INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Estudo sobre os efeitos do cobre e zinco no crescimento da plântula de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith cultivada *in vitro*. Aplicação da análise por ativação com nêutrons.

MARIA CRISTINA TESSARI ZAMPIERI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mitiko Saiki

São Paulo

2010

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Estudo sobre os efeitos do cobre e zinco no crescimento da plântula de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L. B. Smith cultivada *in vitro*. Aplicação da análise por ativação com nêutrons.

MARIA CRISTINA TESSARI ZAMPIERI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mitiko Saiki

São Paulo

2010

Dedico esta dissertação à pessoa que começa a escrever uma história, eu mesma.

“ Aproveito este momento para repensar minha vida: percebo meus erros e acertos, procuro me perdoar pelos fracassos e orgulhar-me das vitórias. A história da minha vida foi baseada nos meus erros, acertos, fracassos e vitórias. E por isso, são valorizados por igual. Sem eles eu não seria quem sou.”

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade e pelo privilégio que me foi dado em compartilhar tamanha experiência e, ao frequentar este curso, perceber e atentar para a relevância de temas interdisciplinares que não faziam parte, em profundidade, da minha vida.

A minha querida e estimada orientadora Prof^a. Dr^a. MITIKO SAIKI pelo incentivo, por ter me ensinado a arte de pensar o trabalho acadêmico com rigor e disciplina, aprimorando os meus conhecimentos, sem a qual este trabalho não teria sido concluído, e também pela presteza no auxílio e discussão do trabalho.

Especialmente ao Prof. Dr. ARMANDO REIS TAVARES e Prof^a. Dr^a. GLADYS FLÁVIA DE ALBUQUERQUE MELLO PINNA, pelos seus espíritos inovadores e empreendedores na tarefa de multiplicar seus conhecimentos, pela sua disciplina nos ensinamentos, a importância do trabalho em tratamento, pela colaboração nos ensaios experimentais e participação na discussão dos resultados.

A minha querida família pela paciência em tolerar a minha ausência, especialmente o meu marido Norair Zampieri que soube compreender, como ninguém, a fase pela qual eu estava passando e nas horas mais difíceis sempre esteve presente durante a realização deste trabalho e às vezes tentou entender minhas dificuldades.

A minha filha Thais e meu filho Rodolfo Thiago que me ensinaram que a vida é predisposta a mudanças e há a necessidade da aceitação do diferente para poder crescer. Suas sugestões e críticas levaram a sucessivas revisões e consequentemente ao meu aprendizado.

Aos meus pais Armando e Rutilde de forma muito carinhosa pela oportunidade de ser sua filha, terem me ensinado que as pessoas com quem convivemos têm habilidades, peculiares e precisamos ver o lado positivo de

todos. Por terem sido o contínuo apoio nestes anos, ensinando-me, principalmente, a importância da construção de meus próprios valores.

Aos meus incentivadores da graduação que direta e indiretamente proporcionaram a mim ideais na construção do conhecimento, interdisciplinaridade e o respeito pelo seres vivos, Profs. Ms. Éneas Furtado de Araújo, Ms. Jurandir José de Carvalho, Dr^a. Magda Medhat Pechliye, Dr^a. Olga Martins Mimura, Dr^a. Yur Maria e Souza Tedesco.

Aos meus queridos amigos do Laboratório de Análise por Ativação com Nêutrons, Dany, João, Larissa, Karina, Katia, Michelle, Rita, Thalita, Guilherme, Edmila, Meire, Kelly, Roberto, Paulo, Davi, Tiana pela espontaneidade e alegria na troca de conhecimentos e materiais numa rara demonstração de amizade e solidariedade. Aos meus amigos do Laboratório de Anatomia Vegetal, Zé, Rafa, Emilia, Vanessa, Renata, Nathalia, Luiz, Diego, Paula. Aos técnicos dos laboratórios CRPq, Edson e Regina, e as técnicas dos laboratórios do Departamento de Anatomia Vegetal Gisele e Tassia.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) em especial ao pessoal do Centro do Reator de Pesquisa (CRPq) pela oportunidade concedida para realização do trabalho.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa, Processo nº 2008/55680-8.

E, finalmente, a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram para concretização deste trabalho.

“Falar sobre interdisciplinaridade nos traz idéias como atitude, humildade, integração, olhar. Só que quando olhamos a realidade notamos que o ser humano é muito mais complexo do que simples definições. A arte de conviver com o novo se dá no próprio convívio. Ser interdisciplinar hoje é buscar entender quem somos como indivíduo dentro do coletivo. Queremos ser melhores e isso talvez consigamos revendo as dificuldades e os próprios paradoxos, para assim entender o outro em sua plenitude.”

Profª. Drª. Magda Medhat Pechliye

**ESTUDO SOBRE OS EFEITOS DO COBRE E ZINCO NO
CRESCIMENTO DA PLÂNTULA DE *Aechmea blanchetiana*
(BAKER) L. B. SMITH CULTIVADA *IN VITRO*. APLICAÇÃO DA
ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS**

Maria Cristina Tessari Zampieri

RESUMO

Os metais são componentes da biosfera, ocorrendo naturalmente no solo e nas plantas, contudo como consequência de ações antrópicas, os seus níveis vêm se aumentando muito, dependendo da região. O cobre (Cu) e zinco (Zn) são elementos essenciais para o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas em excesso são tóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial das plantas em absorver os metais Cu e Zn e os efeitos que estes ocasionam nas plântulas cultivadas *in vitro*. Os resultados deste estudo poderão contribuir principalmente em pesquisas agrícolas e nas da área do meio ambiente. A planta investigada neste trabalho foi a *Aechmea blanchetiana*, pertence à família Bromeliaceae, e que pode ser terrestre ou epífita e é amplamente utilizada como planta ornamental. Na parte experimental, o cultivo das plântulas e a exposição das plântulas em diferentes concentrações de Cu ou Zn, foram realizados no Instituto de Botânica (IBt) de São Paulo. Após a germinação das sementes as plântulas foram transferidas para crescimento e expostas em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de Cu ou de Zn. Após este período de cultivo *in vitro*, as plântulas foram analisadas por meio da morfometria, anatomia e análise por ativação com nêutrons. O controle de qualidade dos resultados da análise por ativação avaliado por meio das análises dos materiais de referência certificados mostrou boa precisão e exatidão dos dados para os diversos elementos determinados. As concentrações mais altas de Cu utilizadas na exposição da espécie foram as que causaram maiores variações estruturais nos parâmetros

morfométricos e anatômicos, no entanto para o Zn não houve diferenças significativas para a maioria dos parâmetros analisados. A *A. blanchetiana* mostrou ser uma espécie bioacumuladora de Zn, apresentando altos valores de absorção deste elemento nas suas partes aéreas e radiculares.

**A STUDY ON COPPER AND ZINC EFFECTS IN THE GROWTH OF
Aechmea blanchetiana (BAKER) LB SMITH SEEDLINGS
CULTIVATED *IN VITRO*. APPLICATION OF NEUTRON
ACTIVATION ANALYSIS**

Maria Cristina Tessari Zampieri

ABSTRACT

Metals are components of the biosphere, occurring naturally in soil and plants, but as a result of human actions, their levels have been greatly increased, depending on the region. Copper (Cu) and zinc (Zn) are essential for the growth and development of plants, however if in excess become toxic. The aim of this study was to evaluate the potential of plants to absorb Cu and Zn and what effects they cause in seedlings cultivated *in vitro*. The results of this study may contribute primarily in agricultural and environmental research. The plant investigated was the *Aechmea blanchetiana* species of the Bromeliaceae family. It is a terrestrial or epiphytic species used as an ornamental plant. The cultivation of seedlings for this study and their exposure to different concentrations of Cu and Zn were performed at the Institute of Botany (IBt) of São Paulo. After seed germination, the seedlings were transferred for growth in a culture media containing different concentrations of Cu or Zn. After this period of *in vitro* cultivation, the seedlings were analyzed for morphometry, anatomy and by neutron activation analysis. Quality control of the results from neutron activation analysis was carried out by the analysis of certified reference materials. The data obtained showed good precision and accuracy for several elements determined. The highest concentrations of Cu used in the exposure were those that caused major structural changes in morphometric and anatomical parameters, however for the Zn no significant differences were verified for most parameters. The *A. blanchetiana* proved to be a bioaccumulator species of Zn, absorbing high levels of this element in the aerial parts and roots.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Considerações sobre o efeito do Cu nas plantas	18
1.2. Considerações sobre o efeito do Zn em plantas	22
1.3. Cultivo de plantas <i>in vitro</i>	23
2. OBJETIVOS	25
3. MÉTODO DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS (NAA)	27
3.1. Equação fundamental da INAA	28
3.2. Método comparativo de INAA.....	31
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
4.1. Obtenção das sementes de <i>Aechmea blanchetiana</i> (Baker) L.B. Smith	35
4.2. Semeadura in vitro da espécie <i>A. blanchetiana</i> (Baker) L.B. Smith	36
4.2.1. Preparação das soluções para preparo do meio de cultivo	36
4.2.2. Inoculação das sementes de <i>A. blanchetiana</i>	36
4.2.3. Transferência das plântulas para crescimento.....	38
4.2.4. Características das plântulas antes da exposição ao Cu ou Zn.....	38
4.2.5. Exposição das plântulas de <i>A. blanchetiana</i> ao de meio cultivo MS modificado contendo diferentes concentrações de Cu ou Zn	41
4.3. Análise morfométrica e anatômica das plântulas de <i>A. blanchetiana</i>	47
4.3.1. Tratamento das plântulas de <i>A. blanchetiana</i> após a sua exposição aos elementos Cu ou Zn para análise morfométrica	47

4.3.2. Procedimento adotado para análise morfométrica.....	50
4.3.3. Preparação de amostras para análise anatômica das folhas e raízes .	51
4.4. Preparação de amostras para análise por ativação com nêutrons.....	52
4.4.1 Determinação da massa seca das amostras	52
4.5. Preparação dos padrões sintéticos dos elementos para as análises	53
4.6. Análise dos materiais de referência certificados.....	55
4.6.1. Determinação de perda de umidade na secagem dos materiais de referência certificados.....	55
4.7. Procedimento para a análise por ativação.....	56
4.7.1. Irradiações curtas.....	56
4.7.2. Irradiações longas.....	57
4.8. Tratamento dos resultados obtidos das análises.....	60
4.8.1. Cálculo do limite de detecção	60
4.8.2. Controle dos resultados analíticos	60
4.8.3. Análise de variância dos dados obtidos nas análises morfométricas ..	62
4.8.4. Cálculo do índice de translocação	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1. Resultados da monitoração semanal das plântulas	64
5.2. Resultados das análises morfométricas das amostras de plântulas	86
5.3. Índice estomático e densidade estomática.....	91
5.4. Resultados das análises anatômicas	95

5.4.1. Análises anatômicas em vista frontal da epiderme foliar	95
5.4.2. Análises anatômicas em vista transversal da epiderme foliar	104
5.5. Resultados das percentagens de perda de umidade da parte aérea e radicular obtidas nas secagens das amostras de plântulas	126
5.6. Resultados das análises pelo método de NAA	129
5.6.1. Resultados das análises dos materiais de referência certificados	129
5.6.2. Resultados das análises das amostras das partes aéreas e radiculares	131
5.7. Resultados dos índices de translocação dos elementos	144
6. CONCLUSÕES	152
APÊNDICE A	155
Descrição da ocorrência/alteração nas plântulas durante a monitoração semanal nas culturas <i>in vitro</i>	155
APÊNDICE B	157
Concentrações dos elementos nas soluções padrões codificadas de F 7, S 7, Br 7, L 7 e Cu 10.	157
APÊNDICE C	158
Dados obtidos na monitoração semanal efetuada para as amostras dos tratamentos C0 e Z0.	158
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	160

1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade o homem fez e faz uso dos metais, aperfeiçoando a sua manipulação. Os metais encontrados no solo na forma *in natura* são em geral, substâncias inorgânicas originárias da transformação das rochas. Alguns metais são requeridos como micronutrientes e macronutrientes pelos seres vivos com funções de formação de tecidos e reguladores do organismo, mas em altas concentrações podem ser tóxicos.

Como os metais podem causar efeitos tóxicos aos seres vivos, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005) estabeleceu índices permissíveis ou valor padrão de potabilidade nas águas doces Classe I. Para os elementos em estudo neste trabalho tem-se para o cobre (Cu) o valor de 0,009 mg L⁻¹ e para zinco (Zn) 0,18 mg L⁻¹ como valores padrão de potabilidade.

O excesso de Cu ou Zn presente na água ou solo pode ser de ações antrópicas tais como das aplicações de produtos fitoquímicos (fungicidas, pesticidas, inseticidas), adubações na agricultura (Panou-Filotheou e Bosabalidis, 2004; Marsola et al., 2005), de resíduos sólidos industriais, de mineradoras (Deng, et al., 2007; Freitas, et al., 2007; Cunha, et al., 2008), descarte de materiais metalúrgico, eletrônico, de bateria, pigmentos para tintas e da indústria de plásticos (Zeitouni, 2003).

Nos últimos anos, com a degradação do meio ambiente decorrente principalmente da ação antrópica (Becerril et al., 2007), as plantas vêm sendo amplamente estudadas para serem usadas no biomonitoramento da poluição aérea (Pignata et al., 2002) e do solo, bem como na fitorremediação de solos contaminados por metais (Soares et al., 2001).

Diversos estudos vêm sendo feitos sobre os efeitos dos elementos Cu e Zn às plantas, devido ser micronutrientes essenciais, porém em altas concentrações podem causar efeito de toxicidade às plantas. A falta ou excesso deste micronutriente desencadeia fenômenos fisiológicos os quais podem ser

externados pelas plantas com sintomas visíveis na morfologia, anatomia e na interdependência com outros metais necessários para o desenvolvimento e crescimento das plantas.

Vários estudos têm sido realizados para avaliar como as plantas detectam e respondem aos excessos e deficiências dos elementos traço (Stoyanova e Doncheva, 2002; An et al., 2004; Antonioli et al., 2005; Sridhar et al., 2007). Dentre as diferentes plantas investigadas encontram-se as espécies da família Bromeliaceae (Flores, 1975; Benzing et al., 1976; Pignata et al., 2002; Figueiredo et al., 2001).

A *Aechmea blanchetiana*, espécie que foi analisada neste trabalho, pertence à família Bromeliaceae. Esta família representada por 56 gêneros e cerca de 3.270 espécies (Grant e Zijlstra, 1998; Luther, 2002) distribuídas nas subfamílias Pitcairnioideae, Bromelioideae e Tillandsioideae (Smith e Downs, 1979; Judd et al., 1999), ocorrendo predominantemente em regiões neotropicais (Dahlgren et al., 1985). É amplamente distribuída no Brasil, especialmente no leste brasileiro, que é considerado como um dos centros de diversidade do gênero (Smith, 1955). *A. blanchetiana* pode ser terrestre ou epífita, completamente exposta à luminosidade (Smith e Downs, 1979) e amplamente utilizada como planta ornamental (Kanashiro, 2007). As folhas são distribuídas em espiral intercalando sobre o caule rizomatoso formando assim um tanque igual a uma roseta que acumula água e nutrientes (Benzing et al., 1976).

A importância na ampliação do conhecimento sobre a potencialidade da *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith (Bromeliaceae) em absorver os metais Cu e Zn em diferentes concentrações bem como sobre os efeitos ocasionados pelos elementos decorrentes desta absorção, poderão ser úteis nas pesquisas agrícolas e na área do meio ambiente. Isto devido ao fato do Cu e Zn serem elementos essenciais porém em altas concentrações podem ocasionar efeitos tóxicos nas plantas.

Na América Latina as pesquisas com bioindicadores utilizando Bromeliaceae teve início na década de 80. Dentre os estudos nos quais foi avaliada esta característica usando plantas jovens sem floração, tem-se o

trabalho de Schrimpff, (1984). Este autor examinou 66 amostras de *Tillandsia recurvata* L. coletadas próximas às rodovias de alto tráfego, áreas industriais e áreas residenciais. Os seus resultados indicaram que o padrão de distribuição do elemento chumbo, varia entre as regiões, com maior índice nos locais mais urbanizados. Isto demonstrou que a *T. recurvata* L. respondeu como um bioindicador de acumulação de acordo com a situação da poluição do local.

Brighigna et al., (1997) estudaram a capacidade da *Tillandsia caput-medusae* Morren atuar como bioindicadora de metais em Costa Rica. Os resultados deste estudo indicaram reposta positiva uma vez que os tricomas presentes na superfície das folhas apresentaram absorção de mais de 60% dos metais presentes na poluição aérea e o restante ficando depositados nas superfícies foliares.

Pignata et al., (2002) analisando as folhas de *Tillandsia capillaris* Ruiz e Pav., da região central da Argentina, identificaram o potencial desta espécie como bioindicador de acúmulo de metais da poluição aérea, bem como de várias respostas fisiológicas na Bromeliaceae.

No Brasil os estudos sobre bioindicadores da poluição começaram com Strehl e Lobo, (1989) com plantas adultas e floradas, na cidade de Porto Alegre. Os autores identificaram o potencial bioindicador nas *Tillandsia aeranthos* e *T. recurvata*, isto é, foi verificado que a poluição por metais afeta no crescimento das plantas causando o aumento da parte vegetativa e inibição das partes reprodutivas.

Figueiredo et al., (2001) analisaram amostras de *Tillandsia usneoides* L., de três diferentes regiões da cidade de São Paulo, e detectaram a presença de elementos constituintes da poluição aérea, demonstrando que esta espécie pode ser considerada bioindicadora da qualidade do ar.

No século XIX já se havia descrito sobre associações existentes entre os metais presentes nas plantas e solos específicos, isto é, com rochas mineralizadas com metais preciosos. Karpinsky (1841 *apud* Brooks, 1983) foi um dos pioneiros a identificar algumas destas associações, devido ao grande

interesse econômico na descoberta de minas ou afloramentos metálicos. As plantas indicadoras são espécies individuais que crescendo em um substrato, apresentam morfologias distintas devido a presença do metal no solo (Brooks, 1983).

Recentemente há o interesse em utilizar estas plantas com este potencial de indicadora, na descontaminação de solos contaminados com excesso de metais causado pelas ações decorrentes da industrialização mundial, a fitorremediação (Yanqun et al., 2005).

Solos com potencial tóxico contendo altas concentrações de Zn são encontrados em afloramentos metálicos ou próximos as suas minas onde este elemento foi extraído, fundido ou transformado. Muitas espécies vegetais são conhecidas por colonizarem estas regiões tolerando altas concentrações de metais presente no solo. Rengel (2000) estudou ecótipos de *Holcus lanatus* tolerantes e sensíveis a toxicidade do Zn. O autor concluiu que a espécie tolerante não possui capacidade para acumular Zn, mas cresce melhor em condições de deficiência de Zn em comparação com os ecótipos sensíveis a toxicidade de Zn.

A fitoextração de metais por cultivares não alimentares pode ser um modelo confiável no controle dos teores de metais nos solos agrícolas ou solos contendo resíduos industriais como o lodo. Soares et al., (2001) em sua pesquisa em solo contaminado por resíduos de Zn provenientes da Companhia Mineira de Metais em Três Marias (MG), utilizaram espécies arbóreas nativas do sudeste brasileiro com potencial de recomposição florística de áreas degradadas. Os resultados deste estudo indicaram que devido à elevada concentração de Zn no solo, 12 das 20 espécies apresentaram teores de Zn acima dos valores considerados tóxicos, evidenciando o potencial fitotóxico desse elemento para as espécies estudadas.

As plantas com a capacidade em acumular grande quantidade de Zn, metalíferas como a *Thlaspi caerulescens* (Brassicaceae), acumulam concentrações deste elemento variando de 1.000 a 10.000 mg kg⁻¹. Na fitorremediação, a ênfase está no montante total do contaminante retirado do solo

e translocado para a parte aérea da planta (caules + folhas). Rossi et al., (2002) pesquisaram a capacidade de acúmulo e translocação de metais na *Brassica napus*. Os resultados deste estudo indicaram que a planta acumulou e translocou o Zn para a parte aérea da planta, resultando na presença de altas concentrações nas folhas. Os autores concluíram que a capacidade de fitoextração de diferentes metais pela *Brassica napus* pode ser devido aos mecanismos bioquímicos e genéticos que regulam o transporte de íons na membrana celular das células das raízes, determinando diferentes características de acúmulo de metais e de tolerância pelas plantas.

Com o desenvolvimento de tecnologias para fitorremediação de solos contaminados com metais em regiões subtropicais, Yanqun et al., (2005) utilizaram 21 amostras de 16 espécies de plantas herbáceas para investigar acúmulo de metais pelas plantas da área de mineração em Yunnan (China). A espécie *Sonchus asper* (L.) Hill foi a que apresentou a mais alta concentração de Zn ($13231,2 \text{ mg kg}^{-1}$) e a *Incarvillea* sp. a menor concentração ($8755,3 \text{ mg kg}^{-1}$) sendo ambas as espécies provenientes da província de Qilinkeng. Os autores concluíram que as várias espécies investigadas são hiperacumuladoras de metais, e o assunto se trata de uma pesquisa muito complexa e de caráter interdisciplinar envolvendo estudos das características do solo, da interação solo-planta e plantas hiperacumuladoras.

As plantas de cevada tem sido indicadas como sendo eficientes na absorção e acúmulo de Zn, indicando potencialidade para serem usadas na fitorremediação. Objetivando identificar mudanças estruturais causadas e o acúmulo deste elemento em plantas de cevada, Shridhar et al., (2007) cultivaram esta planta em meios contendo diferentes concentrações de Zn. Os seus resultados indicaram que a *Hordem vulgare* acumulou Zn acima de 11283 mg kg^{-1} na parte aérea. Foram verificadas também alterações estruturais como o decréscimo de espaços intracelulares, encolhimento das células epidérmicas e do parênquima paliçádico. Este estudo mostrou que a planta cevada pode acumular níveis significativos de Zn sem apresentar sintomas da fitotoxicidade ou redução no crescimento quando cultivadas em meios contendo concentrações baixas do

Zn, ao contrário para concentrações mais altas, nas quais foram observadas alterações estruturais.

Neste contexto como justificativa da presente pesquisa convém salientar que as plantas podem ser indicadoras de metais poluentes do meio ambiente, pois apresentam capacidade em absorver e biotransformar moléculas orgânicas e inorgânicas exógenas presentes no meio ambiente decorrentes de ações antrópicas. A absorção de metais pela espécie *A. blanchetiana* pode ser um modelo confiável no controle dos teores de metais nos solos, visto que se trata de uma planta ornamental.

1.1. Considerações sobre o efeito do Cu nas plantas

O Cu ocorre naturalmente no solo em concentrações adequadas para o desenvolvimento das plantas, mas pode ser encontrado em altas concentrações devido à ação antrópica. Em altas concentrações o Cu altera o crescimento e desenvolvimento da vegetação.

A função do Cu está na sua associação com enzimas nos processos de reação redox, sendo reversivelmente oxidado de Cu^{1+} a Cu^{2+} . Uma destas enzimas, a plastocianina está envolvida no transporte de elétrons durante reações dependentes da luz na fotossíntese (Taiz e Zeiger, 2002).

As plantas que crescem em meios contendo altas concentrações de Cu apresentam a biomassa reduzida, sintomas de clorose e alterações nas atividades enzimáticas. Bailey e McHargue, (1944) estudando o efeito deste elemento em tomateiros identificaram que a alta concentração de Cu diminuiu a atividade da catalase e aumentou a atividade da oxidase nas folhas. Nos frutos do tomateiro, as atividades da catalase e da peroxidase diminuem progressivamente com a adição de Cu e a atividade da invertase apresenta uma resposta contrária. Neste trabalho foi concluído que as distintas respostas nos frutos e folhas servem para enfatizar a diferença fisiológica provocada pelo Cu nos órgãos reprodutivos e vegetativos.

Os estudos realizados por Soares et al., (2000) em casa de vegetação enfatizam que a toxicidade do Cu para diferentes tipos de plantas, em concentrações variando entre 20 e 100 mg kg⁻¹ desse elemento na massa seca, interferem no desenvolvimento e translocação de outros nutrientes essenciais. Estes autores estudaram duas espécies, *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla*, em diferentes concentrações de Cu na solução nutritiva, para avaliar seu crescimento e desenvolvimento. Os seus resultados indicaram toxicidade do Cu uma vez que foi observada nos primeiros dias de cultivo, a presença de clorose, necrose e murchamento das folhas das espécies. Não foi verificado o aparecimento de raízes secundárias e as raízes principais se apresentaram finas e escurecidas. Além disso, com o aumento das concentrações de Cu houve alteração do índice de translocação para o Fe. No caso, as espécies estudadas mostraram ser sensíveis à exposição de diferentes concentrações de Cu. Não houve alteração dos índices de translocação para os elementos P, K, S, Ca e Mg, ao contrário do que ocorreu com o Fe.

O excesso Cu pode inibir o alongamento celular, dependente da turgência da célula, síntese de componentes da parede, bem como sobre o conteúdo regulador do crescimento. O papel exato do Cu na inibição do crescimento permanece pouco claro. Alaoui-Sossé et al., (2003) pesquisaram a espécie *Cucumis sativus* (pepino) exposta ao estresse usando Cu no meio de cultivo. Foi verificado que as massas das folhas, caule e raízes obtidas na base seca foram afetadas pelas concentrações do Cu utilizado. Houve um aumento significativo do peso do cotilédone enquanto nas áreas foliares houve significativa redução entre 36-37%. A massa seca foliar aumentou significativamente para diferentes concentrações de Cu. A condutância estomática foi afetada assim como a massa seca foliar. O conteúdo de Mg e K foi menor nas primeiras e segundas folhas sujeitas ao estresse de Cu e o Ca somente na primeira folha. Este fato indicou a inibição do fotossistema que até então não estava sendo relacionada com a abertura estomática. Nas raízes, o teor de Cu encontrado foi mais elevado que o das folhas ao contrário dos teores encontrados para o Mg, K e Ca os quais permaneceram inalterados. Os autores concluíram que o Cu em excesso pode levar ao desequilíbrio nutricional, absorção e translocação ascendente na espécie em estudo. O Cu pode inibir a absorção K, um íon

importante para manter o turgor e expansão foliar, e também o Mg um nutriente essencial para o processo de fotossíntese.

Quando plantas são expostas aos metais podem sofrer inibição no crescimento, fuga de íons da membrana celular, destruição dos pigmentos e consequentemente a morte da planta. O impacto da ação do metal é o acúmulo de peróxido de hidrogênio, que por conseguinte destrói vários tipos de moléculas alterando o metabolismo da célula vegetal. Com o aumento do teor de peróxido de hidrogênio ocorre a explosão oxidativa que ativa os mecanismos de defesa da planta. Chich-Cheng et al., (2005) investigaram o efeito do Cu no crescimento das raízes de soja (*Glycine max*), analisaram alterações nos níveis de peróxido de hidrogênio, atividade das enzimas lacase e da peroxidase e conteúdo de lignina. Os seus resultados indicaram que há inibição significativa do crescimento das raízes em até 50%. Nos resultados dos níveis de peróxido de hidrogênio foi verificado aumento do teor desta substância na presença do Cu nas diferentes concentrações com este elemento. A atividade da lacase aumentou em três vezes quando comparada com controle e o de lignina três vezes. Os autores concluíram que as lacases foram responsáveis pela biossíntese da lignina durante os tratamentos com diferentes concentrações de Cu. Com o prolongamento dos tratamentos, as peroxidases e lacases atuaram juntas para a biossíntese da lignina.

A crescente utilização de produtos fitoquímicos e adubos de compostos orgânicos e inorgânicos na agricultura ocasionam aumento do teor de Cu no solo. O acúmulo de Cu no solo implica no estresse das plantas o qual pode ser observado na redução das dimensões do caule, volume radicular, diminuição do tamanho das folhas e o aparecimento de clorose. As raízes são os órgãos vegetativos que estão em contato direto com as substâncias contaminantes e são as primeiras estruturas a sofrerem o efeito tóxico dos metais. Panou-Filothou e Bosabalidis, (2004) determinaram os efeitos de altas concentrações de Cu no solo por meio da morfologia, anatomia e ultraestrutura em raízes de orégano (*Origanum vulgare*). Os resultados deste estudo evidenciaram que as plantas tratadas com altas concentrações de Cu apresentam redução no comprimento e volume de suas raízes, apresentando má formação na região terminal bem como

as raízes laterais com a diminuição no seu comprimento. Nos cortes transversais, em microscopia óptica, as raízes expostas a diferentes concentrações de Cu exibiram um esquema irregular de células epidérmicas desintegrando-se e as paredes das células corticais apresentaram-se dobradas. Também vestígios de tecidos meristemáticos foram encontrados na região cortical da raiz e houve a diminuição do volume da epiderme em até 50%, aumento do córtex de 9%, do xilema de 25% e do floema de 22% e diâmetro exterior do xilema apresentou-se maior que o do controle em cerca de 50%. Em ultraestrutura, Panou-Filothéou e Bosabalidis, (2004) observaram células epidérmicas desorganizadas com sinais de plasmólise. Os plastídeos não apresentaram a forma de amiloplastos e exibiram os estromas com alta densidade contendo intrusões globulares e gotículas elétron densos.

O Cu é um componente de várias enzimas da planta e está envolvido no transporte de elétrons na catalise de reação redox pelas mitocôndrias e cloroplastos. O excesso de Cu nas plantas pode induzir alterações em vários processos como na integridade da membrana a qual pode levar a inibição do seu crescimento. Segundo Lombardi e Sebastiani, (2005) a toxicidade do Cu causa a geração do estresse oxidativo catalisando a geração de espécies reativas como oxigênio, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila causando danos moleculares no DNA, RNA, proteínas e na membrana celular induzindo a peroxidação lipídica. Lombardi e Sebastiani, (2005) realizaram cultura *in vitro* de *Prunus cesafera*, em meio de cultivo acrescidos de diferentes concentrações de Cu. Os resultados desta pesquisa mostraram que na presença de baixas concentrações deste elemento, as plântulas não apresentaram diferenças significativas quanto à toxicidade ao Cu. Nas concentrações mais elevadas as lâminas das folhas mais velhas sofreram escurecimento evoluindo para senescência e necrose. No entanto as folhas mais jovens não apresentaram qualquer efeito adverso. Os resultados da massa das folhas (seca ou úmida), para as concentrações mais baixas de Cu não apresentaram diferenças, mas para as concentrações mais altas houve redução significativa. Para avaliar as alterações na absorção de Fe induzida pela exposição da planta a concentrações de Cu, Lombardi e Sebastiani, (2005) usaram a técnica de espectrometria de absorção atômica para determinação do Fe. Os resultados desta pesquisa indicaram que a absorção do

Fe foi estimulada nas plantas. Os autores concluíram que concentrações superiores a 50 mmol L⁻¹ de Cu no meio de cultivo ocasionaram efeito tóxico nas plântulas. Também a cultura *in vitro* demonstra ser um sistema de abordagem útil para estudo de alterações moleculares induzidas ao efeito do Cu.

1.2. Considerações sobre o efeito do Zn em plantas

A poluição resultante da exploração mineira, atividade industrial, a eliminação do lodo de esgoto tem aumentado consideravelmente no ambiente durante as últimas décadas. Recentemente, os metais têm recebido considerável atenção devido à sua ocorrência natural e as observações de que altas concentrações deprimem o crescimento das plantas, embora alguns metais traço fossem necessários para o crescimento saudável das espécies vegetais.

O Zn é considerado como um elemento essencial e desempenha um papel de micronutriente para as espécies vegetais, de modo que em baixas concentrações deste elemento deve ser utilizado em todos os meios para desenvolvimento das plantas.

A deficiência de micronutrientes como o Zn foi reconhecida como fator limitante para uma produção rentável. A deficiência pode interferir no desenvolvimento das plantas resultando em sintomas fitopatológicos como deformação, escurecimento e desenvolvimento unilateral das folhas (Loustalot et al., 1943).

Os solos do cerrado são frequentemente deficientes em Zn, devido a sua característica química. Oliveira et al., (2000) estudaram o *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1 em latossolo vermelho escuro do município de Santo Antonio de Goiás (GO). Verificaram que na presença de baixas concentrações de Zn, as plantas não apresentaram diferenças significativas em seu crescimento quanto à deficiência deste elemento. Para concentrações elevadas de Zn houve redução da qualidade da forrageira diminuindo a proteína bruta e aumentando o teor de fibra em detergente neutro.

Outra pesquisa realizada por Schöffel e Lucio, (2001) em Jaboticabal (SP) e com duas variedades de arroz, IAC165 e IAC202, com o mesmo tipo de solo em diferentes concentrações de Zn mostrou que há diferença significativa entre os cultivares dependendo doses de Zn aplicadas. Dentre as duas variedades estudadas, a espécie IAC165 teve maior rendimento na produção de matéria seca e apresentou maior acúmulo de Zn na parte aérea.

1.3. Cultivo de plantas *in vitro*

Como neste trabalho será utilizado o cultivo *in vitro* serão apresentadas a seguir algumas considerações.

Com relação a cultura *in vitro* verifica-se que se trata de um sistema de abordagem útil para estudo de alterações induzidas, constituída por um conjunto de técnicas que permite o isolamento e desenvolvimento de células, sementes, tecidos e plântulas.

Segundo Calvete et al., (2002) espaço limitado, irradiação controlada, alta umidade relativa do ar no interior dos frascos são alguns fatores que caracterizam o ambiente de cultivo *in vitro*

A cultura *in vitro* é uma técnica utilizada para evitar alterações do meio externo no andamento do processo de germinação e desenvolvimento das plântulas. Diversas pesquisas são realizadas com germinação e explantes *in vitro*. Souza et al., (1999) conseguiram determinar as condições ideais de cultura *in vitro* nos meios de cultivo líquido ou semi-sólido com explantes de repolho. Os autores concluíram que não há diferença significativa entre os meios de cultivo semi-sólido ou líquido.

Santos, (2007) realizou pesquisa usando diferentes tipos de vedação dos frascos de cultura *in vitro* de videira, concluiu que a vedação usada nos experimentos está associada à indução da nutrição fotoautotrófica das plantas.

O sucesso da cultura *in vitro* está intimamente ligado à escolha dos meios de cultura associada às sementes e condições físico-químicas apropriadas. A composição do meio de cultura varia com o material vegetal e com os objetivos da cultura (Silva et al., 2005).

Existem misturas de sais minerais e nutrientes orgânicos que constituem diferentes meios para cultivo (Nicoloso et al., 2001), entre os quais são destacados o meio de Murashige e Skoog (MS), Murashige e Tucker (MT), o de Blaydes e o de Nitsch e Nitsch (NN).

O meio de cultura tem um fator crítico que é o seu pH ou acidez que pode interferir na polimerização do Agar ou com outros constituintes do meio, sendo geralmente ajustado entre os valores de pH 5,2 a 5,8.

Além disso, vários fatores podem afetar o desenvolvimento das plântulas, entre eles a presença de microrganismos, sobretudo de fungos e bactérias, de modo que, os métodos de desinfestação devem ser eficazes, para que a plântula se desenvolva livre de fungos e bactérias (Coulto et al., 2004)

As sementes ou as plântulas são introduzidas *in vitro* após desinfestação e desinfecção das superfícies. A repicagem ocorre pela mudança do meio de cultivo em que se encontram as plântulas, permitindo o desenvolvimento das mesmas.

A cultura *in vitro* é um sistema de cultivo eficiente para a regeneração de plantas a partir de eixos de folhas, caule e raiz (Arrabal et al., 2001). Estes autores estudaram a regeneração de *Cryptanthus sinuosus* L.B. Smith (Bromeliaceae) em meio MS, sem reguladores de crescimento. Neste trabalho foi verificado que o sistema de cultura é potencialmente capaz de produzir cerca de 4.500 plantas / explante / ano os quais alcançam altas taxas de aclimação. Os autores desta pesquisa afirmam que o método *in vitro* pode ser sugerido para os programas de preservação de espécies ameaçadas de extinção.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi estudar sobre os efeitos do cobre e zinco nas plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) LB Smith cultivadas *in vitro* nos meios de cultivo MS (Murashige e Skoog, 1962), contendo diferentes concentrações destes elementos. Para alcançar este objetivo foram realizados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar por meio de observações a presença de clorose, necrose, contaminações fúngicas e bacterianas e mortalidades nas culturas;
- Avaliar por meio de análises morfométricas o crescimento das folhas e raízes das plântulas;
- Avaliar por meio de análises anatômicas, das folhas e raízes, os efeitos ocasionados pelo cobre e zinco;
- Determinar os teores dos elementos, principalmente de Cu e Zn nas partes aéreas e radiculares da planta por meio da análise por ativação com nêutrons para o cálculo dos índices de translocação para a plântulas cultivada em meios contendo diferentes concentrações Cu e Zn, separadamente. Foram determinados os teores dos elementos Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, La, Rb, Sc, e Zn, para avaliar se a exposição aos meios contendo Cu ou Zn possam afetar na absorção dos elementos presentes nas amostras.

Para o desenvolvimento desta pesquisa, com características interdisciplinares, o trabalho foi desenvolvido com pesquisadores nas diferentes áreas do conhecimento (Ciências exatas e da terra, Ciência biológicas e Ciências agrárias).

O método utilizado para análise elementar das plântulas foi a análise por ativação com nêutrons (NAA) instrumental. Para controle de qualidade dos

resultados analíticos nas determinações elementares foram analisados os materiais de referência certificados NIST 1577b *Bovine Liver* , NIST SRM 1547 *Peach Leaves* e INCT TL-1 *Tea Leaves*.

Neste trabalho foram determinadas as concentrações dos elementos Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, La, Rb, Sc e Zn nas amostras das partes aéreas e radiculares da *A. blanchetiana*.

3. MÉTODO DE ANÁLISE POR ATIVAÇÃO COM NÊUTRONS (NAA)

O método de análise por ativação com nêutrons permite a determinação qualitativa e quantitativa de elementos presentes nas amostras. Este método baseia-se na conversão de núcleos atômicos estáveis em núcleos radioativos por meio de uma irradiação com nêutrons e subsequente a medição da emissão radiação liberada por estes núcleos radioativos.

Dentre os vários tipos de radiação que são emitidas, a medição da radiação gama oferece as melhores características para a determinação seletiva e simultânea dos elementos.

Pela ativação com nêutrons, os radionuclídeos podem ser produzidos a partir de diversos elementos presentes na amostra, embora em diferentes taxas de produção. A radioatividade emitida pelos radionuclídeos pode ser mensurada, utilizando equipamento com uma alta resolução de energia para a detecção da radiação gama.

Este processo de análise por ativação é chamado não destrutivo ou análise por ativação com nêutrons instrumental (INAA). O procedimento INAA é caracterizado pela ativação por meio de irradiação em um reator nuclear, pela medição da radiação gama depois de adequado tempo de decaimento dependendo da meia vida, seguida de interpretação dos espectros de raios gama, em termos dos elementos presentes e de suas concentrações.

A INAA apresenta seu uso em muitos campos da ciência tendo como vantagem especial de as amostras não serem submetidas a qualquer tratamento químico, nem antes, nem depois da ativação.

Pelo método INAA os elementos leves, tais como H, C, N, O, Si, não produzem produtos radioativos após a ativação de nêutrons. Isto significa que estes elementos não podem interferir na determinação de outros elementos que se tornam radioativos. Geralmente a INAA permite a determinação de elementos

traço em limites de detecção na ordem mg kg^{-1} e $\mu\text{g kg}^{-1}$. Além disso, a alta seletividade de espectrometria de raios gama permite simultânea avaliação de muitos radionuclídeos.

Não há risco de contaminação em comparação aos métodos convencionais de análise dos elementos em que a amostra deve ser dissolvida. Esta vantagem da INAA tem sido explorada em muitas aplicações biológicas e para a análise de quantidades diminutas de material, tais como aerossóis e poeira cósmica.

Uma vez que a detecção da radiação na INAA está relacionada com as propriedades do núcleo atômico, os resultados das análises não são afetados pelo estado físico e químico dos elementos.

O método é bem descrito pelas leis da física e da seletividade clara para todos os elementos. A razão é que a combinação das propriedades nucleares, como a meia vida, as energias e as intensidades da radiação gama são características únicas para cada radionuclídeo.

Estas características contribuem para um alto grau de precisão dos resultados e conseqüentemente faz com que a INAA seja reconhecida como uma técnica bastante adequada para uso nas pesquisas das áreas do meio ambiente assim como na avaliação das concentrações da ordem de ppb de elementos necessários para desenvolvimento e crescimento das plantas.

3.1. Equação fundamental da INAA

Os dois fenômenos que ocorrem na análise por ativação com nêutrons instrumental são:

1. Conversão do núcleo atômico estável (A) por ativação com um nêutron (x) em radionuclídeo instável (*B) que emite radiação característica (y), por meio da reação nuclear:

2. Decaimento do radionuclídeo formado:

O radionuclídeo formado *B é proporcional à seção de choque para ativação, ao fluxo de nêutrons e ao número de átomos do núcleo alvo.

O processo da formação do radionuclídeo pode ser expresso em:

$$(dN_B / dt)_C = N_A \Phi \sigma_A \quad (3.3)$$

onde:

N_A = número de átomos do núcleo alvo;

N_B = número de átomos do radionuclídeo formado;

Φ = fluxo de nêutrons em $n \text{ cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$

σ = seção de choque para ativação em cm^2 .

*B sendo instável decai em uma taxa de $\lambda_B N_B$, então a formação total de *B será:

$$(dN_B/dt) = N_A \Phi \sigma - \lambda_B N_B \quad (3.4)$$

onde:

λ_B = constante de decaimento do radionuclídeo formado.

Da solução da equação diferencial de Leibnitz (3.4) pode se obter a seguinte relação:

$$N_B = \{ N_A \Phi \sigma [1 - e^{-\lambda_B t_i}] + N_{B0} e^{-\lambda_B t_i} \} / \lambda_B \quad (3.5)$$

onde:

t_i = tempo de irradiação, considerando-se que $t_i = 0$,

$N_{B0} = 0$ (uma vez que nenhum radionuclídeo foi formado antes da irradiação) a relação (3.5) pode ser escrita:

$$N_B = \{ N_A \Phi \sigma [1 - e^{-\lambda_B t_i}] / \lambda_B \quad (3.6)$$

Por meio da equação (3.6) pode ser calculado o número de átomos radioativos formados (N_B) para um tempo o irradiação (t_i), com o conhecimento dos valores de λ_B , N_A , Φ e σ .

A atividade (D) do radionuclídeo (*B) em desintegrações por segundo pode ser dado como:

$$D = \lambda_B N_B \quad (3.7)$$

onde:

D = é atividade de *B em desintegrações por segundo (dps) ao final da irradiação por um t_i .

Substituindo a aquação (3.6) em (3.7), teremos:

$$D = N_A \Phi \sigma [1 - e^{-\lambda_B t_i}] \quad (3.8)$$

Sendo (A) a atividade medida experimentalmente, em taxa de contagens, temos:

$$A = z D = z \lambda N \quad (3.9)$$

onde:

z = coeficiente de detecção ou eficiência do detector, que depende do arranjo experimental, da natureza do equipamento utilizado para detecção.

Portanto considerando a expressão geral para cálculo da atividade em número de taxas de contagens após um tempo de irradiação (t_i) como:

$$A = z N \Phi \sigma [1 - e^{-\lambda t_i}] \quad (3.10)$$

onde:

$$-\lambda t_i = -0,693 t_i / t_{1/2}$$

$t_{1/2}$ = tempo de meia vida do radioisótopo formado, portanto a relação (3.10) pode ser escrita como:

$$A = z N \Phi \sigma [1 - e^{(-0,693 t_i / t_{1/2})}] \quad (3.11)$$

A relação 3.11 fornece a atividade em função do número de átomos, entretanto para calcular a massa do elemento na amostra, substitui-se (N) em função do número de Avogadro:

$$N = (N_{AV} m f) / M \quad (3.12)$$

onde:

N_{AV} = constante de Avogadro;

m = massa do elemento presente na amostra em gramas;

f = abundância isotópica do núcleo alvo;

M = massa atômica do elemento.

Substituindo a equação (3.12) em (3.11), tem-se a equação para o cálculo da atividade absoluta da massa de um elemento após o tempo t_i de irradiação (De Soete et al., 1972):

$$A = z \Phi \sigma N_{AV} m f [1 - e^{-0,693 t_i / t_{1/2}}] / M \quad (3.13)$$

3.2. Método comparativo de INAA

Pelo método comparativo de análise por ativação com nêutrons instrumental, as amostras e padrões dos elementos a serem determinados são

irradiados juntos sob o mesmo fluxo de nêutrons e as medições das atividades gama são realizadas na mesma geometria.

Considerando estas condições de análise pode-se escrever a equação (3.13) para a amostra e padrão e obter as seguintes relações:

$$A_a^0 = z \Phi \sigma N_{AV} m_a f [1 - e^{-0,693 t_i / t_{1/2}}] / M \quad (3.14)$$

$$A_p^0 = z \Phi \sigma N_{AV} m_p f [1 - e^{-0,693 t_i / t_{1/2}}] / M \quad (3.15)$$

onde:

os índices a e p se referem a amostra e padrão, respectivamente;

A_a^0 e A_p^0 são taxas de contagens da amostra e padrão respectivamente, para o tempo de decaimento $t = 0$.

Dividindo-se a relação (3.14) pela (3.15), membro a membro, tem-se:

$$A_a^0 / A_p^0 = m_a / m_p \quad (3.16)$$

Como a amostra e padrão são medidos em diferentes tempos de decaimento tem-se a relação (3.17) pela lei de decaimento (Friedlander et al., 1964).

$$A = A_0 e^{-\lambda t} \quad (3.17)$$

onde:

t = tempo de decaimento.

Escrevendo a relação (3.17) para a amostra e padrão e substituindo as relações obtidas na relação (3.16) tem-se a relação:

$$m_a = m_p A_a e^{\lambda(t_a - t_p)} / A_p \quad (3.18)$$

onde:

$\lambda = 0,693 / t_{1/2}$ que é a constante de decaimento;

A_a = taxa de contagens da amostra para tempo de decaimento t_a ;

A_p = taxa de contagens do padrão para tempo de decaimento t_p .

A concentração do elemento na amostra é expressa por:

$$C_a = m_a / M_a \quad (3.19)$$

onde:

M_a = massa total da amostra

Portanto, tem-se em termos de concentração do elemento a equação (3.20) que será utilizada para os cálculos das concentrações dos elementos:

$$C_a = A_a m_p e^{0,693 (t_a - t_p) / t_{1/2}} / A_p M_a \quad (3.20)$$

onde:

C_a = concentração do elemento na amostra;

A_a = taxa de contagens na amostra para tempo de decaimento t_a ;

m_p = massa do elemento no padrão;

A_p = taxa de contagens do padrão para o tempo de caimento t_p ;

M_a = massa total da amostra.

4. PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental deste trabalho consistiu das seguintes etapas:

- Cultivo *in vitro*;
 - Obtenção das sementes de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith para cultivo;
 - Semeadura e crescimento *in vitro* da espécie;
 - Exposição das plântulas em diferentes concentrações de Cu ou Zn;
- Monitoração das culturas;
- Análise morfométrica das folhas e raízes;
- Análise anatômica das folhas e raízes;
- Determinação dos elementos nas plântulas pelo método de análise por ativação com nêutrons;
 - Tratamento das amostras (limpeza, secagem, moagem) para análise dos elementos;
 - Determinação das percentagens de umidade das amostras das partes aéreas e radiculares;
 - Preparação dos padrões sintéticos dos elementos.
 - Análise por ativação dos materiais de referência certificados e amostras da *A. blanchetiana*.

4.1. Obtenção das sementes de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith

Os procedimentos para obtenção das sementes de *A. blanchetiana* e semeadura *in vitro* foram realizados no Laboratório do Núcleo em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica (IBt)-SP

As sementes de *A. blanchetiana* foram obtidas das plantas cultivadas no Laboratório do Núcleo em Plantas Ornamentais/IBt e armazenadas em geladeira até o preparo das sementes para plantio.

As sementes retiradas dos frutos foram lavadas com água destilada, desinfestadas por meio de imersões em soluções de hipoclorito de sódio a 20% e surfactante Tween-20 a 0,1% submetendo-se por 15 minutos em agitação, para a retirada de mucilagem. Posteriormente, estas sementes foram lavadas, quatro vezes com água destilada autoclavada, em condições assépticas na câmara de fluxo laminar. Na FIG. 4.1 estão as fotos do fruto, semente das plantas de *A. blanchetiana*.

FIGURA. 4.1 Foto dos frutos e sementes utilizados na cultura *in vitro* da *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith. A – Foto dos frutos; B – Foto das sementes.

4.2. Semeadura *in vitro* da espécie *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith

4.2.1. Preparação das soluções para preparo do meio de cultivo

As soluções concentradas ou estoque, em grandes volumes contendo, separadamente micronutrientes, macronutrientes e outros componentes foram preparadas de acordo com a composição química apresentada na TAB. 4.1 e fazendo a dissolução com água destilada ou água ultra pura. Estas soluções foram preparadas e armazenadas em frascos âmbar e mantidas sob refrigeração convencional, para serem posteriormente diluídas e utilizadas. Estas condições de armazenamento foram adotadas para evitar a deterioração destas soluções.

Por meio da diluição destas soluções estoques foram obtidas as concentrações dos componentes do meio MS modificado (Murashige e Skoog, 1962) conforme as concentrações apresentadas na TAB. 4.2.

O meio de cultivo MS modificado acrescido de 30 g L⁻¹ de sacarose, 7 g L⁻¹ de agar, e o pH ajustado para 5,8, foi envasado em frascos de vidro com tampa de polipropileno e utilizado para inoculação das sementes.

4.2.2. Inoculação das sementes de *A. blanchetiana*

Em cada frasco de vidro, com 20 mL do meio de cultivo MS modificado, foram inoculadas sessenta sementes, totalizando trinta frascos com mil e oitocentas sementes. Após o processo de inoculação, os frascos foram lacrados com tampa de polipropileno e filme de polietileno, e transferidos para sala de crescimento, mantidos sob temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 h dia e 32 μmol m⁻² s⁻¹ de radiação fotossinteticamente ativa (PAR).

Após 10 dias da inoculação iniciou a germinação das sementes como mostra a foto A da FIG. 4.2, e decorridos mais 20 dias da inoculação, as plântulas já apresentaram de três a quatro folíolos (foto C da FIG. 4.2).

Tabela 4.1. Composição química das soluções estoque para o preparo do meio de cultivo MS modificado.

Solução de macronutrientes	g/L
NH_4NO_3	16,5
KNO_3	19,0
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7
KH_2PO_4	1,7
Solução de micronutrientes	mg/100 mL
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1690
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	860
H_2BO_3	620
KI	83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	2,5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	25
Fe EDTA	g/100 mL
Na_2EDTA	0,745
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,557

Tabela 4.2. Quantidade dos componentes em mL L^{-1} de água deionizada (a menos que esteja indicada) para o preparo do meio de cultura MS.

Componente químico	Valores
Água desionizada	400
Solução de macronutrientes	50
Solução de micronutrientes	10
FeEDTA	5
Sacarose	30 g L^{-1}

FIGURA. 4.2. Fotos das sementes e da germinação *in vitro* da *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith em meio de cultivo MS semi-sólido. Fotos A – Sementes; B – Germinação; C – Plântulas com três ou quatro folíolos sem protusão de raízes.

4.2.3. Transferência das plântulas para crescimento

Sessenta dias após a inoculação, as plântulas foram transferidas para meio de cultivo MS modificado sem adição de Agar e em condições de assepsia em uma câmara de fluxo laminar.

Em cada frasco contendo 20 mL do meio de cultivo MS modificado foram inoculadas oito plântulas, totalizando cem frascos e oitocentas plântulas. Após o processo de inoculação estes frascos foram lacrados com tampas de polipropileno e filme de polietileno e transferidos para sala de crescimento, onde foram mantidos a uma temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 16 horas dia e $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiação fotossintética ativa.

As plântulas permaneceram durante 10 meses nesta sala de crescimento.

4.2.4. Características das plântulas antes da exposição ao Cu ou Zn

Amostras de oito lotes com dez plântulas foram coletadas para as análises quanto à morfometria (TAB. 4.3), anatomia e determinação dos

elementos constituintes. Aplicando o método de análise por ativação com nêutrons foram analisadas as partes aéreas e radiculares das plântulas. Os resultados destas análises foram designados como amostras do tempo inicial (T0).

Tabela 4.3. Médias dos parâmetros obtidos na análise morfométrica das plântulas de *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivadas *in vitro*.

Parâmetros	T0
	M ± DP
Altura da plântula (mm)	172,4 ± 61,7
Número de folhas	9,4 ± 2,8
Número de raízes	10,8 ± 4,4
Diâmetro do colo (mm)	3,1 ± 1,0
Comprimento da folha (mm)	127,9 ± 51,6
Largura da folha (mm)	6,6 ± 1,6
Espessura da folha (mm)	0,34 ± 0,11
Diâmetro da raiz (mm)	0,27 ± 0,12
Comprimento da raiz (mm)	141,3 ± 72,8

M – Média aritmética de 22 exemplares; DP – Desvio padrão.

As amostras designadas de T0 apresentaram as médias do índice estomático de 1,1%, densidade estomática de 0,7, número de células da epiderme de 61,4 e número de estômatos por mm² de 0,7 para a face inferior das regiões medianas das folhas e, para a face superior foram 3,3% para o índice estomático, 2,4 para a densidade estomática, número de células da epiderme de 70,9 e número de estômatos por mm² de 2,4.

Para as amostras das partes aéreas a perda de umidade foi de 85,6% sendo a massa fresca de 34,7 g e massa seca de 5 g, já para as partes

radiculares a perda de umidade foi de 35,8% sendo a massa fresca de 2,648 g e massa seca de 1,701 g.

Foram realizadas as determinações dos elementos nas amostras T0 pelo método de análise por ativação com nêutrons e os resultados estão apresentados nas TAB. 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4. Médias das concentrações de elementos nas amostras das partes aéreas de *A. blanchetiana* da amostra T0. Resultados na base seca do material expresso em mg kg⁻¹ a menos que esteja indicado.

Elementos	Amostra T0 M ± DP (n)	DPR (%)	Limite de detecção
Br	0,73 ± 0,01 (2)	1,9	0,03
Ca (%)	0,23 ± 0,02 (2)	9,1	0,019
Co (µg kg ⁻¹)	71,2 ± 1,3 (4)	1,8	0,004
Cr	0,14 ± 0,02 (3)	12,1	0,05
Fe	91,3 ± 4,5 (4)	4,9	2,1
K (%)	1,85 ± 0,08 (4)	4,3	0,005
La (µg kg ⁻¹)	1,8 ± 0,5**	-	0,002
Rb	0,91 ± 0,03 (4)	3,3	0,11
Sc (µg kg ⁻¹)	1,54 ± 0,10**	-	0,2
Zn	9,2 ± 0,3 (4)	3,3	0,10

M - Média aritmética; DP - Desvio padrão; DPR - Desvio padrão relativo; n – Número de determinações; **Valor individual ± incerteza. Incerteza calculada considerando erros nas contagens da amostra e padrão.

Tabela 4.5. Concentrações de elementos nas amostras da parte radicular de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* para amostra T0. Resultados na base seca do material expresso em mg kg⁻¹ a menos que esteja indicado.

Elementos	Amostra T0*	Limite de detecção
Br	0,342 ± 0,007	0,02
Ca (%)	0,30 ± 0,01	0,02
Co (µg kg ⁻¹)	461 ± 9	5,1
Cr	0,24 ± 0,01	0,03
Fe	149,7 ± 1,8	2,9
K (%)	0,595 ± 0,008	0,009
La (µg kg ⁻¹)	25,5 ± 1,2	3,6
Rb	0,23 ± 0,11	0,12
Sc (µg kg ⁻¹)	3,18 ± 0,11	0,3
Zn	24,0 ± 0,1	0,2

*Valor individual ± incerteza. Incerteza calculada considerando erros nas contagens da amostra e padrão.

4.2.5. Exposição das plântulas de *A. blanchetiana* ao de meio cultivo MS modificado contendo diferentes concentrações de Cu ou Zn

As plântulas foram expostas nos meios de cultivo contendo Cu ou Zn em concentrações iguais ou superiores aos valores do índice de potabilidade para água doce Classe I, estabelecidos pela Resolução 357 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005).

Inicialmente os 150 frascos de vidro com capacidade de 500 mL e suas respectivas tampas a serem utilizados nos ensaios de exposição foram lavados com detergente líquido diluído em água (2:100) seguidas de três enxágues, sendo o primeiro com água quente, o segundo com água a temperatura ambiente e o

terceiro com água destilada. Posteriormente estes frascos foram secos a temperatura ambiente. Todas as vidrarias e utensílios laboratoriais utilizados para o cultivo das plântulas foram submetidos a este procedimento de limpeza.

4.2.5.1. Preparação do meio de cultivo contendo diferentes concentrações de Cu

Foi preparada uma solução estoque de micronutrientes (modificada) sem a adição de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Esta solução foi armazenada em um frasco âmbar e mantida sob refrigeração convencional para posterior uso.

Foi também preparada uma solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ com a concentração de 0,3536 g/100 mL. A qual foi armazenada em um frasco âmbar e mantida sob refrigeração convencional. A solução concentrada de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ foi diluída ou não diluída, para se obter as concentrações de Cu utilizadas nos ensaios experimentais. Na TAB. 4.6 são apresentadas as concentrações de Cu nos meios de cultivo MS utilizados para exposição de plântulas. Em um becker com capacidade de 3000 mL foram adicionadas as soluções diluídas de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, as de macronutrientes, de micronutrientes (modificada) e os demais componentes do meio MS modificado. Estes componentes foram homogeneizados usando um agitador magnético, bem como o seu pH foi acertado para $5,2 \pm 0,2$ usando solução de NaOH e/ou HCl para correção da acidez.

Os frascos foram previamente identificados com as concentrações correspondentes do Cu, no caso codificadas de C0, C1, C2, C3 e C4, e foram envasados com 120 mL de meio de cultivo MS modificado. Estes frascos foram fechados com suas respectivas tampas e levados à autoclave por 15 min. em temperatura de 120 °C e pressão de 1,0 atm. Após 24 h estes frascos foram retirados da autoclave, envoltos com filme de polietileno e transportados para a sala de crescimento onde permaneceram, para posterior uso na inoculação das plântulas. Na FIG. 4.3 estão apresentadas as fotos das etapas para preparo dos meios de cultivo para exposição, das plântulas em meio de cultivo MS modificado.

4.2.5.2. Preparação do meio de cultivo contendo diferentes concentrações de Zn

Os meios de cultivo contendo diferentes concentrações de Zn foram preparados utilizando o mesmo procedimento descrito para o caso do Cu. No caso foi preparado a solução de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ com concentração de 7,915 g/100 mL. Os meios de cultivo MS contendo diferentes concentrações de Zn codificadas em Z0, Z1, Z2, Z3, Z4 estão apresentados na TAB. 4.6.

TABELA 4.6. Concentrações dos elementos Cu e de Zn nos meios de cultivo MS (modificado) em mg L^{-1}

		[Cu]			[Zn]
Tratamentos	C0	0,0	Tratamentos	Z0	0,0
	C1	0,009		Z1	0,18
	C2	0,09		Z2	1,8
	C3	0,9		Z3	18
	C4	9		Z4	180

4.2.5.3. Procedimentos adotados na inoculação das plântulas de *A. blanchetiana* em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de Cu ou Zn

Após 10 meses de crescimento, em condições assépticas em câmara de fluxo laminar, foi realizada a poda das plântulas de *A. blanchetiana* obtidas de semeadura *in vitro* como pode ser observado na foto D da FIG. 4.3. As folhas mais velhas foram desbastadas na região mediana, em relação ao comprimento e nas folhas mais jovens na região do ápice. Foram também retiradas as folhas senescentes. Para as raízes foi realizada poda total.

Após o desbaste, cada plântula foi transferida para um frasco contendo meio de cultivo MS modificado, com uma determinada concentração de Cu, até que cada frasco estivesse completo com cinco plântulas, sendo 13 replicatas para

cada tratamento (foto F da FIG. 4.3). O mesmo procedimento foi realizado para o caso do elemento Zn.

Para o experimento ser inteiramente casualizado, estes frascos com meio de cultivo MS modificado foram colocados em ordem crescente da concentração do elemento. Para cada lote de plântulas aberto, uma plântula de cada vez foi retirada, desbastada e imediatamente colocada dentro do primeiro frasco e assim sucessivamente. Posteriormente a inoculação, os frascos foram fechados com suas respectivas tampas e vedados com filme de polietileno.

FIGURA. 4.3. Fotos das etapas para exposição das plântulas em meio de cultivo contendo diferentes concentrações de Cu ou Zn. Fotos A – preparo da solução estoque e correção do pH; B – preparo da solução estoque contendo Cu ou Zn em meio de cultivo MS; C – envasilhamento dos frascos com meios de cultivo; D – inoculação das plântulas em câmara de fluxo laminar; E e F – poda e distribuição das plântulas em meio de cultivo contendo Cu ou Zn.

4.2.5.4. Transferência das plântulas expostas ao Cu ou Zn para crescimento e sua monitoração

Os frascos com as plântulas foram transferidos para a sala de crescimento e mantidos sob temperatura de $25 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16 h dia e sob radiação fotossinteticamente ativa de $32 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fornecida por lâmpadas fluorescentes. As amostras de plântulas permaneceram na sala de crescimento por 16 semanas.

As plântulas foram monitoradas semanalmente para observações da proliferação bacteriana e/ou fúngica. Os frascos que apresentaram as contaminações foram descartados para evitar a proliferação aos demais. O número de plântulas descartadas foi utilizado na determinação do índice de contaminação (**IC**) pela relação:

$$\text{IC} = (p_c / p_i) \times 100 \quad (4.1)$$

onde:

p_c = número de plântulas contaminadas;

p_i = número de plântulas no início da exposição ao elemento (65 plântulas por tratamento).

Para o acompanhamento semanal do crescimento, desenvolvimento e as alterações visíveis das plântulas durante a exposição, foram elaborados códigos de identificação das variáveis que correlacionam com uma determinada alteração os quais estão apresentados no APÊNDICE A na TAB. 4.4.

Aos resultados obtidos na monitoração semanal foi aplicado o modelo matemático de frequência absoluta. A frequência é o número de vezes que a variável foi observada no período de 16 semanas de exposição. No caso, as variáveis foram clorose, necrose, manchas amareladas, descoloração, manchas escuras, aparecimento de raízes, aparecimento de folhas, estiolamento da planta, folhas com listras e aparecimento de brotos. Com os dados das frequências foi

possível inferir sobre o desenvolvimento e crescimento das plântulas nas condições que foram expostas.

Após 16 semanas do crescimento, os frascos com as plântulas foram transferidos para o Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica do IPEN.

O índice de sobrevivência (**IS**) das plântulas foi determinado após o término dos ensaios experimentais de exposição e foi expresso em porcentagem. Este índice foi utilizado para expressar a qualidade da planta representando de modo prático e conveniente a comparação dos tratamentos de *A. blanchetiana* em diferentes concentrações de Cu ou Zn, de acordo com a relação:

$$IS = (p_v \times 100) / (p_v + p_m) \quad (4.2)$$

onde:

p_v = número de plântulas vivas

p_m = número de plântulas mortas. Foram consideradas mortas, as plântulas que apresentavam cor pardacenta e estavam em estado de degradação.

4.3. Análise morfométrica e anatômica das plântulas de *A. blanchetiana*

4.3.1. Tratamento das plântulas de *A. blanchetiana* após a sua exposição aos elementos Cu ou Zn para análise morfométrica

As plântulas foram retiradas dos frascos e submetidas a várias lavagens com água deionizada e depois depositadas em bandejas plásticas e deu-se o início as mensurações e a contagem das plântulas vivas e mortas por tratamento.

Cada plântula foi mensurada quanto ao seu número de folhas e raízes, as medições do comprimento total da plântula conforme apresentado na foto A da FIG. 4.4. (da base até o ápice da folha mais desenvolvida) usando uma régua

convencional, e do diâmetro do colo como mostrado na foto C da FIG. 4.4. (região basal da plântula onde emergem as raízes) com o uso de um paquímetro digital (marca Mitutoyo).

Cada plântula foi separada manualmente em partes aéreas e radiculares, e também foram selecionadas as folhas de número cinco (de dentro para fora do centro do tanque) das plântulas para as análises morfométricas e anatômicas. O critério para seleção das folhas foi baseado na literatura (Proença e Sajo, 2004). No caso das raízes, foram selecionadas aquelas mais desenvolvidas de cada plântula.

Foram feitas as medições da largura e espessura da região mediana (conforme mostra a foto D da FIG. 4.4.) e o comprimento total foliar (desde o ápice até a base da folha), comprimento e diâmetro da raiz (na porção mediana) (ver foto B da FIG. 4.4), por meio do uso de paquímetro digital. Após as mensurações das folhas “cinco” elas foram seccionadas nas regiões medianas, como pode ser observado nas fotos E e F da FIG. 4.4., com auxílio de bisturi cirúrgico, as quais posteriormente foram fixadas em álcool etílico 70%, para uso nas análises morfométricas e anatômicas.

As demais folhas e raízes constituintes das plântulas foram colocadas em sacos de papel *Kraft*, para posterior tratamento e determinação dos elementos.

FIGURA. 4.4. Foto mostrando os procedimentos adotados nas análises morfométricas das plântulas de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith. Fotos A – Medição do comprimento total da plântula; B – Medição do comprimento da raiz; C – Medição do colo das plântulas; D – Medição da espessura da região mediana das folhas; E e F – Secção mediana da folha cinco (as setas indicam na foto a região).

4.3.2. Procedimento adotado para análise morfométrica

As análises morfométricas foram realizadas no Laboratório do Departamento de Anatomia Vegetal, do Instituto de Biociências (IB) da Universidade de São Paulo.

Para isso as amostras de folhas foram lavadas várias vezes com água destilada. De cada tratamento foram analisadas, no mínimo 10 folhas, para obtenção de dados para cálculo do índice estomático e densidade estomática.

Para a dissociação da epiderme foliar, a amostra foi macerada de acordo com a técnica descrita por Franklin (1945). Após dissociação da epiderme, as amostras das faces superior e inferior foram separadas, coradas com azul de Astra 1% e Safranina 1% (Kraus et al., 1998), e posteriormente montadas entre lâmina e lamínula, com glicerina 50% (Johansen, 1940).

Para cada tratamento de plântula, foram analisadas 10 amostras das regiões medianas das folhas, e em cada amostra três regiões aleatórias de 1,0 mm² das faces inferior e superior.

Para cada região de 1,0 mm² observada, foi realizada a captura da foto, a qual foi efetuada com auxílio de um fotomicroscópio Olympus Vanox e com o uso do sistema de digitalização de fotos IM50 acoplado ao microscópio Leica DMLB. Foram capturadas 660 fotos e as contagens das estruturas foram realizadas com o auxílio do programa ImageJ 1.42 (Image Processing and Analysis in Java) para obtenção de dados para determinação do índice estomático e densidade estomática.

De posse dos dados das contagens das estruturas, números células e número de estômatos das regiões medianas da epiderme foliar foram calculados o índice estomático (**IE**) e a densidade estomática (**DE**) por meio das relações (Royer, 2001):

$$IE = [E/(C+E)] \times 100 \quad (4.3)$$

onde:

E = número de estômatos;

C = células epidérmicas.

$$DE = E/A \quad (4.4)$$

onde:

E = número de estômatos;

A = área, a qual foi delimitada de 1,0 mm² da epiderme foliar nas faces superior ou inferior, na qual foi realizada a análise morfométrica.

4.3.3. Preparação de amostras para análise anatômica das folhas e raízes

As amostras de folhas e raízes foram lavadas várias vezes com água destilada e fixadas em etanol 70%. De cada tratamento foram analisadas as regiões medianas de no mínimo três folhas e três raízes para avaliação de possíveis alterações microscópicas nos tecidos celulares das plântulas causadas pelo efeito da exposição aos elementos Cu ou Zn.

As regiões medianas das folhas e raízes, separadamente por tratamento, foram retiradas dos frascos e hidratadas com água destilada por 15 min.

Para a técnica de cortes a mão livre e observação no microscópio ótico, foi necessário que as amostras fossem suficientemente finas e transparentes. As seções transversais foram feitas perpendicular ao maior eixo da amostra da região mediana das folhas ou raízes.

Para realizar o corte foi necessário o uso de um suporte de isopor de 3 cm de comprimento por 1 cm de largura. Este suporte foi rachurado com lâmina de barbear, na qual a amostra foi inserida para ser seccionada.

As seções transversais das amostras de folhas e raízes feitas com lâmina de barbear foram depositadas sobre vidro de relógio com água destilada com auxílio de um pincel. Os cortes mais finos em um número médio de 40 cortes por amostra da região mediana foram transferidos para placa de Petri com água destilada usando um estereomicroscópio e pincel.

Os materiais submetidos aos cortes foram submetidos a uma solução de hipoclorito de sódio 50% para descoloração, de compostos orgânicos por um período de 15 min. Após a descoloração os cortes foram lavados por três vezes em água destilada e transferidos para uma placa de Petri contendo etanol 50% onde permaneceram por 15 min.

Os cortes transversais foram corados com Safranina 1% por 20 min., lavados com etanol 50% para retirada do excesso de corante e depois com azul de Astra 1% por 20 min. E novamente lavados com etanol 50%. Os cortes foram reidratados com água destilada e a seguir montados entre lâmina e lamínula com glicerina 50% e vedadas às laterais (lutadas) com esmalte incolor.

As lâminas com as seções transversais das amostras foram analisadas por meio da microscopia óptica e os registros fotográficos obtidos com auxílio do fotomicroscópio Leica DMLB e sistema de digitalização de imagens (IM 50).

4.4. Preparação de amostras para análise por ativação com nêutrons

4.4.1 Determinação da massa seca das amostras

As plântulas de *A. blanchetiana* de cultura *in vitro* expostas a diferentes concentrações de Cu ou Zn foram lavadas por três vezes em água deionizada, e a seguir, foram separadas manualmente em partes aéreas (folha e caule) e

radiculares. As amostras foram colocadas em sacos de papel *Kraft* para secagem. No caso, das folhas dos tratamentos com Cu foram feitas as secagens de 2300 folhas e no caso das raízes 1430. Para os tratamentos com Zn foram feitas as secagens de 1830 folhas e 1740 raízes. Estas amostras permaneceram por três dias em temperatura ambiente e posteriormente foram submetidas a secagem em uma estufa de circulação forçada de ar marca FANEM – modelo 320-E, a temperatura média de 42 ± 2 °C por um período de 48 h até que obtivesse massa constante do material seco.

Para determinação da perda de água (umidade) destas amostras foram feitas as suas pesagens antes e depois da secagem. As amostras secas foram moídas usando um liquidificador com lâminas de titânio para se obtê-las na forma de pó. Estas amostras colocadas em frascos plásticos os quais foram identificados e guardados em um dessecador a temperatura ambiente para posterior análise pelo método de ativação com nêutrons.

4.5. Preparação dos padrões sintéticos dos elementos para as análises

As soluções padrão estoques certificadas de elementos utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Spex Certiprep, USA. A partir destas soluções estoque foram preparadas soluções mais diluídas contendo um ou mais elementos, utilizando materiais volumétricos (micropipetas, pipetas e balões) que foram previamente verificados quanto a sua calibração.

Alíquotas de 50 µL destas soluções diluídas foram pipetadas sobre tiras de papel de filtro Whatman nº. 40. Estas tiras com dimensões de 1,5 cm de largura e 8 cm de comprimento foram mantidas na posição vertical utilizando suporte de vidro. Para secagem das alíquotas pipetadas a temperatura ambiente, as tiras foram colocadas dentro de um dessecador. As concentrações dos elementos nas soluções padrões codificadas de Br 7, Cu 10, F 7, L 7 e S 7 bem como a massa de cada um dos elementos utilizados estão apresentadas na TAB. 4.5 no APÊNDICE B.

Após a secagem, estas tiras de papel filtro foram dobradas com auxílio de pinças com as extremidades protegidas por fita de teflon “veda-rosca” e colocadas em invólucros de plásticos (FIG. 4.5). Estes invólucros foram vedados utilizando um ferro elétrico para solda e folha de celofane.

Os plásticos utilizados para preparação destes invólucros foram previamente lavados com solução de ácido nítrico p.a. diluído e água purificada MILLIQ, seguida de secagem a temperatura ambiente, tomando-se o cuidado para que não ocorresse a contaminação. Os invólucros de plástico foram confeccionados usando seladora elétrica e folhas de celofane incolores.

Os padrões sintéticos em invólucros de plástico foram utilizados na análise por ativação com nêutrons.

FIGURA. 4.5. Foto dos invólucros de plásticos contendo padrões sintéticos de elementos.

4.6. Análise dos materiais de referência certificados

Para avaliar a exatidão e a precisão dos resultados analíticos foram feitas as análises dos materiais de referência certificados INCT-TL-1 *Tea Leaves*, proveniente do *Institute of Nuclear Chemistry and Technology* da *Warszana*, Polônia, NIST SRM 1547 *Peach Leaves* e SRM 1577b *Bovine Liver* ambos provenientes do *National Institute of Standards & Technology*, *Gaithersburg, USA*.

4.6.1. Determinação de perda de umidade na secagem dos materiais de referência certificados

Para determinação das percentagens da perda de umidade (**P**), pesaram-se cerca de 200 mg de cada material em um pesa filtro previamente tarado. A secagem foi realizada em uma estufa universal da marca FABBE-PRIMAR, modelo 219 a temperatura de 85 °C. Após 4 h de secagem foram realizadas as primeiras pesagens, depois de 12 h foram realizadas as segundas pesagens. Tendo as massas do material antes e após a secagem, foi calculada a percentagem de perda do material pela relação:

$$P=(m_i-m_f) \times 100/m_i \quad (4.5)$$

onde:

m_i = massa inicial do material antes da secagem;

m_f = massa final do material após a secagem.

Os valores de perda de umidade obtidos nas secagens foram de 10,06% para NIST SRM 1547 *Peach Leaves*, 7,98% para INCT-TL-1 *Tea Leaves* e 7,7% para NIST SRM 1577b *Bovine Liver*. Estes valores das percentagens de perda de umidade foram utilizados nos cálculos das concentrações dos elementos na base seca dos materiais.

4.7. Procedimento para a análise por ativação

Pesou-se uma massa de 150 a 200 mg de cada uma das amostras da parte aérea, radicular e materiais de referência em invólucros de polietileno, utilizando-se a balança analítica da marca *Shimadzu Libror* - AEL- 40SM com uma precisão de 0,00001 g. Estes invólucros contendo as amostras foram selados utilizando um ferro elétrico para solda e folha de celofane.

4.7.1. Irradiações curtas

As irradiações curtas foram realizadas para determinação do elemento Cu.

A amostra e o padrão de Cu (FIG. 4.6.) foram acondicionados dentro de um invólucro de polietileno e irradiados usando um dispositivo chamado “coelho” também polietileno, próprio para irradiações curtas na Estação Pneumática 4 do reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN-CNEN/SP.

FIGURA. 4.6. Foto da amostra e padrão sintético do elemento. Fotos A – padrão sintético do elemento; B – amostra; C - amostra + padrão sintético em um novo invólucro de polietileno; D - dispositivo próprio para irradiação “coelho”.

Para determinação do Cu pela medição do radioisótopo ^{66}Cu de meia-vida curta, uma amostra e um padrão de Cu foram irradiados por 12 s, sob fluxo nêutrons térmicos de $6,6 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Utilizando um cronometro foram registrados os tempos de início e final das contagens da amostra e padrão no cálculo dos tempos de decaimento considerando o decaimento durante a contagem. A amostra e o padrão foram fixados, separadamente, em suportes de aço inoxidável chamados de “panelinhas” com fita adesiva crepe, para as contagens.

Foram feitas as medições das atividades gama do radioisótopo formado no caso o ^{66}Cu com energia de raios gama de 1039,20 keV e meia-vida de 5,10 min., usando um detector semicondutor de Ge hiperpuro acoplado a uma placa ACE8K ambos da marca EG & G ORTEC, a um microcomputador e sistema eletrônico associado. A resolução do sistema utilizado (FWHM) foi de 0,84 keV para o pico de 122,37 keV do ^{57}Co e o pico de 1332,40 keV do ^{60}Co .

O sistema utilizado para estas contagens foi diariamente verificado quanto ao seu funcionamento em relação às medidas de taxas de contagens, resolução e energias dos raios gama por meio da medição de uma fonte de $^{57}\text{Co} + ^{60}\text{Co}$.

A amostra e o padrão sintético foram medidos por um período de 300 s nas contagens. Para o processamento dos espectros gama utilizou-se programa de computação VISPECT2, que fornece as energias e as áreas dos picos dos espectros gerados. A identificação do radioisótopo ^{66}Cu foi feita pela energia dos raios gama e pela meia vida. O cálculo da concentração do Cu foi realizado pelo método comparativo utilizando o programa PAKI o qual utiliza a relação (3.20).

4.7.2. Irradiações longas

As amostras e os padrões sintéticos dos elementos envoltos em folhas de alumínio, devidamente identificados, foram colocados dentro do dispositivo cilíndrico de alumínio chamado de “coelho” e irradiados no reator nuclear de pesquisa IEA-R1 do IPEN-CNEN/SP.

O tempo para irradiação utilizado foi de 16 h sob fluxo de nêutrons térmicos de $4 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a $5 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Depois de adequados tempos de decaimento, de cerca de cinco dias, as amostras e os padrões foram fixados em “panelinhas” de aço inoxidável com fita crepe para as contagens.

Foram feitas as medições das atividades gama dos radioisótopos formados utilizando um detector semiconductor de Ge hiperpuro acoplado a uma placa ACE8K ambos da marca EG & G ORTEC, a um microcomputador e sistema eletrônico associado, o mesmo sistema utilizado na irradiação curta.

Os padrões sintéticos foram medidos por um período de 5.400 s e as amostras de 20.000 s na primeira contagem, cinco a oito dias após o término da irradiação. Na segunda contagem, realizada após o decaimento de 13 a 18 dias de decaimento, foi utilizado um tempo de contagem de 5.400 s para os padrões e de 50.000 s para as amostras.

Para o processamento dos espectros gama utilizou-se programa de computação VISPECT2, que nos fornece as energias dos raios gama, e as áreas dos picos. A identificação dos radioisótopos foi feita pela energia dos raios gama e pela meia-vida. Na TAB. 4.6 estão apresentadas as energias de raios gama e meia vida dos radioisótopos utilizados neste trabalho.

Os cálculos das concentrações dos elementos foram realizados por meio do programa ESPECTRO. O programa utiliza a relação (3.20) para o cálculo destas concentrações dos elementos.

TABELA 4.6 – Radioisótopos utilizados com suas energias de raios gama e meia vida (IAEA, 1990).

Elemento	Radioisótopo medido	Energias dos raios gama (keV)	Meia-vida
As	⁷⁶ As	559,10	26,36 h
Br	⁸² Br	776,52	35,3 h
Ca	⁴⁷ Ca	1297,09	4,54 d
Cd	¹¹⁵ Cd	527,91	53,46 h
Co	⁶⁰ Co	1173,24	5,27 a
Cr	⁵¹ Cr	320,08	27,7 d
Cs	¹³⁴ Cs	795,85	2,06 a
Cu	⁶⁴ Cu	1345,77	12,7 h
Cu	⁶⁶ Cu	1039,20	5,10 min
Fe	⁵⁹ Fe	1099,25	44,5 d
K	⁴² K	1524,58	12,36 h
La	¹⁴⁰ La	1596,21	40,27 h
Mo	⁹⁹ Mo	739,58	65,94 h
Rb	⁸⁶ Rb	1076,60	18,66 d
Sb	¹²⁴ Sb	1690,98	60,2 d
Sc	⁴⁶ Sc	889,28	83,81 d
Se	⁷⁵ Se	264,66	119,77 d
Zn	⁶⁵ Zn	1115,55	243,9 d

4.8. Tratamento dos resultados obtidos das análises

4.8.1. Cálculo do limite de detecção

O limite de detecção é a menor concentração de um elemento na amostra, que pode ser detectado qualitativamente, mas não necessariamente ser quantificado (Cienfuegos, 2005).

Os limites de detecção (**LD**) dos elementos presentes nos materiais foram calculados segundo o critério de Currie (Currie, 1968) por meio da relação:

$$LD = (2,71 + 4,65 \times BG^{1/2}) / LT \quad (4.6)$$

onde:

BG = *background* (radiação de fundo);

LT = tempo vivo de medição (*Live time*)

4.8.2. Controle dos resultados analíticos

A precisão indica a reprodutibilidade ou concordância entre os valores das concentrações de um elemento obtidas numa amostra em “n” determinações. Quanto mais próximos entre si estiverem estes valores maior será a precisão. A precisão é a habilidade do método de reproduzir o mesmo resultado, embora não necessariamente o correto, sempre que o procedimento é realizado (Cienfuegos, 2005). A precisão dos resultados foi avaliada por meio do desvio padrão relativo dado por:

$$DPR = (DP / M) \times 100 \quad (4.7)$$

onde:

DPR = desvio padrão relativo em porcentagem;

DP = desvio padrão das “n” determinações;

M = média aritmética das “n” determinações.

A exatidão indica a concordância entre os resultados obtidos nas análises pelo mesmo método numa mesma amostra e sob condições diferentes, isto é, diferentes operadores, diferentes equipamentos, diferentes laboratórios (Cienfuegos, 2005). A exatidão dos resultados analíticos obtidos foi calculada segundo a relação:

$$Er = |M - C_{ref,i}| \times 100 / C_{ref,i} \quad (4.8)$$

onde:

Er = erro relativo em porcentagem;

M = média aritmética das “n” determinações;

$C_{ref,i}$ = valor certificado para o elemento i;

Os valores *Z-score* ou diferenças padronizadas permitem identificar resultados dispersos nas análises, isto é, atribuindo uma nota (*score*) relativa, para cada resultado obtido nos diferentes laboratórios. Assim, um valor *Z-score* próximo de zero significa que o resultado obtido é semelhante ao valor apresentado no certificado. Um valor disperso num ensaio experimental é qualquer resultado que apresenta um valor absoluto de *Z-score* maior que três (Pizzolato et al., 2008).

Neste trabalho os valores *Z-score* foram calculados para os elementos que apresentaram valores certificados nos seus certificados usando a equação (Bode, 1996; IAEA, 2001):

$$Z\text{-score}_i = (C_i - C_{ref,i}) / (\sigma_i^2 + \sigma_{ref,i}^2)^{1/2} \quad (4.9)$$

onde:

C_i = valor da média nas determinações do elemento i obtido na análise do material de referência;

$C_{ref,i}$ = valor certificado para o elemento i ;

σ_i = valor do desvio padrão nas determinações obtido para o elemento i na análise do material de referência certificado;

$\sigma_{ref,i}$ = valor da incerteza fornecido no certificado para o elemento i .

4.8.3. Análise de variância dos dados obtidos nas análises morfométricas

Os testes estatísticos foram aplicados aos dados obtidos nas análises morfométricas para avaliar o efeito dos elementos Cu ou Zn no desenvolvimento das estruturas foliares e radiculares das plântulas.

Para se interpretar os dados obtidos nos materiais biológicos devem ser consideradas as mínimas diferenças significativas entre as variáveis (Ayres et al., 2005) e para o tratamento dos resultados foi utilizado o programa estatístico BioEstat 4.0.

O teste da análise de variância (ANOVA), compara a magnitude das variações entre as amostras, decompondo a variância total em duas partes:

1. Entre as amostras, constituindo o chamado quadrado médio dos tratamentos;
2. Dentre cada tratamento, comparando o denominado quadrado médio do erro experimental.

O teste da análise de variância consiste em analisar a razão entre esses quadrados médios (Ayres et al., 2005).

Aos dados obtidos nas análises morfométricas foram aplicados teste estatístico da ANOVA seguido pelo teste *t Student*. Os testes estatísticos foram aplicados ao nível de confiança de 95% ou seja $p < 0,05$.

4.8.4. Cálculo do índice de translocação

A translocação é a transferência de um elemento de qualquer forma química (igual ou diferente da absorvida) de um órgão ou de uma região de absorção para outra qualquer, por exemplo da raiz para a parte aérea (Malavolta et al., 1974).

De posse dos resultados das concentrações dos elementos e a massa seca das amostras da parte aérea e radicular de cada plântula foi calculado o conteúdo ou massa do elemento da parte aérea (**PA**) e da radicular (**R**). Calculou-se o índice de translocação (**IT**) em termos de porcentagens dos elementos utilizando a relação (Abichequer et al., 2003):

$$IT = (PA / (PA + R)) \times 100 \quad (4.10)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Resultados da monitoração semanal das plântulas

A monitoração semanal das plântulas de *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith expostas a solução contendo diferentes concentrações do elemento Cu ou Zn indicou ocorrência de sintomas de clorose, necrose e de outros sintomas. Alguns destes sintomas apresentados no desenvolvimento das plântulas foram a contaminação por fungos e/ou bactérias, manchas amareladas, descoloração, manchas escuras, aparecimento de raízes, aparecimento de folhas, estiolamento da planta, folhas com listras e aparecimento de brotos.

No APÊNDICE C são apresentadas nas TAB. 5.1 e 5.2, a título ilustrativo, os dados da monitoração semanal efetuada para os tratamentos C0 e Z0.

Aos resultados obtidos nas observações semanais, foi aplicado modelo matemático para avaliar a frequência dos parâmetros, contaminação, clorose, necrose, manchas amareladas, descoloração, manchas escuras, aparecimento de raízes, aparecimento de folhas, estiolamento da planta, folhas com listras e aparecimento de brotos.

Analisando as frequências dos parâmetros na TAB. 5.3 para o tratamento C0 ($\text{Cu} = 0,0 \text{ mg L}^{-1}$) verifica-se que não houve proliferação bacteriana ou fúngica. A partir da 2ª semana de monitoração começaram surgir os primeiros sintomas de clorose nas folhas mais velhas que foram progredindo para a necrose na 4ª semana. O surgimento de novas raízes na 1ª semana e as folhas na 2ª semana indicaram o desenvolvimento das plântulas. As manchas amareladas apareceram na 2ª semana, a descoloração logo na 1ª semana. As manchas escuras, a partir da 2ª semana, surgiram nas folhas mais velhas na região do colo.

TABELA 5.3. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento semanal das plântulas de *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo sem Cu (Tratamento C0, Cu = 0,0 mg L⁻¹).

Semana	Frequência dos parâmetros											
	Contaminação	Clorose	Necrose	Mancha	Descoloração	Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
				amarelada		escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	0	0	0	1	0	4	0	8	0	0	2
2 ^a	0	8	0	3	0	2	0	0	10	0	0	3
3 ^a	0	3	0	5	0	1	0	10	5	0	0	7
4 ^a	0	7	2	4	0	2	0	5	3	0	0	2
5 ^a	0	5	2	3	0	2	0	6	3	0	0	3
6 ^a	0	5	2	3	0	2	0	6	3	0	0	3
7 ^a	0	5	2	3	0	2	0	6	3	0	0	3
8 ^a	0	5	3	1	0	0	0	13	8	0	0	8
9 ^a	0	7	2	1	0	0	0	9	6	0	0	6
10 ^a	0	7	2	1	0	0	0	9	6	0	0	6
11 ^a	0	6	3	1	0	2	0	7	9	0	0	6
12 ^a	0	6	3	1	0	2	0	7	9	0	0	6
13 ^a	0	4	0	0	0	1	0	12	9	0	0	3
14 ^a	0	5	5	0	0	1	0	6	8	0	3	1
15 ^a	0	5	5	0	0	1	0	6	8	0	3	1
16 ^a	0	5	5	0	0	1	0	6	8	0	3	1

Na TAB. 5.4 são apresentadas as frequências dos parâmetros para o tratamento C1 ($\text{Cu} = 0,009 \text{ mg L}^{-1}$) no qual ocorreu a contaminação fúngica de três frascos com culturas. As plântulas apresentaram a presença de clorose a partir da 2ª semana nas folhas mais velhas progredindo para necrose a partir da 3ª semana. A descoloração das folhas foi observada a partir da 2ª semana de monitoramento e as manchas escuras na 3ª semana. As folhas começaram a surgir na 2ª semana e raízes na 1ª semana. Não houve estiolamento e folhas com listras apareceram na 10ª semana. O aparecimento de brotos laterais foi observado a partir da 1ª semana de monitoramento.

Nas culturas do tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$) ocorreu a contaminação bacteriana e fúngica em quatro frascos. Na TAB. 5.5 estão apresentadas as frequências dos parâmetros da monitoração que mostraram que a partir da 1ª semana as plântulas apresentaram no seu desenvolvimento os efeitos fitotóxicos com a presença de clorose, necrose, manchas amarelas, descoloração. No entanto, a tolerância e adaptação ao meio MS com concentração de $\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$ foi presenciada com o aparecimento das primeiras folhas, raízes e brotos laterais. As machas escuras apareceram na 13ª semana e não houve o aparecimento de folhas com listras e plântulas estioladas.

Os dados da frequência dos parâmetros do tratamento C3 ($\text{Cu} = 0,9 \text{ mg L}^{-1}$) estão apresentados na TAB. 5.6 verifica-se proliferação bacteriana ou fúngica. Os efeitos fitotóxicos do elemento Cu foi sentida pelas plântulas com o aparecimento da clorose na 1ª semana e progredindo rapidamente para necrose das folhas na 2ª semana ao mesmo tempo as manchas escuras. As manchas amarelas e a descoloração das folhas apareceram na 1ª semana. O desenvolvimento das plântulas pôde ser observado com o aparecimento das raízes e brotos laterais na 1ª semana, assim com as folhas na 2ª semana.

Na TAB. 5.7 estão apresentadas as frequências dos parâmetros observadas nos frascos de culturas para o tratamento C4 ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$), no qual não foi observada contaminação bacteriana ou fúngica. A partir da 1ª semana de monitoração começaram a surgir os primeiros sintomas da fitotoxicidade do elemento nas plântulas como a clorose nas folhas mais velhas, manchas amareladas, descoloração e manchas escuras. Os sintomas de necrose

apareceram a partir da 2ª semana. O desenvolvimento das plântulas neste tratamento foi mais lento. O aparecimento das folhas e raízes ocorreu na 2ª semana em alguns exemplares. Já os brotos laterais apareceram logo na 1ª semana através de propagações caulinares na base do colo da plântula. O estiolamento começou a partir da 8ª semana. Na 5ª semana de monitoramento algumas plântulas começaram a apresentar folhas com listras amarelas.

Além dos sintomas já citados da fitotoxicidade do Cu, em alguns frascos as plântulas apresentaram suas folhas acobreada conforme mostra a foto capturada durante a monitoração (FIG.5.1). A apresentação das folhas com esta característica indica que, possivelmente, ocorreu alguma alteração no sistema fotossintético da planta.

FIGURA 5.1. Foto do frasco com cultura *in vitro* de plântulas de *A. blanchetiana*, do tratamento C4 ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$). As setas indicam as folhas com cor acobreada.

TABELA 5.4. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com Cu = 0,009 mg L⁻¹ (Tratamento C1).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	0	0	4	0	0	6	0	2	0	0	3
2 ^a	0	7	0	5	4	0	0	2	10	0	0	6
3 ^a	2	1	0	0	0	1	0	11	8	0	0	8
4 ^a	2	9	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
5 ^a	3	6	1	2	1	0	0	5	1	0	0	4
6 ^a	3	6	1	2	1	0	0	5	1	0	0	4
7 ^a	3	6	1	2	1	0	0	5	1	0	0	4
8 ^a	3	4	4	1	0	0	0	5	6	0	0	9
9 ^a	3	7	5	1	0	0	0	2	3	0	0	6
10 ^a	3	6	4	3	0	0	0	2	3	0	10	5
11 ^a	3	7	5	1	0	0	0	2	3	0	0	6
12 ^a	3	7	5	1	0	0	0	2	3	0	0	6
13 ^a	3	1	2	0	1	1	0	8	7	0	0	5
14 ^a	3	1	2	0	1	1	0	8	7	0	0	5
15 ^a	3	1	2	0	1	1	0	8	7	0	0	5
16 ^a	3	1	2	0	1	1	0	8	7	0	0	5

TABELA 5.5. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com Cu = 0,09 mg L⁻¹ (Tratamento C2).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	1	1	2	2	0	0	1	7	0	0	3
2 ^a	2	3	2	4	2	0	0	6	7	0	0	11
3 ^a	2	3	3	2	1	0	0	8	7	0	0	6
4 ^a	2	4	5	3	1	0	0	2	2	0	0	5
5 ^a	2	4	1	1	1	0	0	10	6	0	0	5
6 ^a	2	4	1	1	1	0	0	10	6	0	0	5
7 ^a	2	4	1	1	1	0	0	10	6	0	0	5
8 ^a	4	2	5	0	0	0	0	7	7	0	0	7
9 ^a	4	4	4	0	0	0	0	5	6	0	0	5
10 ^a	4	4	4	0	0	0	0	5	6	0	0	5
11 ^a	4	4	4	0	0	0	0	5	6	0	0	5
12 ^a	4	4	4	0	0	0	0	5	6	0	0	5
13 ^a	4	2	0	0	0	1	0	8	5	0	0	3
14 ^a	4	2	0	0	0	1	0	8	5	0	0	3
15 ^a	4	2	0	0	0	1	0	8	5	0	0	3
16 ^a	4	2	0	0	0	1	0	8	5	0	0	3

TABELA 5.6. Frequência absoluta das parâmetros observadas no monitoramento das plântulas de *Aechmea blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com Cu = 0,9 mg L⁻¹ (Tratamento C3).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	1	0	5	1	0	2	0	7	0	0	2
2 ^a	0	3	2	2	1	3	0	5	8	0	0	2
3 ^a	0	5	1	2	1	2	0	6	10	0	0	5
4 ^a	0	4	2	1	1	2	0	8	9	0	0	5
5 ^a	0	2	1	0	0	0	0	12	9	3	0	8
6 ^a	0	2	1	0	0	0	0	12	9	3	0	8
7 ^a	0	2	1	0	0	0	0	12	9	3	0	8
8 ^a	0	8	3	1	2	0	0	12	6	0	0	5
9 ^a	0	8	1	1	2	0	0	10	5	0	0	5
10 ^a	0	8	1	1	2	0	0	10	5	0	0	5
11 ^a	0	8	1	1	2	0	0	10	5	0	0	5
12 ^a	0	8	1	1	2	0	0	10	5	0	0	5
13 ^a	0	3	3	1	0	0	0	13	12	0	0	10
14 ^a	0	3	3	1	0	0	0	13	12	0	0	10
15 ^a	0	3	3	1	0	0	0	13	12	0	0	10
16 ^a	0	3	3	1	0	0	0	13	12	0	0	10

TABELA 5.7. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com Cu = 9 mg L⁻¹ (Tratamento C4).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	4	0	2	2	1	4	0	0	0	0	1
2 ^a	0	5	2	5	1	4	0	1	6	0	0	8
3 ^a	0	6	3	1	0	0	0	5	0	0	0	5
4 ^a	0	10	4	2	0	0	0	1	0	0	0	1
5 ^a	0	7	2	0	0	1	0	4	0	0	1	10
6 ^a	0	7	2	0	0	1	0	4	0	0	1	10
7 ^a	0	7	2	0	0	1	0	4	0	0	1	10
8 ^a	0	8	10	0	1	10	0	3	0	1	0	3
9 ^a	0	8	10	0	1	10	0	3	0	1	0	3
10 ^a	0	8	10	0	1	10	0	3	0	1	0	3
11 ^a	0	8	10	0	1	10	0	3	0	1	0	3
12 ^a	0	8	10	0	1	10	0	3	0	1	0	3
13 ^a	0	4	12	0	0	0	0	8	1	0	0	7
14 ^a	0	4	12	0	0	0	0	8	1	0	0	7
15 ^a	0	4	12	0	0	0	0	8	1	0	0	7
16 ^a	0	4	12	0	0	0	0	8	1	0	0	7

Os dados da frequência dos parâmetros apresentados na TAB. 5.8 para as plântulas no tratamento Z0 ($\text{Zn} = 0,0 \text{ mg L}^{-1}$) mostra que ocorreu a contaminação bacteriana. A partir da 2ª semana de monitoração as plântulas apresentaram em menor grau clorose e necrose nas folhas mais velhas. As manchas amarelas e descoloração começaram a surgir na 1ª semana e as manchas escuras a partir da 14ª semana. O surgimento de novas folhas e raízes ocorreu a partir da 1ª semana.

Analisando os dados das frequências para o tratamento Z1 ($\text{Zn} = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$) verifica-se a contaminação bacteriana e fúngica em três frascos de cultivo (TAB. 5.9). As plântulas apresentaram os efeitos do Zn com os sintomas de clorose, necrose, manchas amarelas e descoloração a partir da 1ª semana de monitoramento nas folhas mais velhas. O desenvolvimento das plântulas pode ser observado na 1ª semana com o crescimento das raízes e de brotos laterais, no entanto as folhas a partir da 2ª semana. Os estiolamentos das plântulas ocorreram na 11ª semana e folhas com listras surgiram na 14ª semana.

TABELA 5.8. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo isento de zinco (Tratamento Z0, Zn = 0,0 mg L⁻¹).

Semana	Frequências dos parâmetros											
				Manchas		Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	alteração	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	0	0	1	5	0	3	1	5	0	0	1
2 ^a	0	5	1	2	4	0	0	2	12	0	0	1
3 ^a	1	7	0	3	2	0	0	5	5	0	0	3
4 ^a	1	6	0	2	2	0	0	6	5	0	0	4
5 ^a	1	3	0	2	2	0	0	8	7	2	0	6
6 ^a	1	3	0	2	2	0	0	8	7	2	0	6
7 ^a	1	3	0	2	2	0	0	8	7	2	0	6
8 ^a	1	0	0	0	0	0	0	12	12	0	0	12
9 ^a	1	6	1	0	0	0	0	8	6	0	0	6
10 ^a	1	6	1	0	0	0	0	8	6	0	0	6
11 ^a	1	9	2	0	0	0	0	5	7	1	0	4
12 ^a	1	9	2	0	0	0	0	5	7	1	0	4
13 ^a	1	0	0	0	0	0	0	12	12	0	0	5
14 ^a	1	4	0	0	0	2	0	11	11	1	0	6
15 ^a	1	4	0	0	0	2	0	11	11	1	0	6
16 ^a	1	4	0	0	0	2	0	11	11	1	0	6

TABELA 5.9. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com Zn = 0,18 mg L⁻¹ (Tratamento Z1).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	4	2	2	2	0	0	0	3	0	0	10
2 ^a	1	3	1	0	2	0	0	12	6	0	0	0
3 ^a	1	5	3	2	1	0	0	4	3	0	0	4
4 ^a	1	6	2	2	1	0	0	5	4	0	0	7
5 ^a	1	0	0	0	0	0	0	10	9	0	0	7
6 ^a	1	0	0	0	0	0	0	10	9	0	0	7
7 ^a	2	0	0	0	0	0	0	9	8	0	0	6
8 ^a	2	0	1	0	0	0	0	9	8	0	0	8
9 ^a	2	6	0	0	1	0	0	7	5	0	0	11
10 ^a	2	6	0	0	1	0	0	7	5	0	0	1
11 ^a	3	5	3	1	0	0	0	1	6	1	0	7
12 ^a	3	5	3	1	0	0	0	1	6	1	0	7
13 ^a	3	0	0	0	0	5	0	10	9	2	0	6
14 ^a	3	5	0	0	0	3	0	7	9	0	3	4
15 ^a	3	5	0	0	0	3	0	7	9	0	3	4
16 ^a	3	5	0	0	0	3	0	7	9	0	3	4

Nas culturas do tratamento Z2 ($\text{Zn} = 1,8 \text{ mg L}^{-1}$) não ocorreu a contaminação de plântulas (TAB. 5.10). A partir da 1ª semana foram observados os primeiros sintomas como a clorose e manchas amarelas progredindo para a necrose na 2ª semana e o escurecimento das regiões do colo das plântulas. O desenvolvimento de novas raízes, folhas e brotos laterais começaram a partir da 1ª semana. Os estiolamentos das plântulas começaram a surgir a partir 11ª semana e as folhas com listras a partir da 13ª semana.

Nos frascos de culturas do tratamento Z3 ($\text{Zn} = 18 \text{ mg L}^{-1}$) os resultados das frequências dos parâmetros mostraram a não ocorrência de contaminação bem como o aparecimento de folhas com listras e estiolamento (TAB. 5.11). Os sintomas de clorose apareceram na 1ª semana progredindo para a necrose na 4ª semana já as manchas amarelas e descoloração das folhas apareceram na 1ª semana e as manchas escuras na 2ª semana. O desenvolvimento das plântulas foi observado com o aparecimento de novas raízes e brotos laterais na 1ª semana e em seguida na 2ª semana das folhas.

A análise dos resultados da frequência dos parâmetros na TAB. 5.12 para o tratamento Z4 ($\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$), mostrou que houve contaminação bacteriana e fúngica das plântulas. O efeito do Zn pode ser observado com o aparecimento da clorose progredindo para necrose a partir da 2ª semana e o mesmo efeito foi verificado para as manchas escuras. Em alguns exemplares o seu desenvolvimento foi observado com o crescimento de novas raízes e folhas a partir da 1ª semana, e os brotos laterais na 2ª semana. A partir da 14ª semana algumas plântulas começaram a apresentar folhas com listras amarelas.

TABELA 5.10. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com $\text{Zn} = 1,8 \text{ mg L}^{-1}$ (Tratamento Z2).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	1	0	8	0	0	1	1	5	0	0	6
2 ^a	0	7	1	3	0	1	0	7	5	0	0	2
3 ^a	0	7	5	4	0	0	0	7	3	0	0	8
4 ^a	0	5	3	3	0	0	0	9	3	0	0	6
5 ^a	0	4	1	1	0	0	0	10	7	0	0	7
6 ^a	0	4	1	1	0	0	0	10	7	0	0	7
7 ^a	0	4	1	1	0	0	0	10	7	0	0	7
8 ^a	0	4	1	1	0	0	0	10	7	0	0	7
9 ^a	0	8	0	0	0	0	0	6	7	0	0	6
10 ^a	0	8	0	0	0	0	0	6	7	0	0	6
11 ^a	0	8	4	1	0	0	0	4	9	1	0	6
12 ^a	0	8	4	1	0	0	0	4	9	1	0	6
13 ^a	0	4	2	0	0	2	0	9	9	0	1	8
14 ^a	0	4	0	0	0	2	0	8	12	0	2	2
15 ^a	0	4	0	0	0	2	0	8	12	0	2	2
16 ^a	0	4	0	0	0	2	0	8	12	0	2	2

TABELA 5.11. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com Zn = 18 mg L⁻¹ (Tratamento Z3).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas	Não houve	Aparecimento	Aparecimento	Estiolamento	Folhas	Aparecimento
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração	escuras	variação	de folhas	de raízes	da planta	com listras	de brotos
1 ^a	0	4	0	5	4	0	1	0	4	0	0	1
2 ^a	0	4	0	5	2	1	0	3	6	0	0	1
3 ^a	0	2	0	5	0	0	0	10	8	0	0	9
4 ^a	0	2	1	5	0	0	0	9	6	0	0	9
5 ^a	0	0	0	2	0	0	0	12	9	0	0	7
6 ^a	0	0	0	2	0	0	0	12	9	0	0	7
7 ^a	0	0	0	2	0	0	0	12	9	0	0	7
8 ^a	0	0	0	2	0	0	0	12	9	0	0	7
9 ^a	0	9	1	1	0	0	0	7	9	0	0	5
10 ^a	0	9	1	1	0	0	0	7	9	0	0	5
11 ^a	0	8	2	3	1	0	0	10	7	0	0	3
12 ^a	0	8	2	3	1	0	0	10	7	0	0	3
13 ^a	0	5	2	1	0	1	0	13	11	0	0	6
14 ^a	0	4	4	0	0	1	0	12	11	0	0	0
15 ^a	0	4	4	0	0	1	0	12	11	0	0	0
16 ^a	0	4	4	0	0	1	0	12	11	0	0	0

TABELA 5.12. Frequência absoluta dos parâmetros observados no monitoramento das plântulas de *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivadas *in vitro* em meio de cultivo com Zn = 180 mg L⁻¹ (Tratamento Z4).

Semana	Frequências dos parâmetros											
	Manchas					Manchas escuras	Não houve variação	Aparecimento de folhas	Aparecimento de raízes	Estiolamento da planta	Folhas com listras	Aparecimento de brotos
	Contaminação	Clorose	Necrose	amareladas	Descoloração							
1 ^a	0	4	0	5	1	0	3	1	5	0	0	0
2 ^a	0	6	1	3	1	1	0	4	6	0	0	1
3 ^a	1	1	1	1	0	0	0	10	6	0	0	6
4 ^a	1	1	0	0	0	0	0	10	6	0	0	5
5 ^a	1	0	0	0	0	0	0	10	6	0	0	7
6 ^a	1	3	0	0	0	0	0	8	6	0	0	4
7 ^a	1	3	0	0	0	0	0	8	6	0	0	4
8 ^a	1	3	0	0	0	0	0	8	6	0	0	4
9 ^a	1	9	3	2	0	0	0	4	4	0	0	4
10 ^a	1	9	3	2	0	0	0	4	4	0	0	4
11 ^a	1	9	4	1	0	0	0	8	5	0	0	4
12 ^a	1	9	4	1	0	0	0	8	5	0	0	4
13 ^a	2	2	1	0	0	4	0	10	7	0	0	5
14 ^a	2	2	3	0	0	2	0	8	4	0	4	4
15 ^a	2	2	3	0	0	2	0	8	4	0	4	4
16 ^a	2	2	3	0	0	2	0	8	4	0	4	4

Entre os 65 frascos contendo em cada frasco cinco plântulas expostas a concentrações crescentes do elemento Cu, em sete frascos foram observadas plântulas com desenvolvimento de contaminação bacteriana ou fúngica. Estes frascos contaminados foram descartados para evitar a proliferação para os demais. O mesmo fato ocorreu para seis frascos com plântulas expostas a diferentes concentrações de Zn.

Nas Tabelas 5.13. e 5.14 estão os dados coletados do número de plântulas vivas, mortas e contaminadas juntamente os valores de índices de contaminação e de sobrevivência obtidos para os tratamentos com Cu e Zn, separadamente.

Os índices de contaminações nos frascos com plântulas entre os tratamentos do elemento Cu variaram de 0 a 30,8% e de 0 a 23,1% para o elemento Zn. Segundo Teixeira et al., (2008) estes efeitos de contaminação podem ser evitados com a adição de esterilizante ao meio de cultivo e na água dos enxagues de todos utensílios utilizados, incluindo os frascos de cultura.

Os índices de sobrevivência das culturas expressam a qualidade das plântulas e permitem de modo prático e conveniente a comparação entre os tratamentos e estes resultados para melhor visualização estão apresentados nas FIG. 5.2 e 5.3 para o caso do Cu e Zn, respectivamente. Os índices de sobrevivência entre os tratamentos variaram de 46 a 80% para as plantas expostas a solução com concentrações crescentes de Cu e de 56,4 a 81,7% para caso do Zn (TAB. 5.13 e 5.14), estes resultados não apresentaram diferenças significativas.

TABELA 5.13. Número de plântulas vivas, mortas, contaminadas, índices de sobrevivência e contaminação para *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Cu.

Parâmetros	Tratamentos				
	C0	C1	C2	C3	C4
	(Cu = 0,0 mg L ⁻¹)	(Cu = 0,009 mg L ⁻¹)	(Cu = 0,09 mg L ⁻¹)	(Cu = 0,9 mg L ⁻¹)	(Cu = 9 mg L ⁻¹)
Plântulas vivas	46	38	36	40	30
Plântulas mortas	19	12	9	25	35
Somatório (vivas + mortas)	65	50	45	65	65
Plântulas contaminadas por fungos ou bactérias	0	15	20	0	0
Índice de sobrevivência (%)	70,8	76,0	80,0	61,5	46,2
Índice de contaminação (%)	0	23,1	30,8	0	0

TABELA 5.14. Número de plântulas vivas, mortas, contaminadas, índices de sobrevivência e de contaminação para *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Zn.

Parâmetros	Tratamentos				
	Z0	Z1	Z2	Z3	Z4
	(Zn = 0,0 mg L ⁻¹)	(Zn = 0,18 mg L ⁻¹)	(Zn = 1,8 mg L ⁻¹)	(Zn = 18 mg L ⁻¹)	(Zn = 180 mg L ⁻¹)
Vivas	49	38	51	45	31
Mortas	11	12	14	20	24
Somatório (vivas + mortas)	60	50	65	65	55
Plântulas contaminadas por fungos ou bactérias	5	15	0	0	10
Índice de sobrevivência (%)	81,7	76,0	78,5	69,2	56,4
Índice de contaminação (%)	7,7	23,1	0	0	15,4

FIGURA 5.2. Índices de sobrevivência e de contaminação das plântulas de *A. blanchetiana*, cultivadas *in vitro* em solução nutritiva com diferentes concentrações de Cu; Tratamento C0 (Cu = 0,0 mg L⁻¹), C1 (Cu = 0,009 mg L⁻¹), C2 (Cu = 0,09 mg L⁻¹), C3 (Cu = 0,9 mg L⁻¹), C4 (Cu = 9 mg L⁻¹).

FIGURA 5.3. Índices de sobrevivência e de contaminação das plântulas de *A. blanchetiana*, cultivadas *in vitro* em solução nutritiva com diferentes concentrações de Zn; Tratamento Z0 (Zn = 0,0 mg L⁻¹), Z1 (Zn = 0,18 mg L⁻¹), Z2 (Zn = 1,8 mg L⁻¹), Z3 (Zn = 18 mg L⁻¹), Z4 (Zn = 180 mg L⁻¹).

Foram analisadas as alterações decorrentes dos efeitos do Cu e Zn por meio da comparação das colorações das estruturas, a olho nu nas plântulas, bem como pela comparação entre as alturas, e o número de folhas nos diferentes tratamentos. Na foto da FIG. 5.4. capturada após a retirada das plântulas dos frascos de cultivos, estão apresentados alguns exemplares, na foto A da esquerda para a direita em ordem crescente das concentrações de Cu. Na foto B

da FIG. 5.4. estão apresentados alguns exemplares de plântulas submetidas aos tratamentos em diferentes concentrações de Zn, onde podem ser visualizadas as diferenças entre as alturas das plântulas, números de folhas e sistemas radiculares das plântulas.

FIGURA 5.4. Fotos obtidas após a exposição, das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, em meios contendo diferentes concentrações crescentes de Cu (Foto A) e Zn (Foto B). C0 (Cu = 0,0 mg L⁻¹); C1 (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 (Cu = 9 mg L⁻¹); Z0 (Zn = 0,0 mg L⁻¹); Z1 (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 (Zn = 180 mg L⁻¹).

As folhas das plântulas apresentaram diferenças em suas alturas e largura como podem ser visualizadas na foto A da FIG. 5.5. A foto C da FIG. 5.5. mostra um exemplar da plântula submetida a mais alta concentração de Cu, na qual são visíveis as alterações ocasionadas pela alta concentração deste elemento no seu crescimento. Nesta concentração ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$) a plântula se desenvolveu em menor grau, exibindo novas e pequenas folhas, bem como brotos laterais com coloração negra e manchas escuras na região do seu colo. Além disso, o exemplar apresentou clorose, necrose nas folhas mais velhas e ausência do sistema radicular.

Na foto B da FIG. 5.5. são apresentados exemplares de raízes das plântulas que se desenvolveram nos meios contendo diferentes concentrações de Cu. A raiz da plântula no tratamento C4 apresentou coloração mais escura, aspecto retilíneo, ausência de raízes laterais e diâmetro maior que as dos demais tratamentos. Várias plântulas do tratamento C4 apresentavam somente uma raiz adventícia, bem como as raízes deste tratamento foram verificadas em menor número por plântula.

A foto D da FIG. 5.5 mostra raízes referentes aos tratamentos com Zn. Os exemplares apresentaram raiz de cor clara com tom acinzentado bem como a ocorrência de muitas e pequenas raízes laterais, com aspecto plumoso devido à maior incidência de pelos radiculares.

FIGURA 5.5. Fotos das estruturas e plântula de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de Cu ou Zn. Fotos A e B – Folhas de número cinco e raízes retiradas das plântulas, do tratamento de plântulas C0 (Cu = 0,0 mg L⁻¹), C1 (Cu = 0,009 mg L⁻¹), C2 (Cu = 0,09 mg L⁻¹), C3 (Cu = 0,9 mg L⁻¹), C4 (Cu = 9 mg L⁻¹); C – Plântula do tratamento C4 (Cu = 9 mg L⁻¹) com manchas escuras, clorose e ausência de raízes; D – Raízes do tratamento de plântulas Z0 (Zn = 0,0 mg L⁻¹), Z1 (Zn = 0,18 mg L⁻¹), Z2 (Zn = 1,8 mg L⁻¹), Z3 (Zn = 18 mg L⁻¹), Z4 (Zn = 180 mg L⁻¹).

5.2. Resultados das análises morfométricas das amostras de plântulas

A morfometria das folhas e raízes consistiu em obter as dimensões dos seus parâmetros como: altura das plantas, número de folhas, número de raízes, diâmetro do colo, comprimento da folha cinco, largura da folha número cinco, espessura da folha cinco, diâmetro e comprimento da raiz. Os resultados destas análises foram obtidos para correlacionar com as concentrações crescentes de Cu ou Zn utilizadas nos meios de cultivo da exposição das plântulas *A. blanchetiana*.

Com os dados obtidos nas análises morfométricas foram calculadas as médias aritméticas e os desvios padrão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguidos do teste *t Student* para comparação entre os resultados obtidos para as distintas concentrações de Cu ou Zn (TAB. 5.15 e 5.16). Nestas Tabelas as médias com as letras idênticas colocadas ao lado dos valores indicam que não há diferenças significativas.

Nos resultados obtidos para as diferentes concentrações de Cu (TAB. 5.15), houve redução considerável da altura das plântulas sendo que no tratamento C4 as plântulas apresentaram as menores alturas. No final de 16 semanas de exposição verificou uma redução significativa da altura com o aumento da concentração, isto é, para um mg de Cu acrescida ao meio de cultivo houve redução de aproximadamente 11 mm na altura da plântula.

Com relação aos resultados do número de folhas, no mesmo intervalo de exposição houve uma redução deste parâmetro com a concentração de Cu no meio. O maior valor do número de folhas observado para o tratamento C0 (testemunha) que não diferiu significativamente quando comparado com os dos tratamentos C1, C2 e C3, no entanto foram verificados diferenças significativas entre os dados destes tratamentos e os do tratamento C4. Para a mais alta concentração de Cu utilizada foi obtido menor número de folhas por plântula.

O número de raízes diminui com o aumento das concentrações de Cu utilizadas nos meios de cultivo. O maior número de raízes observado foi para as

amostras do tratamento C0 e o menor para o tratamento C4. O número de raízes obtidos para as plântulas do tratamento C4 deferiu significativamente quando comparado com os demais tratamentos.

O parâmetro diâmetro do colo das plântulas apresentou diferenças significativas. Este parâmetro atingiu seu maior valor nas amostras do tratamento C3 e decresceu segundo o modelo de regressão quadrático com mais baixo valor do diâmetro do colo para as amostras do tratamento C4, sendo neste tratamento os diâmetros dos colos significativamente diferentes daqueles obtidos nos demais tratamentos.

Os comprimentos das folhas obtidos nos tratamentos C0, C1 e C2 não apresentaram diferenças significativas porém nas amostras dos tratamentos C3 e C4 os valores destes comprimentos apresentaram diferenças significativa. Para o parâmetro largura da folha, foi verificada diferença entre as amostras dos tratamentos C2 e C3 com (maior largura) e C4 (menor valor). Os valores das espessuras das folhas não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos.

Entre os diâmetros das raízes obtidos nas amostras dos tratamentos C0, C1 e C2 não apresentaram uma redução significativa, entretanto para os tratamentos C3 e C4 foram verificados aumento dos diâmetros. Para o parâmetro comprimento das raízes foi verificado uma redução considerável deste parâmetro com o aumento da concentração de Cu nos tratamentos. O maior diâmetro das raízes foi observado nas amostras do tratamento C4.

Na análise dos resultados dos ensaios experimentais para as diferentes concentrações de Zn, o parâmetro altura das plântulas não apresentou diferença significativa entre os tratamentos com diferentes concentrações de Zn (TAB. 5.16).

Já para o número de folhas foi significativo entre as amostras dos tratamentos Z0 (testemunha), Z2, Z3 e Z4, sendo o menor número de folhas obtido para as amostras do tratamento Z3 e maior para o Z1.

Para os demais parâmetros analisados da TAB. 5.16 não foram verificadas diferenças significativa entre os dados obtidos para as diferentes concentrações de Zn, podendo assim inferir que as plântulas apresentaram tolerância as diferentes concentrações de Zn a que foram expostas.

TABELA 5.15. Médias dos parâmetros obtidos na análise morfométrica das plântulas de *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivadas *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Cu.

Parâmetros	Tratamento C0	Tratamento C1	Tratamento C2	Tratamento C3	Tratamento C4
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Altura da plântula (mm)	265,2 ± 87,1a	184,6 ± 41,4b	209,5 ± 35,0b	189,0 ± 60,7b	118,2 ± 41,2c
Número de folhas	14,6 ± 5,6a	12,8 ± 4,2a	11,6 ± 3,0ab	12,0 ± 3,8a	8,1 ± 1,5b
Número de raízes	10,2 ± 5,3a	8,1 ± 4,0ab	7,2 ± 3,1ac	7,3 ± 3,3bc	3,3 ± 1,3d
Diâmetro do colo (mm)	4,2 ± 0,7a	4,0 ± 0,9a	4,3 ± 1,2ab	4,9 ± 1,2b	3,2 ± 0,8c
Comprimento da folha (mm)	109,8 ± 43,2ab	98,1 ± 52,2b	140,8 ± 38,7ab	141,5 ± 58,1b	78,3 ± 32,2c
Largura da folha (mm)	7,4 ± 1,9bc	6,7 ± 1,5c	8,3 ± 2,5ab	9,0 ± 2,3a	6,0 ± 1,5c
Espessura da folha (mm)	0,36 ± 0,06a	0,32 ± 0,11a	0,32 ± 0,09a	0,35 ± 0,09a	0,34 ± 0,13a
Diâmetro da raiz (mm)	0,18 ± 0,10bc	0,17 ± 0,08b	0,13 ± 0,07b	0,23 ± 0,18ac	0,32 ± 0,12a
Comprimento da raiz (mm)	113,5 ± 64,8a	92,0 ± 49,3a	90,2 ± 44,7a	86,2 ± 43,1a	34,5 ± 10,7b

M - Média aritmética; DP - Desvio padrão; C0 - (Cu = 0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹); As médias com letras distintas, em linha indicam que há diferença entre si, pelo teste *t* (p<0,05) para os parâmetros estudados.

TABELA 5.16. Médias dos parâmetros obtidos na análise morfométrica das plântulas de *A. blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivadas *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Zn.

Parâmetros	Tratamento Z0	Tratamento Z1	Tratamento Z2	Tratamento Z3	Tratamento Z4
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Altura da plântula (mm)	197,5 ± 58,2a	191,5 ± 34,0a	212,5 ± 39,4a	223,8 ± 42,2a	172,5 ± 60,4a
Número de folhas	11,8 ± 2,7a	12,9 ± 3,7a	10,1 ± 3,1b	6,9 ± 1,0c	8,1 ± 2,1bc
Número de raízes	10,8 ± 2,2a	9,2 ± 2,4ab	8,1 ± 1,5bc	6,9 ± 3,0c	4,8 ± 2,4d
Diâmetro do colo (mm)	4,2 ± 0,7a	4,5 ± 1,0a	4,2 ± 0,9a	4,6 ± 1,1a	4,6 ± 0,8a
Comprimento da folha (mm)	121,0 ± 38,8a	138,5 ± 35,6a	154,1 ± 42,7a	143,2 ± 34,3a	132,5 ± 40,5a
Largura da folha (mm)	7,7 ± 1,2a	8,6 ± 1,8a	7,4 ± 2,2a	7,5 ± 2,2a	8,6 ± 2,2a
Espessura da folha (mm)	0,37 ± 0,07a	0,39 ± 0,06a	0,37 ± 0,06a	0,35 ± 0,05a	0,42 ± 0,05a
Diâmetro da raiz (mm)	0,27 ± 0,12a	0,33 ± 0,11a	0,30 ± 0,11a	0,40 ± 0,12a	0,31 ± 0,09a
Comprimento da raiz (mm)	87,2 ± 22,7a	70,3 ± 24,3a	75,4 ± 15,7a	74,8 ± 30,3a	63,8 ± 34,1a

M - Média aritmética; DP - Desvio padrão; Z0 - (Zn = 0,0 mg L⁻¹); Z1 - (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 - (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 - (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 - (Zn = 180 mg L⁻¹); As médias com letras distintas, em linha indicam que há diferença entre si, pelo teste *t* (p<0,05) para os parâmetros estudados.

5.3. Índice estomático e densidade estomática

O índice estomático (IE) e a densidade estomática (DE) foram avaliados para identificar possíveis alterações fisiológicas nas plântulas, para as diferentes concentrações dos elementos Cu ou Zn aplicadas ao meio de cultivo.

Com os dados obtidos dos parâmetros números de células da epiderme e de estômatos foram calculadas as médias e desvios padrão, o índice e densidade estomática das folhas cinco (TAB. 5.17 e 5.18). Os índices estomáticos das regiões medianas das folhas cinco expostas a diferentes concentrações de Cu variaram de 0,4 a 1,3% para a face inferior e de 4,5 a 6,4% para a superior. Para as regiões medianas das folhas dos tratamentos expostos a diferentes concentrações de Zn os índices variaram de 0,3 a 1,6% para a face inferior e de 5,1 a 6,3% para a superior. As densidades estomáticas das regiões medianas das folhas cinco expostas a concentrações de Cu variaram de 0,3 a 0,8 para a face inferior e de 3,5 a 5,5 para a superior. Para as regiões medianas das folhas dos tratamentos expostos a concentrações de Zn, as densidades variaram de 0,2 a 0,5 para a face inferior e de 3,9 a 5,7 para a superior.

As folhas, em desenvolvimento, indicam ser capazes de detectar sinais e responder a estímulos alterando o processo de diferenciação estomática. Os resultados permitiram relacionar as diferentes concentrações de Cu ou Zn no desenvolvimento destas estruturas a partir de plântulas. Os maiores índices e densidades estomáticas foram observados para o tratamento C4 na face inferior, indicando que houve maior diferenciação celular, mesmo sendo encontrado o menor valor para o comprimento foliar. A razão entre estas variáveis (comprimento foliar / densidade estomática) é menor para o tratamento C4 (ver TAB. 5.15 e 5.17), indicando uma resposta fisiológica com aumento relativo da diferenciação estomática das plântulas submetidas a esta concentração de Cu ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$) no meio de cultivo.

Com o aumento da concentração de Zn ocorreu diminuição da diferenciação estomática na face inferior. E a partir do tratamento Z1 houve aumento na diferenciação estomática, mas por outro lado o menor número de

células da epiderme, indicando que houve maior alongamento destas células. No entanto, nos tratamentos Z0 e Z4 ocorreu a diminuição desta diferenciação.

Na face superior da epiderme das folhas, houve aumento dos números de células da epiderme, nos tratamentos C3, C4 e Z1 e estes resultados não apresentaram diferenças significativas. Aumentando as concentrações dos elementos, o menor índice e densidade estomática foram observados para os tratamentos C2 e Z3 e os maiores valores para os tratamentos C1, Z1 e Z2 para o índice estomático e para a densidade os tratamentos C3 e Z1.

TABELA 5.17. Médias do número de células da epiderme, número de estômatos, índice estomático e densidade estomática da face inferior das regiões medianas das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Cu e Zn. (n = 30 determinações para cada tratamento).

Tratamentos	Número de células da epiderme/mm ²	Número de estômatos/mm ²	Índice estomático (IE) (%)	Densidade estomática (DE)
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
C0	58,1 ± 8,7	0,33 ± 0,08	0,548 ± 0,014	0,33 ± 0,08
C1	58,1 ± 13,1	0,31 ± 0,07	0,424 ± 0,011	0,31 ± 0,07
C2	53,3 ± 8,8	0,41 ± 0,07	0,702 ± 0,013	0,41 ± 0,07
C3	60,8 ± 12,6	0,43 ± 0,08	0,659 ± 0,011	0,43 ± 0,08
C4	57,5 ± 12,6	0,83 ± 0,15	1,25 ± 0,02	0,83 ± 0,15
Z0	52,1 ± 12,1	0,23 ± 0,07	0,321 ± 0,009	0,23 ± 0,07
Z1	32,8 ± 18,6	0,53 ± 0,08	1,61 ± 0,03	0,53 ± 0,08
Z2	48,9 ± 10,4	0,21 ± 0,05	0,454 ± 0,008	0,21 ± 0,05
Z3	55,0 ± 11,7	0,27 ± 0,05	0,434 ± 0,010	0,27 ± 0,05
Z4	52,4 ± 6,4	0,31 ± 0,08	0,528 ± 0,014	0,31 ± 0,08

M - Média aritmética; DP - Desvio padrão; C0 - (Cu = 0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹); Z0 - (Zn=0,0 mg L⁻¹); Z1 - (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 - (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 - (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 - (Zn = 180 mg L⁻¹).

TABELA 5.18. Médias do número de células da epiderme, número de estômatos, índice estomático e densidade estomática da face superior das regiões medianas das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Cu ou Zn. (n = 30 determinações para cada tratamento).

Tratamentos	Número de células da epiderme/mm ²	Número de estômatos/mm ²	Índice estomático (IE) (%)	Densidade estomática (DE)
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
C0	77,9 ± 13,0	4,4 ± 1,8	5,3 ± 2,0	4,4 ± 1,8
C1	73,8 ± 15,1	4,9 ± 1,3	6,4 ± 1,7	4,9 ± 1,3
C2	73,6 ± 10,3	3,5 ± 1,6	4,5 ± 1,8	3,5 ± 1,6
C3	86,5 ± 10,7	5,5 ± 2,1	5,9 ± 2,2	5,5 ± 2,1
C4	89,4 ± 10,1	5,2 ± 1,0	5,3 ± 2,5	5,2 ± 1,0
Z0	80,1 ± 17,2	4,8 ± 1,7	5,6 ± 1,3	4,8 ± 1,7
Z1	83,0 ± 5,1	5,7 ± 1,6	6,4 ± 1,7	5,7 ± 1,6
Z2	72,0 ± 5,6	3,9 ± 1,5	6,4 ± 2,1	3,9 ± 1,5
Z3	68,3 ± 6,7	4,7 ± 1,7	5,1 ± 5,1	4,7 ± 1,7
Z4	74,9 ± 10,5	5,1 ± 1,9	6,3 ± 1,7	5,1 ± 1,9

M - Média aritmética; DP - Desvio padrão; C0 - (Cu = 0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹); Z0 - (Zn = 0,0 mg L⁻¹); Z1 - (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 - (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 - (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 - (Zn = 180 mg L⁻¹).

Aos dados originais obtidos das mensurações, para determinação do índice estomático e densidade estomática, foram aplicados testes estatísticos da ANOVA seguidos do teste *t Student*, a um nível de confiança de 95%. Os resultados destes testes indicaram que não há diferença significativa entre os diferentes tratamentos do Cu ou os de Zn.

5.4. Resultados das análises anatômicas

5.4.1. Análises anatômicas em vista frontal da epiderme foliar

Após a dissociação da epiderme foram observados em vista frontal os estômatos das folhas de *A. blanchetiana* que são tetracíticos, isto é, envolvido por quatro células subsidiárias sendo duas paralelas às células-guarda e o par restante polar, conforme descrito por Sousa et al., (2005) em *Aechmea* Subg. Chevaliera. Nas fotos A e D da FIG. 5.6, são apresentados estes resultados. Os estômatos das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* estão distribuídos em fileiras longitudinais como apresentado em *Tillandsia* (Scatena e Segecin, 2005) e encontram-se no mesmo nível das células epidérmicas como em *A. rodriguesiana* (Sousa et al., 2005).

Os estômatos aparecem na superfície superior e inferior da epiderme sendo em maior número na superfície superior. Essas observações em *A. blanchetiana* podem estar relacionadas com as características da espécie, visto que a planta pode ser terrestre ou epífita (Benzing et al., 1976; Dahlgren et al., 1985).

Os estômatos estão isolados dos tricomas peltados e não foram observados estômatos cobertos pelos tricomas peltados como pode ser observado nas fotos B e C da FIG. 5.6.

As folhas das plântulas exibem tricomas peltados na epiderme, uma das características anatômicas peculiares da família, que são absorventes na maioria das espécies de Bromelioideae e Tillandsioideae (Benzing et al., 1976).

FIGURA 5.6. Fotomicrografias em vista frontal da epiderme das folhas das plântulas de *A. blanchetiana*, cultivadas *in vitro*. Fotos A e B – Tempo inicial (T0); C - C0 (Cu = 0,0 mg L⁻¹); D - C1 (Cu = 0,009 mg L⁻¹); E - C2 (Cu = 0,09 mg L⁻¹). Setas indicam a presença de cristais.

A presença de tricomas peltados nas folhas faz com que estas plantas sejam altamente qualificadas na absorção de aerossóis e partículas dispersas no ar, pois aumentam a interface da superfície foliar com o ambiente (Brighigna et al., 1997). Desta forma estas plantas, recebem água da atmosfera, da chuva, orvalho, neblina, a que são rapidamente conduzidas para os tecidos internos da folha por intermédio destes tricomas peltados (Brighigna et al., 1997), de modo que os metais Cu e Zn podem ter sido absorvidos pelos tricomas, pois as plântulas expostas ao Cu ou Zn foram mantidas na condição “in vitro” e os frascos durante a monitoração foram inclinados a 60° para que o meio de cultivo entrasse em contato com as folhas.

Os tricomas peltados das folhas de *A. blanchetiana* exibem a base estruturalmente dividida em três células quadrangulares e uma retangular, esse fato foi também descrito por Sousa et al., (2005) para o caso de *Aechmea* subg. *Chevaliera* e não se encontram em depressões na epiderme das folhas. Mas para Proença e Sajo, (2004) que estudaram *Aechmea* Ruiz & Pav, os tricomas peltados estão em depressões na epiderme pelas células da base, em forma quadrangular e retangular.

A distribuição dos tricomas peltados das folhas é irregular, isto é, não há distribuição definida. Os tricomas estão presentes em maior número na face superior que na inferior, fato também observado por Sousa et al., (2005) e Braga, (1977).

Os tricomas peltados verificados no presente estudo foram localizados nas regiões marginais das folhas, e pôde ser observado a presença de tricomas unisseriados em todos os tratamentos. Nas folhas expostas aos elementos Cu ou Zn foi verificada a alteração no número de células da base dos tricomas unisseriados variando de 3 a 7 células. Na FIG. 5.7 são apresentadas as fotos dos tricomas unisseriados do tratamento Z1 ($\text{Zn} = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$) em diferentes estágios de desenvolvimento, observando-se ainda que eles desenvolveram sobre os acúleos, estruturas não vascularizadas que se apresentam nas laterais das folhas.

FIGURA 5.7. Fotomicrografias em vista frontal da epiderme das regiões medianas das folhas cinco das plântulas de *A. blanchetiana*, cultivadas *in vitro* exposta ao Zn (Tratamento Z1, $\text{Zn} = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$) evidenciando tricomas unisseriados em diferentes estágios de desenvolvimento.

Na FIG. 5.8 são apresentadas as fotomicrografias em vista frontal das regiões medianas das folhas cinco das plântulas expostas nos ensaios ao Cu. Pode-se observar na foto A da FIG. 5.8 tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$) o crescimento de tricoma unisseriado que se duplicou a partir das células da base. Na foto B da FIG. 5.8 para tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$) observa-se a região da câmara subestomática apresentando uma estrutura amorfa de cor amarelada em primeira visualização e após três dias apresentaram forma circular como gotículas. Na foto C da FIG. 5.8 do tratamento C3 ($\text{Cu} = 0,9 \text{ mg L}^{-1}$) podem ser observados os núcleos com cor muito escura das células companheiras, indicando alterações devido a presença de Cu. Na fotomicrografia D da FIG. 5.8 tratamento C4 ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$) pode ser observada a presença de vários cristais amorfos nas células da epiderme.

FIGURA 5.8. Fotomicrografias das regiões medianas das folhas cinco das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de Cu. Fotomicrografias A e B - tratamento C2 (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C - tratamento C3 (Cu = 0,9 mg L⁻¹); D - tratamento C4 (Cu = 9 mg L⁻¹). Setas indicam a presença dos cristais.

A epiderme da região mediana das folhas da *A. blanchetiana* é uniestratificada e as células apresentaram em vista frontal, paredes onduladas com contorno retangular (FIG. 5.9). Nas fotomicrografias A, B e C da FIG. 5.9 podem ser visualizadas as faces inferiores das folhas das plântulas submetidas a

diferentes concentrações de Zn e na fotomicrografias D desta mesma figura a face superior da folha.

Os idioblastos, células contendo ráfides de oxalato de cálcio são característicos da planta de *A. blanchetiana*. Segundo Brighigna et al., (2002) a função do oxalato de cálcio é neutralizar a grande quantidade de cálcio com ácido oxálico, havendo a reabsorção do oxalato de cálcio por ocasião da necessidade de cálcio pela planta. O oxalato de cálcio pode ainda servir como depósitos para resíduos metabólicos que de outra forma seriam tóxicos para a planta. Além destas estruturas foram visualizados outros cristais com formato de drusas e amorfos, nos diferentes tratamentos conforme mostra a fotomicrografia da FIG. 5.10 e foram também observados no interior das células da epiderme nas faces superior e inferior, nas células companheiras e nas células polares dos estômatos. O excesso deste cristal pode ser uma resposta fisiológica das plântulas a exposição dos elementos Cu ou Zn, entretanto serão necessários novos testes para identificar sua constituição química.

FIGURA 5.9. Fotomicrografias em vista frontal da epiderme das folhas das plântulas de *A. blanchetiana*, cultivadas *in vitro* em diferentes concentrações de Zn evidenciando as células da epiderme com paredes de onduladas e com contorno regular. Fotomicrografias A – tratamento Z0 (Zn = 0,0 mg L⁻¹); B – tratamento Z1 (Zn = 0,18 mg L⁻¹), C - tratamento Z2 (Zn = 1,8 mg L⁻¹); D – tratamento Z3 (Zn = 18 mg L⁻¹) .

FIGURA 5.10. Fotomicrografias em vista frontal da epiderme das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* em diferentes concentrações de Zn evidenciando as células da epiderme com paredes onduladas e com contorno regular. Fotomicrografias A, B e C – tratamento Z3 (Zn = 18,0 mg L⁻¹); D – tratamento Z4 (Zn = 180 mg L⁻¹). As setas indicam a presença dos cristais.

5.4.2. Análises anatômicas em vista transversal da epiderme foliar

Em seções transversais da lâmina foliar da plântula de *A. blanchetiana*, os tricomas peltados se inserem pelo pedículo na epiderme. O pedículo é constituído de três a cinco células, sendo as superiores retangulares e as basais quadrangulares.

A epiderme é uniestratificada com células relativamente pequenas, de paredes espessadas e lume reduzido, revestida por uma cutícula delgada.

As células-guarda dos estômatos apresentam paredes espessadas que se projetam formando cristas.

Os feixes vasculares intercalam-se com células do parênquima clorofiliano, as fibras fortemente lignificadas foram observadas como calotas adjacentes ao floema e xilema. Cordões de fibras não associados aos feixes vasculares encontram-se dispersos no parênquima clorofiliano.

Nas amostras das folhas submetidas a diferentes concentrações do elemento Cu foi possível observar, em microscopia óptica, a presença de elementos circulares nas células do parênquima aquífero e grande quantidade de amido no parênquima clorofiliano nas amostras do tratamento C0 (FIG.5.11).

Na FIG. 5.12 está apresentada fotomicrografia da seção transversal da região mediana da folha para as amostras do tratamento C1(Cu = 0,009 mg L⁻¹). Em microscopia óptica os exemplares neste tratamento apresentaram a presença de machinhas escuras nas células do parênquima clorofiliano, e variação do contorno destas células. O parênquima aquífero apresentou-se na face inferior da folha, formado por uma camada de três de células.

FIGURA. 5.11. Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, tratamento C0 ($\text{Cu} = 0,0 \text{ mg L}^{-1}$). Ce – câmara subestomática; Ct – cutícula; Epda – epiderme face superior; Epda – epiderme face inferior; Fe – feixe vascular; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Barras - 100 μm . Seta indica a presença de elementos circulares.

FIGURA 5.12. Fotomicrografia da seção transversal da folha da plântula de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*. Tratamento C1 ($\text{Cu} = 0,009 \text{ mg L}^{-1}$). Ce – câmara subestomática; Epda – epiderme face superior; Epda – epiderme face inferior; Es, estômato; Fe – feixe vascular; Fi – floema; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Xi – xilema; Barra = 100 μm .

Na FIG. 5.13 estão apresentadas as fotomicrografias das amostras do tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$) em vista transversal das folhas. Nos exemplares analisados deste tratamento em microscopia óptica, pôde se observado vários cristais de diferentes formatos, estes cristais apresentaram-se nas células da epiderme, do parênquima aquífero e clorofiliano próximos aos feixes vasculares. Variação no tamanho das células da epiderme da face superior, irregularidades em sua distribuição, a coloração mais intensa destas células indicam maior lignificação ou a presença de compostos fenólicos, fato também observado para as células do parênquima aquífero. Pôde também ser observado no parênquima clorofiliano, grande deposição de grânulos e desorganização celular com variação no contorno destas células.

FIGURA 5.13. Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, para as amostras do tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$). Cr – cristal; Epda – epiderme face superior; Epda – epiderme face inferior; Fe – feixe vascular; Fi – floema; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Xi – xilema; Barras - 100 μm . Seta indica a presença de estrutura circular no interior da célula do parênquima clorofiliano.

Na FIG. 5.14 estão apresentadas as fotomicrografias da seção transversal da região mediana das folhas para a amostra do tratamento C3 (A) e amostra do tratamento C4 (B). Nos exemplares analisados para as amostras do tratamento C3, houve o aparecimento de cristais, desorganização das células do feixe vascular, irregularidade nas células da epiderme face superior com coloração mais intensa indicando maior lignificação. Nos exemplares do tratamento C4, foram observadas a desorganização das células do parênquima clorofiliano com variações no contorno, espaçamento entre as células e deposições de cor escura.

FIGURA 5.14 Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*. A - tratamento C3 ($\text{Cu} = 0,9 \text{ mg L}^{-1}$); B - tratamento C4 ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$). Epda – epiderme face superior; Epba – epiderme face inferior; Fe – feixe vascular; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Barras - 100 μm .

Nas amostras das regiões medianas das folhas nos tratamentos do Zn também foram observadas alterações devido às concentrações deste elemento. Na FIG. 5.15 com a ausência de Zn pode ser observado em microscopia óptica o espaçamento entre as células no parênquima clorofiliano, e pequena quantidade de cristais dispersos no interior das células.

Na FIG. 5.16 estão apresentadas as fotomicrografias dos exemplares de folhas em seções transversais do tratamento Z1 ($\text{Zn} = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$) nas quais pôde ser observada presença de grande quantidade de amido, a coloração avermelhada mais intensa nas células da epiderme e do parênquima clorofiliano indicando maior lignificação destas células.

Na FIG. 5.17 estão apresentadas as fotomicrografias das seções transversais das amostras do tratamento Z2 ($\text{Zn} = 1,8 \text{ mg L}^{-1}$) nas quais pôde ser observada a presença de cristal no interior das células do pedículo do tricoma peltado. No parênquima clorofiliano desorganização celular e espaçamento entre estas células, deposições de cor escura no interior das células.

Na FIG 5.18 estão apresentadas as fotomicrografias das seções transversais das amostras do tratamento Z3 ($\text{Zn} = 18 \text{ mg L}^{-1}$) nas quais pôde ser observada coloração avermelhada mais intensa nas células da epiderme e do parênquima clorofiliano indicando maior lignificação destas células.

Na FIG. 5.19 estão apresentadas as fotomicrografias das seções transversais das amostras do tratamento Z4 ($\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$). Os exemplares deste tratamento apresentaram grande quantidade de grânulos, presença de deposições escura nas células do parênquima e estruturas circulares de cor clara no parênquima aquífero.

FIGURA 5.15. Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, tratamento Z0 ($\text{Zn} = 0,0 \text{ mg L}^{-1}$). Epda – epiderme face superior; Epda – epiderme face inferior; Fe – feixe vascular; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Barras - 100 μm ; Elipse indica espaçamento entre as células; Circulo indica a presença de célula brasiforme.

FIGURA 5.16. Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, tratamento Z1 ($\text{Zn} = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$). Ce – câmara subestomática; Epda – epiderme face superior; Epba – epiderme face inferior; Es – estômato; Fe – feixe vascular; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Barras - 100 μm ; Setas indicam a presença de grânulos.

FIGURA 5.17. Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, tratamento Z2 ($\text{Zn} = 1,8 \text{ mg L}^{-1}$). Ce – câmara subestomática; Epda – epiderme face superior; Epda – epiderme face inferior; Es – estômato; Fe – feixe vascular; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Tp – tricoma peltado; Barras - 100 μm ; Setas indicam deposições escuras.

FIGURA 5.18. Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, tratamento Z3 ($\text{Zn} = 18 \text{ mg L}^{-1}$). Ce – câmara subestomática; Epda – epiderme face superior; Epba – epiderme face inferior; Fe – feixe vascular; Paq – parênquima aquífero; Barras - 100 μm .

FIGURA 5.19. Fotomicrografias das seções transversais das folhas das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, tratamento Z4 ($\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$). Epda – epiderme face superior; Epda – epiderme face inferior; Fe – feixe vascular; Paq – parênquima aquífero; Pcl – parênquima clorofiliano; Barras - 100 μm ; Setas indicam estruturas circulares no parênquima aquífero.

A *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* apresentou raiz adventícia com uma epiderme pluriestratificada, constituindo o velame. As células do velame, de formatos variados, apresentaram paredes delgadas. A camada periférica desse tecido, região do epivelame apresentou pelos radiculares unicelulares. A endoderme se apresentou como uma camada unisseriada com células de paredes espessada e lúmen reduzido. A hipoderme se apresentou como uma camada plurisseriada e lume bem reduzido (Pita e Menezes, 2002).

Na FIG. 5.20 estão apresentadas as fotomicrografias das seções transversais das raízes do tratamento C0. Não foram observadas alterações estruturais neste tratamento.

As alterações estruturais observadas nas fotomicrografias de alguns exemplares do tratamento C1 ($\text{Cu} = 0,009 \text{ mg L}^{-1}$) estão apresentados na FIG. 5.21.

FIGURA 5.20 Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento C0 ($\text{Cu} = 0,0 \text{ mg L}^{-1}$). Ar – aerênquima; Ep – epitelame; Hi – hipoderme; M – medula; V – velame; Pr – pelo radicular; Barras - 100 μm .

Nos exemplares analisados do tratamento C1 nas amostras de raízes foram observadas a redução do comprimento dos pelos radiculares, espessamento, aparecimento de intrusões e atrofia, deposição escura nas células do aerênquima. Desorganização celular na região da hipoderme, presença de cristais nestas células, estas células também apresentaram-se com o lúmen maior, menos lignificado. Irregularidade na distribuição das células do epitelame.

Na FIG. 5.22 estão apresentadas as fotomicrografias das seções transversais das raízes para o tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$). Neste tratamento pôde ser observada a irregularidade da distribuição das células do epitelame, deposições nas células do aerênquima e na hipoderme as células apresentaram-se menos lignificada com o lúmen maior.

Na FIG. 5.23 estão apresentadas as fotomicrografias das seções transversais das raízes para o tratamento C3 ($\text{Cu} = 0,9 \text{ mg L}^{-1}$). Neste tratamento pôde ser observada a presença de pelos radiculares bifurcados e com intrusões, irregularidade da distribuição das células do epitelame e também na hipoderme as células apresentaram-se menos lignificada com o lúmen maior.

Na FIG. 5.24 estão apresentadas as fotomicrografias das seções transversais das raízes para o tratamento C4 ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como no tratamento C3, no tratamento C4 pôde ser observada a presença de pelos radiculares bifurcados, irregularidade da distribuição das células do epitelame, na hipoderme houve maior desorganização das células, e estas apresentaram-se menos lignificada.

Nos tratamentos com diferentes concentrações de Zn pôde ser observada, em microscopia óptica, poucas alterações nas estruturas celulares das raízes. Na ausência de Zn (FIG. 5.25) no meio de cultivo não ocorreu alterações. Nos tratamentos Z1 (FIG. 5.26) e Z2 (FIG. 5.27) houve a presença de algumas deposições nas células do aerênquima. Na FIG. 5.28 estão as fotomicrografias do tratamento Z3 ($\text{Zn} = 18 \text{ mg L}^{-1}$) e neste tratamento houve distribuição irregular nas células do epitelame e menos lignificação nas células da hipoderme, assim como no tratamento Z4 ($\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$) que podem ser observadas nas fotomicrografias da FIG. 5.29.

FIGURA 5.21. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento C1 ($\text{Cu} = 0,009 \text{ mg L}^{-1}$). Barras - 100 μm . Setas indicam a presença de deposições circulares de cor escura e deposições cristalinas.

FIGURA 5.22. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$). Barras - 100 μm ; Setas indicam a presença cristais na fotomicrografia superior e deposições escuras na fotomicrografia inferior.

FIGURA 5.23. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento C3 ($\text{Cu} = 0,9 \text{ mg L}^{-1}$). Barras - 100 μm ; Elipses indicam pelos radiculares bifurcados.

FIGURA 5.24. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento C4 ($\text{Cu} = 9 \text{ mg L}^{-1}$). Barras - 100 μm ; Círculos indicam a presença de pelos radiculares bifurcados.

FIGURA 5.25. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento Z0 (Zn = 0,0 mg L⁻¹). Barras - 100 µm. Círculo indica a presença de pelo radicular atrofiado.

FIGURA 5.26. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento Z1 ($\text{Zn} = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$). Ar – aerênquima; Ep - epitelame; M – medula; Pr – pelo radicular; V – velame; Barra - 100 μm .

FIGURA 5.27. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento Z2 ($\text{Zn} = 1,8 \text{ mg L}^{-1}$). Ar – aerênquima; Ep - epitelame; M – medula; Pr – pelo radicular; V – velame; Barras - 100 μm .

FIGURA 5.28. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*, tratamento Z3 ($\text{Zn} = 18 \text{ mg L}^{-1}$). Ar – aerênquima; Ep - epivelame; M – medula; Pr – pelo radicular; V – velame; Barras - 100 μm .

FIGURA 5.29. Fotomicrografias em vista transversal das raízes das plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro*, tratamento Z4 ($\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$). Ar – aerênquima; Ep - epivelame; M – medula; Pr – pelo radicular; V – velame; Barras - 100 μm ; Círculo indica a presença do desenvolvimento de raiz lateral.

5.5. Resultados das percentagens de perda de umidade da parte aérea e radicular obtidas nas secagens das amostras de plântulas

O crescimento das plantas é definido como aumento irreversível de seu volume. O maior componente de crescimento é a expansão celular governada pela pressão de turgor. Todavia, a altura é apenas um critério que pode ser usado para medir o crescimento. O crescimento pode ser medido, também em termos da variação de massa fresca, isto é, peso de tecido vivo, durante um determinado período. No entanto, a massa fresca da planta crescendo em um meio, flutua em resposta as alterações do *status* hídrico, de modo que o melhor critério é a medição da massa seca das plantas (Taiz e Zeiger, 2002).

Os dados da massa fresca e seca bem como a percentagem de perda de umidade das plântulas *A. blanchetiana*, estão apresentados nas TAB. 5.19 e 5.20, para os diferentes tratamentos de Cu, Zn.

As perdas de umidade das partes aéreas na secagem variaram de 82,6 a 87,5% para as amostras expostas ao elemento Cu e de 84,8 a 88,9% para o Zn. Já as perdas de umidade nas partes radiculares variaram 17,2 a 30,0% para as amostras expostas ao Cu e 11,8 e 72,9% para as amostras dos tratamentos do Zn.

TABELA 5.19. Massa fresca e seca da parte aérea e radicular, das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Cu e o T0.

Partes das plântulas	Tratamentos	Massa fresca (g) (n)	Massa seca (g)	Perda de umidade (%)
Aérea	C0	35,7 (46)	6,1	82,8
	C1	29,2 (38)	4,5	84,5
	C2	28,5 (36)	3,6	87,6
	C3	38,5 (40)	4,8	87,4
	C4	29,7 (30)	5,2	82,6
Radicular	C0	1,091 (46)	0,903	17,2
	C1	0,831 (38)	0,612	26,4
	C2	0,778 (36)	0,604	22,2
	C3	1,278 (40)	0,988	22,7
	C4	1,048 (30)	0,739	30,0

n – Número de plântulas; C0 - (Cu=0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹); T0 - (Cu = 0,006 mg L⁻¹).

TABELA 5.20. Massa fresca e seca da parte aérea e radicular das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em solução nutriente contendo diferentes concentrações de Zn.

Partes das plântulas	Tratamentos	Massa fresca (g) (n)	Massa seca (g)	Perda de umidade (%)
Aérea	Z0	33,6 (49)	5,3	84,4
	Z1	26,5 (38)	3,6	86,5
	Z2	48,2 (51)	5,4	88,9
	Z3	43,3 (45)	5,4	87,5
	Z4	42,4 (31)	6,2	85,5
Radicular	Z0	0,938 (49)	0,629	33,0
	Z1	0,754 (38)	0,665	11,8
	Z2	1,491 (51)	0,570	43,0
	Z3	2,102 (45)	0,851	72,9
	Z4	1,937 (31)	0,660	66,0

n – Número de plântulas; Z0 - ($\text{Zn}=0,0 \text{ mg L}^{-1}$); Z1 - ($\text{Zn} = 0,18 \text{ mg L}^{-1}$); Z2 - ($\text{Zn} = 1,8 \text{ mg L}^{-1}$); Z3 - ($\text{Zn} = 18 \text{ mg L}^{-1}$); Z4 - ($\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$).

As amostras das partes aéreas nos tratamentos C2, C3, Z2 e Z3 apresentaram as maiores perdas de umidade e estas amostras apresentaram os maiores comprimentos foliares. Estes resultados mostram que houve maior expansão das células foliares, e como consequência o crescimento das estruturas para as plântulas destes grupos nos tratamentos.

As maiores perdas de umidade das partes radiculares na secagem foram para as amostras dos tratamentos C1, C4, Z2, Z3 e Z4 indicando maior expansão das células radiculares. As amostras dos tratamentos C4 e Z3 são as que apresentaram os maiores diâmetros radiculares.

5.6. Resultados das análises pelo método de NAA

5.6.1. Resultados das análises dos materiais de referência certificados

No material de referência certificado SRM 1577b *Bovine Liver* por meio da irradiação curta foi feita a determinação do elemento Cu. A média e desvio padrão da concentração de Cu obtida em três determinações foi de $145,2 \pm 21,6 \mu\text{g g}^{-1}$, sendo o valor do certificado igual a $160 \pm 8 \mu\text{g g}^{-1}$ (NIST, 1991). Portanto houve boa concordância com o valor certificado com erro percentual igual a 9,3% e boa precisão com desvio padrão relativo de 14,9%.

Os resultados obtidos nos materiais de referência INCT-TL-1 *Tea Leaves* e NIST SRM 1547 *Peach Leaves* juntamente com os respectivos valores dos certificados estão apresentados na TAB. 5.21 e 5.22 respectivamente. Os resultados destas análises indicaram boa exatidão com porcentagens de erro relativo variando entre 0,5 a 14,6%. A precisão dos resultados destes materiais de referência foi avaliada por meio dos desvios padrão relativos (DPRs) os quais variaram entre 2,3 a 14,6%.

As concentrações dos elementos obtidos no material de referência INCT-TL-1 *Tea Leaves* e NIST SRM 1547 *Peach Leaves*, foram analisadas quanto a sua exatidão com base nos valores de *Z-score* ou diferença padronizada (Bode, 1996; IAEA, 2001). Os valores de *Z-score* obtidos para os resultados no material de referência INCT TL-1 *Tea Leaves* e NIST SRM 1547 *Peach Leaves* foram $|Z\text{-score}| < 2$ indicando que os dados obtidos estão dentro da faixa de valores do certificado a um nível de confiança de 95%.

Para se ter uma ideia da sensibilidade do método de NAA aplicado foram calculados os limites de detecção dos elementos presentes e cujos resultados estão apresentados nas TAB. 5.21 e 5.22 para os materiais de referência INCT TL-1 *Tea Leaves* e NIST 1547 *Peach Leaves*, respectivamente.

TABELA 5.21. Concentrações dos elementos no material certificado INCT-TL-1 *Tea Leaves*. Resultados na base seca do material, expresso em mg kg⁻¹ a menos que esteja indicado.

Elementos	Presente trabalho				Limite de detecção	Valores do certificado (INCT, 2002)
	M ± DP (n)	Er (%)	DPR (%)	Z-score		
Br	14,1 ± 1,3 (11)	14,6	9,2	1,1	0,03	12,3 ± 1,0
Ca (%)	0,56 ± 0,04 (13)	3,8	7,1	-0,3	0,02	0,582 ± 0,052
Co (µg kg ⁻¹)	409 ± 38 (12)	5,7	9,3	0,4	6,3	387 ± 42
Cr	1,92 ± 0,11 (15)	0,5	5,7	0,04	0,07	1,91 ± 0,22
Fe	553 ± 25 (16)	-(**)	4,5	-	4,0	*432
K (%)	1,79 ± 0,11 (14)	5,3	6,1	0,6	0,0014	1,70 ± 0,12
La	0,97 ± 0,05 (16)	3,0	5,1	-0,3	0,004	1,00 ± 0,07
Rb	83,2 ± 3,9 (16)	2,1	4,7	0,2	0,22	81,5 ± 6,5
Sc (µg kg ⁻¹)	254 ± 11 (15)	4,5	4,3	-0,5	0,7	266 ± 24
Zn	39,2 ± 0,9 (14)	12,9	2,3	1,6	0,2	34,7 ± 2,7

*Valor informativo; M – Média aritmética; DP – Desvio padrão; DPR – Desvio padrão relativo; Er – Erro relativo; n – Número de determinações; ** – Não determinado.

TABELA 5.22. Concentrações dos elementos no material certificado NIST SRM 1547 *Peach Leaves*. Resultados na base seca do material, expresso em mg kg^{-1} a menos que esteja indicado.

Elementos	Presente trabalho				Limite de detecção	Valores do certificado (NIST-2003)
	M $\pm$ DP (n)	Er (%)	DPR (%)	Z-score		
Br	13,8 $\pm$ 1,3 (12)	-(**)	9,4	-	0,05	*11
Ca (%)	1,51 $\pm$ 0,14 (11)	3,2	9,3	-0,3	0,04	1,56 $\pm$ 0,02
Co	0,076 $\pm$ 0,010 (8)	-	13,2	-	0,003	*0,07
Cr	1,61 $\pm$ 0,16 (12)	-	9,9	-	0,07	*1
Fe	220,7 $\pm$ 17,7 (13)	1,2	8,0	0,12	3,8	218 $\pm$ 14
K (%)	2,6 $\pm$ 0,2 (11)	7,0	7,7	0,8	0,006	2,43 $\pm$ 0,03
La	9,9 $\pm$ 0,7 (12)	-	7,1	-	8,6	*9
Rb	18,8 $\pm$ 1,3 (12)	4,6	6,9	-0,5	0,2	19,7 $\pm$ 1,2
Sc	0,045 $\pm$ 0,005 (13)	-	11,1	-	0,005	*0,04
Zn	20,5 $\pm$ 3,0 (12)	14,5	14,6	0,86	0,2	17,9 $\pm$ 0,4

*Valor informativo; M – Média aritmética; DP – Desvio padrão; DPR – Desvio padrão relativo; Er – Erro relativo; n – Número de determinações; ** – Não determinado.

5.6.2. Resultados das análises das amostras das partes aéreas e radiculares

Nas amostras das plântulas o Cu foi detectado, somente na mais alta concentração de exposição das plântulas. Como o fótópico do Cu não foi identificado nas outras amostras, utilizou-se o artifício de medir o padrão e a amostra juntos para identificação do pico. De posse da área sob o pico de ^{66}Cu (radiação de fundo background), calculou-se o limite de detecção que foi de $64,1 \mu\text{g g}^{-1}$.

O Cu não é um elemento favorável para sua determinação pela NAA pelas medidas das atividades do ^{64}Cu e ^{66}Cu devido às suas características nucleares bem como devido a interferência das altas atividades do ^{24}Na (com

meia vida de 14,96 h) que mascaram a atividades menos intensa para o ^{64}Cu com meia vida de 12,7 h e para o ^{66}Cu com meia vida de 5,10 min.

As determinações de Cu nas amostras de plântulas das parte aéreas estão previstas para serem efetuadas pela técnica de espectrometria de absorção atômica com chama pelo Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas “Prof^a. Dr^a. Leonia Aparecida de Lima” (Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, UNESP-Botucatu).

Os resultados das partes aéreas e radiculares das amostras submetidas aos tratamentos estão apresentados nas tabelas seguintes. Nestas tabelas estão apresentados os valores das concentrações dos elementos, os desvios padrão e os valores das incertezas nas amostras das plântulas expostas a diferentes concentrações de Cu ou Zn.

Foram determinadas as concentrações dos elementos Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, La, Rb, Sc, e Zn, para avaliar se a exposição ao meios contendo diferentes concentrações de Cu ou Zn afetaram na absorção dos elementos presentes nas amostras das partes aéreas.

5.6.2.1. Resultados para as amostras das plântulas expostas a diferentes concentrações de Cu

Nos resultados da TAB. 5.23 para as amostras das partes aéreas obtidas nos tratamentos com Cu, a concentração do Br apresentou um ligeiro aumento para as amostras do tratamento C0 e depois redução para as amostras no tratamento C4. Os resultados obtidos para as concentrações de Br não apresentaram diferenças significativas entre as amostras nos diferentes tratamentos. O Br é absorvido pelas plantas na forma de íon brometo e embora ele ocorra em todos os tecidos das plantas, ainda não é reconhecida sua essencialidade (Macêdo e Morril, 2008). Como o Br não foi adicionado ao preparo dos meios de cultivo utilizados nos experimentos, a presença deste elemento nas plântulas se deve das sementes utilizadas no seu cultivo ou das impurezas presentes nos compostos utilizados nos meios de cultivo.

TABELA 5.23. Médias das concentrações de elementos nas amostras das partes aéreas de *A. blanchetiana* da amostra T0 e amostras expostas a diferentes concentrações de Cu. Resultados na base seca do material expresso em mg kg⁻¹ a menos que esteja indicado.

Elementos	Tratamentos				
	C0	C1	C2	C3	C4
Br	0,6 ± 0,2 (3)a	0,5 ± 0,1 (4)a	0,44 ± 0,08 (3)a	0,6 ± 0,2 (3)a	0,39 ± 0,06 (3)a
Ca (%)	0,15 ± 0,04 (4)a	0,14 ± 0,03 (3)a	0,21 ± 0,06 (3)a	0,16 ± 0,03 (3)a	0,15 ± 0,02 (3)a
Co (µg kg ⁻¹)	233 ± 19 (4)a	260 ± 23 (4)a	256 ± 31 (3)a	261 ± 13 (3)a	245 ± 3 (3)a
Cr	0,14 ± 0,03 (3)a	0,11 ± 0,03 (3)ab	0,10 ± 0,04 (3)ab	0,08 ± 0,03 (3)b	0,16 ± 0,01 (3)c
Fe	255 ± 40 (3)a	253 ± 19 (4)a	253 ± 16 (3)a	286 ± 10 (3)a	248 ± 7 (3)a
K (%)	2,4 ± 0,9 (4)a	3,6 ± 0,2 (4)b	3,8 ± 0,4 (3)b	4,1 ± 0,2 (3)b	2,7 ± 0,2 (3)a
La (µg kg ⁻¹)	8,2 ± 5,8 (4)a	23 ± 4 (4)b	18 ± 4,6 (3)b	5,9 ± 1,2**†	11,0 ± 1,5**†
Rb	1,3 ± 0,2 (4)a	1,31 ± 0,05 (4)a	1,4 ± 0,1 (3)a	1,50 ± 0,04 (2)†	0,88 ± 0,05 (3)b
Sc (µg kg ⁻¹)	1,4 ± 0,6 (4)a	1,0 ± 0,2 (3)a	1,1 ± 0,2 (3)a	1,0 ± 0,4(2)†	-(*)
Zn	86 ± 14 (4)a	91,5 ± 5,3 (4)a	88,2 ± 6,5 (3)a	103,3 ± 7,1(3)a	70 ± 2 (3)a

M - Média aritmética; DP - Desvio padrão; DPR - Desvio padrão relativo; n – Número de determinações; **Valor individual ± incerteza. Incerteza calculada considerando erros nas contagens da amostra e padrão; - (*) Indica que o elemento não foi detectado; As médias com letras distintas, em linha indicam que há diferença entre si, pelo teste *t* (*p*<0,05); † - Indica que o valor não participou da ANOVA; T0 - (Cu = 0,006 mg L⁻¹); C0 - (Cu=0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹).

Para o Ca verifica-se que houve um ligeiro aumento na sua concentração para as amostras do tratamento C2. Os resultados das concentrações deste elemento não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O Ca é considerado um macronutriente essencial para a planta e desempenha funções de componente da membrana celular formando pontes entre os fosfatos e grupos carboxílicos dos fosfolipídios. Também é um elemento cofator de enzimas envolvidas na permeabilidade da membrana celular (Raven et al., 2001). Nas plântulas as concentrações de Ca não variaram e isto indica que o Cu não interferiu na regulação destas funções do Ca. Segundo Rodrigues et al., (1993), concentrações mais baixas de Ca no meio de cultivo em plantas de *Stylosanthes guyanensis* refletem em aumento expressivo de material seco relativa a expansão foliar, medida pela área foliar, apresentando folhas mais espessadas, inclusive com reservas de carboidratos. Já no caso das partes aéreas das plântulas de *A. blanchetiana* no tratamento C2 ($\text{Cu} = 0,09 \text{ mg L}^{-1}$) obteve-se maior concentração de Ca e menor massa seca por plântula, indicando maior translocação do elemento para a parte aérea.

Já para o elemento Co, as concentrações deste elemento foram na mesma ordem de grandeza, isto é, não houve diferenças significativas entre as concentrações de Co para os distintos tratamentos com Cu. Segundo Taiz e Zeiger (2002) o Co é um elemento não essencial às plantas, mas é um componente de várias enzimas em microrganismos fixadores de nitrogênio que se localizam nas raízes de várias plantas. Segundo Page e Feller (2005) o Co é um elemento de interesse em pesquisas, pois ele é absorvido e redistribuído para o sistema radicular das plantas, e depois translocado para o sistema aéreo e estes mecanismos de transporte para o sistema aéreo é muito lento e não estão bem elucidados.

As concentrações de Cr nas amostras das partes aéreas nos tratamentos com Cu indicaram um incremento na concentração deste elemento para as amostras do tratamento C4 em comparação ao C0 (Testemunha). As concentrações deste elemento entre os diferentes tratamentos apresentaram diferenças significativas. O Cr não apresenta essencialidade comprovada na nutrição mineral para as plantas, porém ele é requerido por microrganismos em alguns processos metabólicos específicos para fixação biológica de nitrogênio

(Castilhos et al., 2001). O Cr absorvido pelas plantas é acumulado nas raízes formando barreiras que diminuem a translocação para as partes aéreas (Castilhos et al., 2001).

Para o elemento Fe as concentrações deste elemento nas partes aéreas não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O Fe é componente das proteínas do grupo heme, como as catalases. Uma molécula desta enzima pode catalisar milhares de moléculas de peróxido de hidrogênio que é tóxico e está relacionado ao estresse oxidativo nas plantas (Taiz e Zeiger, 2002).

Nas determinações do elemento K as concentrações nas amostras aumentaram com o aumento da concentração de Cu e as concentrações apresentaram diferenças significativas. Houve aumento nas amostras do tratamento C3 e diminuição nas amostras do tratamento C4. O K é o principal cátion no estabelecimento do turgor celular e manutenção da eletroneutralidade (Taiz e Zeiger, 2002), e as diferentes concentrações de Cu utilizadas indicam a interferência na permeabilidade das membranas das células. A outra característica importante do K está no crescimento meristemático, na distribuição da água e na fotossíntese (Raven et al., 2001).

Para o elemento La ocorreu incremento nas concentrações deste elemento dependendo dos tratamentos do Cu. Houve diferenças significativas entre as amostras do tratamento C0 em relação as amostras dos tratamento C1 e C2. E este elemento não apresenta essencialidade nutricional para as plantas.

As concentrações do elemento Rb diminuíram entre as amostras dos tratamentos C0 e C4, entretanto entre as amostras dos tratamentos C0, C1, C2 e C3 as concentrações de Rb obtidas foram da mesma ordem de grandeza. A essencialidade biológica do Rb não é conhecida, mas é encontrado em minerais e solo junto com K. Na deficiência de K a planta absorve o Rb (Läuchi e Epstein, 1970).

Nas determinações do elemento Sc houve ligeira redução nas concentrações deste elemento entre as amostras dos tratamentos C0 e C1.

Já nas determinações das concentrações do Zn nas amostras das partes aéreas expostas a diferentes concentrações de Cu, houve ligeiro aumento no tratamento C3, no entanto não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos. O Zn é considerado um micronutriente essencial para o desenvolvimento das plantas, muitas enzimas requerem íons de Zn para suas atividades, e este elemento pode ser exigido para a síntese de clorofila (Taiz e Zeiger, 2002).

Na Tabela 5.24 estão apresentados os resultados das concentrações dos elementos para uma determinação nas amostras das partes radiculares das plântulas expostas a diferentes concentrações de Cu. As concentrações do Br apresentaram variações entre os tratamentos há ligeiro aumento para o tratamento C1 em comparação ao C0 (testemunha) e depois redução nas amostras do tratamento C2. Na análise exploratória dos valores das concentrações deste elemento entre os tratamentos C1 e C2 verifica-se que há diferenças.

Para o elemento Ca verifica-se uma pequena variação na sua concentração nas partes radiculares com o uso da exposição do Cu. Para as amostras dos tratamentos C2, C3 e C4 ocorreu diminuição 30% de Ca na parte radicular em comparação com as amostras do tratamento C0 (testemunha). As concentrações de Co nas partes radiculares apresentaram grande variação. Este elemento aumentou nas amostras dos tratamentos C1, C2 e C3 em comparação com o C0 e houve redução de 58% nas amostras do tratamento C4.

As concentrações do elemento Cr indicaram um incremento na concentração deste elemento de 45% para as amostras do tratamento C3 em comparação ao C0 e redução da concentração deste elemento nas amostras do tratamento C2. Para o Fe a concentração deste elemento nas partes radiculares aumenta em 34% para as amostras do tratamento C4.

Nas determinações do elemento K as concentrações nas amostras aumentaram até o tratamento C3 e diminuíram em 26% nas amostras do tratamento C4. Para o La ocorreu diminuição nas concentrações deste elemento dependendo dos tratamentos do Cu, variando de 35 a 67%. As concentrações do

Rb aumenta 20% entre as amostras dos tratamentos C0 e C1, entretanto entre as amostras dos tratamentos C0 e C4 as concentrações de Rb obtidas diminuíram em cerca de 20%.

Nas determinações do elemento Sc nas mostras das partes radiculares não houve variação das concentrações deste elemento, foram da mesma ordem de grandeza. Já nas determinações das concentrações do Zn nas partes radiculares houve aumento entre as amostras dos tratamentos C0 e C3 e redução no tratamento C4, altas concentrações de Cu podem inibir a absorção de Zn pelas raízes (Malavolta, 1980).

TABELA 5.24. Concentrações de elementos nas amostras da parte radicular de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* para amostra exposta a diferentes concentrações de Cu. Resultados na base seca do material expresso em mg kg⁻¹ a menos que esteja indicado.

Elementos	Tratamentos				
	C0	C1	C2	C3	C4
Br	0,65 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,51 ± 0,01
Ca (%)	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01
Co (µg kg ⁻¹)	1147 ± 21	1607 ± 30	1321 ± 24	1949 ± 36	662 ± 13
Cr	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,02	0,26 ± 0,01	0,60 ± 0,02	0,44 ± 0,02
Fe	447,8 ± 4,1	548,5 ± 4,7	428,0 ± 3,7	513,9 ± 4,4	603,7 ± 5,2
K (%)	1,20 ± 0,02	1,29 ± 0,02	1,30 ± 0,02	1,58 ± 0,03	0,91 ± 0,01
La (µg kg ⁻¹)	90,5 ± 1,8	58,4 ± 1,8	56,9 ± 1,7	30,1 ± 1,5	38,0 ± 2,1
Rb	0,54 ± 0,06	0,65 ± 0,06	0,57 ± 0,05	0,62 ± 0,07	0,48 ± 0,05
Sc (µg kg ⁻¹)	3,3 ± 0,2	4,0 ± 0,2	3,4 ± 0,2	4,0 ± 0,3	3,8 ± 0,2
Zn	198,6 ± 1,3	253,7 ± 1,3	224,2 ± 1,2	349,5 ± 1,8	102,2 ± 0,6

Valores individuais ± incerteza. C0 - (Cu=0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹).

5.6.2.2. Resultados para as amostras das plântulas expostas a diferentes concentrações de Zn

Nos resultados da TAB. 5.25 para as amostras das partes aéreas obtidas nos tratamentos com Zn, a concentração do Br diminuiu dependendo da concentração de Zn acrescidas ao meios de cultivo. No entanto para as amostras do tratamento Z1 houve aumento da concentração de Br. Nas análises estatísticas dos valores das concentrações deste elemento entre os tratamentos verifica-se que houve diferenças significativas. Um elemento convencionalmente definido como tóxico como o Br poderá deixar de sê-lo se sua concentração no meio for suficientemente baixa e não ser prejudicial à vida da planta. Os teores de Br encontrado nas plantas podem variar de 0 a 300 ppm (Malavolta, 1980) e os valores das concentrações verificadas nos tratamentos deste elemento nas plântulas estão dentro desta faixa.

Para o Ca verifica-se que não houve variação na sua concentração com o uso das diferentes concentrações de Zn.

Para o Co, as concentrações deste elemento variaram entre os tratamentos e verifica-se diferenças significativas nas concentrações deste elemento entre os tratamentos.

As concentrações de Cr das partes aéreas nos tratamentos com Zn indicaram um incremento na concentração deste elemento de 20% para o tratamento Z1 em comparação ao Z0 (testemunha). Já para as amostras do tratamento Z4 houve redução da concentração deste elemento em quase 150%, apresentando diferenças significativas. Segundo Malavolta (1980), as plantas em solução nutritiva absorvem e transportam o Cr, de modo que os teores deste elemento no material seco está em geral na faixa de 0,02-1 ppm, sendo verificado nas amostras das partes aéreas, nos tratamentos com Zn, que estas concentrações estão dentro da faixa sugerida.

Para o Fe a concentração deste elemento nas partes aéreas não apresentaram diferenças significativas apesar da ocorrência de uma ligeira diminuição em torno de 15% para o tratamento Z4 e ligeiro aumento para o

TABELA 5.25. Médias das concentrações de elementos nas amostras das partes aéreas de *A. blanchetiana* expostas a diferentes concentrações de Zn. Resultados na base seca do material expresso em mg kg⁻¹ a menos que esteja indicado.

Elementos	Tratamentos				
	Z0	Z1	Z2	Z3	Z4
Br	0,47 ± 0,03(3)a	0,50 ± 0,10(3)a	0,38 ± 0,11(3)a	0,33 ± 0,09(3)b	0,33 ± 0,06(4)b
Ca (%)	0,17 ± 0,03(3)a	0,17 ± 0,01(3)a	0,17 ± 0,05(3)a	0,18 ± 0,03(3)a	0,19 ± 0,05(4)a
Co (µg kg ⁻¹)	422 ± 30(3)a	267 ± 51(3)bc	257 ± 58(3)bc	298 ± 13(3)b	220 ± 19(4)c
Cr	0,36 ± 0,02(3)a	0,43 ± 0,02(3)a	0,12 ± 0,04(2)†	0,17 ± 0,04(3)bc	0,16 ± 0,02(4)c
Fe	264,5 ± 13,2(3)a	272,6 ± 15,3(3)a	255,9 ± 12,6(3)a	274,6 ± 33,2(3)a	240,3 ± 31,6(4)a
K (%)	3,25 ± 0,11(3)a	3,39 ± 0,07(3)a	4,0 ± 0,2(3)bc	3,2 ± 0,2(3)a	3,4 ± 0,3(4)ac
La (µg kg ⁻¹)	22,7 ± 5,7(2)†	27,8 ± 7,1(3)a	15,2 ± 1,3*†	11,1 ± 1,3*†	16,9 ± 5,0(3)a
Rb	1,13 ± 0,09(3)a	1,32 ± 0,02(3)b	1,44 ± 0,06(3)b	1,3 ± 0,2(3)b	1,4 ± 0,1(4)b
Sc (µg kg ⁻¹)	1,2 ± 0,2(3)a	1,0 ± 0,2(3)a	1,4 ± 0,2*†	1,0 ± 0,5(3)a	1,0 ± 0,3(3)a
Zn	13,9 ± 0,6(3)a	26,0 ± 0,9(3)b	54,9 ± 1,8(3)c	87,1 ± 13,5(3)d	209,6 ± 28,5(4)e

*Valor individual ± incerteza. Incerteza calculada considerando erros nas contagens da amostra e padrão; As médias com letras distintas, em linha indicam que há diferença entre si, pelo teste *t* (*p*<0,05); † - Indica que o valor não participou da ANOVA; Z0 - (Zn=0,0 mg L⁻¹); Z1 - (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 - (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 - (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 - (Zn = 180 mg L⁻¹).

tratamento Z3. Altas concentrações de P, Cu, Mn ou Zn interferem na absorção de Fe pela plantas (Malavolta, 1980), fato este verificado para a alta concentração de Zn, no tratamento Z4 ($\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$) aplicada no meio de cultivo das plântulas de *A. blanchetiana*.

Nas determinações de K, as suas concentrações nas partes aéreas aumentaram com o aumento da concentração de Zn no tratamento Z2 e houve ligeira diminuição nas amostras do tratamento Z3. Nas análises estatísticas destes resultados verifica que não há diferenças entre os tratamentos do Zn.

Para o La ocorreu incremento na concentração deste elemento para o tratamento Z1 e diminuição para o tratamento Z3.

As concentrações do Rb aumentaram para os tratamentos Z2 e Z4, pode ser observado que houve diferenças significativas entre as amostras do tratamento Z0 e os outros tratamentos.

Nas determinações do elemento Sc não houve diferenças significativas entre os tratamentos.

Já nas determinações do Zn nas partes aéreas houve aumento crescente das concentrações deste elemento entre os tratamentos com o aumento das suas concentrações no meio de cultivo. Nas análises estatísticas dos dados houve diferenças entre os valores destas concentrações entre os tratamentos dependentes das concentrações de Zn acrescida nos meios de cultivo.

Na Tabela 5.26 estão apresentados os resultados das concentrações dos elementos nas amostras das partes radiculares das plântulas expostas a diferentes concentrações de Zn. As concentrações do Br apresentaram nas raízes diferenças entre os tratamentos. Ocorreu aumento da concentração para o tratamento Z0 (testemunha) e uma redução nos demais tratamentos. A menor concentração de Br verificada foi para o tratamento Z2. Na análise exploratória dos valores das concentrações obtidas para este elemento verifica-se que entre os tratamentos não há diferenças.

TABELA 5.26. Concentrações de elementos da parte radicular da *A. blanchetiana* exposta a diferentes concentrações de Zn. Resultados na base seca do material expresso em mg kg⁻¹ a menos que esteja indicado.

Elementos	Tratamentos				
	Z0	Z1	Z2	Z3	Z4
Br	0,90 ± 0,01	0,72 ± 0,02	0,48 ± 0,01	0,72 ± 0,02	0,56 ± 0,02
Ca (%)	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,20 ± 0,01	0,19 ± 0,02	0,26 ± 0,01
Co (µg kg ⁻¹)	964 ± 18	1051 ± 22	1025 ± 21	1326 ± 27	1195 ± 25
Cr	0,27 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,22 ± 0,03
Fe	637 ± 5	642 ± 6	470 ± 5	588 ± 6	398 ± 4
K (%)	1,19 ± 0,02	1,14 ± 0,01	1,42 ± 0,01	1,80 ± 0,01	1,01 ± 0,01
La (µg kg ⁻¹)	51,0 ± 1,5	12,5 ± 2,1	22,5 ± 1,9	15,1 ± 2,0	21,2 ± 1,8
Rb	0,77 ± 0,05	0,65 ± 0,06	0,75 ± 0,06	- (*)	0,17 ± 0,06
Sc (µg kg ⁻¹)	4,5 ± 0,2	4,0 ± 0,2	3,7 ± 0,2	4,1 ± 0,3	5,1 ± 0,4
Zn	42,0 ± 0,7	44,3 ± 0,4	78,8 ± 0,5	199,7 ± 1,3	896,4 ± 5,5

Valores individuais ± incerteza. Incerteza calculada considerando erros nas contagens da amostra e padrão; - (*) Indica que o elemento não foi detectado; Z0 - (Zn = 0,0 mg L⁻¹); Z1 - (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 - (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 - (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 - (Zn = 180 mg L⁻¹).

Para o Ca verifica-se que houve variação na sua concentração nas partes radiculares com o uso da exposição do Zn. Para o tratamento Z1 ocorreu diminuição de Ca na parte radicular em comparação com o tratamento Z0 (testemunha) e aumentou para o Z4.

As concentrações de Co nas partes radiculares apresentaram grande variação. Este elemento aumentou nos tratamentos Z1, Z2, Z3 e Z4 em comparação com o Z0. As concentrações de Cr indicaram uma redução na concentração deste elemento para os tratamentos Z1, Z2, Z3 e Z4 em comparação com o Z0.

Nas determinações de K as concentrações destas amostras aumentaram para o tratamento Z3 e diminuem para os demais tratamentos. Para o La ocorreu diminuição nas concentrações deste elemento dependendo dos tratamentos do Zn. As concentrações do Rb diminuíram entre os tratamentos Z0 e Z1.

Nas determinações do Sc houve variação entre as concentrações deste elemento. A menor concentração deste elemento foi verificada para o tratamento Z2 e a maior para o tratamento Z4.

Já nas determinações das concentrações do Zn nas partes radiculares ocorreu aumento da concentração deste elemento com o aumento da concentração nos meios de cultivo, apresentando diferenças.

O acúmulo do metal Zn nas partes aéreas e radiculares das plântulas aumentou significativamente, com o aumento das concentrações crescentes de Zn no meio de cultivo. O aumento das concentrações de Zn com a concentração do elemento no meio de cultivo indica a *A. blanchetiana* como acumuladora do metal Zn.

5.7. Resultados dos índices de translocação dos elementos

O conteúdo total ou massa do elemento na parte aérea (PA) e radicular (R) foi calculado usando a concentração do elemento obtido nas análises e as massas das partes aéreas e radiculares por plântula. Calculou-se o índice de translocação utilizando a relação 4.10.

Os resultados das massas dos elementos por plântula nas partes aéreas e radiculares estão apresentados nas TAB. 5.27 e 5.28 para as diferentes concentrações de Cu e Zn, respectivamente. Na TAB. 5.29 estão os resultados dos índices de translocação.

Nas amostras das partes aéreas para as diferentes concentrações de Cu (TAB. 5.27) foi verificada variação entre as massas do Br por plântula, verifica-se que nas amostras das partes aéreas ocorreu decréscimo de 52% para as amostras do tratamento C2 em comparação com as amostras do tratamento C0 (testemunha), estes resultados não apresentaram diferenças significativas. Nas amostras das partes radiculares a massa deste elemento no tratamento C2 apresentou a menor massa. Podem ser observados na TAB. 5.29 ligeira variações dos IT para o elemento Br nas amostras expostas a diferentes concentrações de Cu, o maior índice para as amostras do tratamento C0 e o menor IT para as amostras do tratamento C3 e não apresentaram diferenças significativas.

Nas amostras das partes aéreas ocorreu o incremento das massas do Ca por plântula para os tratamentos C2 e C4. No entanto verifica-se que nas partes radiculares ocorreram diminuições das massas deste elemento para todos os tratamentos em comparação com o C0. Os IT do Ca para as partes aéreas das plântulas aumentaram para as amostras dos tratamentos C2 e C4 em comparação ao tratamento C0, o maior índice para este elemento foi na concentração de Cu = 9 mg L⁻¹.

A massa do elemento Co aumentou para as amostras das partes aéreas no tratamento C4, bem como nas amostras das partes radiculares para o tratamento C3. Pode-se inferir que a mais alta concentração de Cu (9 mg L⁻¹)

FIGURA 5.27. Médias das massas dos elementos nas amostras das partes aéreas e radiculares das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de Cu.

Partes das plântulas	Trata- mentos	Massa dos elementos em µg/plântula (a menos que indicado)									
		Br**	Ca	Co**	Cr**	Fe	K	La**	Rb	Sc**	Zn
		M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Aéreas	C0	83,7 ± 30,4a	203 ± 51,4a	31,1 ± 2,5a	16,5 ± 4,8a	36,2 ± 6,0a	3236 ± 122a	1,1 ± 0,19a	0,18 ± 0,02a	0,18 ± 0,01a	11,5 ± 1,9a
	C1	65,8 ± 13,1a	179 ± 38,6a	30,0 ± 2,8a	11,6 ± 3,9ab	30,1 ± 2,2b	4230 ± 214a	2,9 ± 0,5b	0,16 ± 0,02ab	0,11 ± 0,02a	10,9 ± 0,6a
	C2	43,6 ± 7,9a	208,3 ± 55,5a	25,8 ± 2,6b	10,2 ± 3,7b	25,1 ± 1,6b	3749 ± 407a	1,8 ± 0,4c	0,14 ± 0,02b	0,10 ± 0,01a	8,7 ± 0,6b
	C3	67,5 ± 26,8a	187,6 ± 33,7a	31,6 ± 1,6a	10,1 ± 3,0b	34,6 ± 1,2a	4938 ± 253b	0,7 ± 0,1†	0,18 ± 0,03†	0,12 ± 0,02†	12,5 ± 0,9†
	C4	67,3 ± 10,3a	264,6 ± 40,3a	42,2 ± 0,6c	28,1 ± 1,0c	42,7 ± 1,2c	4648 ± 96b	1,9 ± 0,3†	0,15 ± 0,03ab	- (*)	12,1 ± 2,0a
Radiculares	C0	12,7 ± 3,3	4,1 ± 0,9	22,5 ± 1,8	7,6 ± 0,7	8,8 ± 2,1	23,5 ± 2,8	1,8 ± 0,4	0,011 ± 0,009	0,06 ± 0,01	3,9 ± 0,7
	C1	12,0 ± 2,6	3,2 ± 0,8	25,9 ± 1,7	6,1 ± 0,8	8,8 ± 1,7	20,8 ± 2,4	1,0 ± 0,1	0,011 ± 0,009	0,070 ± 0,005	4,1 ± 0,5
	C2	7,9 ± 2,5	2,8 ± 0,1	22,5 ± 1,2	4,4 ± 0,6	7,3 ± 1,2	22,1 ± 20,0	1,0 ± 0,1	0,010 ± 0,006	0,036 ± 0,006	3,8 ± 0,5
	C3	15,2 ± 3,5	4,0 ± 0,1	48,2 ± 1,7	14,8 ± 0,7	12,7 ± 1,9	39,0 ± 2,6	0,7 ± 0,4	0,015 ± 0,001	0,084 ± 0,002	1,6 ± 0,8
	C4	12,6 ± 1,8	4,1 ± 0,1	16,3 ± 1,2	10,8 ± 0,8	14,9 ± 1,3	22,4 ± 1,4	0,9 ± 0,6	0,012 ± 0,004	0,075 ± 0,002	0,42 ± 0,03

M – média; DP = desvio padrão; ** Indica a massa do elemento em ng/plântula; - (*) Indica que o elemento não foi determinado; As médias com letras distintas, em linha indicam que há diferença entre si, pelo teste *t* ($p < 0,05$); † - Indica que o valor não participou da ANOVA; C0 - (Cu=0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹).

acrescida ao meio de cultivo induz a translocação do Co para a parte aérea das plântulas, pois este tratamento apresentou o maior IT apresentando diferenças significativas.

Nas análises das amostras das partes aéreas e radiculares verificou-se que a massa do Cr por plântula aumentou no tratamento C4, para a mais alta concentração de Cu aplicada no meio de cultivo, e também verificou-se para este tratamento o maior IT para o Cr.

O Fe teve sua massa por plântula, reduzida no tratamento C2 das amostras das partes aéreas e radiculares. Nas amostras do tratamento C4 apresentaram incremento de 21 e 69% para as amostras das partes aéreas e radiculares por plântula, respectivamente, em comparação com o C0. Estes resultados indicaram que nas mais altas concentrações de Cu, o Fe ficou mais restrito no sistema radicular das plântulas. Pode-se verificar que nas mais altas concentrações houve ligeira diminuição nos IT, indicando que o Cu no meio de cultivo interferiu na translocação de Fe para as partes aéreas das plântulas. Os resultados das análises apresentaram diferenças significativas.

As massas do K aumentaram nas amostras das partes aéreas para todos os tratamentos sendo as amostras dos tratamentos C3 e C4 que apresentaram diferenças significativas, no entanto nas partes radiculares houve redução da massa deste elemento, exceto para as amostras das partes radiculares para o tratamento C3 que aumentou. Pode ser verificado nas análises estatísticas (TAB 5.29) que grande parte do K absorvido pelo sistema radicular das plântulas é translocado para as partes aéreas, sendo o menor IT para as amostras do tratamento C3.

Ocorreu uma variação nas massas do La nas amostras das partes aéreas, verifica-se que há diferenças entre os valores variando entre os tratamentos. No entanto para as amostras das partes radiculares houve um decréscimo das massas deste elemento em todos os tratamentos. Os IT deste elemento aumentaram em todas as amostras em comparação ao índice do tratamento C0, sendo o maior valor verificado nas amostras do tratamento C1.

Ocorreu variações nas massas do elemento Rb tanto nas amostras das partes aéreas como radiculares. Os IT deste elemento diminuíram em comparação com os índices das amostras do tratamento C0.

Para as amostras das partes aéreas, as massas do Sc reduziram em média 36% entre os tratamentos. Já para as amostras das partes radiculares houve variações, verifica-se que o maior valor de massa do Sc foi para o tratamento C3. E os IT deste elemento diminuíram em comparação com os índices das amostras do tratamento C0, sendo o menor valor de translocação para as amostra do tratamento C4.

Nas massas do elemento Zn para as amostras das partes aéreas e radiculares, verifica-se ligeiro decréscimo da massa deste elemento para as amostras do tratamento C2. No entanto para as massas deste elemento nas amostras das partes radiculares os tratamentos C3 e C4 apresentaram os menores valores de massa para o Zn. Podendo assim inferir que as diferentes concentrações de Cu interferiram na absorção e translocação do Zn nas plântulas cultivadas *in vitro*, sendo o menor valor de translocação observado para as amostras do tratamento C3 e os maiores valor para as amostras do tratamento C4.

Nas amostras das partes aéreas e radiculares nas plântulas expostas a diferentes concentrações de Zn (TAB. 5.28) houve variação nas massas do Br diminuindo em todas as amostras dos tratamentos com Zn, exceto para o tratamento Z4. Já os IT deste elemento seguiram em aumento linear, sendo o menor valor para as amostras do tratamento Z1 e o maior para o tratamento Z4 (TAB. 5.29).

As massas de Ca por plântula nas amostras das partes aéreas e radiculares expostas a diferentes concentrações de Zn variaram entre os tratamentos. No entanto, nas amostras do tratamento Z4 foram as que apresentaram maiores valores de massa de Ca por plântula. Estes resultados indicam que ocorreu maior absorção deste elemento pelas plântulas na mais alta concentração de Zn (180 mg L^{-1}) no meio de cultivo. Este aumento na massa de Ca pode ser relacionado com regulação metabólica, pois o cálcio atua como

FIGURA 5.28. Média das massas dos elementos nas amostras das partes aéreas e radiculares das plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro* em meios de cultivo contendo diferentes concentrações de Zn.

Partes das plântulas	Tratamentos	Massa dos elementos em µg/plântula (a menos que indicado)									
		Br**	Ca	Co**	Cr**	Fe	K	La**	Rb	Sc**	Zn
		M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
Aéreas	Z0	54,0 ± 3,0a	189 ± 36a	48,5 ± 0,3a	41,8 ± 1,8a	30,4 ± 1,5ab	3736 ± 130a	2,6 ± 0,7†	0,13 ± 0,01a	0,14 ± 0,02a	1,6 ± 0,1a
	Z1	47,2 ± 9,9ab	161 ± 10a	25,2 ± 0,5b	30,8 ± 2,2a	25,7 ± 1,4a	3192 ± 64a	2,6 ± 0,7a	0,13 ± 0,01a	0,09 ± 0,02a	2,5 ± 0,1a
	Z2	39,6 ± 11,3a	180 ± 51a	27,0 ± 6,1b	12,1 ± 3,7†	26,9 ± 1,3ab	4189 ± 440b	1,6 ± 0,4†	0,15 ± 0,01a	0,15 ± 0,04†	5,8 ± 0,2a
	Z3	39,7 ± 10,7a	217 ± 32a	36,0 ± 1,6c	20,4 ± 4,9b	33,0 ± 3,9b	3801 ± 224b	1,3 ± 0,1†	0,16 ± 0,01a	0,12 ± 0,05a	10,5 ± 1,6b
	Z4	65,4 ± 11,7c	375 ± 96b	43,6 ± 3,9a	32,2 ± 4,1ac	47,6 ± 6,3c	6735 ± 574c	3,4 ± 1,0a	0,28 ± 0,03a	0,21 ± 0,05a	41,6 ± 5,6c
Radiculares	Z0	11,6 ± 1,7	2,1 ± 0,5	12,4 ± 1,6	3,5 ± 1,3	8,1 ± 0,9	15,3 ± 1,2	0,65 ± 0,08	0,010 ± 0,004	0,058 ± 0,004	0,54 ± 0,05
	Z1	12,6 ± 3,3	1,8 ± 0,1	18,4 ± 2,7	3,9 ± 2,8	11,2 ± 1,9	19,9 ± 2,2	0,21 ± 0,01	0,011 ± 0,009	0,070 ± 0,007	0,8 ± 0,2
	Z2	8,0 ± 2,6	3,3 ± 0,1	17,1 ± 2,7	3,00 ± 0,08	7,8 ± 1,8	23,7 ± 2,7	0,41 ± 0,01	0,013 ± 0,009	0,062 ± 0,009	1,3 ± 0,4
	Z3	9,1 ± 1,1	2,4 ± 0,6	16,8 ± 1,2	1,65 ± 0,05	7,4 ± 1,1	22,8 ± 1,1	0,19 ± 0,03	-	0,052 ± 0,003	2,5 ± 0,3
	Z4	11,9 ± 1,3	5,5 ± 0,7	25,4 ± 0,9	4,68 ± 0,06	8,5 ± 1,4	21,5 ± 1,3	0,45 ± 0,06	-	0,108 ± 0,004	19,1 ± 1,2

M – Média; DP = Desvio padrão; ** Indica a massa do elemento em ng/plântula; - (*) Indica que o elemento não foi determinado; As médias com letras distintas, em linha indicam que há diferença entre si, pelo teste *t* ($p < 0,05$); † - Indica que o valor não participou da ANOVA; Z0 - (Zn = 0,0 mg L⁻¹); Z1 - (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 - (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 - (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 - (Zn = 180 mg L⁻¹).

mensageiro e também requerido pelas plantas como cofator de enzimas envolvidas no controle osmótico (Taiz e Zeiger, 2002), também se pode sugerir que o Ca e Zn compartilham o mesmo mecanismo de transporte (Stoyanova e Doncheva, 2002). Os IT para o Ca diminuíram (TAB. 5.29), portanto houve interferência do Zn na translocação de Ca para as partes aéreas das plântulas. Segundo Malavolta (1980), a maior parte do Ca absorvido pela planta é transportada no xilema, embora possa fazê-lo pelo floema. O movimento ascendente se dá por meio de reações de trocas em vasos condutores. O Ca^{+2} é deslocado dos sítios de trocas por outros cátions Mg, Mn e Zn. Depois de localizado na folha o Ca se torna muito imóvel e somente pode ser redistribuído em condições especiais. Podemos assim inferir que as diferentes concentrações de Zn interferiram na translocação do Ca para a parte aérea.

Nas amostras das partes aéreas e radiculares as massas do Co variaram entre os tratamentos com Zn. Ocorreu aumento linear nas massas deste elemento sendo para as amostras do tratamento Z4 que apresentaram maiores valores de massas indicando que a mais alta concentração de $\text{Zn} = 180 \text{ mg L}^{-1}$ induz a maior absorção de Co pelas plântulas em cultivo *in vitro*. Por outro lado, a translocação deste elemento diminuiu com o aumento das concentrações de Zn aplicado em todos os tratamentos.

As massas do Cr por plântula nas amostras das partes aéreas e radiculares apresentaram variações e nas amostras do tratamento Z2 este elemento apresentou sua menor massa. Os IT tiveram ligeira diminuição nas amostras com o aumento das concentrações de Zn .

Para as massas do Fe por plântula nas amostras das partes aéreas aumentaram nos tratamentos Z3 e Z4 e nas amostras das partes radiculares a massa deste elemento aumentou para o tratamento Z1. As diferentes concentrações de Zn aplicadas nos meios de cultivos das plântulas proporcionaram o aumento dos IT do Fe para as partes aéreas, verifica-se um aumento linear da translocação. O menor índice foi observado para as amostras do Z1 e o maior índice para as amostras do tratamento Z4.

Tabela 5.29. Índices de translocação dos elementos Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, La, Rb, Sc e Zn em plântulas de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* em resposta a diferentes concentrações de Cu e Zn.

Tratamentos	Índice de translocação dos elementos (%)									
	Br	Ca	Co	Cr	Fe	K	La	Rb	Sc	Zn
	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP	M ± DP
C0	86,2 ± 4,4a	82,6 ± 3,6a	57,9 ± 2,1a	80,2 ± 2,9a	80,2 ± 2,4a	92,6 ± 2,3a	34,6 ± 17,7a	94,3 ± 0,8a	70,2 ± 1,6a	74,3 ± 3,4a
C1	84,2 ± 2,9a	83,7 ± 2,8a	54,4 ± 2,3b	64,1 ± 8,3a	77,3 ± 1,3b	95,3 ± 0,2b	75,0 ± 3,6b	93,7 ± 0,3ab	61,2 ± 4,6a	72,7 ± 1,1ab
C2	84,3 ± 2,6a	88,0 ± 2,6a	53,6 ± 2,5b	68,2 ± 9,5a	77,5 ± 1,1ab	94,5 ± 0,6ab	64,2 ± 6,5b	93,3 ± 0,6bc	74,1 ± 2,8a	69,6 ± 1,6b
C3	80,3 ± 6,4a	82,1 ± 2,5a	39,6 ± 1,2c	40,0 ± 7,2b	73,2 ± 0,7c	92,7 ± 3,5a	90,6 ± 2,9†	92,4 ± 2,9†	57,7 ± 9,1†	59,2 ± 2,6†
C4	84,1 ± 1,9a	86,5 ± 1,8a	96,3 ± 0,1d	72,2 ± 0,7a	74,2 ± 0,5c	95,3 ± 0,1b	95,3 ± 2,4†	92,8 ± 4,9c	- (*)	82,7 ± 0,4c
Z0	82,4 ± 0,8a	90,3 ± 1,9a	79,7 ± 1,1a	92,4 ± 0,3a	78,8 ± 0,8a	96,0 ± 0,1a	80 ± 9†	92,9 ± 0,5a	69,9 ± 3,3a	74,8 ± 0,8a
Z1	78,9 ± 3,5a	89,7 ± 0,6a	57,5 ± 4,5b	91,0 ± 0,5a	69,6 ± 1,2b	94,1 ± 0,1b	92,0 ± 1,8a	91,6 ± 0,4b	57,4 ± 5,7b	76,0 ± 0,6a
Z2	82,7 ± 3,8a	83,9 ± 3,4b	61,0 ± 5,9b	79,5 ± 5,0†	77,4 ± 1,7a	94,6 ± 0,5b	81,0 ± 6,8†	92,3 ± 0,3a	70,8 ± 3,3†	81,4 ± 0,5b
Z3	80,7 ± 3,9a	89,8 ± 1,3a	68,1 ± 1,0c	(-)	81,6 ± 1,7c	94,3 ± 0,3b	87,5 ± 3,9†	-	68,2 ± 9,6a	80,6 ± 3,3b
Z4	84,4 ± 2,4a	86,6 ± 3,0a	63,1 ± 2,1bc	87,2 ± 1,4	84,9 ± 1,6d	96,9 ± 0,3c	87,5 ± 3,7a	-	64,7 ± 5,4a	68,5 ± 2,9c

M – Média; DP - Desvio padrão; -(*) Indica que o elemento não foi determinado; As médias com letras distintas, em linha indicam que há diferença entre si, pelo teste *t* ($p < 0,05$); † - Indica que o valor não participou da ANOVA; C0 - (Cu = 0,0 mg L⁻¹); C1 - (Cu = 0,009 mg L⁻¹); C2 - (Cu = 0,09 mg L⁻¹); C3 - (Cu = 0,9 mg L⁻¹); C4 - (Cu = 9 mg L⁻¹); Z0 - (Zn = 0,0 mg L⁻¹); Z1 - (Zn = 0,18 mg L⁻¹); Z2 - (Zn = 1,8 mg L⁻¹); Z3 - (Zn = 18 mg L⁻¹); Z4 - (Zn = 180 mg L⁻¹).

As massa do K nas amostras das partes aéreas teve seu maior valor para o tratamento Z4 e verificou-se que houve diferenças entre os tratamentos para as massas deste elemento. Nas amostras das partes radiculares o tratamento Z2 foi o que apresentou maior valor de massa de K. O IT para o K aumentou para as amostras do tratamento Z4 e diminuiu para as dos demais tratamentos.

Já nas massas do elementos La e Rb nas amostras das partes aéreas e radiculares apresentaram diferenças nos valores das massas, assim com nos valores de IT destes elementos e em algumas amostras estes elementos não foram detectados.

Nas amostras das partes aéreas a massa por plântula do Sc aumentou para o tratamento Z4 e os seus IT variaram entre os tratamentos.

Nas amostras das partes aéreas e radiculares houve o aumento das massas de Zn dependendo das concentrações de Zn utilizado na exposição das plântulas de cultivo *in vitro*. Estes resultados indicaram que com o aumento das doses crescentes de Zn nos meios de cultivo, mais altas foram as massas deste elemento nas partes aéreas e radiculares. O Zn é um não-redox-ativo, mas tem um papel estrutural e/ou catalítico em muitas proteínas e enzimas incluindo nitrato redutase e nitrogenase (Taiz e Zeiger, 2002). O acúmulo do Zn ocorreu nas partes aéreas e radiculares das plântulas após o período de 16 semanas, aumentando significativamente. Resultados similares foram feitas por Samantaray *et al.*, (1999) em explantes de *Setaria itálica* L em cultura *in vitro*. Os IT do Zn variaram entre os tratamentos para a parte aérea. Pode ser observado os índices começam a decair a partir do tratamento Z2 indicando que com o aumento da concentração de Zn no meio de cultivo menor é a translocação deste elemento para as partes aéreas.

6. CONCLUSÕES

Na monitoração das plântulas de *A. blanchetiana* durante a exposição foi verificado que os principais sintomas dos efeitos do Cu e Zn nas folhas foram a clorose, necrose, e as plântulas mostraram-se tolerantes, uma vez que a partir da 1ª semana de exposição ocorreu o desenvolvimento de novas raízes.

Os resultados das análises morfométricas das folhas e raízes das plântulas, indicaram que os parâmetros avaliados apresentaram em menor ou maior grau o efeito dos elementos Cu ou Zn. As mais altas concentrações de Cu utilizadas nos tratamentos foram as que causaram maiores variações nos parâmetros analisados. Isto se deve provavelmente a interferência do elemento no desenvolvimento e crescimento das estruturas. Já para o caso da exposição ao Zn as plântulas não apresentaram alterações na maioria dos parâmetros analisados, indicando grau de tolerância da espécie estudada às diferentes concentrações deste elemento.

Nas análises anatômicas das folhas e raízes foram verificadas em microscopia óptica, alterações nas estruturas celulares indicando que as concentrações crescentes dos elementos Cu e Zn causaram efeitos nestas estruturas, apesar das folhas estudadas não apresentarem qualquer tipo de alteração a olho nu. Houve o aparecimento de cristais nas folhas e raízes, aumento e diminuição da lignificação das células radiculares, atrofia dos pelos radiculares, alteração no contorno das células do parênquima clorofiliano, grande deposição de grânulos. Para o caso do Zn, os efeitos nas estruturas celulares não foram tão significativos, indicando que o Cu é mais tóxico para o desenvolvimento das estruturas analisadas.

Os resultados obtidos permitiram concluir que a NAA é uma técnica altamente sensível e seletiva para determinação de elementos em ampla faixa de concentrações dependendo do elemento. O elemento Cu foi detectado, somente na mais alta concentração de exposição das plântulas, por meio das irradiação longa de 16 h no reator nuclear e não foi detectado nas demais concentrações,

devido às suas características nucleares para ativar bem como devido a interferência das altas atividades do ^{24}Na (com meia vida de 14,96h) que mascararam a atividades menos intensa do ^{64}Cu e ^{66}Cu . Na irradiação curta pela medição do ^{66}Cu nas amostras das plântulas o Cu foi detectado somente na mais alta concentração de exposição das plântulas. O valor do limite de detecção do Cu foi de $64,1 \mu\text{g g}^{-1}$.

A qualidade dos resultados com relação a exatidão e precisão foi avaliada por meio das análises dos materiais de referência certificados INCT-TL-1 *Tea Leaves* e NIST SRM 1547 *Peach Leaves* e cujos dados obtidos demonstraram a viabilidade de aplicar o procedimento analítico adotado na determinação dos elementos Br, Ca, Co, Cr, Fe, K, La, Rb, Sc e Zn nas amostras das plântulas por meio da irradiação longa. Estes resultados mostraram boa reprodutibilidade com desvios padrão relativos abaixo de 14,6% e boa exatidão com erros relativo inferiores abaixo 14,6%.

Nas determinações dos elementos das partes aéreas é verificado que o Cu afetou no acúmulo de elementos com o incremento das concentrações de Ca, Co, K, La e Zn e a diminuição de Br, Cr, Fe, Rb, Sc. Para as partes radiculares as concentrações dos elementos aumentaram em todos os tratamentos exceto para o Ca nos tratamentos C2, C3 e C4. Nas diferentes concentrações de Zn aplicadas no seu cultivo, nas amostras das partes aéreas ocorreu a diminuição da concentração de Br e Ca, e as concentrações dos outros elementos aumentaram. Já nas partes radiculares somente o Ca apresentou redução nas concentrações quando comparado o resultado obtido para amostra do tratamento Z0 com a do Z1.

Os resultados deste estudo indicaram que a exposição da espécie *A. blanchetiana* a diferentes concentrações de Cu nos seus meios de cultivo, provocou diferença absorção dos elementos Ca, Fe, K e Zn pelas plântulas. Concluiu-se que Cu interferiu na absorção destes elementos essenciais, e também nos valores de índices de translocação. A *A. blanchetiana* mostrou ser uma espécie bioacumuladora de Zn, uma vez que altos teores deste elemento foram obtidas nas suas partes aéreas e radiculares. Com a aplicação de diferentes doses de Zn nos meios de cultivo das plântulas, os conteúdos dos

elementos essenciais e os índices de translocação indicaram respostas diferenciadas. Esses achados permitem concluir que o Zn afetou na translocação dos elementos Ca, Fe, K e Zn nas plântulas de *A. blanchetiana* cultivadas *in vitro*.

APÊNDICE A

Descrição da ocorrência/alteração nas plântulas durante a monitoração semanal nas culturas *in vitro*.

TABELA 4.4. Legenda das variáveis da monitoração semanal das culturas *in vitro* de *A. blanchetiana*.

Identificação	Variável	Descrição da ocorrência/alteração nas plântulas	Foto da alteração na plântula de <i>Aechmea blanchetiana</i> (Baker) L.B. Smith
0	Contaminação	Ocorrência da contaminação por fungos e/ou bactérias. Os fracos foram descartados para que não haja proliferação para os demais.
1	Presença de clorose	Aparecimento da clorose foliar em toda ou em parte da folha. Ocorreu na cor tonalidade amarelo pálido.
2	Presença de necrose	A necrose ocorre com a mudança de cor das folhas, passando do verde para o tom pardo. A folha também pode apresentar aspecto de putrefação e transparência.
3	Manchas amarelas	As manchas amarelas aparecem aleatoriamente nas folhas, com aspectos circulares e são bem delimitadas.
4	Descoloração	As folhas apresentavam cor verde inicialmente, com o passar do dias apresentaram-se na cor branca e com um leve tom de verde.

5	Manchas escuras	As folhas apresentavam cor verde inicialmente, depois de algum tempo apresentaram-se na cor escura com um tom marrom escuro.
6	Sem alteração	As plântulas não apresentaram alteração na cor, ou outro aspecto visível. Desenvolveram-se muito bem crescendo em comprimento e número de folhas e raízes.
7	Aparecimento de folhas	Aparecimento de novas folhas na região do tanque das plântulas, indicando o desenvolvimento da planta.
8	Aparecimento de raízes	As raízes aparecem na região do colo, sua cor é esbranquiçada, quase transparente, se distinguindo das raízes mais velhas.
9	Planta estiolada	O estiolamento ocorre com crescimento exagerado do caule e diminuição das folhas.
10	Folhas com listras	As folhas aparecem com listras em tom amarelo.
11	Aparecimento de brotos	Os brotos ocorrem na região do colo da planta, às vezes são ligados por estolões, indicando reprodução vegetativa.

APÊNDICE B

Concentrações dos elementos nas soluções padrões codificadas de F 7, S 7, Br 7, L 7 e Cu 10.

TABELA 4.5. Concentração dos elementos na solução e massas dos elementos nos padrões.

Padrão F 7		
Elemento	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa
Ca	10037	501,85 μg
Rb	199,80	9,99 μg
Fe	7022,4	351,12 μg
Zn	719,568	35,97 μg
Padrão S 7		
Elemento	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa
As	30,105	1505,25 ng
Cu	2009,2	100,46 μg
Se	160,144	8,007 μg
Cr	39,98	1,999 μg
Mo	60,12	3,006 μg
Sb	12,0054	600,27 ng
Padrão Br 7		
Elemento	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa
Br	99,7	4,985 μg
Padrão L 7		
Elemento	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa
K	10016	500,8 μg
La	12	0,6 μg
Cs	12	0,6 μg
Sc	1,6	80 ng
Co	3,003	150,15ng
Cd	200,28	10014 ng
Padrão Cu 10		
Elemento	Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa
Cu	4996,986	249,9 μg

APÊNDICE C

Dados obtidos na monitoração semanal efetuada para as amostras dos tratamentos C0 e Z0.

TABELA 5.1. Resultados da monitoração da planta de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* em solução nutriente isenta de Cu (Tratamento C0).

Frasco nº	Semana da Monitoração															
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a	9 ^a	10 ^a	11 ^a	12 ^a	13 ^a	14 ^a	15 ^a	16 ^a
1	8;11	8;11	7;8;11	1;3	1	1	1	1;7;8	1	1	2;8	2;8	7;8;11	1;7;8;11	1;7;8;11	1;7;8;11
2	8	8	7;8	1	1	1	1	7;8	7;8	7;8	7;8	7;8	7;8	1;7;8	1;7;8	1;7;8
3	11	1;11	7;11	1	1	1	1	2;7;8	1	1	1;5;8	1;5;8	1;7;8	1;2	1;2	1;2
4	6	1;5	3;7;11	2	2	2	2	7;11	1	1	1;5;8	1;5;8	1;5;7	2;5	2;5	2;5
5	8	1;11	1;11	1;2;5	1;2;5	1;2;5	1;2;5	1;7;11	1	1	1	1	1;7;8	8;10	8;10	8;10
6	4;8	1;5;8	1;3	1;3	1;3	1;3	1;3	1;7;8	1;7;8	1;7;8	1;8	1;8	7	1;2;8	1;2;8	1;2;8
7	6	1;3;8	3;11	1	7;11	7;11	7;11	1;7;8	1;7;8	1;7;8	1;5	1;5	11	7;8	7;8	7;8
8	8	1;3;8	7;11	7;11	7;11	7;11	7;11	2;7;11	2;7;11	2;7;11	7;8;11	7;8;11	7;8	2	2	2
9	6	1;8	1;7	1	11	11	11	2;3;7;11	2;3;7;11	2;3;7;11	2;3;7;11	2;3;7;11	7	10	10	10
10	8	8	7;8	7;8	7;8	7;8	7;8	7;8;11	7;8;11	7;8;11	2;7;8;11	2;7;8;11	7;8;11	10	10	10
11	8	3;8	3;7;8	3;7;8	3;7;8	3;7;8	3;7;8	1;7;8;11	1;7;8;11	1;7;8;11	1;7;8;11	1;7;8;11	1;7;8	1;2;7;8	1;2;7;8	1;2;7;8
12	8	8	3;5;7	3;5;7	3;5;7	3;5;7	3;5;7	7;11	7;11	7;11	7;11	7;11	7;8	7;8	7;8	7;8
13	6	1;8	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8	7;8	7;8	7;8

Legenda: 0 – contaminação por fungos e/ou bactérias; 1 - presença de clorose; 2 – presença de necrose; 3 – manchas amarelas; 4 – descoloração das folhas; 5 – manchas escuras; 6 – não houve alteração; 7 - aparecimento de folhas; 8 - aparecimento de raízes; 9 – planta estiolada; 10 – folhas com listras; 11 – aparecimento de brotos.

TABELA 5.2. Resultados da monitoração da planta de *A. blanchetiana* cultivada *in vitro* em solução nutriente isenta de Zn (Tratamento Z0).

Frasco nº	Semana da Monitoração															
	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	7ª	8ª	9ª	10ª	11ª	12ª	13ª	14ª	15ª	16ª
1	4	4;7;8;11	4;7;8;11	4;7;8;11	7;8	7;8	7;8	7;8;11	1;7	1;7	7;8	7;8	7;8	1;7;8	4;7;8;11	4;7;8;11
2	4;7	8	7;8	7	7	7	7	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8	7;8	7;8	7;8	7;8	7
3	8;11	1	1	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	1;2;7;8	1;2;7;8	7;8	1;7;8	1	7;8;11
4	6	1;8	3;7	3;7	3;4;11	3;4;11	3;4;11	7;8;11	1;7	1;7	1;8	1;8	7;8	7;8;11	3;7	3;7
5	6	1;8	11	11	8;9;11	8;9;11	8;9;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	1;8	1;8	7;8	7;8;11	11	11
6	6	4;8	4;8	4;8	4;8	4;8	4;8	7;8;11	1	1	1;7;11	1;7;11	7;8;11	7;8;9;11	4;8	4;8
7	4	2;8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	8	1;8	1;8	1;8	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	1;2	1;2	1;2	1;2	7;8	7;8;11	1;8	1;8
9	4;8	4;7;8	1	1	7	7	7	7;8;11	7;8;11	7;8;11	1	1	7;8	5;7;8	1	1
10	4;8	4;8	1;3	1;3	7;8;9;11	7;8;9;11	7;8;9;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	1;3	1;3
11	1;8	1;8	1;7;8	1;7;8	1;7;8	1;7;8	1;7;8	7;8;11	1	1	1	1	7;8;11	1;8	1;7;8	1;7;8
12	3;8	3;8	1;7;11	1;7;11	1;7;11	1;7;11	1;7;11	7;8;11	7;8;11	7;8;11	1;8;9;11	1;8;9;11	7;8;11	7;8;11	1;7;11	1;7;11
13	6	3;8	1;3	1;3	1;3	1;3	1;3	7;8;11	1	1	1;11	1;11	7;8;11	1;5;7	1;3	1;3

Legenda: 0 – contaminação por fungos e/ou bactérias; 1 - presença de clorose; 2 – presença de necrose; 3 – manchas amarelas; 4 – descoloração das folhas; 5 – manchas escuras; 6 – não houve alteração; 7 - aparecimento de folhas; 8 - aparecimento de raízes; 9 – planta estiolada; 10 – folhas com listras; 11 – aparecimento de brotos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABICHEQUER, A.D.; BOHNEM, H.; ANGHINONI, I. Absorção, translocação e utilização de fósforo por variedades de trigo submetidas à toxidez de alumínio. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 27, p. 373-378, 2003.

ALAOUI-SOSSÉ, B.; GENET, P.; VINIT-DUNAND, F.; TOUSSAINT, M.-L.; EPRON, D.; BADOT, P.M. Effect of copper on growth in cucumber plants (*Cucumis sativus*) and its relationships with carbohydrate accumulation and changes in ion contents. **Plant Science**, v. 166, p. 1213-1218, 2003.

AN, Y.J.; KIM, Y.M.; KWON, T.I.; JEONG, S.W. Combined effect of copper, cadmium, and lead upon *Cucumis sativus* growth and bioaccumulation. **Science of the Total Environment**, v. 326, p. 85-93, 2004.

ANTONIOLLI, Z.I.; SILVA, R.F.; SALLES, A.S.; ZINI, R.O.; LEALI, L.T.; LUPATINI, M.; MORO, C.A.J. Comportamento de quatro espécies florestais nativas a solo contaminado por cobre. **XXXI Congresso brasileiro de ciência do solo**. Aug, 2007.

ARDUINI, J.; GODBOLD, D.L.; ONNIS, A.; STEFANI, A. Heavy metals influence mineral nutrition of tree seedlings. **Chemosphere**, v. 36, n. 4-5, p. 739-744, 1998.

ARNETOLI, M.; VOOIJS, R.; GONNELLI, C.; GABRIELLI, R.; VERKLEIJ, J.A.; SCHAT, H. High level Zn and Cd tolerance in *Selene paradoxa* L. from a moderately Cd and Zn contaminated copper mine tailing. **Environmental Pollution**, v. 152, n. 2, p. 380-386, 2008.

ARRABAL, R.; AMANCIO, F.; CARNEIRO, L.A.; NEVES, L.J.; MANSUR, E. Micropagation of endangered endemic Brazilian bromeliad *Cryptanthus sinuosus* (L.B. Smith) for *in vitro* preservation. **Biodiversity and Conservation**, v.11, p. 1081-1089, 2002.

AYRES, M.; AYRES-JR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas**. Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá. 2005.

BAILEY, L.F.; McHARGUE, J.S. Effect of boron, copper, manganese and zinc in the enzyme activity of tomato and alfalfa plants grown in the greenhouse. **Plant Physiology**, v.19, n. 1, p. 105-116, 1944.

BECERRIL, J.M.; BARRUTIA, O.; GARCÍA-PLAZAOLA, J.I.; HERNÁNDEZ, A.; OLANO, J.M.; GARBISU, C. Espécies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. **Ecossistemas**, n. 2, p.1-6, 2007.

BENZING, D.H.; HENDERSON, K.; KESSEL, B.; SULAK, J. The absorptive capacities of bromeliad trichomes. ***American Journal of Botany***, v. 63, n.7, p. 1009-1014, 1976.

BODE, P. ***Instrumental and organizational aspects of a neutron activation analysis laboratory***. Ph Thesis Interfacultair Reactor Institut, Delf University of Technology, 1996. 250 p.

BRAGA, M.M.N. Anatomia foliar de Bromeliaceae da Campina. ***Acta Amazonica***, v. 7, n. 3: Suplemento, 1977. 74p.

BRIGHIGNA, L.; RAVANELLI, M.; MINELLI, A.; ERCOLI, L. The use epiphyte (*Tillandsia caput-medusae morren*) as bioindicator of air pollution in Costa Rica. ***The Science of Total Environment***, v.198, p. 175-180, 1997.

BRIGHINA, L.; PAPINI, A.; MOSTI, S.; CORNIA, A.; BOCCHINI, P.; GALLETTI, G. The use of tropical bromeliads (*Tillandsia* spp.) for monitoring atmospheric pollution in town of Florence, Italy. ***Revista de Biologia Tropical***, v. 50, n. 2, p. 577-584, 2002.

BROOKS, R.R. ***Biological methods of prospecting for minerals***. New York: John Wiley and Sons, 1983.

CALVETE, E.O.; AZEVEDO, M.; BORDIGNOU, M.H.; SUGIN, M. Análises anatômicas e da biomassa em plantas de morangueiro cultivadas *in vitro* e *ex vitro*. ***Horticultura Brasileira***, v. 20, n. 4, p. 649-653, 2002.

CASTILHOS, D.D.; GUADAGNIN, C.A.; SILVA, M.D.; LEITZKE, V.W.; FERREIRA, L.H.; NUNES, M.C. Acúmulo de cromo e seus efeitos na fixação biológica de nitrogênio e absorção de nutrientes em soja. ***Revista Brasileira de Agrociência***, v. 7, n. 2, p. 121-124, 2001.

CHIH-CHENG, L.; LI-MING, C.; ZIN-HUANG, L. Rapid effect of copper on lignin biosynthesis in soybean roots. ***Plant Science***, v. 168, p. 855-861, 2005.

CIENFUEGOS, F. ***Estatística aplicada ao laboratório***. Rio de Janeiro: Interciência, 2005.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Ministério do Meio Ambiente. ***Resolução nº 357, de 17 de março de 2005***.

COULTO, J.M.F.; OTNI, W.C.; PINHEIRO, A.L.; FONSECA, E.P. Desinfestação e germinação *in vitro* de sementes de mogno (*Swietenia macophylla* King). ***Revista Árvore***, v. 28, n. 5, p. 633-642, 2004.

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

CURRIE, L.A. Limits for qualitative detection and quantitative determination. **Analytical Chemistry**, v. 40, p. 586-593, 1968.

DAHLGREN, R.M.T.; CLIFFORD, H.T.; YEA, P.F. **The families of the monocotyledons: structures, evolution and taxonomy**, Berlin: Springer-Verlag, 1985.

DENNY, H.J.; WILKINS, D.A. Zinc tolerance in *Betula* spp. **New Phytology**, v. 106, p. 517-524, 1987.

DENG, J.; LIAO, B.; YE, M.; DENG, D.; LAN, C.; SHU, W. The effects of heavy metal pollution on genetic diversity in zinc/cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* populations. **Plant Soil**, v. 297, p. 83-92, 2007.

DE SOETE, D.; GILBELS, R.; HOSTE, J. **Neutron activation analysis**, New York: Wiley Interscience, 1972.

FIGUEIREDO, A.M.G.; SAIKI, M.; TICIANELLI, R.B.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; MARKET, B. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 249, n. 2, p. 391-395, 2001.

FLORES, E.M. Algunos aspectos de anatomia foliar comparada de las especies de Bromeliaceae (*Aechmea mexicana* Baker y *Hechtia glomerata* Zucc.). **Revista de Biología Tropical**, v.2, p. 29-52, 1975.

FRANKLIN, G. L. Preparation of thin sections of synthetic resins and wood resins composites, and a new macerating method for wood. **Nature**, v.155, p. 51-59, 1945.

FREITAS, M.; ZOCHE, J.J.; QUADROS, K.E. Metais pesados (Mn e Zn) em *Thypha domingensis* Pers. em áreas de mineração de carvão. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 789-791, 2007.

FRIEDLANDER, G.; KENNEDY, J.W.; MILLER, J.M. **Nuclear and radiochemistry**, New York: John Wiley. 1964.

GRANT, J.R.; ZIJLSTRA, G. An annotated catalogue of generic names of the Bromeliaceae. **The Mary Selby Botanical Gardens**, USA, v. 19, n.1, p. 91-121, 1998.

IAEA. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Practical aspects of operating a neutron activation analysis laboratory**. Viena: IAEA, 1990 (IAEA – TECDOC – 564).

IAEA. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Quality aspects of research reactor operations for instrumental neutron activation analysis laboratory**. Viena: IAEA, 2001 (IAEA – TECDOC – 1218).

INCT. Institute of Nuclear Chemistry and Tecnology. **Polish certified reference material for multielement trace analysis**. Tea Leaves (INCT-TL-1), 2002.

JOHASEN, D.A. **Plant microtechnique**, New York: Mc Graw Hill, 1940.

JUDD, S. W.; CAMPBELL, C. S.; KELLOG, E. A.; STEVENS, P. F.; DONOGHUE, M. J. **Plant sistematics: a philogenetic approach**, Standerland: Sinauer Associates, 1999.

KANASHIRO, S; RIBEIRO, R.C.S; GONÇALVES, A.N.; DIAS, C.T.S.; JOCYS,T. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento de *Aechmea blanchetiana* (Baker) L.B. Smith cultivada *in vitro*. **Hoehnea**, v. 34, n. 1, p. 59-66, 2007.

KRAUS, J.E.; SOUSA, H.C.; REZENDE, M.H.; CASTRO, N.M.; VECCHI C.; LUQUE, R. Astra blue and basic fuchsin double staining of plant materials. **Biotechnic and Histochemistry**, v.73, p. 235-243, 1998.

LÄUCHI, A; EPSTEIN, E. Transport of potassium and rubidium in plant roots. **Plant Physiology**, v. 45, p. 639-641, 1970.

LOMBARDI, L.; SEBASTIANI, L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. **Plant Science**, v. 168, p. 797-802, 2005.

LOUSTALOT, A.J.; BURROWS, F.W.; GILBERT, S.G.; NASON, A. Effect of copper and zinc deficiencies on the photosynthetic activity of the foliage of young tung trees. **Plant Physiology**, v. 20, p. 283-288, 1943.

LUTHER, H.E. **An alphabetical list of bromeliad binomials**, 8 ed. USA: The Marie Selby Botanical Gardens, 2002.

MACÊDO, L.S.; MORRIL, W.B.B. Toxicidade dos ametais no solo e nas plantas: uma revisão de literatura. **Tecnologia e Ciência Agropecuária**, v.2, n.2, p. 39-42, 2008.

MALAVOLTA, E.; HAAG, H.P.; MELLO, F.A.F.; BRASIL SOBRINHO, M.O.C. **Nutrição mineral e adubação de plantas cultivadas**. Livraria pioneira editora, 1974.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**, São Paulo: Agronômica Ceres, 1980.

MARSOLA, T.; MIYAZAWA, M.; PAVAN, M.A. Acumulação de cobre e zinco em tecidos do feijoeiro em relação com o extraído do solo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 1, p. 92-98, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497, 1962.

NICOLOSO, F.T.; ERIG, A.C.; MARTINS, C.F.; RUSSOWSKI, D. Micropopagação de Ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 3, n. 2, p. 11-18, 2001.

NIST. National Institute of Standards and Technology. **Certificate of analysis. standard reference material**. 1577b Bovine Liver, Janeiro, 1991.

NIST. National Institute of Standards and Technology. **Certificate of analysis. standard reference material**. 1547 Peach Leaves, Janeiro, 2003.

OLIVEIRA, I.P.; CASTRO, F.G.F.; PAIXÃO, V.V.; MOREIRA, F.P.; CUSTÓDIO, D.P.; SANTOS, R.S.M.; FARIA, C.D. Efeitos qualitativos e quantitativos de aplicação do zinco no capim Tanzânia. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 30, n.1, p. 43-48, 2000.

PAGE, V.; FELLER, U. Selective transport of zinc, manganese, nickel, cobalt and cadmium in the root system and transfer to the leaves in young wheat plants. **Annals of Botany**, v. 96, n.3, p. 425-434, 2005.

PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A.M. Root structural aspects associated with copper toxicity in oregano – *Origanum vulgare* subsp. *Hirtum*. **Plant Science**, v. 166, p. 1497-1504, 2004.

PIGNATA, M.L.; GUDINO, G.L.; WANNAZ, E.D.; PLA, R.R.; GONZALES, C.M.; CARREIRAS, H.A.; ORELLANA, L. Atmospheric quality and distribution of heavy metals in Argentina employing *Tillandsia capillaries* as a biomonitor. **Environmental Pollution**, v. 120, n. 1, p. 59-68, 2002.

PITA, P.B.; MENEZES, N.L. Anatomia da raiz de espécies de *Dyckia* Schult. f. e *Echolirium* Mart. ex Schult e Schult. f. (Bromeliaceae, Ptcairnoidae) a Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil), com especial referência ao velame. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 25, n. 1, p. 25-34, 2002.

PIZZOLATO, M.; CATEN, C.S.; JORNADA, J.A.H. A influência do sistema de gestão de laboratórios nos ensaios de proficiência da construção civil. **Gestão de Produção**, v. 15, n. 3, p. 579-589, 2008.

PROENÇA, S.L.; SAJO, M.G. Estrutura foliar de espécies de *Aechmea* Ruiz&Pav. (Bromeliácea) do estado de São Paulo, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, v. 18, n. 2, p. 319-331, 2004.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**, 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

RENGEL, Z. Ecotypes of *Holcus lanatus* tolerant to zinc toxicity also tolerate zinc deficiency. **Annals of Botany**, v. 86, p. 1119-1126, 2000.

RODRIGUES, J.D.; RODRIGUES, S.D.; PEDRAS, J.F.; DELACHIAVE, M.E.A.; BOARO, C.S.F.; ONO, E.O. Diferentes níveis de cálcio e o desenvolvimento de plantas de estilosantes (*Stylosanthes guyanensis* (AUBL.) SW. CV "Cook") CATILHOS. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 2, p. 166-175, 1993.

ROSSI, G.; FIGLIOLA.; SOCCIARELLI, S.; PENNELLI, B. Capability of *Brassica napus* to accumulate cadmium, zinc and copper from soil. **Acta Biotechnology**, v. 22, n. 1-2, p. 133-140, 2002.

ROYER, D.L. Stomatal density and stomatal index as indicators of paleoatmospheric CO₂ concentration. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 114, p. 1-28, 2001.

SAMANTARAY, S.; ROUT, G.R.; DAS, P. *In vitro* selection and regeneration of zinc tolerant calli from *Setaria italica* L. **Plant Science**, v. 143, p. 201-209, 1999.

SANTOS, R.P. **Respostas morfofisiológicas de videiras cultivadas sob diferentes condições in vitro**. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

SCATENA, V.L.; SEGECIN, S. Anatomia foliar de *Tillandsia* L. (Bromeliaceae) dos Campos Gerais, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 635-649, 2005.

SCHÖFFEL, E.R.; LÚCIO, A.D.C. Comportamento de variedades de arroz sob diferentes doses de zinco aplicadas no solo. **Revista FZVA-Uruguaiana**, v. 7, p. 17-23, 2001.

SCHRIMPFF, E. Air pollution patterns in two cities of Colômbia, S. A. according to trace substance content of an epiphyte (*Tillandsia recurvata* L.). **Water, Air, and Soil Pollution**. v. 21, p. 279-315. 1984.

SILVA, P.R.; SOUZA, E.S.; REBOUÇAS, F.S.; ALMEIDA, W.A.B. Otimização de protocolos para regeneração de plantas *in vitro* de tangerina "Cleopatra" (*Citrus reshni* Hort. ex Tan). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 3, p. 484-487, 2005.

SMITH, L.B. The Bromeliaceae of Brasil. **Smithsonian Miscellaneous Collection**, v.126, n. 1, p 290, 1955.

SMITH, L.B.; DOWNS, R.J. Bromelioideae (Bromeliaceae). **Flora Neotropical**, v. 14, p. 1493-2142, 1979.

SOARES, C.R.F.S.; ACCIOLY, A.M.A.; MARQUES, T.C.L.L.S.M.; SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S. Acúmulo e distribuição de metais pesados nas raízes, caule e folhas de mudas de árvores em solo contaminado por rejeitos de indústria de zinco. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, p. 302-315, 2001.

SOARES, C.R.F.S.; SIQUEIRA, J.O.; CARVALHO, J.G.; MOREIRA, F.M.S.; GRAZZIOTTI, P.H. Crescimento e nutrição mineral de *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus urophylla* em solução nutritiva com concentração crescente de cobre. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 3, p. 213-225, 2000.

SOUSA, G.M.; ESTELITA, M.E.M.; WANDERLEY, M.G.L. Anatomia foliar de espécies brasileira de *Aechmea* subg.chevaliera (Gaidich.ex Beer) Baker, Bromelioideae-Bromeliaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, n. 3, p. 603-613, 2005.

SOUZA, C.M.; PINTO, J.E.B.P.; RODRIGUES, B.M.; MORAIS, A.R.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Influência dos fatores físicos na regeneração de repolho. **Ciência Agrotécnica**, v. 23, n. 4, p. 830-835, 1999.

SRIDHAR, B.B.M.; HAN, F.X.; DIEHL, S.V.; MONTS, D.L.; SU, Y. Effects of Zn and Cd accumulation on structural and physiological characteristics of barley plants. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 19, n. 1, p. 15-22, 2007.

STOYANOVA, Z.; DONCHEVA, S. The effect of zinc supply and succinate treatment on plant growth and mineral uptake in pea plant. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.14, n.2, p. 111-116, 2002.

STREHL, T.; LOBO, E.A. Analysis of the morphological characters of *Tillandsia aeranthos* (Loisel.) L.B. Smith and *T. recurvata* (L.) L. (Bromeliaceae) as bioindicators of the urban pollution in Porto Alegre city, Southern Brazil. **Aquilo Ser Botany**, v. 27, p.19-27, 1989.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

TEIXEIRA, S.L.; RIBEIRO, J.M.; TEIXEIRA, M.T. Utilização de hipoclorito de sódio na esterilização de meio de cultura para multiplicação *in vitro* de *Eucalyptus pellital*. **Ciência Florestal**, v. 18, n. 2, p. 185-191, 2008.

YANQUN, Z.; YUAN, L.; JIANJUN, C.; HAIYAN, C.; QIN, L.; SCHAVARTZ, C. Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead-zinc mining in Yunnan, China. **Environment Internacional**, v. 31, p. 755-762, 2005.

ZEITOUNI, C.F. **Eficiência de espécies vegetais como fitoextratoras de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco de um latossolo vermelho amarelo distrófico**. 2003. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agronômico, São Paulo.