das plantas (CAI et al., 2011).

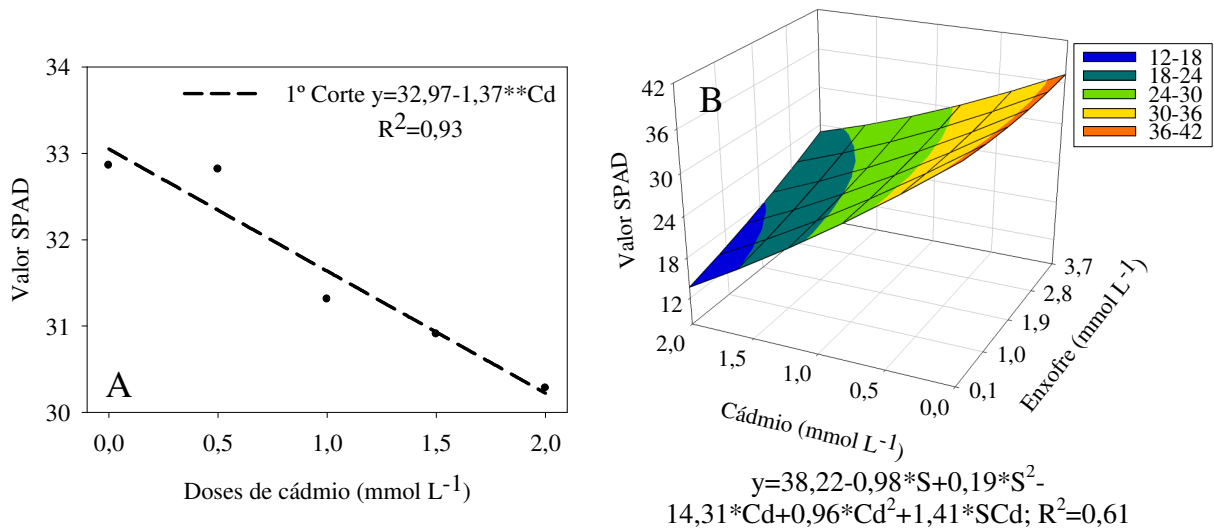


Figura 1 - Valor SPAD nas folhas do capim-tanzânia em função de doses de cádmio no primeiro período de crescimento (A) e das combinações de doses de enxofre e de cádmio em solução nutritiva no segundo período de crescimento (B)

Zhang, Fukami e Sekimoto (2000) avaliaram o efeito do cádmio fornecido na dose de  $8,92 \mu\text{mol L}^{-1}$  para 16 genótipos de trigo e observaram redução no valor SPAD de todos os genótipos quando houve aplicação de cádmio. Hassan, Wang e Zhang (2005) estudaram o efeito da aplicação de enxofre ( $0,2$ ;  $0,4$  e  $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na cultura do arroz submetida ao estresse causado pela aplicação de cádmio ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e relataram que o valor SPAD aumentou linearmente com a elevação das doses de enxofre.

#### 4.3.2 Macronutrientes

Para a concentração de nitrogênio na parte aérea coletada no primeiro corte e no tecido radicular do capim-tanzânia não foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio. A concentração de nitrogênio na parte aérea colhida no segundo corte do capim-tanzânia aumentou em 29% com o fornecimento da dose de cádmio de  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$  em relação à ausência de cádmio, mas o fornecimento de doses de cádmio superiores a  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$  diminuiu a concentração de nitrogênio na parte aérea da forrageira (Figura 2A).

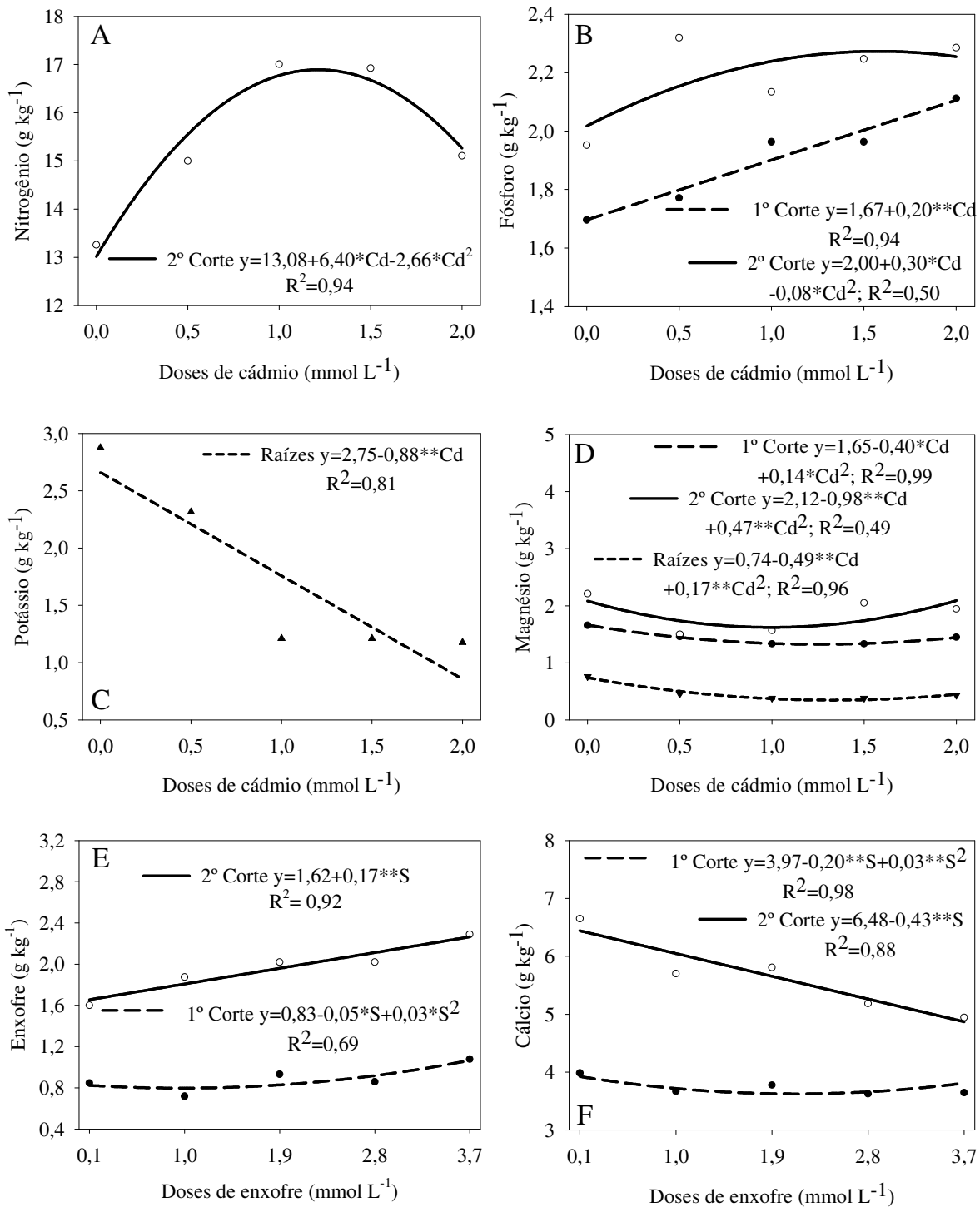


Figura 2 - Concentrações de nitrogênio (A), fósforo (B), potássio (C) e magnésio nos tecidos do capim-tanzânia (D) em função de doses de cádmio e concentrações de enxofre (E) e cálcio (F) nos tecidos do capim-tanzânia em função de doses de enxofre na solução nutritiva

Quando a quantidade de cádmio absorvida é alta, esse metal causa injúrias oxidativas na membrana plasmática (GILL; TUTEJA, 2010), diminuindo a absorção de nitrogênio pela

planta (HATATA; ABDEL-AAL, 2008), e conseqüentemente, proporcionando mais baixas concentrações de nitrogênio nos tecidos da planta. Esse efeito tem sido reportado em plantas cultivadas em ambientes com alta disponibilidade de cobre (QUARTACCI; COSI; NAVARIZZO, 2001) e alumínio (LIDON; AZINHEIRA; BARREIRO, 2000). Hatata e Abdel-Aal (2008) avaliaram o efeito do cádmio (10, 50 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em girassol (*Helianthus annuus*) e obtiveram concentração de nitrogênio menor em 60 e 46% nos tecidos da parte aérea e no tecido radicular, respectivamente, quando compararam a dose de cádmio de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com a ausência de aplicação de cádmio.

A concentração de fósforo na parte aérea coletada no primeiro corte do capim-tanzânia aumentou linearmente com as doses de cádmio, com acréscimo de 24% com a aplicação de cádmio de 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em relação à ausência de cádmio. No material vegetal coletado no segundo corte da parte aérea do capim-tanzânia, os resultados da concentração de fósforo ajustaram-se ao modelo de segundo grau, onde a maior concentração foi verificada com a aplicação de cádmio de 1,87  $\text{mmol L}^{-1}$ , representando aumento de 14,5% em relação à ausência de aplicação de cádmio (Figura 2B). Para a concentração de fósforo no tecido radicular do capim-tanzânia não foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio, bem como o efeito das doses de enxofre e doses de cádmio.

O cádmio diminui a produção de massa da planta (GILL; TUTEJA, 2010), causando efeito de concentração do fósforo absorvido nos tecidos da planta. Zhang, Fukami e Sekimoto (2000) avaliaram a influência do cádmio (8,92  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na concentração de nutrientes em genótipos de trigo e descreveram que a concentração de fósforo aumentou em todos os genótipos avaliados quando houve fornecimento de cádmio.

Para a concentração de potássio na parte aérea do capim-tanzânia no primeiro e segundo cortes não foi significativa a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Todavia, a concentração de potássio diminuiu linearmente com as doses de cádmio no tecido radicular do capim-tanzânia, de forma que o fornecimento da dose de cádmio de 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  reduziu em 64% a concentração de potássio, em relação à ausência de fornecimento de cádmio (Figura 2C). Esse resultado ocorreu porque o cádmio compete com o potássio pelos mesmos sítios de absorção e de transporte transmembranar (CLARKSON; LUTTGE, 1989), de forma que o aumento no fornecimento do metal pesado diminuiu proporcionalmente a absorção de potássio pela planta, resultando em menores concentrações desse macronutriente. Zhang, Fukami e Sekimoto (2000) relataram que a concentração de potássio no sistema radicular dos genótipos de trigo diminuiu quando houve fornecimento de cádmio na dose de 8,92  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em solução nutritiva, em relação à ausência de aplicação desse metal pesado.

O fornecimento de cádmio alterou significativamente a concentração de magnésio nos tecidos de parte aérea e raiz do capim-tanzânia, ajustando-se os resultados ao modelo de segundo grau. O fornecimento de cádmio de 1,42; 1,04 e 1,44 mmol L<sup>-1</sup> em solução nutritiva diminuiu em 17, 24 e 43% a concentração de magnésio na parte aérea colhida no primeiro e segundo cortes e no tecido radicular em relação à ausência de fornecimento de cádmio, respectivamente (Figura 2D).

A exemplo do que ocorre com o potássio, a quantidade absorvida de magnésio pela planta decresce gradualmente quando há alta disponibilidade de cádmio na solução (SHUKLA et al., 2003), uma vez que esses elementos competem diretamente pelo mesmo sítio de absorção (CLARKSON; LUTTGE, 1989). Wang et al. (2013) avaliaram a toxicidade causada pelo fornecimento de cádmio (0,1 mmol L<sup>-1</sup>) em azevém perene (*Lolium perenne*) e reportaram que a concentração de magnésio nas folhas diminuiu em 20% quando houve fornecimento de cádmio.

A concentração de enxofre na parte aérea do capim-tanzânia coletada no primeiro e segundo cortes foi alterada significativamente pelo fornecimento de enxofre. No primeiro corte, os resultados da concentração de enxofre nos tecidos da parte aérea ajustaram-se ao modelo de segundo grau, pelo qual o fornecimento de enxofre de 0,83 mmol L<sup>-1</sup> resultou na maior concentração desse nutriente. Houve aumento de forma linear na concentração de enxofre na parte aérea coletada no segundo corte do capim, de forma que o fornecimento de enxofre de 3,7 mmol L<sup>-1</sup> aumentou em 39% a concentração desse nutriente quando comparado ao fornecimento de enxofre de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 2E). Na concentração de enxofre no tecido radicular não houve significância para a interação doses de enxofre x doses de cádmio, para doses de enxofre e doses de cádmio.

Normalmente, a concentração de enxofre nos tecidos da planta aumenta com o fornecimento de enxofre devido à maior absorção, mas podem ocorrer variações em função da concentração de outros nutrientes em solução, fatores climáticos, teor de água da planta, exigência nutricional, condições de estresse, entre outros fatores (HAWKESFORD et al., 2012). Schmidt (2012) verificou aumento linear na concentração de enxofre na parte aérea colhida no primeiro (0,15 a 1,00 g kg<sup>-1</sup>) e segundo cortes (0,2 a 1,5 g kg<sup>-1</sup>) e nas raízes (0,22 a 1,20 g kg<sup>-1</sup>) do capim-tanzânia cultivado com doses de enxofre (0,10; 0,55; 1,00; 1,45 e 1,90 mmol L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva.

As doses de enxofre alteraram significativamente a concentração de cálcio na parte aérea do capim-tanzânia colhida no primeiro e segundo cortes, com os resultados ajustando-se ao modelo de segundo grau no primeiro corte e ao modelo de primeiro grau no segundo corte.

A maior concentração de cálcio foi verificada com o fornecimento de enxofre de 3,33 mmol L<sup>-1</sup> durante o primeiro período de crescimento da gramínea. No segundo crescimento, o suprimento de enxofre de 3,7 mmol L<sup>-1</sup> reduziu em 25% a concentração de cálcio em relação à dose de enxofre de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 2F). A concentração de enxofre no tecido radicular não foi significativa para a interação doses de enxofre x doses de cádmio, para as doses de enxofre e para as doses de cádmio.

Os macronutrientes cálcio, magnésio e potássio competem pelos mesmos sítios de absorção da planta, e dessa forma, as concentrações desses nutrientes nos tecidos da planta variam em função da absorção de um ou de outro (MARSCHNER, 1995). Batista e Monteiro (2010) estudaram o fornecimento de combinações de doses de nitrogênio (7,14; 14,28; 21,42 e 28,57 mmol dm<sup>-3</sup> de solo) e de enxofre (0,31; 0,62; 0,93 e 1,25 mmol dm<sup>-3</sup> de solo) para capim-marandu (*Brachiaria brizantha*) e relataram que as concentrações de cálcio nos tecidos foliares e radiculares não foram alteradas significativamente pelas doses de enxofre.

#### 4.3.3 Micronutrientes

Em relação aos micronutrientes, a concentração de ferro na parte aérea coletada no primeiro corte e nas raízes do capim-tanzânia não foi significativa para a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Contudo, na parte aérea coletada no segundo corte, a concentração de ferro foi alterada pelas doses de cádmio, ajustando-se os resultados ao modelo de segundo grau, pelo qual o fornecimento de cádmio na dose de 0,98 mmol L<sup>-1</sup> resultou na maior concentração desse micronutriente, o que representou aumento de 31,5% em relação à ausência de fornecimento de cádmio (Figura 3A).

Os efeitos causados pelo cádmio interferem na concentração de micronutrientes catiônicos nos tecidos das plantas, mas os mecanismos que determinam a absorção diferencial de um metal em relação ao outro ainda não são bem conhecidos, uma vez que diferentes transportadores estão envolvidos na movimentação de metais no xilema (SANDALIO et al., 2001). Os mesmos autores avaliaram o efeito do cádmio (10, 20, 30, 40 e 50 μmol L<sup>-1</sup>) em *Pisum sativum* e relataram que a concentração de ferro aumentou de forma linear com o fornecimento de cádmio.

A concentração de manganês na parte aérea colhida no primeiro e segundo cortes do capim-tanzânia foi alterada significativamente pelas doses de cádmio na solução nutritiva. No primeiro crescimento a variação foi linear, e o fornecimento de cádmio na dose de 2,0 mmol L<sup>-1</sup> aumentou em 17,5% a concentração de manganês em relação à ausência de



aplicação desse metal pesado. No segundo crescimento houve ajuste dos resultados ao modelo de segundo grau, de forma que o fornecimento de cádmio na dose de  $1,14 \text{ mmol L}^{-1}$  reduziu em 58% a concentração de manganês em relação à não aplicação de cádmio (Figura 3B). A concentração de manganês no tecido radicular do capim-tanzânia não foi significativa para a interação doses de enxofre x doses de cádmio, para as doses de enxofre e para as doses de cádmio em solução nutritiva.

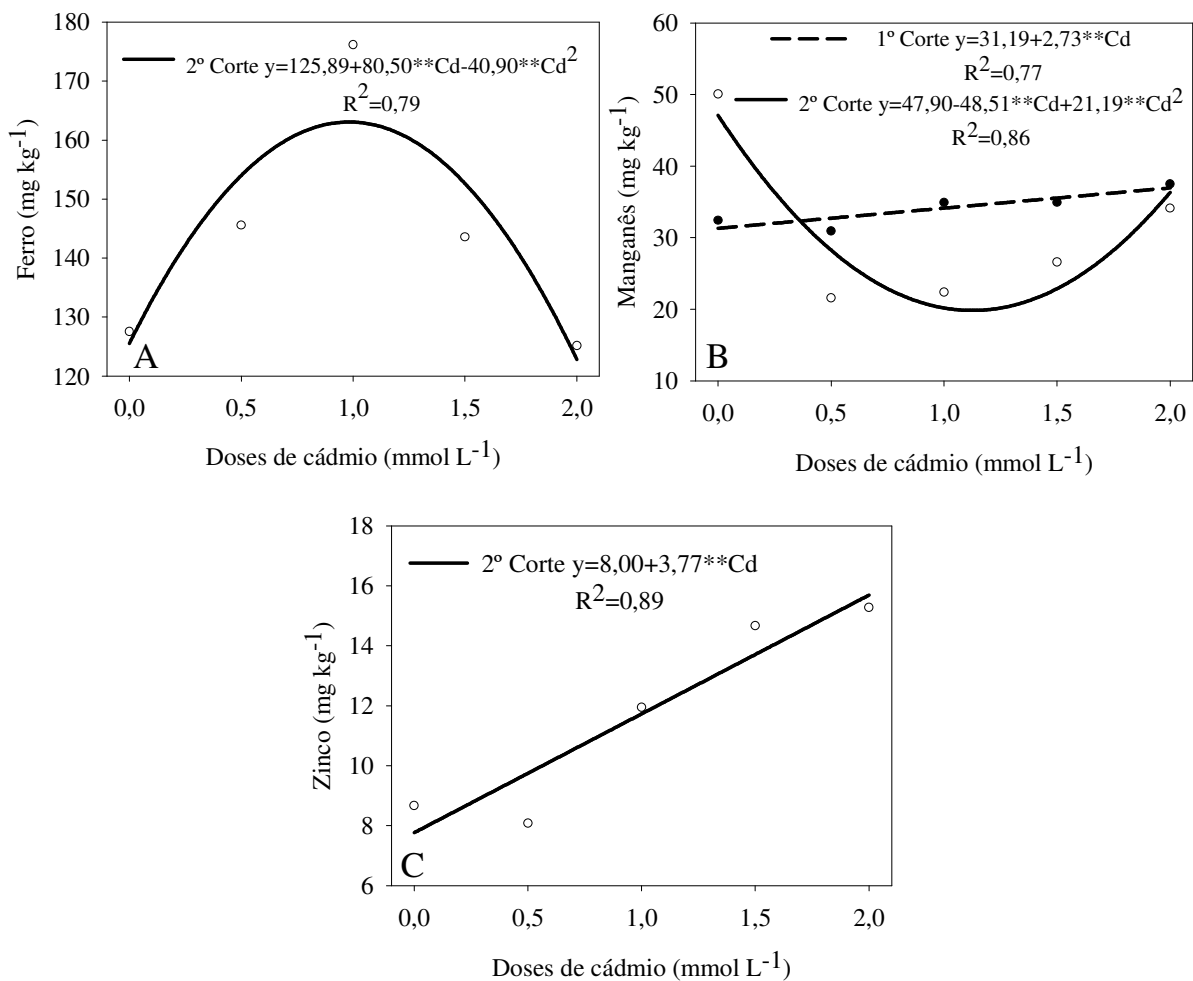


Figura 3 - Concentrações de ferro (A), manganês (B) e zinco (C) nos tecidos da parte aérea do capim-tanzânia em função de doses de cádmio em solução nutritiva

A quantidade de micronutrientes catiônicos absorvidos pode aumentar ou diminuir em condições de média e alta disponibilidade de cádmio (JALIL; SELLES; CLARKE, 1994). Essa variação é dependente da concentração de outros nutrientes em solução e do teor de água da planta (SANDALIO et al., 2001). Zhang, Fukami e Sekimoto (2002) avaliaram a influência da disponibilização de cádmio ( $8,92 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ) no estado nutricional de genótipos de trigo e

relataram que a concentração de manganês no tecido foliar aumentou em alguns genótipos e diminuiu em outros devido às diferenças genotípicas.

A concentração de zinco do capim-tanzânia foi alterada de forma linear e significativa apenas na parte aérea colhida no segundo corte, sendo que o fornecimento de cádmio na dose de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentou em 94,2% a concentração de zinco em relação à ausência de aplicação de cádmio (Figura 3C). A disponibilização de cádmio pode aumentar (SMITH; BRENNAN, 1983) ou diminuir (ABDEL-SABOUR; MORTVEDT; KELOSE, 1988) a quantidade absorvida de zinco pela planta. Essa variação é dependente do genótipo, tempo de exposição ao cádmio e concentração de nutrientes no meio de crescimento, entre outros fatores (SHUKLA et al., 2003). Zhang, Fukami e Sekimoto (2002) reportaram que a concentração de manganês aumentou em alguns genótipos de trigo e diminuiu em outros quando houve fornecimento de cádmio de  $8,92 \mu\text{mol L}^{-1}$  devido à diferença entre genótipos.

#### 4.3.4 Cádmio

O fornecimento de cádmio alterou significativamente a concentração de cádmio na parte aérea colhida no primeiro corte e no tecido radicular do capim-tanzânia, e a interação doses de enxofre x doses de cádmio foi significativa para a concentração de cádmio na parte aérea coletada no segundo corte. Durante o primeiro crescimento, o fornecimento de cádmio de  $1,66 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentou em aproximadamente 30 vezes a concentração de cádmio no tecido foliar em relação à ausência de disponibilização de cádmio (Figura 4A). No segundo crescimento, a alta disponibilidade de cádmio ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) aliada ao baixo suprimento de enxofre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) resultou na maior concentração de cádmio no tecido foliar. Porém, quando houve alta disponibilidade de cádmio e de enxofre ( $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a concentração de cádmio foi menor do que em baixo suprimento de enxofre (Figura 4B). A concentração de cádmio aumentou linearmente no tecido radicular com o fornecimento de cádmio, ultrapassando  $1300 \text{ mg kg}^{-1}$  quando houve fornecimento de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (Figura 4A).

A concentração de cádmio extremamente elevada na parte aérea pode ser atribuída ao transporte de cádmio por transportadores de zinco, como o transportador ZNT1 (PENCE et al., 2000), uma vez que os transportadores das famílias ZIP e Nramp apresentam alta afinidade pelos elementos zinco e cádmio (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005). Nas raízes, altas concentrações de cádmio estão relacionadas à morte de células radiculares, impossibilitando o transporte de grandes quantidades de cádmio para a parte aérea (FERNÁNDEZ et al., 2013). Quando há fornecimento de enxofre em condições de alta

absorção de cádmio, a concentração de cádmio nos tecidos da planta diminui, uma vez que há maior absorção de enxofre e produção de fitoquelatinas pelas plantas (ASTOLFI; ZUCHI; PASSERA, 2004), que contribuem para a desintoxicação causada pelo cádmio.

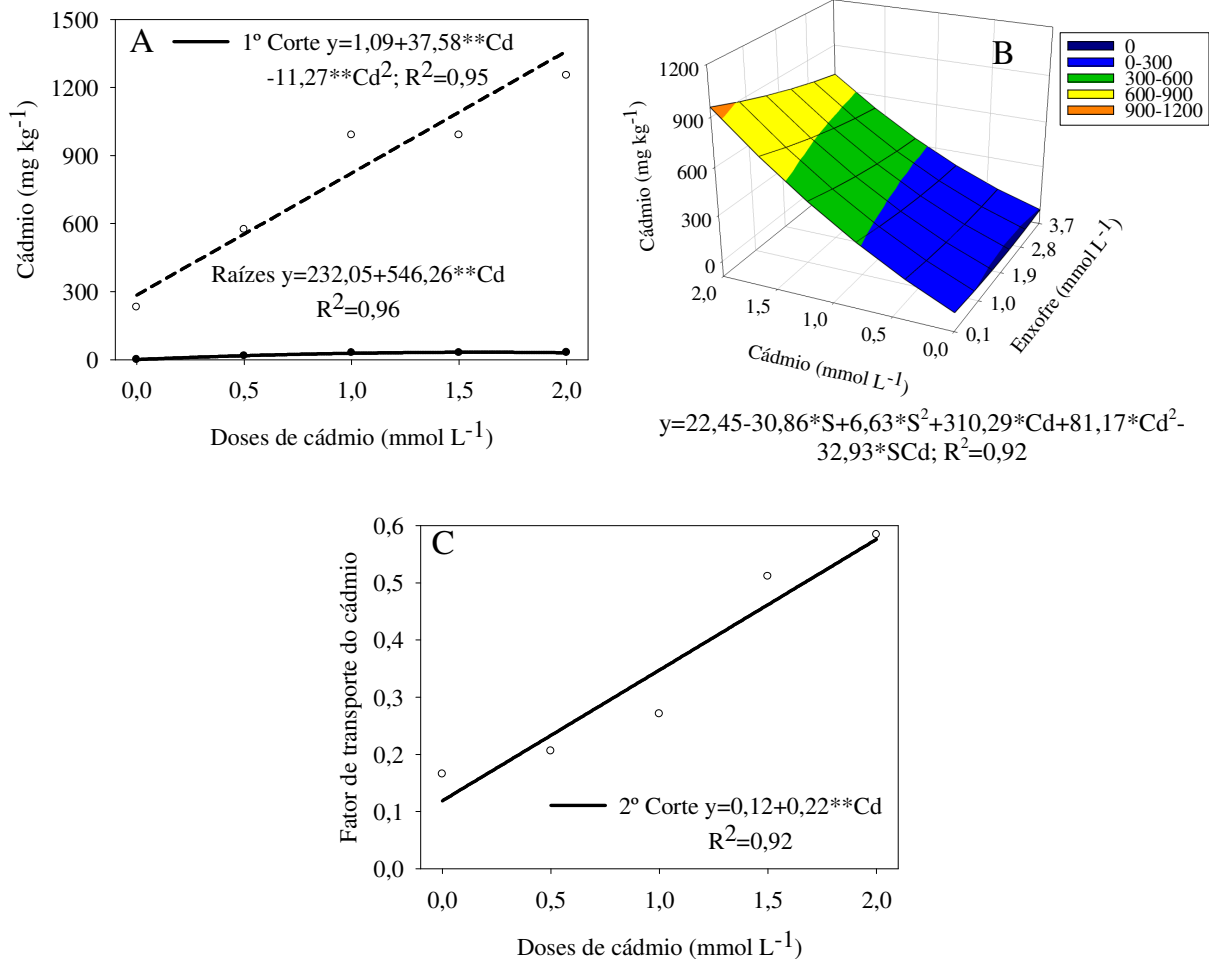


Figura 4 - Concentração de cádmio na parte aérea coletada no primeiro corte e nas raízes do capim-tanzânia (A) e fator de transporte do cádmio (C) em função de doses de cádmio, e concentração de cádmio na parte aérea na época do segundo corte do capim-tanzânia, em função das combinações de doses de enxofre e cádmio em solução nutritiva (B)

Hatata e Abdel-Aal (2008) relataram que as concentrações de cádmio nos tecidos foliares e radiculares de plantas de girassol aumentaram de forma linear com as doses de cádmio (10, 50 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), mesmo sendo doses mais baixas do que as avaliadas nessa pesquisa. Gao et al. (2010) verificaram que o fornecimento de enxofre (0,26  $\text{mmol kg}^{-1}$  de solo) diminuiu em 55 e 19% a concentração de cádmio, respectivamente, no tecido foliar e radicular do arroz cultivado com cádmio (13,38  $\text{mmol kg}^{-1}$  de solo).

O fator de transporte do cádmio pelo capim-tanzânia foi alterado significativamente pelas doses de cádmio na solução nutritiva apenas no segundo período de crescimento das plantas. Houve aumento linear desse fator com a elevação das doses de cádmio, no qual o fornecimento de cádmio de  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentou em mais de 4,6 vezes o fator de transporte em relação à ausência de aplicação de cádmio (Figura 4C). A reabilitação de ambientes contaminados por metais pesados baseia-se no cultivo de plantas tolerantes e que apresentam capacidade de concentrar metais pesados nos tecidos da parte aérea, mas o fator de transporte do cádmio permaneceu abaixo de 1 em todas as situações, indicando que houve maior acúmulo de cádmio nas raízes. Esse fato contribuiu negativamente para a rebrotação das plantas em decorrência da alta concentração de cádmio nas raízes (KRÄMER, 2005).

Safarzadeh, Ronaghi e Karimian (2013) avaliaram o efeito do cádmio (0,4 e 0,8  $\text{mmol kg}^{-1}$  de solo) em sete cultivares de arroz e verificaram que todos os cultivares apresentaram fator de transporte menor do que 1. Todavia, Zhang et al. (2010) avaliaram o potencial de quatro espécies forrageiras (*Pennisetum americanum* x *Pennisetum purpureum*, *Paspalum atratum*, *Silphium perfoliatum* e *Stylosanthes guianensis*) cultivadas na presença de cádmio (8,92; 35,68 e 71,36  $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ) e relataram que as gramíneas forrageiras apresentaram maior potencial fitorremediador em relação às leguminosas por acumularem mais cádmio nos tecidos da parte aérea e produzirem mais biomassa.

#### 4.3.5 Correlações

As concentrações de nitrogênio, fósforo, cálcio, magnésio, cobre, ferro e zinco apresentaram os mais altos coeficientes de correlação ( $r > 0,50$ ) e se correlacionaram de forma positiva com a concentração de enxofre nos tecidos da parte aérea coletados no segundo corte do capim-tanzânia (Tabela 2), sugerindo que houve efeito de concentração dos nutrientes devido à menor produção de massa após a rebrotação. A correlação foi positiva entre a concentração de enxofre e as concentrações de cálcio e magnésio no tecido radicular do capim-tanzânia. O material vegetal colhido durante o segundo crescimento do capim-tanzânia apresentou correlação positiva entre a concentração de enxofre e o fator de transporte do cádmio, indicando que a concentração de enxofre na parte aérea aumenta na medida que o cádmio é transportado das raízes para a parte aérea após a rebrotação da planta, devido à menor produção de massa pela planta.

Tabela 2 - Coeficiente de correlação de Pearson entre valor SPAD, concentração de cádmio, nutrientes minerais e fator de transporte do cádmio do capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e de cádmio em solução nutritiva

<b>Primeiro corte (n=78)</b>													
	<i>SPAD</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>S</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Zn</i>	<i>Cd</i>	<i>FTCd</i>
<i>SPAD</i>	-	0,28*	0,15 <sup>ns</sup>	0,06 <sup>ns</sup>	0,26*	0,16 <sup>ns</sup>	0,29**	-0,05 <sup>ns</sup>	0,12 <sup>ns</sup>	0,23*	0,20 <sup>ns</sup>	-0,20 <sup>ns</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>
<i>S</i>	0,29**	-0,02 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>	0,20 <sup>ns</sup>	0,34**	0,40**	-	0,14 <sup>ns</sup>	0,26*	0,14 <sup>ns</sup>	0,30**	-0,31**	0,06 <sup>ns</sup>
<i>Cd</i>	-0,20 <sup>ns</sup>	0,18 <sup>ns</sup>	0,62**	0,22*	-0,10 <sup>ns</sup>	-0,20 <sup>ns</sup>	-0,31**	0,05 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	0,27*	-0,11 <sup>ns</sup>	-	0,06 <sup>ns</sup>
<b>Segundo corte (n=39)</b>													
	<i>SPAD</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>S</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Zn</i>	<i>Cd</i>	<i>FTCd</i>
<i>SPAD</i>	-	0,05 <sup>ns</sup>	0,16 <sup>ns</sup>	-0,12 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	0,22 <sup>ns</sup>	0,15 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>	-0,17 <sup>ns</sup>	0,43**	-0,38*	-0,82**	0,16 <sup>ns</sup>
<i>S</i>	0,15 <sup>ns</sup>	0,86**	0,99**	0,11 <sup>ns</sup>	0,97**	0,71**	-	0,88**	-0,57**	-0,01 <sup>ns</sup>	0,68**	-0,18 <sup>ns</sup>	0,99**
<i>Cd</i>	-0,82**	-0,08 <sup>ns</sup>	-0,19 <sup>ns</sup>	-0,03 <sup>ns</sup>	-0,12 <sup>ns</sup>	-0,12 <sup>ns</sup>	-0,18 <sup>ns</sup>	-0,08 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>	-0,24 <sup>ns</sup>	0,34*	-	-0,18 <sup>ns</sup>
<b>Raízes (n=78)</b>													
	<i>N</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	<i>Ca</i>	<i>Mg</i>	<i>S</i>	<i>Cu</i>	<i>Fe</i>	<i>Mn</i>	<i>Zn</i>	<i>Cd</i>	...	
<i>S</i>	...	0,35**	0,24*	0,40**	0,66**	0,53**	-	0,07 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	-0,10 <sup>ns</sup>	0,33**	0,26*	...
<i>Cd</i>	...	0,30**	-0,15 <sup>ns</sup>	-0,48**	0,32**	-0,25*	0,26*	-0,12 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>	-	...

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns - não significativo. N - nitrogênio; P - fósforo; K - potássio; Ca - cálcio; Mg - magnésio; S - enxofre; Cu - cobre; Fe - ferro; Mn - manganês; Zn - zinco; Cd - cádmio; FTCd - fator de transporte do cádmio.

A concentração de cádmio apresentou correlação positiva com a concentração de fósforo no material vegetal colhido no primeiro corte e negativa com o valor SPAD no material vegetal colhido no segundo corte da parte aérea do capim-tanzânia (Tabela 2). O cádmio degrada a clorofila e, portanto, quanto maior a concentração desse metal na planta, menor será o teor de clorofila (expresso em valor SPAD) (GILL; TUTEJA, 2011).

#### 4.4 Conclusões

O valor SPAD no tecido foliar do capim-tanzânia diminui com o fornecimento de cádmio, enquanto o suprimento de enxofre aumenta o valor SPAD. As concentrações de nitrogênio e ferro nos tecidos do capim-tanzânia diminuem em condições de alta disponibilidade de cádmio. A concentração de potássio diminui e as concentrações de fósforo e zinco aumentam em condições de média e alta disponibilidade do metal pesado. O suprimento de enxofre aumenta a concentração de enxofre e diminui a concentração de cádmio na parte aérea do capim-tanzânia após a rebrotação.

#### Referências

- ABDEL-SABOUR, M.F.; MORTVEDT, J.J.; KELOSE, J.J. Cadmium and zinc interactions in plants and extractable cadmium and zinc fractions in soil. **Soil Science**, Philadelphia, v. 145, p. 424-431, 1988.
- ANJUM, N.A.; UMAR, S.; AHMAD, A.; IQBAL, M.; NAFEES, N.A. Sulphur protects mustard (*Brassica campestris* L.) from cadmium toxicity by improving leaf ascorbate and glutathione. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 54, p. 271-279, 2008.
- ASTOLFI, S.; ZUCHI, S.; PASSERA, C. Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, p. 795-802, 2004.
- BATISTA, K.; MONTEIRO, F.A. Variações nos teores de potássio, cálcio e magnésio em capim-marandu adubado com doses de nitrogênio e de enxofre. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 34, p. 151-161, 2010.
- BENAVIDES, M.P.; GALLEGOS, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, p. 21-34, 2005.
- BENZARTI, S.; HAMDY, H.; MOHRI, S. Response of antioxidative enzymes and apoplastic bypass transport in *Thlaspi caerulescens* and *Raphanus sativus* to cadmium stress. **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 12, p. 733-744, 2010.

CAI, Y.; CAO, F.; CHENG, W.; ZHANG, G.; WU, F. Modulation of exogenous glutathione in phytochelatins and photosynthetic performance against Cd stress in the two rice genotypes differing in Cd tolerance. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 143, p. 1159-1173, 2011.

CARFAGNA, S.; VONA, V.; MARTINO, V.D.; ESPOSITO, S.; RIGANO, C. Nitrogen assimilation and cysteine biosynthesis in barley: evidence for root sulphur assimilation upon recovery from N deprivation. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 71, p. 18-24, 2010.

CLARKSON, D.T.; LUTTGE, U. Divalent cations, transport and compartmentalization. **Progress in Botany**, Berlin, v. 51, p. 93-112, 1989.

FAN, J.; HU, Z.; ZIADI, N.; WU, C. Excessive sulfur supply reduces cadmium accumulation in brown rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 158, p. 409-415, 2010.

FERNÁNDEZ, R.; BERTRAND, A.; REIS, R.; MOURATO, M.P.; MARTINS, L.L.; GONZÁLEZ, A. Growth and physiological responses to cadmium stress of two populations of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 244-245, p. 555-562, 2013.

GAO, M.X.; HU, Z.Y.; WANG, G.D.; XIA, X. Effect of elemental sulfur supply on cadmium uptake into rice seedlings when cultivated in low and excess cadmium soils. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, Philadelphia, v. 41, p. 990-1003, 2010.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Cadmium stress tolerance in crop plants probing the role of sulfur. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 6, p. 215-222, 2011.

GILL, S.S.; KHAN, N.A.; TUTEJA, N. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 182, p. 112-120, 2012.

HASSAN, M.J.; WANG, Z.; ZHANG, G. Sulfur alleviates growth inhibition and oxidative stress caused by cadmium toxicity in rice. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 28, p. 1785-1800, 2005.

HATATA, M.M.; ABDEL-AAL, E.A. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Dubai, v. 4, p. 655-669, 2008.

HAWKESFORD, M.J.; HORST, W.; KICHEY, T.; LAMBERS, H.; SCHJOERRING, J.; MOLLER, I. S.; WHITE, P. Functions of macronutrients. In: MARSCHNER, P. (Ed.) **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford: Elsevier, 2012. chap. 6, p. 135-189.

HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experimental Station, 1950. 347p. (Circular, 347)

JALIL, A.; SELLES, F.; CLARKE, J.M. Effect of cadmium on growth and the uptake of cadmium and other elements by durum wheat. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 17, p. 1839-1858, 1994.

KABATA-PENDIAS, A. **Trace elements in soils and plants**. 3<sup>rd</sup> ed. Flórida: CRC Press, 2001. 315p.

KAUR, G.; CHANDNA, R.; PANDEY, R.; ABROL, Y.P.; IQBAL, M.; AHMAD, A. Sulfur starvation and restoration affect nitrate uptake and assimilation in rapeseed. **Protoplasma**, Wien, v. 248, p. 299-311, 2010.

KRÄMER, U. Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 16, p. 133-141, 2005.

KRUPA, Z.; OQUIST, G.; HUNER, N.P.A. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* fluorescence analysis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 88, p. 626-630, 1993.

LIDON, F.C.; AZINHEIRA, H.G.; BARREIRO, M.G. Al toxicity in maize: modulation of biomass production and nutrients uptake and translocation. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 23, p. 151-160, 2000.

LITTELL, R.C.; MOTT, G.O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Soil and Crop Society of Florida Proceedings**, Ona, v. 34, p. 94-97, 1975.

MARSCHNER, H. **Mineral nutrition of higher plants**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Academic Press, 1995. 889p.

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

PENCE, N.S.; LARSEN, P.B.; EBBS, S.D.; LETHAM, D.L.D.; LASAT, M.M.; GARVIN, D.F.; EIDE, D.; KOCHIAN, L.V. The molecular physiology of heavy metal transport in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, p. 4956-4960, 2000.

PRASAD, M.N.V. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 35, p. 525-545, 1995.

QUARTACCI, M.F.; COSI, E.; NAVARI-IZZO, F. Lipids and NADPH-dependent superoxide production in plasma membranes vesicles from roots of wheat grown under copper deficiency or excess. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 52, p. 77-84, 2001.



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**, Berlin, v. 59, p. 231-245, 2013.

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

SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ, 1974. 54p.

SAS Institute. **SAS User's guide: Statistics**. Version 9.2. Cary, NC, 2008.

SCHMIDT, F. **Modificações morfológicas e metabólicas em gramínea e leguminosa forrageiras tropicais relativas ao suprimento de enxofre**. 2012. 164p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012.

SHUKLA, U.C.; SINGH, J.; JOSHI, P.C.; KAKKAR, P. Effect of bioaccumulation of cadmium on biomass productivity, essential trace elements, chlorophyll biosynthesis and macromolecules of wheat seedlings. **Biological Trace Element Research**, Totowa, v. 92, p. 257-273, 2003.

SIGMAPLOT. **For windows, version 9.01**. Systat Software, 2004.

SMITH, G.C.; BRENNAN, E.G. Cadmium-zinc interrelationship in tomato plant. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 73, p. 879-882, 1983.

WANG, Q.; LIANG, X.; DONG, Y.; XU, L.; ZHANG, X.; HOU, J.; FAN, Z. Effects of exogenous nitric oxide on cadmium toxicity, element contents and antioxidative system in perennial ryegrass. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 69, p. 11-20, 2013.

ZHANG, G.; FUKAMI, M.; SEKIMOTO, H. Genotypic differences in effects of cadmium on growth and nutrient compositions in wheat. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 23, p. 1337-1350, 2000.

ZHANG, G.P.; FUKAMI, M.; SEKIMOTO, H. Influence of cadmium on mineral concentrations and yield components in wheat genotypes differing in Cd tolerance at seedling stage. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 77, p. 93-98, 2002.

ZHANG, X.; XIA, H.; LI, Z.; ZHUANG, P.; GAO, B. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 2063-2066, 2010.

## 5 ENXOFRE AUMENTA A CONCENTRAÇÃO DE CISTEÍNA E A ATIVIDADE DA ASCORBATO PEROXIDASE NO CAPIM-TANZÂNIA CULTIVADO COM CÁDMIO

### Resumo

Em altas concentrações no tecido da planta, o cádmio induz a formação de espécies reativas de oxigênio em plantas, que podem resultar em danos oxidativos no vegetal. Porém, o fornecimento de enxofre pode minimizar o efeito tóxico causado pelo cádmio, uma vez que participa de compostos do sistema antioxidante das plantas. Objetivou-se avaliar a resposta do sistema antioxidante do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) cultivado com doses de enxofre (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup>) e de cádmio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>) combinadas em solução nutritiva, em esquema fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, em delineamento de blocos ao acaso, com seis repetições. O primeiro corte do capim-tanzânia foi realizado 40 dias após o transplântio das mudas para os vasos e o segundo corte 18 dias após o primeiro. O fornecimento de cádmio em solução nutritiva diminuiu o teor de GSH e a atividade da CAT, e aumentou os teores de MDA, GSSG, glutathiona e a atividade da APX. A interação doses de enxofre x doses de cádmio foi significativa somente para as concentrações de cisteína e a atividade da APX na parte aérea coletada no segundo corte do capim-tanzânia, de forma que o suprimento de enxofre aumentou a concentração desse aminoácido e a atividade dessa enzima. As atividades da SOD, CAT e GR em PAGE não revelaram diferenças no perfil de isoformas ativas na parte aérea do capim-tanzânia, sendo identificadas três isoformas de cada enzima. Contudo, no sistema radicular houve diferenças nas intensidades de SOD, CAT e GR e no número de isoformas de SOD. A enzima SOD do sistema radicular do capim-tanzânia é pouco responsiva ao estresse oxidativo causado por cádmio. A parte aérea do capim-tanzânia tem mais isoformas ativas das enzimas CAT e GR do que as raízes.

Palavras-chave: Antioxidantes enzimáticos; Cisteína; Estresse abiótico; Glutathiona; *Panicum maximum*; Peroxidação lipídica

### Abstract

At high concentration in plant tissue, cadmium induces production of reactive oxygen species that may result in oxidative damage to the plant. However, sulfur supply may mitigate toxic effects caused by cadmium, since it is part of important compounds that are involved in plant antioxidative system. Thus, it was aimed to evaluate the antioxidative system response of Tanzania guineagrass (*Panicum maximum*) grown in nutrient solution with combinations of sulfur rates (0.1, 1.0, 1.9, 2.8 and 3.7 mmol L<sup>-1</sup>) and cadmium rates (0.0, 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 mmol L<sup>-1</sup>) by using a fractionated factorial 5<sup>2</sup>, in randomized block design, with six replications. The first harvest of Tanzania guineagrass was performed at 40 days after seedlings transplanting to the pots, and the second at 18 days after the first harvest. Cadmium supply in nutrient solution decreased GSH content and CAT activity, and increased the contents of MDA, GSSG and glutathione, and APX activity. The interaction sulfur rates x cadmium rates was statistically significant only for cysteine content and APX activity in shoots collected at the second harvest, so sulfur supply increased concentration of such amino acid and the activity of such enzyme. Activities of SOD, CAT and GR in PAGE showed no differences on profile of active isoforms of plant shoots, with three isoforms of each enzyme being identified. However, in root system was identified difference in band intensity of SOD,

CAT and GR and also number of isoforms of SOD. The enzyme SOD of the root system of Tanzania guineagrass is slightly responsive to oxidative stress caused by cadmium. The shoot of Tanzania guineagrass presented more active isoforms of CAT and GR compared to the root system.

Keywords: Abiotic stress; Cysteine; Enzymatic antioxidants; Glutathione; Lipid peroxidation; *Panicum maximum*

## 5.1 Introdução

A contaminação de ambientes por metais pesados, especialmente o cádmio, aumentou consideravelmente em décadas recentes (GARBISU; ALKORTA, 2003), devido às atividades humanas como mineração, produção de combustíveis e fertilizantes fosfatados (ALKORTA et al., 2004; ASTOLFI; ZUCHI; PASSERA, 2004). Plantas cultivadas em condições de alta disponibilidade de cádmio absorvem quantidades maiores desse elemento, levando a planta a produzir menos biomassa (CHAFFEI et al., 2004). As plantas representam a principal fonte de entrada de cádmio na cadeia alimentar (CLEMENS, 2006), o que pode causar sérios problemas de saúde a animais e seres humanos (LIU et al., 2007).

Nas plantas, o cádmio induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (GALLEGO et al., 2012), que podem causar injúrias oxidativas (CUYPERS et al., 2010). Porém, o efeito tóxico causado pela produção de EROs pode ser minimizado pelo sistema antioxidante das plantas, dependendo da concentração do metal presente nas células (FOYER; NOCTOR, 2005). O sistema antioxidante das plantas é formado por antioxidantes não-enzimáticos, como glutathione reduzida (GSH), e antioxidantes enzimáticos como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) (GILL; TUTEJA, 2010).

O enxofre pode minimizar os efeitos deletérios causados pelo cádmio nas plantas, uma vez que participa de importantes compostos, como cisteína, metionina, GSH e várias coenzimas (SAITO, 2000) que atuam direta ou indiretamente no sistema antioxidativo (GILL; TUTEJA, 2010). A glutathione pode controlar a expressão de enzimas antioxidantes induzidas pelo estresse causado por metal pesado, como a SOD e GR (ROMERO-PUERTAS et al., 2007). Portanto, o suprimento de enxofre às plantas cultivadas em ambientes contaminados por metais pesados é necessário a fim de garantir quantidade adequada de compostos contendo enxofre para atenuar a intoxicação causada por elementos tóxicos (GILL; TUTEJA, 2011).

Fan et al. (2010) analisaram o efeito do enxofre (1,87 e 3,74 mmol kg<sup>-1</sup> de solo) na cultura do arroz (*Oryza sativa*) cultivada com cádmio (13,38 µmol kg<sup>-1</sup> de solo) e relataram que o fornecimento de enxofre aumentou a produção de glutatona (GSH+GSSG) e atenuou a intoxicação causada pelo cádmio nessa cultura. Cui e Wang (2006) avaliaram a resposta fisiológica da cultura do milho (*Zea mays*) cultivada com combinações de doses de cádmio (0,00; 0,17; 0,44 e 0,89 mmol kg<sup>-1</sup> de solo) e enxofre (0 e 50 mmol kg<sup>-1</sup> de solo) e reportaram que a peroxidação lipídica aumentou com a aplicação de cádmio, em comparação ao tratamento controle. A atividade da enzima peroxidase (POX) aumentou e da CAT diminuiu quando houve fornecimento de cádmio, porém, as plantas supridas com enxofre apresentaram maior atividade das enzimas POX e CAT, em comparação às plantas cultivadas sem enxofre.

O cultivo de plantas forrageiras em ambientes contaminados por metais pesados é uma alternativa que tem se mostrado viável, uma vez que essas plantas apresentam sistema radicular extenso, facilidade de cultivo e adaptação a variadas condições edafoclimáticas (NASCIMENTO; XING, 2006; ZHANG et al., 2010). Nesse contexto, o cultivo de espécies forrageiras em ambientes contaminados em conjunto com a adubação sulfatada pode ser uma ferramenta interessante na tentativa de minimizar os impactos causados por metais pesados (GRATÃO et al., 2005; RAUSCH; WACHTER, 2005). Portanto, objetivou-se avaliar a resposta do sistema antioxidante do capim-tanzânia (*Panicum maximum*) cultivado com combinações de doses de enxofre e cádmio em solução nutritiva.

## **5.2 Material e Métodos**

### **5.2.1 Tratamentos, delineamento experimental e solução nutritiva**

O cultivo da gramínea forrageira *Panicum maximum* cv. Tanzânia foi conduzido em casa de vegetação (latitude 22° 43" S e longitude 47° 38" O), entre dezembro de 2012 e fevereiro de 2013. Foram avaliadas as combinações de cinco doses de enxofre (0,1; 1,0; 1,9; 2,8 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup>) e cinco doses de cádmio (0,0; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup>) em solução nutritiva (Tabela 1). Utilizou-se o esquema fatorial 5<sup>2</sup> fracionado, descrito por Littell e Mott (1975), com seis repetições, distribuídas em blocos ao acaso.

Tabela 1 - Volumes das soluções estoque empregadas no preparo das soluções nutritivas para as combinações de doses de enxofre e cádmio

Enxofre (mmol L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	1	1	1,9	1,9	1,9	2,8	2,8	3,7	3,7	3,7
Cádmio (mmol L <sup>-1</sup> )	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2
Solução estoque	Volume (mL L <sup>-1</sup> )												
CdCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2	0,5	1,5	0	1	2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
KNO <sub>3</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
KCl (1 mol L <sup>-1</sup> )	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O (1 mol L <sup>-1</sup> )	0,1	0,1	0,1	1	1	1,9	1,9	1,9	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	1,9	1,9	1,9	1	1	0,1	0,1	0,1	-	-	-	-	-
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O (0,01 mol L <sup>-1</sup> )	-	-	-	-	-	-	-	-	80	80	170	170	170
CaCl <sub>2</sub> (1 mol L <sup>-1</sup> )	5	5	5	5	5	5	5	5	4,2	4,2	3,3	3,3	3,3
Micronutrientes - Fe*	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Fe(III) - EDTA**	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

\*Composição da solução estoque de micronutrientes (μmol L<sup>-1</sup>): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> = 46; MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O = 9; ZnCl<sub>2</sub> = 0,73; CuCl<sub>2</sub> = 0,30 e H<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O = 0,11.

\*\*Fe(III) - EDTA = 100 μmol L<sup>-1</sup>.

### 5.2.2 Instalação, condução do experimento e coleta do material vegetal

As sementes do capim-tanzânia foram colocadas para germinar em bandejas contendo areia lavada em água corrente e desionizada, com fornecimento diário de água desionizada. Onze dias após a semeadura, 15 plântulas foram transplantadas para vasos plásticos, com capacidade de 3,8 L (20 cm de altura e 15,5 cm de diâmetro) contendo como substrato quartzo moído. Foram realizados desbastes periódicos até permanecerem seis plantas por vaso.

Um dia após o transplante, iniciou-se o fornecimento das soluções nutritivas (1 L por vaso) preparadas a partir da solução de Hoagland e Arnon (1950), diluídas a 25% da força iônica e modificadas para atender as doses de enxofre, pelo período de sete dias. A partir do oitavo dia foram utilizadas as soluções não diluídas e modificadas para atender as doses de enxofre, pelo período de 20 dias. A partir do vigésimo nono dia foram utilizadas as soluções não diluídas e modificadas para atender as doses de enxofre e de cádmio, até o momento da realização do primeiro corte da parte aérea do capim-tanzânia.

No início do experimento as soluções permaneceram nos vasos durante o dia e a noite, pelo período de uma semana, sendo circuladas pelo substrato quatro vezes ao dia para aeração do sistema radicular do capim-tanzânia. Posteriormente, as soluções foram drenadas à noite,

fornecidas pela manhã e circuladas pelo substrato três vezes ao dia. As soluções modificadas para atender as doses de enxofre foram substituídas em intervalos de sete dias.

O primeiro corte do capim-tanzânia foi realizado 40 dias após o transplântio, cortando-se 5 cm acima da superfície do substrato, adotando como critério o início da senescência das folhas maduras das plantas que estavam em estado fisiológico mais avançado. A parte aérea de uma planta foi coletada em cada vaso para a realização das análises envolvendo o sistema antioxidante no primeiro crescimento do capim-tanzânia.

Durante a condução do segundo crescimento houve fornecimento apenas das soluções não diluídas e modificadas para atender as doses de enxofre, devido à menor produção de biomassa causada pelo efeito residual do cádmio. As soluções modificadas para atender as doses de enxofre também foram trocadas a cada sete dias. O segundo corte foi realizado 18 dias após o primeiro corte, ao nível do substrato, adotando-se o mesmo critério do primeiro corte para a realização da colheita. Devido à menor produção de biomassa no segundo crescimento do capim-tanzânia, todo o material vegetal da parte aérea das plantas de três blocos foi coletado para realização das análises. Imediatamente após cada corte, o material vegetal foi colocado em nitrogênio líquido, até o transporte ao *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Após o segundo corte da parte aérea do capim-tanzânia, as raízes foram separadas do substrato com o auxílio de peneira de malha de 0,25 mm, lavadas em água desionizada e imediatamente colocadas em nitrogênio líquido, para serem levadas ao *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Em cada vaso coletou-se o sistema radicular correspondente à parte aérea da planta coletada no primeiro corte para a realização das análises.

### 5.2.3 Avaliações

#### 5.2.3.1 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e malondialdeído (MDA)

A quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi realizada após a maceração das amostras em 2,4,6-tricloroanisol (TCA) a  $1 \text{ g L}^{-1}$  na relação de 1 g para 10 mL. Após a completa homogeneização, as amostras foram transferidas para tubos e centrifugadas a  $4^{\circ}\text{C}$  em 10.000 rpm por 10 minutos. Do sobrenadante foram retirados 200  $\mu\text{L}$  ao qual foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio a  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  (pH 7,5) e 800  $\mu\text{L}$  de solução de iodeto de potássio a  $1 \text{ mol L}^{-1}$ . Os tubos foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. Após esse período, as amostras permaneceram no escuro por 15 minutos, em

temperatura ambiente, para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro Lambda 40, Perkin Elmer® a 390 nm.

O MDA foi quantificado após reação em ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), segundo método adaptado de Heath e Packer (1968). As amostras foram maceradas em TCA  $1 \text{ g L}^{-1}$  na proporção de 0,2 g para 2 mL de tampão fosfato de potássio (pH 7,5), juntamente com 0,04 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP). Após completa homogeneização a amostra foi centrifugada a  $4^{\circ}\text{C}$  em 10.000 rpm por 10 minutos. Foi retirado e transferido para outro tubo do sobrenadante 0,25 mL juntamente com 1 mL de solução contendo TCA  $200 \text{ g L}^{-1}$  e TBA  $5 \text{ g L}^{-1}$ . A mistura foi colocada em banho-maria por 30 minutos a  $95^{\circ}\text{C}$ , e posteriormente resfriada em gelo. Em seguida, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 535 e 600 nm.

### **5.2.3.2 Extração e quantificação de proteínas**

As extrações e quantificações de proteínas dos tecidos da parte aérea e das raízes do capim-tanzânia foram realizadas após maceração em almofariz contendo nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ , a pH 7,5, (proporção de 0,5 g de amostra de tecido foliar para 3 mL de tampão e 0,5 g de amostra de tecido radicular para 2 mL de tampão), contendo  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido etileno diamino tetracético (EDTA),  $3 \text{ mmol L}^{-1}$  de ditioneitol (DTT) e  $40 \text{ g L}^{-1}$  de PVPP, de acordo com Gomes-Junior et al. (2007). O material homogeneizado foi centrifugado a  $4^{\circ}\text{C}$  em 10.000 rpm por 30 minutos e do sobrenadante foi retirada uma alíquota para ser estocada em *freezer* a  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. A concentração das proteínas totais foi determinada segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

### **5.2.3.3 Cisteína e metionina**

A cisteína e metionina solúveis foram extraídas segundo o método descrito por Bielecki e Turner (1966). Foram utilizados 300 mg de tecido foliar e 400 mg de tecido radicular, em 3 e 4 mL de MCW (metanol:clorofórmio:água, na proporção 12:5:3), respectivamente. A mistura foi deixada overnight a  $4^{\circ}\text{C}$  e centrifugada em 10.000 rpm durante 20 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada para cada 4 mL de MCW. A amostra foi centrifugada novamente e a fase aquosa formada retirada

cuidadosamente. A fase coletada foi colocada em banho-maria por uma hora a 38°C e, em seguida liofilizada para dosagem de aminoácidos solúveis totais e determinação da composição de aminoácidos solúveis por cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC).

A análise de UPLC foi realizada com o sistema Acquity (Waters), coluna BEH C18 (100 mm x 2,1 mm i.d., 1,7 µm), fluxo de 0,7 mL/minuto e temperatura da coluna de 43°C. Foram utilizados para a derivatização 70 µL de tampão borato, 10 mL da amostra contendo os aminoácidos e 20 mL do derivatizante (AccQ - fluor). Posteriormente, a mistura foi colocada em banho seco a 55°C durante 10 minutos e inserida em tubos específicos para injeção da amostra. O volume da injeção foi de 1 µL e a detecção ocorreu através do comprimento de onda de 260 nm. As concentrações de aminoácidos nas amostras foram determinadas em relação à curva padrão de concentrações conhecidas dos aminoácidos.

#### **5.2.3.4 Glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e glutathiona**

A quantificação de GSH e GSSG foi realizada segundo o método descrito por Israr, Sahi e Jain (2006), com modificações. O tecido vegetal (200 mg) foi macerado em 1,9 mL de ácido sulfosalicílico a 1 g L<sup>-1</sup>. Após completa homogeneização a mistura foi transferida para tubos e centrifugada a 4°C em 10.000 rpm por 20 minutos. Do sobrenadante foram retirados 250 µL aos quais foram adicionados 1,75 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), contendo EDTA a 0,5 mmol L<sup>-1</sup> e 100 µL de 5,5' dithio-bis-[ácido 2-nitrobenzóico] (DTNB) a 3 mmol L<sup>-1</sup> e, em seguida mantido em repouso no escuro por cinco minutos. A determinação da GSH ocorreu em espectrofotômetro, a 412 nm (Lambda 40, Perkin Elmer®). Após a leitura, na mesma reação foram adicionados 100 µL de NADPH a 0,4 mmol L<sup>-1</sup> e 2 µL de GR (230 unidades mg<sup>-1</sup>) e mantido no escuro por mais 20 minutos. Para determinação da glutathiona (GSH+GSSG) a leitura foi realizada a 412 nm. O conteúdo de GSSG foi calculado pela diferença entre os valores da glutathiona e GSH. O branco consistiu nas mesmas misturas descritas, porém adicionando-se 250 µL de ácido sulfosalicílico a 1 g L<sup>-1</sup> ao invés do sobrenadante da amostra.



### 5.2.3.5 Atividade enzimática

#### 5.2.3.5.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade de SOD em gel de poliacrilamida em sistema não desnaturante (PAGE) foi determinada utilizando 50 µg de proteínas do extrato protéico para separação eletroforética em PAGE a 12%, 20 mA por placa durante aproximadamente 6 horas, de acordo com Laemmli (1970), sem dodecilsulfato de sódio (SDS). A revelação do gel seguiu o método descrito por Beauchamp e Fridovich (1971), com modificações de Azevedo et al. (1998), no qual o gel foi lavado em água desionizada e, posteriormente, incubado à temperatura ambiente, no escuro e durante 30 minutos em solução tampão fosfato de potássio a 50 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,8); EDTA a 1 mmol L<sup>-1</sup>; riboflavina a 0,05 mmol L<sup>-1</sup>; nitroazul tetrazólio a 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e tetrametiletilenodiamina a 3 g L<sup>-1</sup>. Após o período de incubação do gel, a mistura de reação foi removida, os géis foram lavados em água desionizada e submetidos à iluminação por alguns minutos até o aparecimento de bandas brancas sob fundo roxo. Para ocorrer a fixação das bandas, os géis foram imersos em solução de ácido acético a 70 g L<sup>-1</sup> por 15 minutos, sendo em seguida documentados no programa Image Scanner<sup>®</sup>.

#### 5.2.3.5.2 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi determinada por espectrofotometria e PAGE não desnaturante. A atividade em espectrofotometria foi determinada de acordo com o método descrito por Kraus, McKersie e Fletcher (1995), com modificações de Azevedo et al. (1998). O meio de reação continha 1 mL da solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato de potássio a 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH 7,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato vegetal e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em intervalos de 10 segundos durante 1 minuto, na absorbância de 240 nm.

Para a determinação da atividade em PAGE, as proteínas dos extratos vegetais foram separadas por eletroforese em gel (12%). Para a confecção desse gel (com espessura de 1,5 mm, 6,5 cm de altura e 7,3 cm de largura), 3 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida a 400 g L<sup>-1</sup> foi adicionada a 2,5 mL de tampão tris-hidroximetilaminometano (TRIS) a 2,9 mol L<sup>-1</sup>, (pH 8,9) e 4,5 mL de água desionizada. Como catalisadores foram utilizados 19 mL de N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina (TEMED) e 25 mL de persulfato de amônio a 10 g L<sup>-1</sup>. Após a polimerização, 1 mL de gel de empacotamento foi aplicado sobre o gel principal. Para

confeccionar esse gel foram utilizados 500  $\mu\text{L}$  da solução de acríamida/bis-acrílamida a 400  $\text{g L}^{-1}$ , 1,25 mL de tampão TRIS a 500  $\text{mmol L}^{-1}$ , (pH 6,8) e 2,75 mL de água desionizada. Para a polimerização foram utilizados 10 mL de TEMED e 50 mL de persulfato de amônio a 10  $\text{g L}^{-1}$ .

A eletroforese foi realizada a 4°C e a corrente constante utilizada por placa foi de 20 mA. O tampão de eletrodo foi TRIS a 250  $\text{mmol L}^{-1}$ , (pH 8,3) acrescido de glicina a 1,92  $\text{mol L}^{-1}$ . Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi (2 unidades) e 50  $\mu\text{g}$  de proteína dos extratos. A revelação para atividade de CAT foi realizada após a lavagem do gel por 45 minutos em água desionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 0,03  $\text{mL L}^{-1}$ , à temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após esse período, o gel foi rapidamente lavado em água desionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de  $\text{FeCl}_3$  a 10  $\text{g L}^{-1}$  e  $\text{K}_2\text{Fe}(\text{CN})_6$  a 10  $\text{g L}^{-1}$ , sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água. A fixação foi realizada com solução de ácido acético a 70  $\text{g L}^{-1}$ .

#### **5.2.3.5.3 Ascorbato peroxidase (APX)**

A atividade da APX foi determinada de acordo com o método descrito por Nakano e Asada (1981). Em 1 mL do meio de reação continha 50  $\mu\text{L}$  de amostra e 950  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de potássio a 80  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,0), e esse continha ascorbato a 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , EDTA a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 135  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A leitura foi realizada durante 1 minuto em espectrofotômetro a 290 nm. O coeficiente de extinção molar foi de 2,8  $\text{mmol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

#### **5.2.3.5.4 Glutationa redutase (GR)**

A atividade da GR foi determinada por espectrofotometria e PAGE, de acordo com o método descrito por Smith, Vierheller e Thorne (1988), com modificações de Azevedo et al. (1998), no qual 1 mL do meio de reação continha DTNB a 1  $\text{mmol L}^{-1}$ ; GSSG a 1  $\text{mmol L}^{-1}$ , NADPH a 0,1  $\text{mmol L}^{-1}$  e 30  $\mu\text{L}$  de amostra proteica em solução tampão fosfato de potássio a 100  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH 7,5). A leitura foi realizada durante 1 minuto a 412 nm.

A revelação da atividade da GR foi determinada como descrito por Lee e Lee (2000). A eletroforese em PAGE (12%) foi realizada nas mesmas condições como descrita para CAT. Foi utilizada como padrão uma unidade de GR. Após tempo médio de cinco horas para eletroforese, os géis foram lavados em água desionizada e incubados à temperatura ambiente,

em uma solução de TRIS a  $0,25 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,5); 10 mg de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-yl)-2,5-brometo de difeniltetrazol (MTT); 10 mg de diclorofenolindofenol (DPIP); GSSG a  $2,4 \text{ mmol L}^{-1}$  e NADPH a  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ . Após o aparecimento das bandas a reação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de água desionizada e ácido acético a  $70 \text{ g L}^{-1}$ .

#### 5.2.4 Análise estatística

Os procedimentos estatísticos foram realizados com o auxílio do programa “SAS” (SAS Institute, 2008) utilizando-se inicialmente o teste F. Nos casos de significância da interação doses de enxofre x doses de cádmio efetuou-se a análise de regressão polinomial (superfície de resposta) por meio do procedimento RSREG. Quando a interação doses de enxofre x doses de cádmio não foi significativa, foi efetuado o estudo de regressão de primeiro e segundo graus com auxílio do programa gráfico estatístico SigmaPlot (SIGMAPLOT, 2004). As médias das concentrações de cisteína e metionina foram comparadas pelo teste Tukey ao nível de significância de 5%. Foram realizados estudos de correlação entre as variáveis analisadas. As equações de regressão e os coeficientes de correlação de Pearson apresentam os símbolos (\*) e (\*\*), que indicam níveis de significância de 5 e 1%, respectivamente.

### 5.3 Resultados e Discussão

#### 5.3.1 Malondialdeído (MDA)

O teor de MDA na parte aérea coletada no primeiro e segundo cortes do capim-tanzânia foi alterado significativamente pelas doses de cádmio em solução nutritiva, com os resultados ajustando-se ao modelo de segundo grau. Na parte aérea coletada no primeiro corte, o fornecimento da dose de cádmio de  $1,59 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentou em mais de duas vezes o teor de MDA em relação à não aplicação de cádmio, e na parte aérea coletada no segundo corte o fornecimento de cádmio na dose de  $0,85 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentou em 26% o teor de MDA em relação à não aplicação de cádmio (Figura 2A). O teor de MDA no sistema radicular do capim-tanzânia não foi significativo para a interação doses de enxofre x doses de cádmio, para doses de enxofre e para doses de cádmio em solução nutritiva.

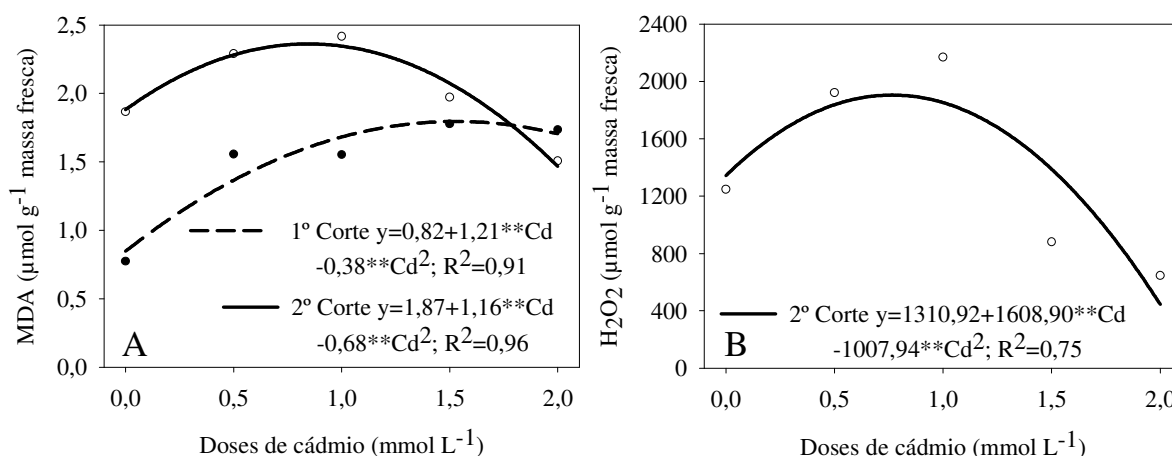


Figura 2 - Teor de malondialdeído (MDA) (A) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (B) na parte aérea do capim-tanzânia, em função de doses de cádmio em solução nutritiva

O cádmio não participa diretamente de reações redox no interior das células, uma vez que não altera o seu estado de oxidação (CLEMENS, 2006), mas resulta em lesões oxidativas devido à produção de EROs, tal como ocorre na peroxidação lipídica, que altera a funcionalidade da membrana e a carbonilação de proteínas (ROMERO-PUERTAS et al., 2002) e aumenta o teor de MDA (GARG; MANCHANDA, 2009). Zhao (2011) avaliou o efeito do fornecimento de cádmio ( $0,08$ ;  $0,89$  e  $8,92 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) para o sistema antioxidante de plantas de trigo (*Triticum aestivum*) e de milho e relatou que o teor de MDA nas duas culturas aumentou de forma linear com a elevação das doses de cádmio.

### 5.3.2 Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

O teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na parte aérea coletada no primeiro corte e no sistema radicular do capim-tanzânia não foi significativa para a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Na parte aérea coletada no segundo corte do capim-tanzânia as doses de cádmio alteraram significativamente o teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , cujos resultados ajustaram-se ao modelo de segundo grau. O fornecimento de cádmio na dose de  $0,79 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentou em 49% a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em relação à não aplicação de cádmio (Figura 2B).

A produção de EROs na planta é inevitável em virtude do metabolismo aeróbio, especialmente durante os processos de respiração e fotossíntese (HALLIWELL, 2006), porém, o teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  é baixo devido à atividade das enzimas CAT, APX e guaiacol peroxidase (GPOX) (GILL; TUTEJA, 2010; WANG; ZHANG; ALLEN, 1999). Na parte aérea coletada no segundo corte do capim-tanzânia houve aumento no teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com o

fornecimento de doses de cádmio próximas a  $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ , mas posteriormente houve redução com o fornecimento de doses de cádmio superiores a  $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ . Dessa forma, a menor produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser atribuída ao aumento da atividade da enzima APX, que também apresenta afinidade pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  (WANG; ZHANG; ALLEN, 1999). Yu et al. (2013) observaram que o fornecimento de cádmio ( $44,6$ ;  $89,2$ ;  $178,4$ ;  $356,8$  e  $713,6 \text{ } \mu\text{mol kg}^{-1}$  de solo) aumentou de forma linear o teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na parte aérea e no sistema radicular das plantas de arroz.

### 5.3.3 Proteína solúvel

O teor de proteína solúvel na parte aérea coletada no primeiro corte do capim-tanzânia não foi significativo para a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Na parte aérea coletada no segundo corte e nas raízes as doses de cádmio alteraram significativamente o teor de proteína solúvel, cujos resultados ajustaram-se ao modelo de segundo grau. O fornecimento da dose de cádmio de  $1,17 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentou em 48% o teor de proteína solúvel na parte aérea coletada no segundo corte e a disponibilidade de cádmio na dose de  $1,83 \text{ mmol L}^{-1}$  diminuiu em 33% o teor de proteína solúvel no sistema radicular, em relação à não aplicação de cádmio (Figura 3).

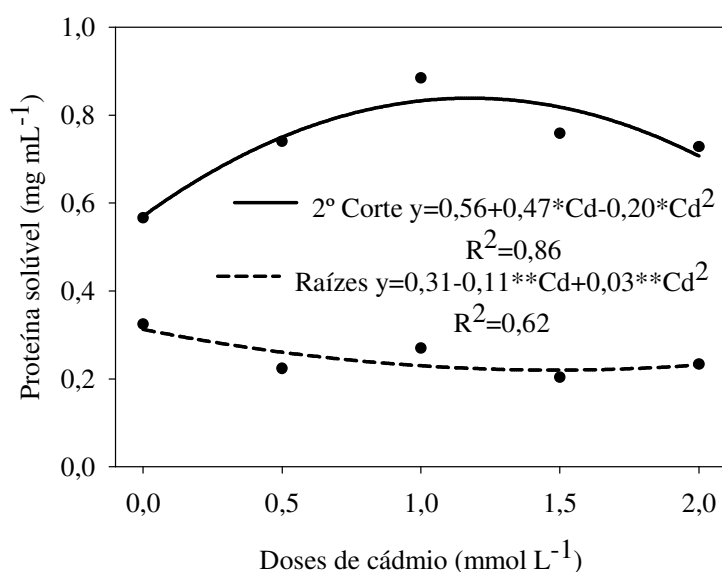


Figura 3 - Teor de proteína solúvel na parte aérea e nas raízes coletadas no segundo corte do capim-tanzânia em função de doses de cádmio em solução nutritiva

Quando há elevadas concentrações de cádmio nos tecidos vegetais, a funcionalidade da proteína pode ser afetada pela produção de EROs, por oxidação de aminoácidos de cadeias laterais ou por reações secundárias com produtos da peroxidação lipídica (como compostos aldeídicos) (REINHECKEL et al., 1998), alterando o teor de proteína solúvel. Aibibu et al. (2010) avaliaram o efeito da aplicação de cádmio (0,04; 0,08; 0,13; 0,17; 0,22 e 0,26 mmol L<sup>-1</sup>) em *Vetiveria zizanioides* e relataram que a produção de proteína solúvel diminuiu na parte aérea e no sistema radicular com a elevação das doses desse metal.

### 5.3.4 Cisteína e metionina

Não foram significativas a interação doses de enxofre x doses de cádmio, os efeitos das doses de enxofre e das doses de cádmio para a concentração de metionina (as concentrações médias na parte aérea colhida no primeiro e segundo cortes e nas raízes do capim-tanzânia foram, respectivamente, de 138,19; 90,92 e 25,26 mg kg<sup>-1</sup> de massa fresca). Entretanto, a interação doses de enxofre x doses de cádmio alterou a concentração de cisteína na parte aérea coletada no primeiro corte e no sistema radicular do capim-tanzânia (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentração de cisteína na parte aérea coletada no primeiro e segundo cortes e no sistema radicular do capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e de cádmio em solução nutritiva

Cádmio	Enxofre	Cisteína		
		mg kg <sup>-1</sup> de massa fresca		
mmol L <sup>-1</sup>		<i>Primeiro corte</i>	<i>Segundo corte</i>	<i>Sistema radicular</i>
0	0,1	10,61ab	18,04a	6,08e
	1,9	12,79ab	16,49a	13,84bc
	3,7	10,49ab	19,81a	10,59cde
1	0,1	17,49a	18,60a	14,79bc
	1,9	12,89ab	17,74a	10,89bcd
	3,7	17,80a	19,11a	23,13a
2	0,1	2,75b	21,59a	11,06bcd
	1,9	9,49ab	18,37a	15,37b
	3,7	17,23a	14,59a	7,81de

Letras distintas em cada coluna indicam médias significativamente diferentes pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

As maiores concentrações de cisteína na parte aérea coletada no primeiro corte da forrageira ocorreram quando houve fornecimento da maior dose de enxofre e fornecimento de cádmio de 1 e 2 mmol L<sup>-1</sup>. No sistema radicular foi verificado que o suprimento de enxofre de

3,7 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 1 mmol L<sup>-1</sup> resultou na maior concentração desse aminoácido. As menores concentrações de cisteína ocorreram em condições de suprimento limitado de enxofre (0,1 mmol L<sup>-1</sup>).

De acordo com Tukendorf e Rauser (1990), o metabolismo do enxofre pela planta é alterado em condições de estresse causado por metais pesados, principalmente, quando o fornecimento de enxofre é limitado, resultando em concentrações menores de cisteína e metionina. O suprimento de enxofre adequado é importante para assegurar que a planta aumente a concentração de cisteína, uma vez que esse aminoácido supostamente é utilizado para a biossíntese de GSH (ZECHMANN; MULLER; ZELNIG, 2008), que atua na tolerância aos metais pesados (GILL; TUTEJA, 2011). Schmidt (2012) verificou que o fornecimento das maiores doses de enxofre (1,9 e 2,5 mmol L<sup>-1</sup>) aumentou a concentração de cisteína nas folhas diagnósticas do capim-tanzânia cultivado com variada disponibilidade de enxofre (0,1; 1,0; 1,3; 1,9 e 2,5 mmol L<sup>-1</sup>).

### 5.3.5 Glutationa reduzida (GSH)

O teor de GSH na parte aérea coletada no primeiro corte do capim-tanzânia aumentou linearmente com as doses de cádmio, de forma que o fornecimento da dose de cádmio de 2,0 mmol L<sup>-1</sup> elevou em 18,5% o teor de GSH em relação à não aplicação de cádmio (Figura 4A). O teor de GSH na parte aérea e no sistema radicular colhidos no segundo corte do capim-tanzânia não foi significativo para a interação doses de enxofre x doses de cádmio, para doses de enxofre e para doses de cádmio em solução nutritiva.

O cádmio altera a produção de EROs das plantas, que aumentam os teores de GSH como mecanismo de defesa aos danos oxidativos (CHAO; HSU; KAO, 2009), uma vez que a GSH combate os radicais livres e está ligada ao ciclo ascorbato-glutationa, o qual remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da célula vegetal (NOCTOR; FOYER, 1998). O suprimento adequado de enxofre aumenta a concentração de cisteína e também permite que a produção de GSH pela planta seja maior (ZECHMANN; MULLER; ZELNIG, 2008). Mishra et al. (2009) relataram que o teor de GSH de *Ceratophyllum demersum* aumentou linearmente com o fornecimento de doses de cádmio menores do que as desse experimento (1, 5 e 10 μmol L<sup>-1</sup>).

### 5.3.6 Glutathiona oxidada (GSSG)

O teor de GSSG na parte aérea colhida no primeiro e segundo cortes do capim-tanzânia não apresentou significância para a interação doses de enxofre x doses de cádmio. Todavia, esse teor diminuiu linearmente no sistema radicular do capim-tanzânia com a elevação das doses de cádmio, sendo que o fornecimento de cádmio na dose de 2,0 mmol L<sup>-1</sup> reduziu em 61% o teor de GSSG em relação à ausência de aplicação de cádmio (Figura 4B).

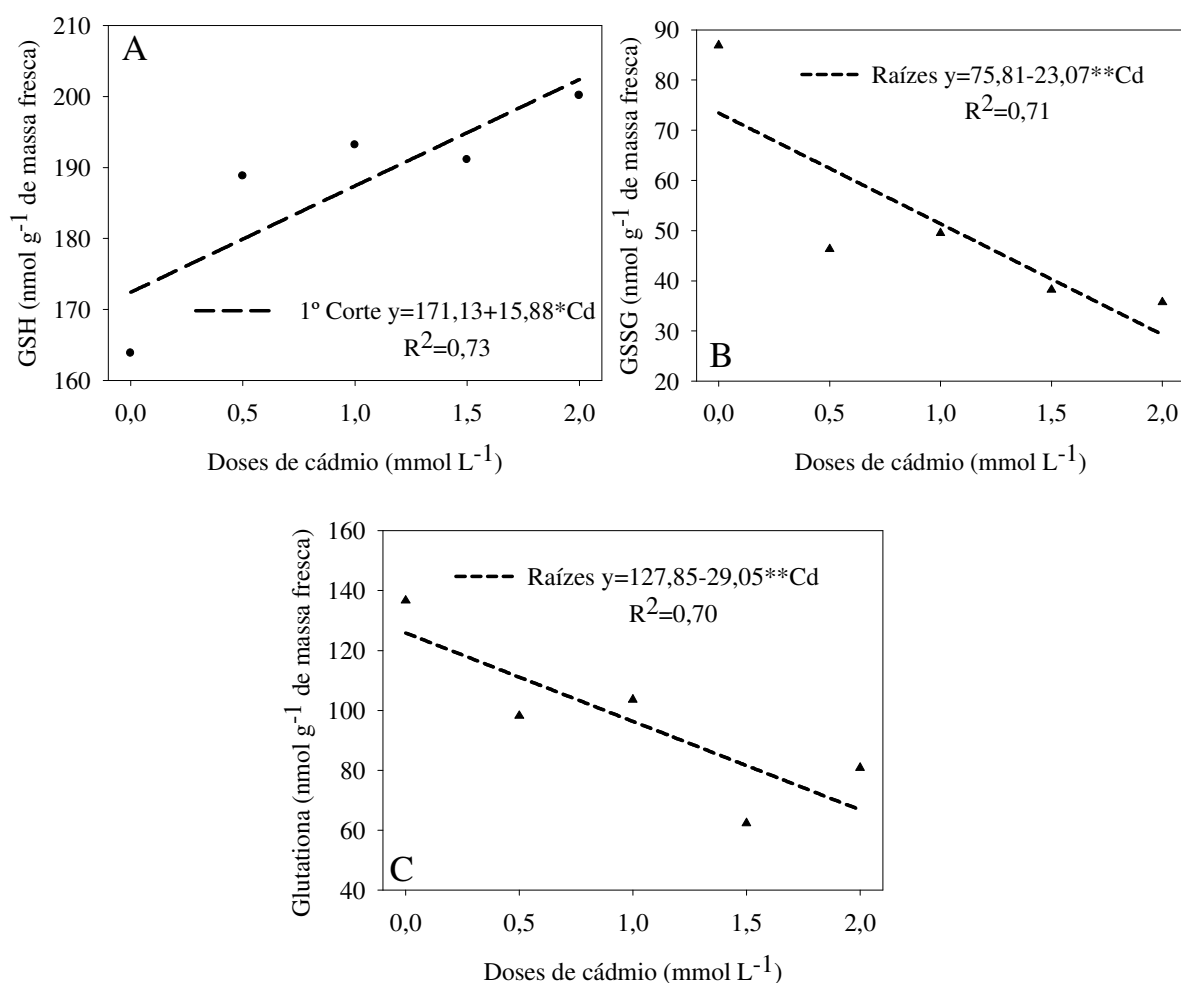


Figura 4 - Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) na parte aérea (A), glutathiona oxidada (GSSG) (B) e glutathiona (GSH+GSSG) (C) nas raízes do capim-tanzânia, em função de doses de cádmio em solução nutritiva

Esse resultado pode ser atribuído à possível redução no teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas raízes do capim-tanzânia, uma vez que teores de GSSG mais elevados estão associados ao aumento do teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pois, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é reduzido a H<sub>2</sub>O + GSSG pela atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPX) (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005). Outra possibilidade de



explicação para o efeito constatado é o aumento da atividade da enzima GR no sistema radicular do capim-tanzânia, resultando em menores teores de GSSG (JIN et al., 2008). Hatata e Abdel-Aal (2008) avaliaram o efeito do cádmio (10, 50 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) na cultura do girassol (*Helianthus annuus*) e relataram que o teor de GSSG diminuiu linearmente com a elevação das doses de cádmio.

### 5.3.7 Glutationa (GSH+GSSG)

O teor de glutatona (GSH+GSSG) na parte aérea coletada no primeiro e segundo cortes do capim-tanzânia não foi significativa para a interação doses de enxofre x doses de cádmio em solução nutritiva, mas foi modificado no sistema radicular pelas doses de cádmio. Houve redução linear no teor de glutatona do sistema radicular do capim-tanzânia com a elevação das doses de cádmio, de forma que o fornecimento da dose de cádmio de 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  reduziu em 45,5% o teor de glutatona em relação à ausência de cádmio na solução (Figura 4C).

Plantas que apresentam alta concentração de cádmio nos tecidos utilizam a GSH como substrato para síntese de fitoquelatinas, como tentativa de diminuir a toxicidade causada pelo cádmio (DAL CORSO et al., 2008), reduzindo o teor de GSH. Em adição, o teor de GSSG do sistema radicular do capim-tanzânia foi reduzido com a elevação das doses de cádmio. Portanto, as reduções nos teores de GSH e GSSG determinam a redução do teor de glutatona. Hatata e Abdel-Aal (2008) verificaram que doses de cádmio (10, 50 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) menores que as desse experimento diminuíram linearmente o teor de glutatona das plantas de girassol.

### 5.3.8 Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT na parte aérea colhida no primeiro e segundo cortes do capim-tanzânia não apresentou significância para a interação doses de enxofre x doses de cádmio. A atividade da CAT no sistema radicular do capim-tanzânia diminuiu linearmente com as doses de cádmio, onde o fornecimento de cádmio na dose de 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$  reduziu em 51,5% a atividade da enzima em relação à não aplicação de cádmio (Figura 5A).

Em condições de elevada quantidade absorvida de cádmio pela planta a atividade da enzima CAT normalmente é reduzida (BENAVIDES; GALLEGO; TOMARO, 2005), uma vez que o cádmio causa a oxidação de grupos tiol da enzima CAT (DAL CORSO et al., 2008). Nahakpam e Shah (2011) verificaram que a atividade da enzima CAT diminuiu na

parte aérea e no sistema radicular de plantas de arroz com a elevação das doses de cádmio (10, 50, 100 e 500  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ).

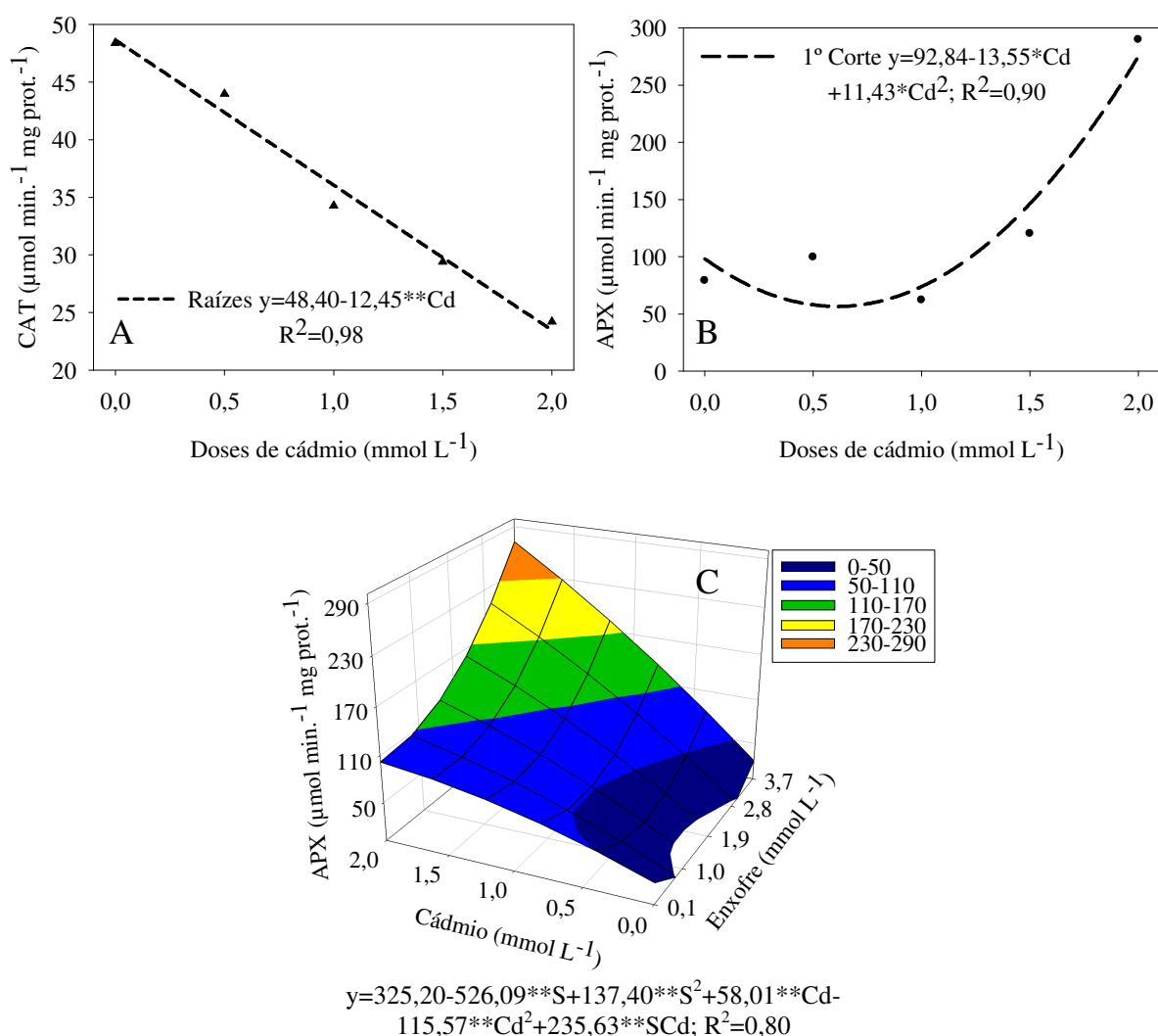


Figura 5 - Atividade da enzima CAT (A) e da enzima APX na parte aérea coletada no primeiro corte (B) do capim-tanzânia em função de doses de cádmio e da enzima APX na parte aérea coletada no segundo corte (C) em função das combinações de doses de enxofre e cádmio na solução nutritiva

### 5.3.9 Ascorbato peroxidase (APX)

Na parte aérea coletada no primeiro corte do capim-tanzânia as doses de cádmio alteraram significativamente a atividade da enzima APX, com os resultados ajustando-se ao modelo de segundo grau. O fornecimento da dose de cádmio de  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$  resultou na menor atividade da enzima. Contudo, doses de cádmio superiores a  $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$  aumentaram a atividade da APX (Figura 5B). A interação doses de enxofre x doses de cádmio foi

significativa para a atividade da enzima APX na parte aérea coletada no segundo corte do capim-tanzânia, notando-se que em condições de alta disponibilidade de cádmio ( $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e baixo suprimento de enxofre ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ) a atividade da enzima foi menor quando comparada às condições de alta disponibilidade de cádmio e alto suprimento de enxofre ( $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (Figura 5C). A atividade da enzima APX no sistema radicular do capim-tanzânia não foi significativa para a interação doses de enxofre x doses de cádmio, para doses de enxofre e doses de cádmio em solução nutritiva.

Plantas expostas ao cádmio têm maior atividade da enzima APX por ativarem o ciclo ascorbato-glutationa (ANJUM et al., 2011; NAHAKPAM; SHAH, 2011), uma vez que a APX atua na redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  e outra de monodeidroascorbato para cada molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BENAVIDES; GALLEGOS; TOMARO, 2005). A oxidação da GSH também está envolvida na ativação do ciclo ascorbato-glutationa, de forma que o suprimento de enxofre aumenta o teor de GSH em plantas cultivadas sob condições de estresse, que é oxidado pela presença do cádmio na tentativa de minimizar os danos causados pelas EROs, ativando o ciclo ascorbato-glutationa, que resulta em maior atividade da enzima APX por atuar na redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado (MENDOZA-CÓZATL et al., 2005; NAHAKPAM; SHAH, 2011).

Gill, Khan e Tuteja (2012) relataram que a atividade da enzima APX aumentou com a elevação das doses de cádmio ( $0,22$ ;  $0,44$  e  $0,88 \text{ mmol kg}^{-1}$  de solo) em plantas de *Lepidium sativum*. Tewari, Kumar e Sharma (2010) verificaram que a atividade da enzima APX em *Morus alba* foi maior na ausência de enxofre quando comparada ao fornecimento de enxofre de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , o que está associado à elevação no teor de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de plantas cultivadas em condições de deficiência de enxofre.

### 5.3.10 Atividades enzimáticas em PAGE

A atividade da enzima SOD em PAGE na parte aérea coletada no primeiro (Figura 6A) e segundo (Figura 6B) cortes do capim-tanzânia não revelou diferenças no perfil de isoformas ativas de SOD para as combinações de doses de enxofre e de cádmio testadas em solução nutritiva. Na parte aérea coletada no primeiro e segundo cortes foram identificadas três isoformas de SOD. No sistema radicular do capim-tanzânia, a atividade da enzima SOD em PAGE revelou diferenças no perfil de isoformas ativas em função das combinações de doses de enxofre e cádmio testadas em solução nutritiva. Quando houve combinação de enxofre de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  sem aplicação de cádmio foram identificadas quatro isoformas, enquanto com a

aplicação de enxofre de  $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$  e de cádmio de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  foram identificadas duas isoformas. Apenas uma isoforma foi identificada com as combinações de enxofre de  $1,9$  e  $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$  sem fornecer cádmio. Nas demais combinações de doses de enxofre e de cádmio não foram identificadas isoformas de SOD (Figura 6C).

A SOD é um grupo de metaloenzimas que catalisa a remoção do radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) por dismutação, uma vez que várias isoformas de SOD são relatadas em plantas superiores (SHAH et al., 2001), como a presença de Cu/Zn-SOD no citosol e cloroplastos, Fe-SOD nos cloroplastos e Mn-SOD na matriz mitocondrial e peroxissomos (BOWLER et al., 1994). Na parte aérea coletada no segundo corte, algumas bandas apresentaram maior intensidade (Figura 6B), sugerindo que a atividade da enzima SOD foi maior no período de rebrotação do capim-tanzânia. A ausência de isoformas de SOD no sistema radicular do capim-tanzânia, em condições de média e alta disponibilidades de cádmio em solução nutritiva, com exceção à combinação das doses de enxofre de  $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$  com cádmio de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , sugere que a enzima SOD do sistema radicular do capim-tanzânia é pouco responsiva ao estresse oxidativo causado por cádmio.

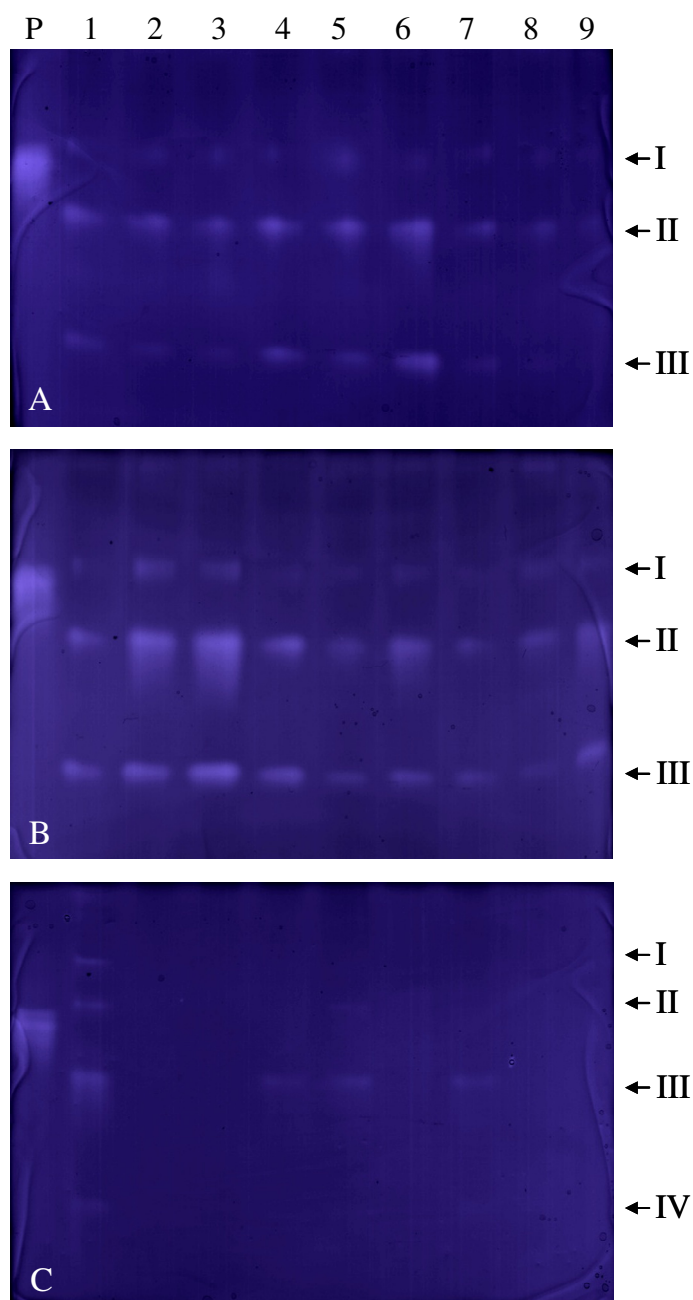


Figura 6 - Atividade da SOD em PAGE não desnaturante na parte aérea colhida no primeiro (A) e segundo (B) cortes e no sistema radicular (C) do capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e de cádmio na solução nutritiva. As bandas seguem a ordem: padrão de SOD bovino (P) e as respectivas combinações de doses de enxofre ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) e de cádmio ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) - 0,1/0,0 (1); 0,1/1,0 (2); 0,1/2,0 (3); 1,9/0,0 (4); 1,9/1,0 (5); 1,9/2,0 (6); 3,7/0,0 (7); 3,7/1,0 (8) e 3,7/2,0 (9). As setas indicam as isoformas identificadas em PAGE

A atividade da enzima CAT em PAGE revelou diferenças no perfil de isoformas ativas de CAT com as combinações de doses de enxofre e de cádmio testadas em solução nutritiva na parte aérea colhida no primeiro e segundo cortes do capim-tanzânia. Nos dois cortes foram

identificadas três isoformas ativas de CAT. No primeiro corte houve maior intensidade das bandas com as combinações das doses de enxofre de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e de cádmio de 2,0 mmol L<sup>-1</sup>, enxofre de 1,9 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e enxofre de 3,7 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (Figura 7A). Na parte aérea coletada no segundo corte as combinações das doses de enxofre de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, enxofre de 1,9 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>, enxofre de 3,7 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e enxofre de 3,7 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 2,0 mmol L<sup>-1</sup> apresentaram maior intensidade em relação às outras bandas (Figura 7B). No sistema radicular do capim-tanzânia foram identificadas apenas duas isoformas ativas de CAT e as bandas referentes às combinações das doses de enxofre de 0,1 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 2,0 mmol L<sup>-1</sup> e enxofre de 1,9 mmol L<sup>-1</sup> e cádmio de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> apresentaram maior intensidade (Figura 7C).

A enzima CAT desempenha importante função na planta, uma vez que está envolvida com genes de defesa, que respondem ao estresse oxidativo fisiológico e ambiental (SCANDALIOS, 1990). Na parte aérea do capim-tanzânia foram identificadas três isoformas de CAT, assim como ocorre em plantas de milho (GUAN; ZAHO; SCANDALIOS, 2000), porém, seis isoformas de CAT são conhecidas em *Arabidopsis thaliana* (FRUGOLI et al., 1996). As maiores intensidades de bandas na parte aérea e no sistema radicular do capim-tanzânia foram verificadas quando houve fornecimento de cádmio na dose de 1,0 e 2,0 mmol L<sup>-1</sup> combinados com as doses de enxofre de 0,1; 1,9 e 3,7 mmol L<sup>-1</sup> na solução nutritiva. Esse resultado indica que a enzima CAT é responsiva à toxicidade causada pelo cádmio e que o capim-tanzânia apresenta mecanismo ativo e eficiente de proteção à membrana. Resultados similares foram reportados por Luo et al. (2011), que avaliaram a resposta do sistema antioxidante em *Lolium perenne* ao cádmio (0,2 e 0,5 mmol L<sup>-1</sup>) e relataram que a atividade da enzima CAT aumentou em condições de maior toxicidade causada pelo cádmio.

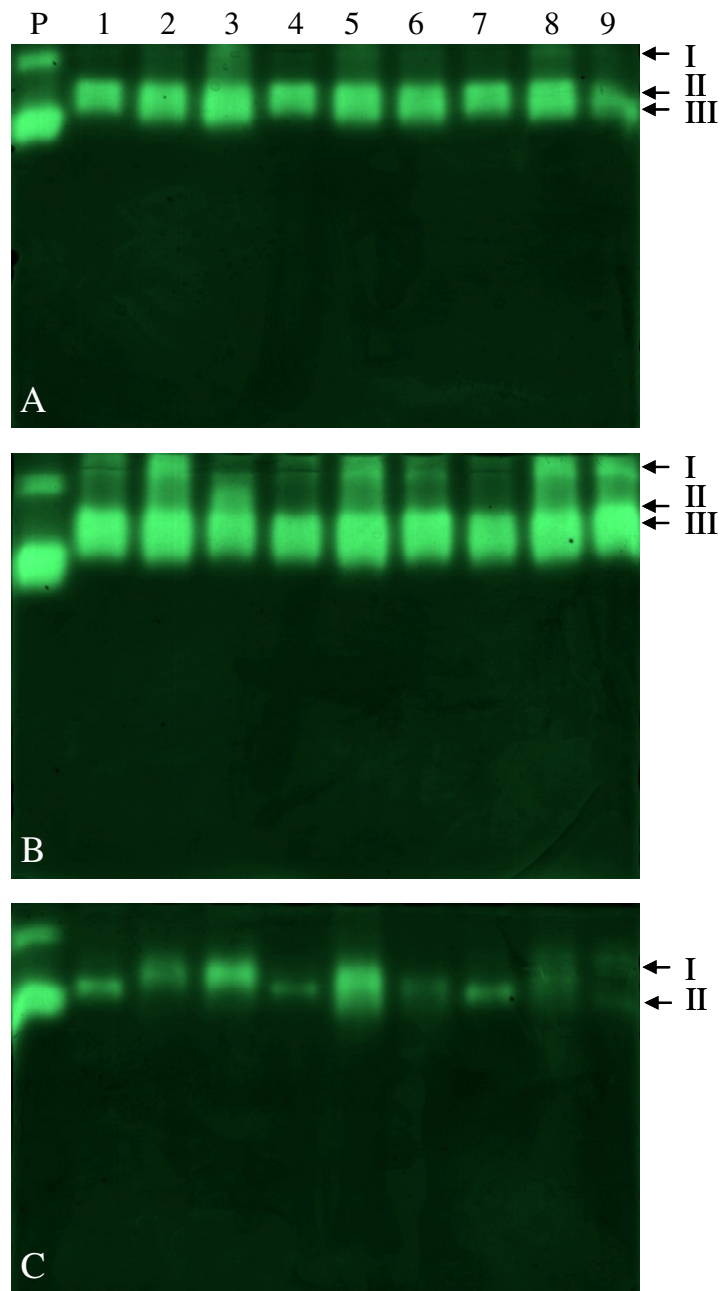


Figura 7 - Atividade da CAT em PAGE não desnaturante na parte aérea coletada no primeiro (A) e segundo (B) cortes e no sistema radicular (C) do capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e de cádmio na solução nutritiva. As bandas seguem a ordem: padrão de CAT bovino (P) e as respectivas combinações de doses de enxofre ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) e de cádmio ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) - 0,1/0,0 (1); 0,1/1,0 (2); 0,1/2,0 (3); 1,9/0,0 (4); 1,9/1,0 (5); 1,9/2,0 (6); 3,7/0,0 (7); 3,7/1,0 (8) e 3,7/2,0 (9). As setas indicam as isoformas identificadas em PAGE

A atividade da enzima GR em PAGE na parte aérea colhida no primeiro e segundo cortes do capim-tanzânia não revelou diferenças no perfil de isoformas ativas em resposta às combinações de doses de enxofre e de cádmio testadas na solução nutritiva. Nos materiais

coletados nos dois cortes foram identificadas três isoformas de GR (Figuras 8A e 8B). No sistema radicular do capim-tanzânia a atividade da enzima GR em PAGE revelou diferenças no perfil de isoformas ativas em função das combinações de doses de enxofre e de cádmio. Foram identificadas apenas duas isoformas de GR ativas no sistema radicular, sendo que as combinações das doses de enxofre de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$  sem emprego de cádmio, enxofre de  $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$  sem aplicação de cádmio, enxofre de  $1,9 \text{ mmol L}^{-1}$  e cádmio de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  e enxofre de  $3,7 \text{ mmol L}^{-1}$  sem disponibilizar cádmio na solução nutritiva apresentaram maior atividade em relação às outras combinações (Figura 8C).

GR é a enzima-chave no ciclo ascorbato-glutationa por proteger células contra os danos oxidativos causados pelo cádmio e por reciclar o metabólito glutaciona, quando oxidado (FOYER; NOCTOR, 2005). A atividade da enzima GR foi maior na parte aérea do capim-tanzânia do que no sistema radicular, possivelmente pelo maior número de isoformas e pela maior intensidade das bandas, o que pode aumentar a reciclagem de glutaciona durante o período de estresse oxidativo nesse tecido (YANNARELLI et al., 2007). Yannarelli et al. (2007) verificaram que a atividade de GR no sistema radicular do trigo foi maior do que na parte aérea em condições de estresse causado por cádmio ( $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ ).



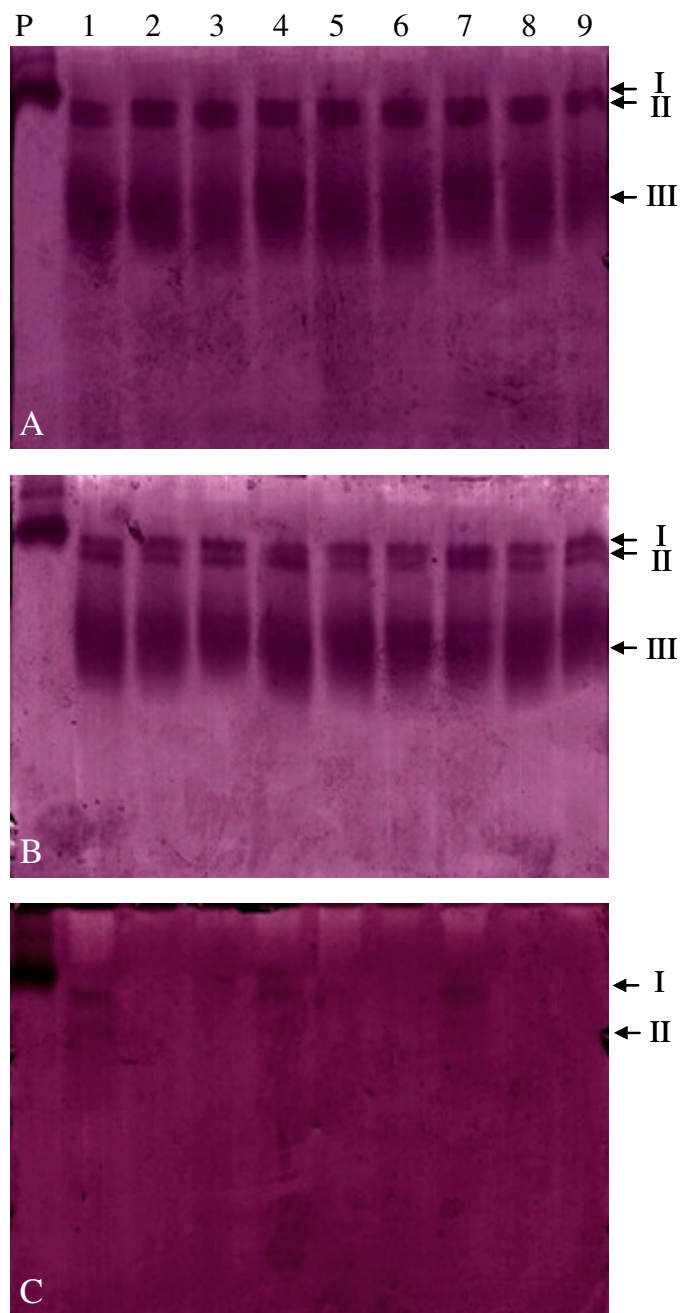


Figura 8 - Atividade da GR em PAGE não desnaturante na parte aérea coletada no primeiro (A) e segundo (B) cortes e no sistema radicular (C) do capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e de cádmio em solução nutritiva. As bandas seguem a ordem: padrão de GR bovino (P) e as respectivas combinações de doses de enxofre ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) e de cádmio ( $\text{mmol L}^{-1}$ ) - 0,1/0,0 (1); 0,1/1,0 (2); 0,1/2,0 (3); 1,9/0,0 (4); 1,9/1,0 (5); 1,9/2,0 (6); 3,7/0,0 (7); 3,7/1,0 (8) e 3,7/2,0 (9). As setas indicam as isoformas identificadas em PAGE

### 5.3.11 Correlações

No primeiro e segundo cortes da parte aérea do capim-tanzânia os mais altos coeficientes de correlação positiva foram verificados entre o teor de glutatona, GSH e GSSG, uma vez que a glutatona é resultado da GSH+GSSG (GILL; TUTEJA, 2010). O teor de MDA correlacionou-se positivamente com o teor de  $H_2O_2$ , pois, o aumento na produção de EROs eleva a peroxidação lipídica da membrana (ROMERO-PUERTAS et al., 2002) (Tabela 3).

Tabela 3 - Coeficiente de correlação de Pearson entre parâmetros indicativos de estresse, antioxidantes não enzimáticos e antioxidantes enzimáticos do capim-tanzânia cultivado com combinações de doses de enxofre e de cádmio em solução nutritiva

Primeiro corte (n=52)								
	MDA	$H_2O_2$	GSH	GSSG	Glut	CAT	APX	GR
MDA	-	0,32*	0,45**	-0,02 <sup>ns</sup>	0,29*	0,08 <sup>ns</sup>	0,24 <sup>ns</sup>	0,32*
$H_2O_2$	-	-	0,34*	-0,28*	-0,02 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>	-0,11 <sup>ns</sup>	0,08 <sup>ns</sup>
GSH	-	-	-	-0,31*	0,41**	0,20 <sup>ns</sup>	0,01 <sup>ns</sup>	0,22 <sup>ns</sup>
GSSG	-	-	-	-	0,73**	-0,08 <sup>ns</sup>	-0,03 <sup>ns</sup>	0,14 <sup>ns</sup>
Glut	-	-	-	-	-	0,06 <sup>ns</sup>	-0,02 <sup>ns</sup>	0,29*
Segundo corte (n=39)								
	MDA	$H_2O_2$	GSH	GSSG	Glut	CAT	APX	GR
MDA	-	0,67**	0,42**	0,33*	0,47**	-0,35*	0,02 <sup>ns</sup>	-0,11 <sup>ns</sup>
$H_2O_2$	-	-	0,24 <sup>ns</sup>	-0,06 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	-0,21 <sup>ns</sup>	0,11 <sup>ns</sup>	-0,22 <sup>ns</sup>
GSH	-	-	-	0,31 <sup>ns</sup>	0,83**	0,00 <sup>ns</sup>	-0,10 <sup>ns</sup>	0,32*
GSSG	-	-	-	-	0,77**	-0,10 <sup>ns</sup>	-0,06 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>
Glut	-	-	-	-	-	-0,09 <sup>ns</sup>	0,00 <sup>ns</sup>	0,07 <sup>ns</sup>
Raízes (n=52)								
	MDA	$H_2O_2$	GSH	GSSG	Glut	CAT	APX	GR
MDA	-	0,33*	0,11 <sup>ns</sup>	-0,04 <sup>ns</sup>	-0,09 <sup>ns</sup>	0,32*	0,16 <sup>ns</sup>	0,05 <sup>ns</sup>
$H_2O_2$	-	-	-0,19 <sup>ns</sup>	-0,20 <sup>ns</sup>	-0,07 <sup>ns</sup>	-0,32*	0,44**	0,12 <sup>ns</sup>
GSH	-	-	-	-0,19 <sup>ns</sup>	0,71**	0,04 <sup>ns</sup>	-0,22 <sup>ns</sup>	0,23 <sup>ns</sup>
GSSG	-	-	-	-	0,13 <sup>ns</sup>	0,50**	0,01 <sup>ns</sup>	-0,27 <sup>ns</sup>
Glut	-	-	-	-	-	0,25 <sup>ns</sup>	-0,09 <sup>ns</sup>	0,29*

\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; ns - não significativo. MDA - malondialdeído;  $H_2O_2$  - peróxido de hidrogênio; GSH - glutatona reduzida; GSSG - glutatona oxidada; Glut - glutatona (GSH+GSSG); CAT - catalase; APX - ascorbato peroxidase; GR - glutatona redutase.

No sistema radicular do capim-tanzânia a enzima CAT apresentou correlação positiva com o teor de GSSG, indicando que em condições de estresse oxidativo essa enzima atua na dismutação do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  e é indispensável para a desintoxicação de EROs (BOLWELL; WOFTASTEK, 1997).

## 5.4 Conclusões

Em condições de alta concentração nos tecidos vegetais do capim-tanzânia, o cádmio aumenta a peroxidação lipídica e a produção de GSH, enquanto o suprimento de enxofre propicia maior concentração de cisteína e atividade mais alta da enzima APX. A enzima SOD do sistema radicular do capim-tanzânia é pouco responsiva ao estresse oxidativo causado por cádmio. A parte aérea do capim-tanzânia tem mais isoformas ativas das enzimas CAT e GR do que as raízes.

## Referências

- AIBIBU, N.; LIU, Y.; ZENG, G.; WANG, X.; CHEN, B.; SONG, H.; XU, L. Cadmium accumulation in *Vetiveria zizanioides* and its effects on growth, physiological and biochemical characters. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 6297-6303, 2010.
- ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J.M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, Berlin, v. 3, p. 71-90, 2004.
- ANJUM, N.A.; UMAR, S.; IQBAL, M.; KHAN, N.A. Cadmium causes oxidative stress in mung bean by affecting the antioxidant enzyme system and ascorbato-glutathione cycle metabolism. **Russian Journal of Plant Physiology**, New York, v. 58, p. 92-99, 2011.
- ASTOLFI, S.; ZUCHI, S.; PASSERA, C. Role of sulphur availability on cadmium-induced changes of nitrogen and sulphur metabolism in maize (*Zea mays* L.) leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 161, p. 795-802, 2004.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BEAUCHAMP, C.H.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, p. 276-287, 1971.
- BENAVIDES, M.P.; GALLEGO, S.M.; TOMARO, M.L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, p. 21-34, 2005.
- BIELESKI, R.L.; TURNER, A. Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 17, p. 278-293, 1966.
- BOLWELL, G.P.; WOFTASTEK, P. Mechanism for the generation of reactive oxygen species in plant defense-broad perspective. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 51, p. 347-349, 1997.

BOWLER, C.; VAN CAMP, W.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D. Superoxide dismutase in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v. 13, p. 199-218, 1994.

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

CHAFFEI, C.; PAGEAU, K.; SUZUKI, A.; GOUIA, H.; GHORBEL, H.M.; MASCALAUX-DAUBRESSE, C. Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through amino acid storage strategy. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 45, p. 1681-1693, 2004.

CHAO, Y.Y.; HSU, Y.T.; KAO, C.H. Involvement of glutathione in heat shock and hydrogen peroxide induced cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 318, p. 37-45, 2009.

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

CUI, Y.; WANG, Q. Physiological responses of maize to elemental sulphur and cadmium stress. **Plant, Soil and Environment**, Praha, v. 52, p. 523-529, 2006.

CUYPERS, A.; PLUSQUIN, M.; REMANS, T.; JOZEFCAK, M.; KEUNEN, E.; GIELEN, H.; OPDENAKKER, K.; NAIR, A.R.; MUNTERS, R.; ARTOIS, T.J.; NAWROT, T.; VANGRONVELD, J.; SMEETS, K. Cadmium stress: an oxidative challenge. **Biometals**, Dordrecht, v. 23, p. 927-940, 2010.

DAL CORSO, G.; FARINATI, S.; MAISTRI, S.; FURINI, A. How plants cope with cadmium: staking all on metabolism and gene expression. **Journal of Integrative Plant Biology**, Hoboken, v. 50, p. 1268-1280, 2008.

FAN, J.; HU, Z.; ZIADI, N.; WU, C. Excessive sulfur supply reduces cadmium accumulation in brown rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental Pollution**, Oxford, v. 158, p. 409-415, 2010.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell and Environment**, Malden, v. 28, p. 1056-1071, 2005.

FRUGOLI, J.A.; ZHONG, H.H.; NUCCIO, M.L.; McCOURT, P.; McPEEK, M.A.; THOMAS, T.L.; McCLUNG, C.R. Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant Physiology**, Rockville, v. 112, p. 327-336, 1996.

GALLEGO, S.M.; PENA, L.B.; BARCIA, R.A.; AZPILICUETA, C.E.; IANNONE, 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**, Oxford, v. 83, p. 33-46, 2012.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. **European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, Isparta, v. 3, p. 58-66, 2003.

- GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, Oxon, v. 143, p. 8-96, 2009.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GILL, S.S.; TUTEJA, N. Cadmium stress tolerance in crop plants probing the role of sulfur. **Plant Signaling and Behavior**, Austin, v. 6, p. 215-222, 2011.
- GILL, S.S.; KHAN, N.A.; TUTEJA, N. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidium sativum* L.). **Plant Science**, Shannon, v. 182, p. 112-120, 2012.
- GOMES-JUNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, p. 449-456, 2007.
- GRATÃO, P.L.; PRASAD, M.N.V.; CARDOSO, P.F.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Phytoremediation: green technology for the clean up of toxic metals in the environment. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 17, p. 53-64, 2005.
- GUAN, L.M.; ZHAO, J.; SCANDALIOS, J.G. Cis-elements and trans-factors that regulate expression of the maize *Cat1* antioxidant gene in response to ABA and osmotic stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is likely intermediary signalling molecule for the response. **Plant Journal**, Hoboken, v. 22, p. 87-95, 2000.
- HALLIWELL, B. Redox biology is fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, p. 312-322, 2006.
- HATATA, M.M.; ABDEL-AAL, E.A. Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments. **American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, Dubai, v. 4, p. 655-669, 2008.
- HEATH, R.L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 125, p. 189-198, 1968.
- HOAGLAND, D.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. California Agriculture Experimental Station, 1950. 347 p. (Circular, 347).
- ISRAR, M.; SAHI, S.V.; JAIN, J. Cadmium accumulation and antioxidative responses in the sesbania *Drummondii callus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 50, p. 121-127, 2006.
- JIN, X.F.; YANG, X.; MAHMOOD, Q.; ISLAM, E.; LIU, D.; LI, H. Response of antioxidant enzymes, ascorbate and glutathione metabolism towards cadmium in hyperaccumulator and nonhyperaccumulator ecotypes of *Sedum alfredii* H. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 23, p. 517-529, 2008.

- KRAUS, T.E.; McKERSIE, B.D.; FLETCHER, R.A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 145, p. 570-576, 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves cucumber in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Shannon, v. 159, p. 75-85, 2000.
- LITTELL, R.C.; MOTT, G.O. Computer assisted design and analysis of response surface experiments in agronomy. **Soil and Crop Society of Florida Proceedings**, Ona, v. 34, p. 94-97, 1975.
- LIU, X.L.; ZHANG, S.Z.; SHAN, X.Q.; PETER, C. Combined toxicity of cadmium and arsenate to wheat seedlings and plant uptake and antioxidative enzyme responses to cadmium and arsenate co-contamination. **Ecotoxicology and Environment Safety**, Amsterdam, v. 68, p. 305-313, 2007.
- LUO, H.; LI, H.; ZHANG, X.; FU, J. Antioxidant responses and gene expression in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) under cadmium stress. **Ecotoxicology**, Dordrecht, v. 20, p. 770-778, 2011.
- MENDOZA-CÓZATL, D.; LOZA-TAVERA, H.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, A.; MORENO-SÁNCHEZ, R. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. **FEMS Microbiology Reviews**, Hoboken, v. 29, p. 653-671, 2005.
- MISHRA, S.; TRIPATHI, R.D.; SRIVASTAVA, S.; DWIVEDI, S.; TRIVEDI, P.K.; DHANKHER, O.P.; KHARE, A. Thiol metabolism play significant role during cadmium detoxification by *Ceratophyllum demersum* L. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 100, p. 2155-2161, 2009.
- NAHAKPAM, S.; SHAH, K. Expression of key antioxidant enzymes under combined effect of heat and cadmium toxicity in growing rice seedlings. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 63, p. 23-35, 2011.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, p. 867-880, 1981.
- NASCIMENTO, C.W.A.; XING, B. Phytoextraction: a review on enhanced metal availability and plant accumulation. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, p. 299-311, 2006.
- NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 249-279, 1998.
- RAUSCH, T.; WACHTER, A. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defense operations. **Trends in Plant Science**, London, v. 10, p. 503-509, 2005.

REINHECKEL, T.; NOACK, H.; LORENZ, S.; WISWEDEL, I.; AUGUSTIN, W. Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. **Free Radical Research**, London, v. 29, p. 297-305, 1998.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; PALMA, J.M.; GOMEZ, L.A.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Cadmium causes oxidative modification of proteins in plants. **Plant Cell and Environment**, Hoboken, v. 25, p. 677-686, 2002.

ROMERO-PUERTAS, M.C.; CORPAS, F.J.; RODRIGUEZ-SERRANO, M.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L.A.; SANDALIO, L.M. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 164, p. 1346-1357, 2007.

SAITO, K. Regulation of sulfate transport and synthesis of sulfur-containing amino acids. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 3, p. 188-195, 2000.

SAS Institute. **SAS User's guide**: Statistics. Version 9.2. Cary, NC, 2008.

SCANDALIOS, J.G. Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. **Advances in Genetics**, San Diego, v. 28, p. 1-41, 1990.

SCHMIDT, F. **Modificações morfológicas e metabólicas em gramínea e leguminosa forrageiras tropicais relativas ao suprimento de enxofre**. 2012. 164p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2012.

SHAH, K.; KUMAR, R.G.; VERMA, S.; DUBEY, R.S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, Shannon, v. 161, p. 1135-1144, 2001.

SIGMAPLOT. **For windows, version 9.01**. Systat Software, 2004.

SMITH, I.K.; VIERHELLER, T.L.; THORNE, C.A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithilbis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical Biochemistry**, New York, v. 175, p. 408-413, 1988.

TEWARI, R.K.; KUMAR, P.; SHARMA, P.N. Morphology and oxidative physiology of sulphur-deficient mulberry plants. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 68, p. 301-308, 2010.

TUKENDORF, A.; RAUSER, W.E. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. **Plant Science**, Shannon, v. 70, p. 155-166, 1990.

WANG, J.; ZHANG, H.; ALLEN, R.D. Over expression of an *Arabidopsis* peroxisomal ascorbate peroxidase gene in tobacco increases protection against oxidative stress. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 40, p. 725-732, 1999.

YANNARELLI, G.G.; FERNÁNDEZ-ALVAREZ, A.J.; SANTA-CRUZ, D.M.; TOMARO, M.L. Glutathione reductase activity and isoforms in leaves and roots of wheat plants subjected to cadmium stress. **Phytochemistry**, Oxford, v. 68, p. 505-512, 2007.

YU, F.; LIU, K.; LI, M.; ZHOU, Z.; DENG, H.; CHEN, B. Effects of cadmium on enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences of rice (*Oryza sativa* L.). **International Journal of Phytoremediation**, Philadelphia, v. 15, p. 513-521, 2013.

ZECHMANN, B.; MÜLLER, M.; ZELNIG, G. Modified levels of cysteine affect glutathione metabolism in plant cells. In: KHAN, N.A.; SINGH, S.; UMAR, S. (Eds.) **Sulfur assimilation and abiotic stresses in plants**. The Netherlands: Springer, 2008. chap. 15, p. 193-206.

ZHANG, X.; XIA, H.; LI, Z.; ZHUANG, P.; GAO, B. Potential of four forage grasses in remediation of Cd and Zn contaminated soils. **Bioresource Technology**, Oxford, v. 101, p. 2063-2066, 2010.

ZHAO, Y. Cadmium accumulation and antioxidative defenses in leaves of *Triticum aestivum* L. and *Zea mays* L. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, p. 2936-2943, 2011.