



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE DE
ECOSSISTEMAS

ESTRESSE POR CHUMBO EM GIRASSOL: RESPOSTAS
FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

CLAUDIA BRITO DE ABREU

CRUZ DAS ALMAS - BAHIA
FEVEREIRO - 2015

ESTRESSE POR CHUMBO EM GIRASSOL: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

CLAUDIA BRITO DE ABREU

Engenheira Agrônoma

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Dissertação submetida ao Colegiado de Curso do Programa de Pós-Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas.

ORIENTADOR: PROF. DR. ANDRÉ DIAS DE AZEVEDO NETO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
MESTRADO EM SOLOS E QUALIDADE DE ECOSSISTEMAS
CRUZ DAS ALMAS - BAHIA - 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Abreu, Claudia Brito de.

Estresse por chumbo em girassol: respostas fisiológicas e bioquímicas /
Claudia Brito de Abreu.– Cruz das Almas, BA., 2015.
45 f. il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto

Dissertação (Mestrado Solos e Qualidade de Ecossistemas) -
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015.

1. Girassol. 2. Metal pesado. 3. Chumbo. I. Azevedo Neto, André
Dias de Azevedo. II. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. III.
Título.

CDD: 635.933 99

Ficha catalográfica elaborada por Lucidalva R. G. Pinheiro- Bibliotecária CRB51161 –
Embrapa Mandioca e Fruticultura

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOLOS E QUALIDADE DE
ECOSSISTEMAS**

**COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
CLAUDIA BRITO DE ABREU**

Prof. Dr. André Dias de Azevedo Neto
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB
(Orientador)

Profa. Dra. Adriana Maria de Aguiar Accioly
Embrapa Mandioca e Fruticultura

Profa. Dra. Paula Ângela Umbelino Guedes Alcoforado
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

Dissertação homologada pelo Colegiado do Curso de Mestrado em Solos e
Qualidade de ecossistemas em
Conferindo o Grau de Mestre em Solos e Qualidade de Ecossistemas
em.....

Ao meu pai **Carlos** (*in memoriam*)
pelo amor que teve por mim.

OFEREÇO

A **Deus** por me dar o dom da vida e
a minha mãe **Erotilde**, pelo amor
que tem por mim e pela presença
constante na minha caminhada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me dar força, saúde e fé em todos os momentos da minha vida. E por me mostrar sempre o caminho que devo seguir.

Ao excelente orientador e professor, Dr. André Dias de Azevedo Neto, pela dedicação, incentivo e por estar sempre presente durante o desenvolvimento da pesquisa compartilhando o seu conhecimento comigo.

A minha mãe Erotilde e minha irmã Elian, pelo amor, carinho e confiança que sempre em mim depositaram. Amo vocês!

Ao Laboratório de Bioquímica da UFRB, em especial a Bárbara e Kátia por estarem presentes nas análises do meu experimento.

Ao Instituto de Química da UFBA pela realização das análises químicas e a Milena Pinelli pela dedicação na leitura das amostras digeridas.

À Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB e aos docentes do Programa de Pós Graduação em Solos e Qualidade de Ecossistemas pelos conhecimentos adquiridos.

Aos amigos do curso de mestrado em especial a Terezinha, Joyce e Jorgiana pela amizade e companheirismo.

A minha amiga Nara, agradeço a amizade e o carinho, obrigada por tudo.

A minha amiga e irmã Bruna, que mesmo distante torce por mim.

A comissão examinadora da defesa, pela contribuição no trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb) pelo auxílio dissertação.

Aos familiares e amigos que direta ou indiretamente torceram por mim.

Enfim, agradeço a todos, pois sem a contribuição de vocês nada disso seria possível.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
INTRODUÇÃO.....	5
A cultura	5
O Pb no solo.....	5
O Pb na planta.....	6
Referências Bibliográficas.....	7

CAPÍTULO 1

ARTIGO: CRESCIMENTO E TEORES DE PIGMENTOS DE GIRASSOL SOB DOSES DE CHUMBO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA	9
Resumo.....	10
Abstract.....	11
Introdução	12
Material e Métodos	13
Resultados e Discussão.....	14
Conclusões	18
Referências.....	18

CAPÍTULO 2

ARTIGO: DISTÚRBIOS NUTRICIONAIS E BIOQUÍMICOS INDUZIDOS POR Pb EM GIRASSOL	22
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução	25
Material e Métodos	26
<i>Condições de crescimento e tratamentos</i>	26
<i>Preparo dos extratos e análises nutricionais e bioquímicas</i>	27
<i>Delineamento experimental e análise estatística</i>	28
Resultados e Discussão.....	28
<i>Crescimento</i>	28
<i>Teores de chumbo</i>	29
<i>Macronutrientes (N, P, K Ca e Mg)</i>	30
<i>Solutos Orgânicos (Carboidratos solúveis, aminoácidos livres, proteínas solúveis e prolina livre)</i>	35
Conclusão	38
Referências	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura	CAPÍTULO 1	Página
1	Produção das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC), raízes (MSR), parte aérea (MSPA) e total (MST) e razão parte aérea/raiz (PA/R) de plantas de girassol após 16 dias de cultivo em casa de vegetação sob diferentes níveis de $Pb(NO_3)_2$ na solução nutritiva. Média de quatro repetições e respectivos desvios-padrões.....	15
2	Teores de clorofila <i>a</i> (Cla), clorofila <i>b</i> (Clb), carotenóides (Car), clorofila total (Clt) e razões clorofila <i>a</i> / clorofila <i>b</i> (Cla/Clb) e clorofilas/carotenóides (Cl/Car) de plantas de girassol após 16 dias de cultivo em casa de vegetação sob diferentes níveis de $Pb(NO_3)_2$ na solução nutritiva. Médias de quatro repetições e respectivos desvios-padrões.....	17
CAPÍTULO 2		
1	Teores de chumbo (Pb) em folhas, caule e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de $Pb(NO_3)_2$. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$	30
2	Teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) em folhas, caule e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de $Pb(NO_3)_2$. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$	32
3	Teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas, caule e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de $Pb(NO_3)_2$. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$	33
4	Teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres, proteínas solúveis e prolina livre em folhas e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de $Pb(NO_3)_2$. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$	37

LISTA DE TABELA

Tabela	CAPÍTULO 2	Página
1	Produção das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR) de plantas de girassol após 16 dias de cultivo em casa de vegetação sob diferentes níveis de $Pb(NO_3)_2$ na solução nutritiva.....	29

ESTRESSE POR CHUMBO EM GIRASSOL: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS

Autora: Claudia Brito de Abreu

Orientador: Prof. André Dias de Azevedo Neto

RESUMO: O presente trabalho objetivou estudar os aspectos fisiológicos e bioquímicos do girassol quando cultivado sob estresse por chumbo. Assim, plantas de girassol foram cultivadas por 16 dias em cinco doses de chumbo na solução nutritiva (0; 0,2; 0,4; 0,6 ou 0,8 mM $Pb(NO_3)_2$, com quatro repetições. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em casa de vegetação. O Pb na solução nutritiva reduziu o crescimento do girassol apenas no nível 0,8 mM. Assim, foram observadas reduções na MSF, MSC, MSR, MSPA e MST de 74, 84, 85, 78 e 80%, respectivamente. Reduziu progressivamente os teores de todos os pigmentos de forma que em 0,8 mM de Pb foram verificadas reduções de 43, 50, 36 e 45% nos teores de Cla, Clb, Car e Clt, respectivamente. Os dados indicam que o girassol apresenta tolerância à toxidez por chumbo até 0,6 mM Pb na solução nutritiva e que a redução dos teores de pigmentos pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento do girassol sob estresse por Pb. Não houve redução nos teores de N, P e K, indicando que a redução do crescimento induzida pelo Pb não pode ser atribuída às deficiências destes nutrientes. Por outro lado, o Pb reduziu significativamente os teores de cálcio e magnésio nas folhas, caule e raízes. O Pb aumentou os teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres e prolina nas folhas e os de proteínas solúveis e de prolina nas raízes, evidenciando as alterações no metabolismo celular decorrentes do estresse. Os dados sugerem que os teores de cálcio e magnésio podem ser utilizados como indicadores nutricionais e os de prolina como indicador bioquímico da toxidez por Pb em girassol.

Palavras-chave: Metal pesado, *Helianthus annuus*, tolerância.

STRESS LEAD IN SUNFLOWER: PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL RESPONSES

Author: Claudia Brito de Abreu

Advisor: Prof. André Dias de Azevedo Neto

ABSTRACT: This work aimed to study the physiological and biochemical aspects of sunflower when grown under stress lead. Thus sunflower plants were cultivated for 16 days in five doses of lead in the nutrient solution (0.0; 0.2; 0.4; 0.6 or 0.8 mM Pb (NO₃)₂, with four replicates and was conducted in a completely randomized design in a greenhouse. The Pb in nutrient solution reduced the Sunflower growth at level 0.8 mM. Thus, reductions were observed in the MSF, MSC, MSR, MSPA and MST of 74, 84, 85 78 and 80%, respectively. progressively reduced the levels of all pigments which form of 0.8 mM Pb reductions were observed 43, 50, 36 and 45% in the content, Cla, Clb, Car and Clt respectively . The data indicate that the sunflower is tolerant to the toxicity of lead to 0.6 mM Pb in nutrient solution and that the reduction of pigment levels can at least partly explain the reduction in sunflower growth under stress Pb. There was reduced from N, P and K, indicating that the reduction of the Pb-induced growth can not be attributed to deficiencies of these nutrients. On the other hand, the Pb significantly reduced the calcium and magnesium contents in leaves, stems and roots. The Pb increased levels of carbohydrates, amino acids and proline in the leaves and the soluble protein and proline in roots, showing the changes in cell metabolism resulting from stress. The data suggest that calcium and magnesium contents may be used as nutritional markers and proline as a biochemical marker of toxicity by Pb in sunflower.

Key-words: Heavy metal, *Helianthus annuus*, tolerance.

INTRODUÇÃO

A cultura

O girassol (*Helianthus annuus* L.) é uma dicotiledônea anual pertencente à família Compositae e originária do continente Norte Americano (CASTRO et al., 1997). A produção mundial do grão de girassol vem crescendo nos últimos anos, tendo alcançado em 2013/14 a faixa de 42,9 milhões de toneladas. A cultura vem apresentando considerável aumento de área no Brasil, em função da crescente demanda dos setores produtivos, na safra 2013/14 a área cultivada com girassol foi de 145,7 mil hectares com uma produção de 232,7 mil toneladas (CONAB, 2014).

A planta possui aproveitamento integral, podendo ser utilizada como forragem, silagem e adubo verde. O grão é fonte de proteína na alimentação humana e animal, sendo o óleo utilizado na alimentação humana, na fabricação do biodiesel e na indústria cosmética (EVANGELISTA e LIMA, 2001).

Devido a várias utilidades e sua importância econômica, o girassol foi a cultura escolhida para esse trabalho.

O Pb no solo

Os metais pesados são definidos como aqueles que têm densidades superiores a 5 g cm^{-3} (GASIC e KORBAN, 2006). A contaminação de solos por metais pesados é de ocorrência generalizada como resultado das atividades humana, agrícola e industrial. Entre os metais pesados o chumbo (Pb) é um poluente potencial que, prontamente, se acumula nos solos e sedimentos (SHARMA e DUBEY, 2005). Ele oferece grande risco de envenenamento para os seres humanos, especialmente às crianças (LASAT, 2002). Assim como outros metais poluentes do solo, o Pb pode ser encontrado na solução do solo como íon livre ou como complexo metálico solúvel; ligado à matéria orgânica; adsorvido aos

constituintes inorgânicos do solo; precipitado como óxido; hidróxido, carbonato, sulfato e fosfato e; incorporado na estrutura de minerais de silicato (LASAT, 2000).

Íons de metais pesados, tais como ferro, cobre, zinco, cobalto ou níquel são micronutrientes essenciais que estão criticamente envolvidas em atividades funcionais de um grande número de proteínas envolvidas na manutenção do crescimento e desenvolvimento dos organismos vivos. No entanto, em concentrações excessivas, estes íons metálicos podem tornar-se prejudiciais para os organismos vivos. Além disso, estes organismos podem também ser expostos a íons altamente tóxicos como o cádmio, chumbo, mercúrio e outros metais que são geralmente considerados não essenciais (GASIC e KORBAN, 2006).

O chumbo tende a se acumular superficialmente no solo, diminuindo sua concentração ao longo do perfil. Dessa forma, a zona de contaminação se encontra confinada na superfície (PETERS e SHEM, 1995). Assim, como outros elementos catiônicos, ele é retido primeiramente nas cargas negativas das superfícies dos colóides do solo, formando, posteriormente, ligações mais estáveis. Neste último caso, ele passa a fazer parte da superfície dos colóides e torna-se pouco disponível para as plantas (PIERANGELI et al., 2001). Quando dissolvido na água e na forma de íon trocável, torna-se disponível para absorção pelas plantas (ANDRADE et al., 2009). A absorção pelas plantas ocorre na forma bivalente (Pb^{2+}) e por mecanismo passivo, sendo absorvido por pêlos radiculares (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000). Mesmo o solo contendo grandes quantidades de metais, a sua absorção pelas plantas é influenciada principalmente por sua fração biodisponível (VAMERALI et al., 2010).

O Pb na planta

O estresse é considerado um fator externo que exerce influência desvantajosa e induz mudanças e respostas em todos os níveis funcionais do organismo. Em condições naturais e agricultáveis, as plantas estão frequentemente expostas aos diversos estresses ambientais, os quais limitam o desenvolvimento e as chances de sobrevivência (ALEXIEVA et al., 2003; TAIZ e ZEIGER, 2013).

O excesso de chumbo nas plantas pode causar diversos sintomas de toxicidade como a redução do crescimento, clorose e escurecimento do sistema radicular, inibição da fotossíntese, distúrbios na nutrição mineral dentre outros

(SHARMA e DUBEY, 2005). Além disso, o estresse por Pb pode alterar os teores de solutos orgânicos, entre eles os carboidratos solúveis, compostos nitrogenados solúveis (aminoácidos livres e prolina livre) e proteínas solúveis.

Os solutos orgânicos são compostos bastante solúveis, de baixo peso molecular e que não apresentam toxicidade quando em elevadas concentrações no interior das células, sendo também referidos como solutos compatíveis ou osmólitos compatíveis (ASHRAF e FOOLAD, 2007). Eles atuam na homeostase iônica e na estabilização de macromoléculas e organelas, favorecendo a manutenção da integridade celular (BOHNERT e SHEN, 1999; BRAY et al., 2000). A acumulação desses compostos orgânicos osmoticamente compatíveis em condições de estresse reflete a capacidade de algumas espécies de realizarem a osmorregulação quando submetidas a condições adversas (SILVA et al., 2010).

O presente trabalho objetivou estudar os aspectos fisiológicos e bioquímicos do girassol quando cultivado sob estresse por chumbo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIEVA, V.; IVANOV, S.; SERGIEV, I.; KARANOV, E. Interaction between stresses. **Bulgarian Journal of Plant Physiology**, p.1-17, 2003.

ANDRADE, M.G.; MELO, V.F.; GABARDO, J.; SOUZA, L.C.P.; REISSMANN, C.B. Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo. I – fitoextração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.33, p.1879-1888, 2009.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M.R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v.59, p.206-216, 2007.

BOHNERT H.J.; SHEN, B. Transformation and compatible solutes. **Scientia Horticulturae**, v.78, p.237-260, 1999.

BRAY, E.A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Responses to abiotic stresses. In: BUCHANA, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (eds), **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, p.1158-1203, 2000.

CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A.; LEITE, R.M.B.V.C.; KARAM, D.; MELLO, H.C.; GUEDES, L.C.A.; FARIAS, J.R.B. **A cultura do girassol**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo. (Circular técnica, 13), 38p, 1997.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Girassol**. 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 de março de 2015.

EVANGELISTA, A.R.; LIMA, J.A. Utilização de silagem de girassol na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS. **Anais...** Maringá, UEM/CCA/DZO, p.177-217, 2001.

GASIC, K.; KORBAN, S.S. Heavy Metal Stress. In: RAO, K.V.M.; RAGHAVENDRA, A.S.; REDDY, K.J. (Eds.) **Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants**. Dordrecht, Springer, pp.219-254, 2006.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. **Trace elements in soils and plants**. 2.ed. Boca Raton, CRC Press, 2000. 331p.

LASAT, M.M. Phytoextracion of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction and assessment of pertinent agronomic issues. **Journal of Hazardous Substance Research**, v.2, 25p., 2000.

LASAT, M.M. Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. **Journal of Environmental Quality**, v.31, p.109-120, 2002.

PETERS, R.W.; SHEM, L. Treatment of Soil Contaminated with heavy metals. In: ALLEN, H.E.; HUANG, C.P.; BAILEY, G.W.; BOWERS, A.R. (Eds.), **Metal speciation and contamination of soil**. CRC Press, Boca Roton, Florida, pp.255-274, 1995.

PIERANGELI, M.A.P.; GUILHERME, L.R.G.; CURI, N.; SILVA, M.L.N.; OLIVEIRA, L. R.; LIMA, J.M. Teor total e capacidade máxima de adsorção de chumbo em latossolos brasileiros. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.25, p.279-288, 2001.

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

SILVA, E.N.; FERREIRA-SILVA, S.L.; VIÉGAS, R.A.; SILVEIRA, J.A.G. The role of organic and inorganic solutes in the osmotic adjustment of drought-stressed *Jatropha curcas* plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.69, p.279-285, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 954p.

VAMERALI, T.; BANDEIRA, M; MOSCA, G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. **Environmental Chemistry Letter**, v.8, p.1-17, 2010.

CAPÍTULO 1

CRESCIMENTO E TEORES DE PIGMENTOS DE GIRASSOL SOB DOSES DE CHUMBO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

(Cópia do artigo publicado no periódico Enciclopédia Biosfera, v.10, n.18, p.1078-1087, 2014, obedecendo as normas deste periódico, excetuando-se a fonte e o espaçamento).

CRESCIMENTO E TEORES DE PIGMENTOS DE GIRASSOL SOB DOSES DE CHUMBO EM SOLUÇÃO NUTRITIVA

Claudia Brito de Abreu¹; Bárbara Lima do Sacramento²; Katia Núbia Azevedo Barros Mota¹; André Dias de Azevedo Neto³.

¹ Mestranda em Solos e Qualidade de Ecossistemas do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; Cruz das Almas – BA- Brasil, CEP: 44380-000 (claudia01abreu@yahoo.com.br)

² Graduanda em Bacharelado em Biologia do Centro de Ciência Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

³ Professor Doutor do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Brasil

RESUMO

O aumento da degradação e contaminação do meio ambiente tem como princípio o uso intenso e inadequado de fertilizantes e pesticidas no solo, como também as atividades industriais e de mineração. O girassol destaca-se como a quarta oleaginosa em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do chumbo sobre a produção de biomassa e teores de pigmentos na cultura do girassol. Assim, plantas de girassol foram cultivadas por 16 dias em cinco doses de chumbo na solução nutritiva (0; 0,2; 0,4; 0,6 ou 0,8 mM $Pb(NO_3)_2$, com quatro repetições. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em casa de vegetação. O chumbo na solução nutritiva reduziu o crescimento do girassol apenas no nível 0,8 mM. Assim, foram observadas reduções na MSF, MSC, MSR, MSPA e MST de 74, 84, 85, 78 e 80%, respectivamente. O estresse por chumbo reduziu progressivamente os teores de todos os pigmentos de forma que em 0,8 mM de Pb foram verificadas reduções de 43, 50, 36 e 45% nos teores de Cla, Clb, Car e Clt, respectivamente. Os dados indicam que o girassol apresenta tolerância à toxidez por chumbo até 0,6 mM Pb na solução nutritiva e que a redução dos teores de pigmentos pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento do girassol sob estresse por Pb.

PALAVRAS-CHAVE: *Helianthus annuus* L., biomassa, fotossíntese, metais pesados.

GROWTH AND YIELD OF PIGMENTS IN SUNFLOWER DOSES OF LEAD IN NUTRIENT SOLUTION

ABSTRACT

Increased degradation and contamination of the environment has the principle intense and inappropriate use of fertilizers and pesticides in the soil, as well as industrial and mining activities. The sunflower stands out as the fourth oilseed grain production and fifth in the world in cultivated area. The aim of this study was to evaluate the effect of lead on the production of biomass and pigment content in sunflower cultivation. Thus, sunflower plants were grown for 16 days in five doses of lead in nutrient solution (0; 0,2; 0,4; 0,6 or 0,8 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, with four replications. The experiment was conducted in a completely randomized design in a greenhouse. The lead in nutrient solution reduced the growth of sunflower only 0,8 mM level. Accordingly, reductions were observed in MSF, MSC, MSR, MSPA and MST of 74, 84, 85, 78 and 80%, respectively. Stress lead progressively reduced concentration of all dyes so that 0,8 mM Pb 43, 50, 36 and 45% in the concentration of Cla Clb, reductions were observed Car and Clt, respectively. The data indicate that sunflower is tolerant to the toxicity of lead to 0,6 mM Pb in the nutrient solution and the reduction of the levels of pigments can, at least in part, explain the reduction in growth of sunflower under stress by Pb.

KEYWORDS: *Helianthus annuus* L., biomass, photosynthesis, heavy metals.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o aumento da degradação do meio ambiente tem como princípio o uso intensivo e inadequado de fertilizantes e pesticidas no solo, atrelado ao aumento das atividades industriais e de mineração. Essas práticas destacam-se como os principais responsáveis pela contaminação do solo, cursos de água e lençol freático por metais pesados (MALAVOLTA, 1994).

No Brasil existem várias áreas contaminadas com chumbo refletindo sobre a saúde da população local. Dentre essas áreas está o município de Santo Amaro da Purificação-BA, onde se encontram antigas instalações da empresa Plumbum, sendo constatada alta contaminação por chumbo em boa parte da população, no solo e nos sedimentos do rio Subaé (KEDE et al., 2008).

É de grande relevância entender o comportamento e as interações dos metais pesados com os constituintes do solo, como também sua mobilização e estabilidade frente às mudanças físico-químicas (SHEPPARD & THIBAUT, 1992).

Em baixas concentrações, os metais tóxicos, são encontrados no solo como resultado do intemperismo e de outros processos pedogenéticos. Dentre os metais tóxicos, o chumbo merece atenção devido a suas características toxicológicas e a seu tempo de permanência nos solos. A toxicidade do Pb depende de sua forma química, ou seja, de sua especiação química, que está intimamente relacionada à sua biodisponibilidade. Assim, diferentes espécies químicas do chumbo podem apresentar toxicidades diferentes e, normalmente, as formas mais solúveis são mais biodisponíveis (KEDE et al., 2008). O chumbo tende a se acumular superficialmente no solo, diminuindo sua concentração ao longo do perfil dessa forma, a zona de contaminação se encontra confinada na superfície (PETERS & SHEM, 1995).

Algumas técnicas visam diminuir ou amenizar o potencial de ação dos metais tóxicos sobre os ecossistemas. Entre essas técnicas está a fitorremediação, que consiste em utilizar espécies vegetais tolerantes à presença de metais tóxicos com potencial para remover, imobilizar ou tornar inofensivos os contaminantes presentes no solo e na água. A capacidade da biomassa das plantas em acumular altas concentrações de metais sem efeito prejudiciais ao seu crescimento enfatiza seu potencial em retirar metais de solos e da água (RASKING & ENSLEY, 2000).

Na exploração das culturas alimentares e econômicas é de grande importância a determinação e o conhecimento da toxicidade dos elementos químicos no solo, na planta e no homem (MACÊDO & MORRIL, 2008). Neste contexto, destacamos a

cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.) que é uma dicotiledônea anual pertencente à família Compositae e originária do continente Norte Americano. Ela destaca-se como a quarta oleaginosa em produção de grãos e a quinta em área cultivada no mundo, devido à presença de características agrônômicas importantes, como tolerância a altas e baixas temperaturas e adaptação às diferentes condições edafoclimáticas (CASTRO et al., 1997).

A resposta das plantas à toxidez por metais pesados envolve alterações estruturais, fisiológicas e bioquímicas que dependem do tipo, da concentração do metal pesado e do tempo de exposição das plantas ao elemento estressante (MACÊDO & MORRIL, 2008). Quando os metais pesados estão presentes em excesso, eles tornam-se tóxicos e reduzem o crescimento de plantas (BHATTI et al., 2013).

SIDDIQUI (2012) reporta que a principal via de entrada do Pb na planta é através da absorção do solo. Apesar do chumbo não ser elemento essencial para as plantas, este é facilmente absorvido e acumulado em diferentes partes da planta. Sua absorção é regulada pelo pH, tamanho de partícula e capacidade de permuta catiônica dos solos bem como pela exsudação e outros parâmetros físico-químicos (AKINCI et al., 2010). Sendo assim, a identificação de espécies cultivadas tolerantes aos metais pesados se configura como uma alternativa importante do ponto de vista ambiental e econômico, pois pode permitir a recuperação de áreas contaminadas com geração de renda (SOUZA et al., 2011a).

Considerando o nível crescente de contaminação dos solos por metais tóxicos e a importância econômica do girassol, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do chumbo sobre a produção de biomassa e os teores de pigmentos na cultura do girassol.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas na UFRB, Campus de Cruz das Almas/BA no período de abril a maio de 2013.

Foram utilizadas plantas de girassol, genótipo Olisun-05. As mudas foram produzidas a partir de sementes, em copos plásticos de 200 mL, utilizando-se como substrato areia lavada irrigada diariamente com água destilada. Decorridos 12 dias da emergência, as plântulas foram transferidas para bacias plásticas contendo 12 L

de solução nutritiva de HOAGLAD & ARNON (1950), à ½ força e sob aeração constante, onde permaneceram por cinco dias, para efeito de aclimatação.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado e os tratamentos foram constituídos de cinco doses de chumbo na solução nutritiva (0; 0,2; 0,4; 0,6 ou 8 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \text{ L}^{-1}$), com quatro repetições. Os níveis das soluções foram completados diariamente com água destilada.

Após 16 dias de estresse, as plantas foram coletadas e separadas em folhas, caules e raízes. Em seguida, o material foi colocado em sacos de papel identificados e levados para secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65 °C por 72 h, para determinação das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR) em balança semi-analítica. A partir desses dados, foram calculadas as massas secas da parte aérea (MSPA), total (MST) e razão parte aérea/raiz (PA/R).

Para determinação dos teores das clorofilas *a* (Cl*a*) e *b* (Cl*b*) e de carotenóides (Car), amostras das folhas foram colocadas em etanol a 95%. Em seguida, foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 470, 649 e 664 nm, conforme metodologia descrita por LICHTENTHALER & BUSCHMANN (2001). A partir dos teores das clorofilas *a* e *b*, foram calculados os teores de clorofila total (Cl*t*) e as razões Cl*a*/Cl*b* e clorofilas/carotenóides.

Os dados coletados foram submetidos à análise da variância (ANOVA) e comparados através de suas médias e respectivos desvios-padrões, utilizando o software estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das variáveis que podem ser consideradas no que diz respeito ao efeito dos contaminantes do solo sobre o crescimento das plantas, a produção de biomassa tem sido considerada a mais importante SOUZA et al. (2011b).

Assim, pode-se observar na (Figura 1) que a produção de massa seca em todas as partes das plantas de girassol permaneceu inalterada até a concentração 0,6 mM de Pb, indicando que o girassol é tolerante até essa concentração de Pb no meio de cultivo. Entretanto, ficou evidente uma redução abrupta do crescimento no nível 0,8 mM de Pb. Dessa forma, foram observadas reduções na MSF, MSC, MSR, MSPA e MST de 74, 84, 85, 78 e 80%, respectivamente, indicando que, para o girassol, o efeito fitotóxico do chumbo está situado em uma estreita faixa de concentração desse metal no meio radicular.

A raiz foi o órgão que apresentou a maior redução de massa seca induzida pelo estresse quando comparada aos demais órgãos da planta. A redução da massa seca das raízes pode ser atribuída à redução da respiração neste órgão causado pelo excesso de chumbo na planta (MERWE et al., 2009). Como os efeitos deletérios do Pb no crescimento do girassol foram mais pronunciados nas raízes, observa-se um aumento de 44% na razão parte aérea/raiz nas plantas submetidas a 0,8 mM de Pb na solução nutritiva.

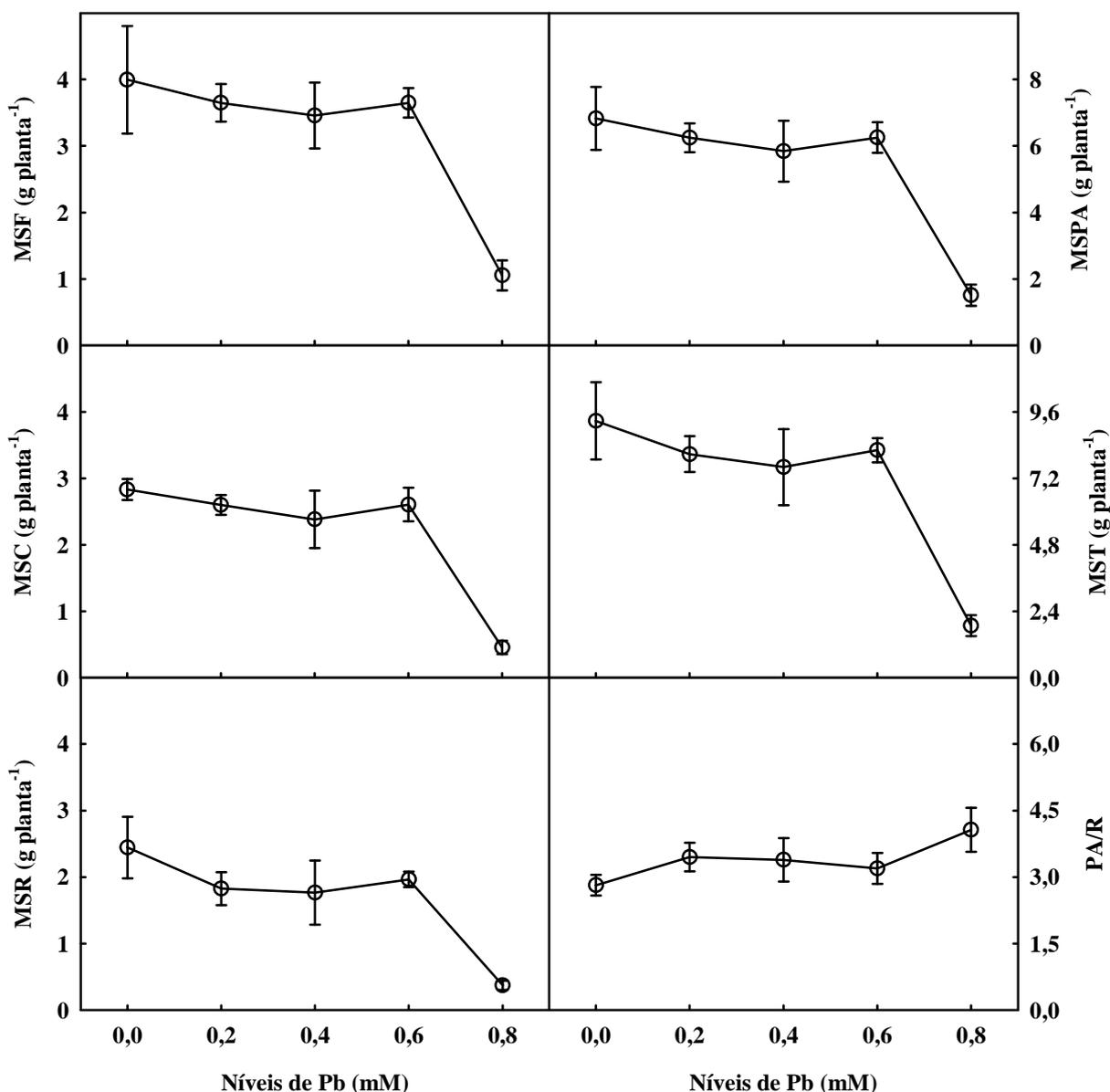


Figura 1: Produção das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC), raízes (MSR), parte aérea (MSPA) e total (MST) e razão parte aérea/raiz (PA/R) de plantas de girassol após 16 dias de cultivo em casa de vegetação sob diferentes níveis de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ na solução nutritiva. Média de quatro repetições e respectivos desvios-padrões.

Resultados semelhantes foram reportados por YONGSHENG et al. (2011) os quais concluíram que o Pb pode inibir o crescimento de plantas de chá. AKINCI et al. (2010) estudaram os efeitos do chumbo em tomate, verificando também redução da massa seca de folhas e raízes pelo aumento das concentrações de chumbo. Resultados reportados por LIMA et al. (2013) revelaram que o cultivo em solo contendo até 180 mg kg^{-1} de Pb reduziu a produção de biomassa das partes das plantas de cenoura e quiabeiro, mas não afetou a da couve manteiga.

A redução no crescimento radicular pode afetar o crescimento de toda a planta por restringir a absorção de água e nutrientes (PEREIRA et al., 2013). Em concordância, LAMHAMDI et al. (2013), verificaram que a redução do crescimento em culturas de trigo e espinafre sob estresse por Pb foi devida à deficiência de macronutrientes induzida pela inibição de absorção.

O incremento de Pb na solução nutritiva reduziu progressivamente os teores de todos os pigmentos no girassol (Figura 2). Dessa forma foram observadas reduções de 43, 50, 36 e 45% nos teores de Cla, Clb, Car e Clt, respectivamente.

A redução dos teores de pigmentos pode ser o resultado da inibição da sua biossíntese ou do aumento da sua degradação. A biossíntese de clorofila pode ser inibida na presença do chumbo, devido à interferência deste elemento na absorção de ferro e magnésio, elementos indispensáveis para a biossíntese dessas moléculas (DRAZKIEWICZ, 1994). Por outro lado, os estresses podem inibir a síntese do ácido 5-aminolevulínico, molécula precursora da clorofila, ou aumentar a atividade da enzima clorofilase que degrada a clorofila (TAIZ & ZEIGER, 2013).

Segundo SHARMA & DUBEY (2005) a fotossíntese é afetada negativamente pela toxicidade do Pb. Plantas expostas aos íons Pb mostram um declínio na taxa fotossintética como resultados da distorção da ultra-estrutura da clorofila, restrição da síntese de clorofila, plastoquinona e carotenóides, obstrução do transporte de elétrons e inibição das atividades das enzimas no ciclo de Calvin, bem como deficiência de CO_2 resultante do fechamento estomático. Dessa forma os dados deste trabalho sugerem que a redução dos teores de pigmentos pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento do girassol sob estresse por Pb.

Os dados também mostram que o pigmento mais afetado pelo estresse por Pb foi a Clb e os menos afetados foram os Car, o que se reflete em um aumento de 15% na razão Cla/Clb e uma redução de 13% na razão clorofilas/carotenóides no nível 8 mM de Pb. Outros trabalhos reportam que o teor de Clb é mais afetado pelo estresse por metais que o teor de Cla, resultando em um aumento da relação Cla/Clb (VODNIK et al.,1999; XIONG et al., 2006). O aumento desta relação pode ser justificado pelo fato de que o primeiro passo na degradação da Clb é a sua conversão em Cla (HORIE et al.,2009; SHIMODA et al.,2012).

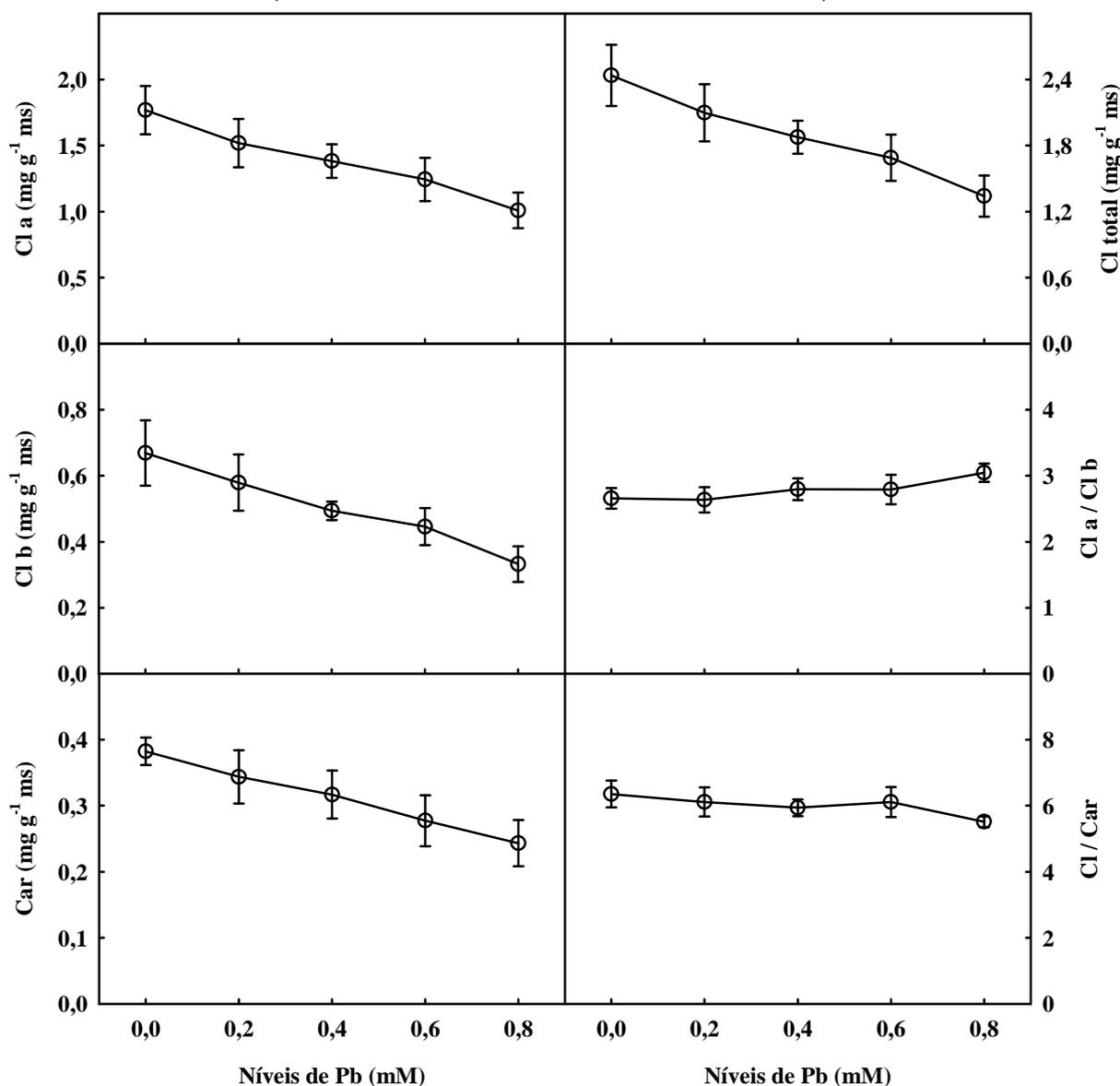


Figura 2: Teores de clorofila *a* (Cla), clorofila *b* (Clb), carotenóides (Car), clorofila total (Clt) e razões clorofila *a*/clorofila *b* (Cla/Clb) e clorofilas/carotenóides (Cl/Car) de plantas de girassol após 16 dias de cultivo em casa de vegetação sob diferentes níveis de Pb(NO₃)₂ na solução nutritiva. Média de quatro repetições e respectivos desvios-padrões.

AKINCI et al. (2010) também verificaram em seu trabalho redução dos teores das clorofilas *a* e *b* em plantas de tomate pelo aumento dos níveis de chumbo. Em relação aos carotenóides, SOUZA et al. (2011b) não observaram alterações no teor destes pigmentos em *Stizolobium aterrimum* pela adição de doses crescentes de Pb associado a fungos micorrízicos ao solo. Neste trabalho, os teores de carotenóides foram menos afetados pelo estresse por Pb que os de clorofilas, indicando uma maior preservação do mecanismo de dissipação do excesso de energia luminosa. Estas moléculas também podem atuar como agentes antioxidantes protegendo os lipídios de membrana do estresse oxidativo gerado nas plantas sob estresse (AZEVEDO NETO et al., 2008; FALK & MUNNÉ-BOSCH, 2010).

CONCLUSÕES

O girassol apresenta tolerância à toxidez por chumbo até 0,6 mM Pb na solução nutritiva, podendo ser utilizado para cultivo em solos cuja contaminação por este metal pesado não exceda este limite.

A redução dos teores de pigmentos pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento do girassol sob estresse por Pb.

AGRADECIMENTOS

CAPES e à UFRB pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

AKINCI, I.E.; AKINCI, S.; YILMAZ, K. Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. **African Journal of Agricultural Research**, v.5, p.416-423, 2010.

- AZEVEDO NETO, A.D.; GOMES-FILHO, E.; PRISCO, J.T. Salinity and oxidative stress. In: Khan, N.A. and Singh, S. (ed.) Abiotic stress and plant responses. **I K International**, New Delhi, India, p.57-82, 2008.
- BHATTI, K.H.; ANWAR, S.; NAWAZ, K.; HUSSAIN, K.; SIDDIQI, E.H.; SHARIF, R.U.; TALAT, A.; KHALID, A. Effect of Heavy Metal Lead (Pb) Stress of Different Concentration on Wheat (*Triticum aestivum* L.). **Middle-East Journal of Scientific Research**, v.14, p.148-154, 2013.
- CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V.B.R.; BALLA, A.; LEITE, R.M.B.V.C.; KARAM, D.; MELLO, H.C.; GUEDES, L.C.A.; FARIAS, J.R.B. **A cultura do girassol**. Londrina: EMBRAPA, CNPSo. (Circular técnica, 13), 38p, 1997.
- DRAZKIEWICZ, M. Chlorophyll-ocurrence, functions, mechanisms of action and external factors. **Photoynthetica**, v.30, p.321-331, 1994.
- FALK, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Tocochromanol functions in plants: antioxidation and beyond. **Journal of Experimental Botany**, v.61, p.1549-1566, 2010.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR 4.6 sistema de análises estatísticas**. Lavras: UFLA, 2003.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water-cultured method for growing plants without soil**. California Agricultural Experiment Station, 32p, 1950.
- HORIE, Y.; ITO, H.; KUSABA, M.; TANAKA, R.; TANAKA, A. Participation of Chlorophyll *b* Reductase in the Initial Step of the Degradation of Light-harvesting Chlorophyll *a/b*-Protein Complexes in *Arabidopsis*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.284, n.26, p.17449-17456, 2009.
- KEDE, M.L.F.; MOREIRA, J.; MAVROPOULOS, E.; ROSSI, A.M.; BERTOLINO, L.C.; PEREZ, D.V.; ROCHA, N.C.C. Estudo do comportamento do chumbo em latossolos brasileiros tratados com fosfatos: contribuições para a remediação de sítios contaminados. **Química Nova**, v.31, p.579-584, 2008.
- LAMHAMDI, M.; GALIOU, O.E.L.; BAKRIM, A.; NÓVOA-MUÑOZ, J.C.; ARIAS-ESTÉVES, M.; AARAB, A.; LAFONT, R. Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.20, p.29-36, 2013.

- LICHTENTHALER, H.K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, F.4.3.1-4.3.8, 2001.
- LIMA, F.S.; NASCIMENTO, C.W.A.; ACCIOLY, A.M.A; SOUSA, C. SILVA; FILHO, F.F.C. Bioconcentração de chumbo e micronutrientes em hortaliças cultivadas em solo contaminado. **Revista Ciência Agronômica**, v.44, p.234-241, 2013.
- MACEDO, L.S.; MORRIL, W.B.B. Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: Revisão de Literatura. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.2, p.29-38, 2008.
- MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados**: mitos, mistificação e fatos. São Paulo: Petroquímica, 1994, 153p.
- MERWE, M.J.V.D.; OSORIO, S.; MORITZ, T.; NESI-NUNES, A.; FERNIE, A.R. Decreased mitochondrial activities of malate dehydrogenase and fumarase in tomato lead to altered root growth and architecture via diverse mechanisms. **Plant Physiology**, v.149, p.653-669, 2009.
- PEREIRA, M.P.; PEREIRA, F.J.; RODRIGUES, L.C.A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E.M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. **Revista Agro@mbiente On-line**, v.7,p.36-43, 2013.
- PETERS, R.W.; SHEM, L. Treatment of Soil Contaminated with heavy metals. In: ALLEN, H.E.; HUANG, C.P.; BAILEY, G.W.; BOWERS, A.R. (Eds.), **Metal speciation and contamination of soil**. CRC Press, Boca Roton, Florida, pp.255-274, 1995.
- RASKING, I.; ENSLEY, B. Phytoremediation of toxic metals – using plants to clean up the environment. **Plant Science**, v.160, p.1073-1075, 2000.
- SHARMA, P.; DUBEY, R.S. Lead toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17, p. 35-52, 2005.
- SHEPPARD, M.I.; THIBAUT, D.H. Desorption and extraction of selected heavy metal from soils. **Soil Science Society American Journal**, v.56, p.415-423, 1992.

- SHIMODA, Y.; ITO, H.; TANAKA, A. Conversion of chlorophyll *b* to chlorophyll *a* precedes magnesium dechelation for protection against necrosis in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.72, p.501-511, 2012.
- SIDDIQUI, S. Lead induced genotoxicity in *Vigna mungo* var. HD-94. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v.11, p.107-112, 2012.
- SOUZA, E.P.; SILVA, I.F.; FERREIRA, L.E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. **Revista Brasileira Agrociência**, v.17, p.167-173, 2011a.
- SOUZA, L.A.; ANDRADE, S.A.L.; SOUZA, C.R.S; SCHIAVINATO, M.A. Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.35, p.1441-1451, 2011b.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013, 954p.
- VODNIK, D.; JENTSCHKE, G.; FRITZ, E.; GOGALA, N.; GODBOLD, D.L. Root-applied cytokinin reduces lead uptake and affects its distribution in Norway spruce seedlings. **Physiologia Plantarum**, v.106, p.75-81, 1999.
- XIONG, Z.-T.; ZHAO, F.; LI, M.-J. Lead toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr.: Effect on nitrate assimilation and growth. **Environmental Toxicology**, v.21, p.147-153, 2006.
- YONGSHENG, W.; QIHUI, L.; QIAN, T. Effect of Pb on growth, accumulation and quality component of tea plant. **Procedia Engineering**, v.18, p.214-219, 2011.

CAPÍTULO 2

DISTÚRBIOS NUTRICIONAIS E BIOQUÍMICOS INDUZIDOS POR Pb EM GIRASSOL

(Cópia do artigo a ser enviado ao periódico Semina, obedecendo as normas deste periódico, excetuando-se a fonte e o espaçamento).

Distúrbios nutricionais e bioquímicos induzidos por Pb em girassol

Disorders nutrition and biochemical induced by Pb in sunflower

Claudia Brito de Abreu^{1*}; André Dias de Azevedo Neto².

Resumo

O presente trabalho objetivou avaliar os efeitos de doses crescentes de chumbo na solução nutritiva sobre o crescimento e teores de macronutrientes e solutos orgânicos em plantas de girassol, em casa de vegetação. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. A produção de massa seca não foi afetada até o tratamento de 0,6 mM indicando que o girassol é tolerante até esta concentração de Pb no meio de cultivo. As reduções nas massas secas das folhas, caule e raízes foram de 74, 84 e 85%, respectivamente. O estresse por Pb não reduziu os teores de N, P e K, indicando que a redução do crescimento induzida pelo Pb não pode ser atribuída às deficiências destes nutrientes. Por outro lado, o Pb reduziu significativamente os teores de cálcio e magnésio nas folhas, caule e raízes, o que pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento induzida pelo Pb nas plantas de girassol. O Pb aumentou os teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres e prolina nas folhas e os de proteínas solúveis e de prolina nas raízes, evidenciando as alterações no metabolismo celular decorrentes do estresse. Os dados também sugerem que os teores de cálcio e magnésio podem ser utilizados como indicadores nutricionais e os de prolina como indicador bioquímico da toxidez por Pb em girassol.

Palavras-chave: Metal pesado, *Helianthus annuus*, nutrição mineral, solutos orgânicos.

¹ Mestranda em Solos e Qualidade de Ecossistemas do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; Cruz das Almas – BA- Brasil. E-mail:claudia01abreu@yahoo.com.br

² Professor Doutor do Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Brasil. E-mail: andre@ufrb.edu.br

*Autor para correspondência

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of increasing doses of lead in the nutrient solution on growth and macronutrient and organic solute contents in sunflower plants. The experimental design was a completely randomized with four replications. The dry mass yield was not affected up to the treatment of 0.8 mM Pb, indicating that sunflower is tolerant to this Pb concentration in the growth media. The reductions in leaves, stems and roots dry masses were 74, 84 and 85%, respectively. Lead stress did not reduce the levels of N, P and K, indicating that the growth reduction in 0.8 mM Pb treatment can not be attributed to deficiencies of these nutrients. On the other hand, Pb significantly reduced the calcium and magnesium contents in leaves, stems and roots, which may, at least in part, explain the Pb-induced growth reduction in sunflower plants. The Pb increased the soluble carbohydrates, free amino acids and proline contents in leaves, and soluble proteins and proline contents in the roots, showing the stress-induced changes in cell metabolism. The data also suggest that the calcium and magnesium concentrations may be used as nutritional indicators and proline content as biochemical indicators Pb toxicity in sunflower.

Key words: Heavy metal, *Helianthus annuus*, mineral nutrition, organic solutes.

Introdução

Poluição por metais pesados tornou-se um dos problemas ambientais mais importantes em todo o mundo. Poluentes metálicos são particularmente difíceis de remediar a partir do solo, da água e ar porque, ao contrário de poluentes orgânicos que podem ser degradado tornando pequenas moléculas inofensivas, elementos tóxicos, tais como chumbo, mercúrio, cádmio, cobre e zinco, são imutável por reações bioquímicas (MALAR et al., 2014). Os metais pesados são definidos como aqueles que têm densidades superiores a 5 g cm^{-3} (GASIC e KORBAN, 2006).

Dependendo do seu estado de oxidação, os metais pesados podem ser altamente reativos, resultando em toxicidade na maioria dos organismos (GASIC e KORBAN, 2006).

O excesso de chumbo nas plantas pode causar diversos sintomas de toxicidade, como a redução do crescimento, clorose, escurecimento do sistema radicular, inibição da fotossíntese e alteração nas concentrações de nutrientes minerais, dentre outros (SHARMA e DUBEY, 2005). O resultado da intoxicação pode ser devido à ação do poluente, inibindo a atividade celular ou rompendo a estrutura da célula devido à sua interferência sobre um elemento essencial (COUTINHO e BARBOSA, 2007). As respostas ao estresse variam amplamente dependendo das características intrínsecas da espécie, do elemento responsável e das condições ambientais (SOUZA et al., 2011).

O Pb em altas concentrações substitui no solo elementos como potássio e cálcio em aluminossilicatos, em especial feldspatos, e metais em sulfetos (BOSSO e ENZWEILER, 2008). Mesmo o solo contendo grandes quantidades de metais, a sua absorção pelas plantas é influenciada principalmente por sua fração biodisponível (VAMERALI et al., 2010), a qual ocorre na forma bivalente (Pb^{2+}) e por mecanismo passivo (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 2000).

Na exploração das culturas alimentares e econômicas são de grande importância a determinação e o conhecimento da toxicidade dos metais pesados no solo, na planta e no homem (MACÊDO e MORRIL, 2008). Neste contexto, destaca-se a cultura do girassol (*Helianthus annuus* L.) que é uma dicotiledônea anual pertencente à família Compositae e originária do continente Norte Americano. Apresenta características agrônômicas importantes, como tolerância a altas e baixas

temperaturas e adaptação às diferentes condições edafoclimáticas (CASTRO et al., 1997).

A produção mundial do grão de girassol vem crescendo nos últimos anos, tendo alcançado em 2013/14 a faixa de 42,9 milhões de toneladas. Isto se deve às características especiais da semente e do óleo com diversas aplicações na formulação de produtos alimentícios. No Brasil, na safra 2013/14 a área cultivada foi de 145,7 mil hectares com uma produção de 232,7 mil toneladas (CONAB, 2014). A planta possui aproveitamento integral, podendo ser utilizada como forragem, silagem e adubo verde (EVANGELISTA e LIMA, 2001).

Íons de metais pesados são tóxicos às plantas ao nível μM e podem induzir uma série de alterações fisiológicas e bioquímicas, tais como distúrbios nas funções das membranas, na atividade enzimática, no balanço hormonal, na nutrição mineral, na fotossíntese, na translocação e nas relações hídricas, as quais levam à redução do crescimento induzida pelo metal (POSCHENRIEDER e BARCELÓ, 2006).

Assim, diversos autores têm reportado alterações nos teores de macronutrientes (Huang e Cunningham, 1996; Paiva et al., 2002; Paiva et al., 2003; Kibria et al., 2009; Akinci et al., 2010; Bertoli et al., 2011; Lamhamdi et al., 2013; Augusto et al., 2014) e de solutos orgânicos (Bhardwaj et al., 2009; Lamhamdi et al., 2013) em plantas cultivadas na presença de Pb. Entretanto, as pesquisas com girassol que buscam relacionar os danos ocasionados pelo chumbo nos processos fisiológicos e bioquímicos, ainda são escassas.

Dessa forma, o presente trabalho objetivou avaliar o efeito de concentrações crescentes de chumbo (Pb) sobre o crescimento, teores de macronutrientes e solutos orgânicos em plantas de girassol, com vistas a um melhor entendimento dos efeitos nutricionais e bioquímicos do Pb sobre esta cultura.

Material e Métodos

Condições de crescimento e tratamentos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas na UFRB, Campus de Cruz das Almas/BA no período de abril a maio de 2013.

Foram utilizadas plantas de girassol, genótipo Olisun-05. As mudas foram produzidas a partir de sementes, em copos plásticos de 200 mL, utilizando-se como substrato areia lavada irrigada diariamente com água destilada. Decorridos 12 dias

da emergência, as plântulas foram transferidas para bacias plásticas contendo 12 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) e sob aeração constante, onde permaneceram por 5 dias, para efeito de aclimatação. Após este período, foram aplicados os tratamentos, os quais consistiram de cinco diferentes concentrações de chumbo na solução nutritiva (0; 0,2; 0,4; 0,6 ou 0,8 mmol $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2 \text{ L}^{-1}$), com quatro repetições. O experimento foi realizado em duplicata com a finalidade de se obter amostras para as análises bioquímicas e para as análises de crescimento. O chumbo aplicado na solução nutritiva foi quelado com EDTA, a fim de evitar sua precipitação com sulfato e fosfato. Os níveis das soluções foram completados diariamente com água destilada e o pH mantido em 5,5 ($\pm 0,5$), com a adição de NaOH ou HCl.

Após 16 dias de estresse, amostras de folhas e raízes de quatro plantas foram coletadas, imediatamente congeladas e, em seguida liofilizadas para as análises bioquímicas. As quatro plantas restantes foram coletadas e separadas em folhas, caules e raízes, colocadas em sacos de papel devidamente identificados e levadas para secagem em estufa com circulação forçada de ar a 65° C por 72 h, para determinação das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR) em balança semi-analítica. Em seguida, o material vegetal foi triturado para realização das análises de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e chumbo (Pb).

Preparo dos extratos e análises nutricionais e bioquímicas

Os extratos usados para determinação dos teores de nutrientes foram preparados por digestão ácida em uma mistura de 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) e 3 mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30%, conforme descrito em Jones (2001). Em seguida, o digerido foi diluído para 100 mL com água desionizada para realização das análises de N, P, K, Ca, Mg e Pb.

Os teores de N foram determinados pelo método espectrofotométrico do fenol-hipoclorito (WEATHERBURN, 1967) o de P pelo método espectrofotométrico do molibdo-vanadato (FAITHFULL, 2002), o de K por fotometria de chama (FAITHFULL, 2002) e os teores de Ca, Mg e Pb por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES, Varian VISTA-PRO Simultaneous).

Os extratos utilizados para análises bioquímicas foram preparados macerando-se, em almofariz cerca de 1,0 g de tecidos frescos de folhas e raízes, em 5 mL de

tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, contendo EDTA 0,1 mM. O homogeneizado foi filtrado em tecido de náilon de malha fina e centrifugado a 12000 rpm x g por 15 min. O sobrenadante foi armazenado em ultra freezer (-80 °C) e utilizado para as determinações de carboidratos solúveis, prolina livre, aminoácidos livres e proteínas solúveis.

O teor de carboidratos solúveis foi identificado por espectrofotometria a 490 nm pelo método do fenol-ácido sulfúrico, utilizando-se a D-(+)-glucose como padrão (DUBOIS et al., 1956). A prolina livre foi determinada por espectrofotometria a 520 nm, utilizando-se a ninhidrina como reagente específico e a prolina pura como padrão (BATES et al., 1973). Os aminoácidos livres totais foram determinados por espectrofotometria a 570 nm pelo método da ninhidrina, utilizando-se a L-leucina pura como padrão (YEMM e COCKING, 1955). As proteínas solúveis foram determinadas por espectrofotometria a 595 nm pelo método de ligação ao corante, utilizando-se a albumina de soro bovino pura como padrão (BRADFORD, 1976).

Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise da variância ($p < 0,05$) e, em caso de significância, foi realizado o estudo de regressão, utilizando o programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2003).

Resultados e Discussão

Crescimento

A produção de massa seca em todas as partes das plantas de girassol permaneceu inalterada até a concentração 0,6 mM de Pb, entretanto diminuiu abruptamente no tratamento de 0,8 mM de Pb. Dessa forma, foram observadas reduções na MSF, MSC e MSR de 74, 84 e 85%, respectivamente (Tabela 1). Comparando com os demais órgãos da planta, a raiz foi o órgão que apresentou a maior redução de massa seca induzida pelo estresse por Pb. A redução no crescimento radicular pode afetar o crescimento de toda a planta por restringir a absorção de água e nutrientes (PEREIRA et al., 2013).

Tabela 1. Produção das massas secas das folhas (MSF), caule (MSC) e raízes (MSR) de plantas de girassol após 16 dias de cultivo em casa de vegetação sob diferentes níveis de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ na solução nutritiva.

Níveis (mM de Pb)	MSF	MSC	MSR
0,0	3,995 ± 0,811 (0)	2,832 ± 0,160 (0)	2,443 ± 0,463 (0)
0,2	3,649 ± 0,283 (9)	2,599 ± 0,150 (8)	1,827 ± 0,248 (25)
0,4	3,458 ± 0,494 (13)	2,383 ± 0,432 (16)	1,766 ± 0,482 (28)
0,6	3,647 ± 0,221 (9)	2,605 ± 0,253 (8)	1,965 ± 0,116 (20)
0,8	1,054 ± 0,225 (74)	0,455 ± 0,098 (84)	0,372 ± 0,069 (85)

Médias de quatro repetições e respectivos desvios-padrões. Valores entre parênteses representam a percentagem de redução em relação ao controle.

Teores de Chumbo

A Figura 1 mostra que as concentrações de Pb aumentaram linearmente nas folhas e raízes e de forma quadrática no caule, com o incremento de chumbo no meio de cultivo. A concentração de Pb nas folhas de girassol variou de 0,067 mmol g^{-1} ms ($\text{Pb}_{0,0}$) a 5,22 mmol g^{-1} ms ($\text{Pb}_{0,8}$); no caule variou de 0,5144 mmol g^{-1} ms ($\text{Pb}_{0,0}$) a 5,55 mmol g^{-1} ms ($\text{Pb}_{0,66}$); nas raízes essa variação foi de 1,7376 mmol g^{-1} ms ($\text{Pb}_{0,0}$) a 20,18 mmol g^{-1} ms ($\text{Pb}_{0,8}$). Dessa forma, as equações indicam que os teores de Pb nas folhas, e raízes expostas a 0,8 mM de Pb foram, respectivamente, 76 e 11 vezes mais elevados que as observadas no controle. No caule, a maior concentração foi estimada na dose de 0,66 mM de Pb, correspondendo a um aumento de 9,78 vezes em relação ao controle. Comparando os teores de Pb entre as diferentes partes da planta, também pode-se observar que os teores nas raízes foram cerca de 3 vezes maiores que os do caule e das folhas.

O maior acúmulo de Pb nas raízes que nas demais partes da planta, sugere que as raízes desempenham um papel importante no armazenamento extra de chumbo (AZAD et al., 2011). Tem sido demonstrado que o chumbo pode aderir à parede de células das raízes, especialmente na forma de pirofosfato (MARSCHNER, 2012). O acúmulo de chumbo nas raízes é considerado um fator que aumenta a tolerância das plantas contra a toxicidade por Pb, pois impede a transferência do metal das raízes para as folhas (AZAD et al., 2011). Neste trabalho, também pôde-se observar que a concentração de Pb no caule apresentou uma tendência de estabilização a

partir do tratamento de 0,2 mM de Pb, indicando uma saturação do mecanismo de retenção de Pb no caule e, conseqüentemente, uma capacidade finita deste órgão para atuar como reservatório do metal, impedindo seu transporte até as folhas.

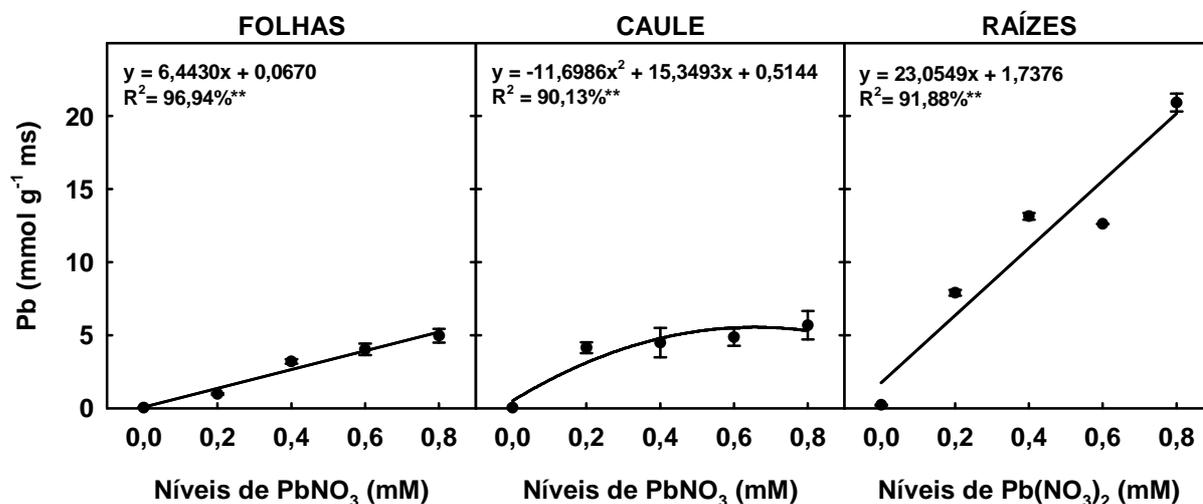


Figura 1. Teores de chumbo (Pb) em folhas, caule e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de $Pb(NO_3)_2$. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$.

O maior acúmulo Pb nas raízes em relação à parte aérea também foi reportado por Romeiro et al. (2007) em plantas de feijão de porco e por Andrade et al. (2009) em grama batatais. Em geral, a concentração aparente de Pb na parte aérea das plantas diminui à medida que a distância a partir da raiz aumenta. Isto ocorre devido a uma maior localização de Pb na parede celular da raiz do que em outras partes da planta, demonstrando o transporte limitado do chumbo devido à barreira da endoderme da raiz (SHARMA e DUBEY, 2005).

Macronutrientes (N, P, K, Ca e Mg)

A Figura 2 mostra os teores de macronutrientes (N, P e K) nas folhas, caules e raízes das plantas de girassol em função das doses de chumbo aplicadas em solução nutritiva.

Pode-se observar na equação de regressão que o cultivo na presença de Pb não causou alterações substanciais nos teores de N nas diferentes partes das plantas (Figura 2). Como é sabido, o N serve como constituinte de diversos componentes da

célula vegetal, incluindo aminoácidos, ácidos nucleicos e clorofilas (TAIZ e ZEIGER, 2013). Este nutriente é absorvido pelas raízes na forma de nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+), sendo preferencial a absorção na forma aniônica (nitrato). Considerando que a relação $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ na solução de Hoagland é 14:1 e que o chumbo é absorvido na forma catiônica, é provável que a ausência de alterações nas concentrações de N observadas nesse trabalho, resultam da ausência de competição desse nutriente com o metal tóxico. Isso, pode ser a causa da escassa informação na literatura a respeito das alterações nos teores de N em plantas cultivadas em presença de Pb.

As concentrações de P nas folhas e caules aumentaram quadraticamente com o aumento de chumbo na meio de cultivo (Figura 2). Dessa forma, as equações indicam que os teores deste nutriente nas folhas e caules das plantas expostas a 0,8 mM de Pb foram de 87 e 67%, respectivamente, mais elevados que os do controle. Este aumento da concentração de P em conjunção com a redução do crescimento indica um efeito de concentração deste nutriente nos tecidos da parte aérea (IMO, 2012). Em contraste, a simulação matemática indica que os teores de P nas raízes das plantas submetidas à maior dose de Pb, diminuíram 8% (Figura 2), sugerindo que o estresse por Pb não afetou a translocação deste nutriente das raízes para a parte aérea em plantas de girassol. Resultados contrários foram reportados por Huang e Cunningham (1996) em *Ambrosia artemisiifolia*, por Paiva et al. (2003) em mudas de ipê-roxo e também por Bertoli et al. (2011) em tomateiro os quais reportaram que a concentração de P nas raízes aumentou com a aplicação de Pb.

Tem sido sugerido que o aumento dos teores de P nas raízes é decorrente da precipitação do Pb, formando sais insolúveis com o fosfato (complexo Pb-P), uma forma de Pb não disponível para a translocação das raízes para a parte aérea (HUANG e CUNNINGHAM, 1996). A formação desse complexo é esperada, pela tendência de combinação do Pb^{2+} com ânions H_2PO_4^- , forma predominante de absorção do P (KABATA-PENDIAS e PENDIAS, 2001). Neste trabalho, o fato dos teores de P nas raízes não ter aumentado pode ser explicado devido o chumbo ter sido aplicado quelado com EDTA, evitando a sua precipitação com o fósforo na forma de fosfato de chumbo.

O estresse de 0,8 mM de Pb aumentou significativamente os teores de K em todas as partes das plantas de girassol, sendo este efeito mais pronunciado nas raízes. Nas folhas os aumentos ocorreram de forma linear e um comportamento quadrático foi observado no caule e nas raízes. Dessa forma, na maior concentração de Pb, as

equações indicam aumentos de 31, 17 e 65% nos teores de K das folhas, caules e raízes, respectivamente, em comparação ao controle. Os dados desse trabalho indicam que o aumento nos teores de K é o resultado de um efeito de concentração (IMO, 2012), haja vista a grande redução do crescimento neste tratamento. Aumentos nos teores de K em dois genótipos de *Amaranthus* cultivados em presença de concentrações elevadas de Pb também foram reportados por Kibria et al. (2009).

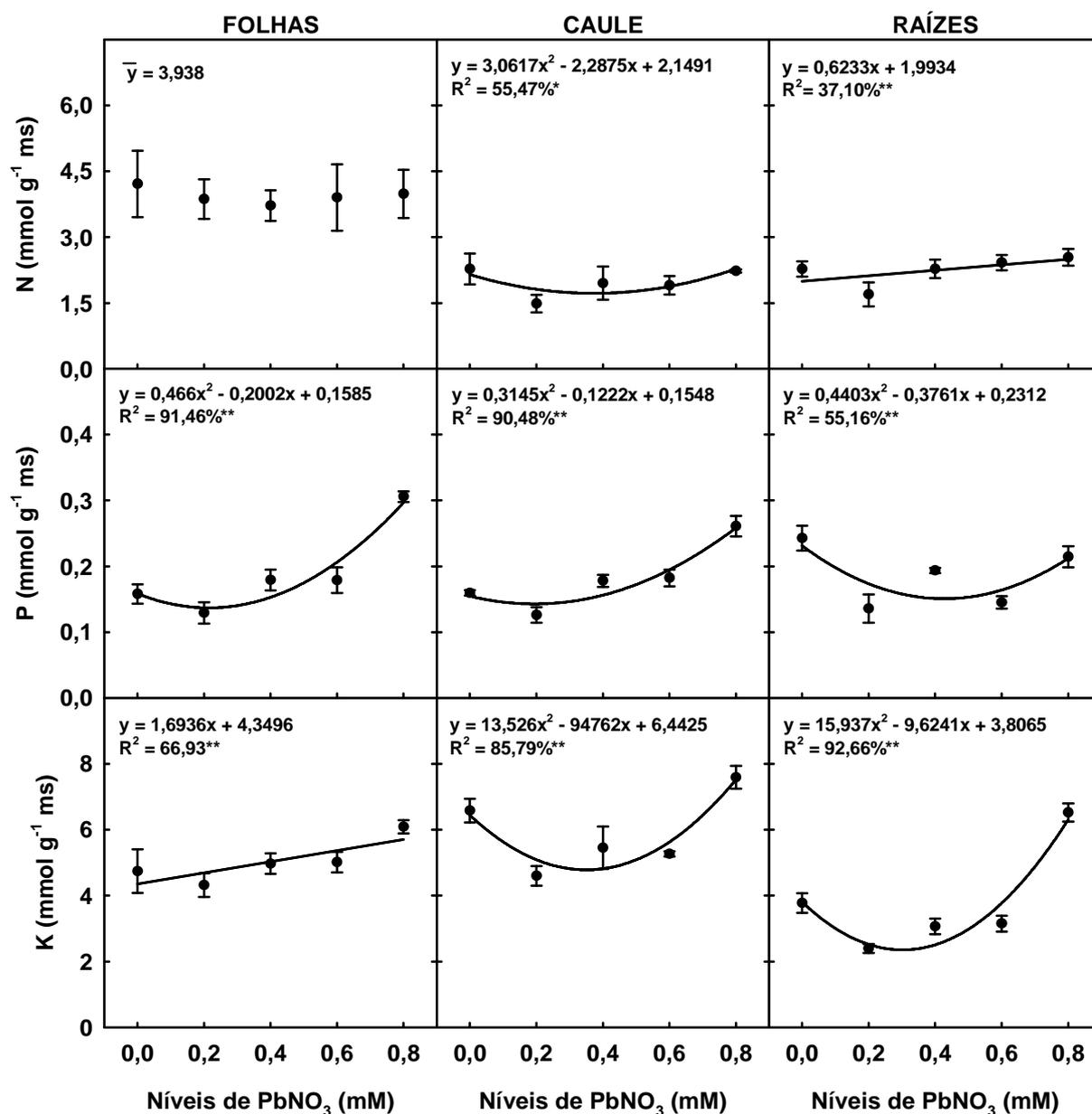


Figura 2. Teores de nitrogênio (N), fósforo (P), e potássio (K) em folhas, caule e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de $Pb(NO_3)_2$. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$.

Considerando que o estresse por Pb não afetou a absorção e a translocação de N, P e K, os dados desse trabalho indicam que a redução do crescimento induzida por este metal tóxico no tratamento de 0,8 mM Pb não pode ser atribuída às alterações nas concentrações destes elementos nas diferentes partes das plantas.

Na Figura 3 pode-se observar que o cultivo na presença de até 0,6 mM Pb não causou alterações nos teores de Ca nas diferentes partes das plantas. Só foram observadas reduções de 21 e 28%, nas folhas e caules respectivamente, no tratamento de 0,8 mM, apresentando resposta quadrática negativa.

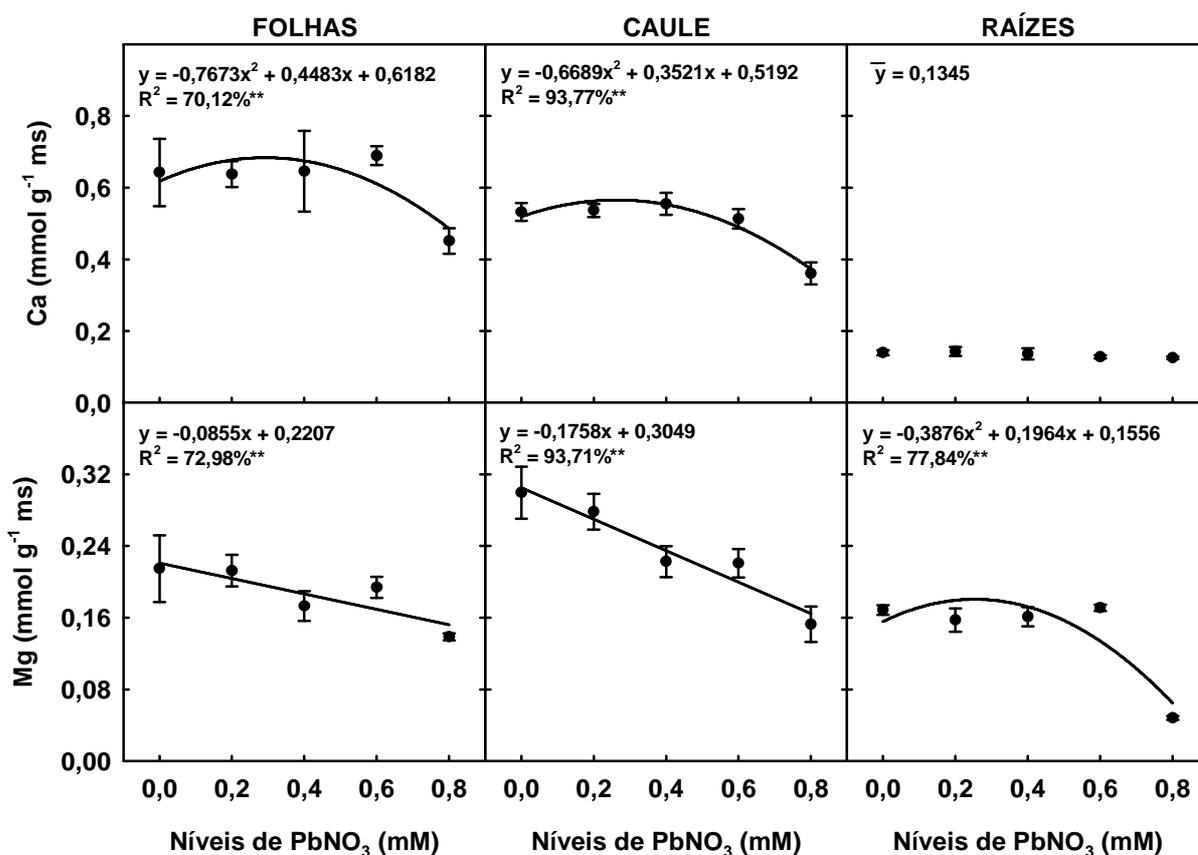


Figura 3. Teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) em folhas, caule e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de $Pb(NO_3)_2$. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$.

Huang e Cunningham (1996) observaram que 20 μM de Pb reduziu em 12% a concentração de cálcio nas raízes e em mais de 40% na parte aérea de plantas de milho. Entretanto, nenhum efeito foi verificado em *Ambrosia artemisiifolia*. A aplicação de 288 μM de Pb reduziu em 35,6 e 18,2%, respectivamente, os teores de Ca nas raízes e nas folhas de mudas de cedro (Paiva et al., 2002), mas não afetou os teores desse nutriente nas raízes e no caule de mudas de ipê-roxo (Paiva et al.,

2003). Azad et al. (2011) trabalhando com mudas de girassol, observaram que houve uma diminuição de Ca nas folhas por aumento das doses de Pb. Augusto et al. (2014) relataram que o teor de Ca nas doses mais baixa de Pb foi afetado significativamente nas raízes e nas folhas de plantas de mostarda. Małkowski et al. (2005) observaram que a maior absorção de Ca foi verificado com o aumento da acumulação de Pb nas extremidades das raízes de milho.

Distúrbios no metabolismo do Ca são provocados pela toxicidade de Pb nas plantas (BERGMANN, 1992). Segundo Marschner (2012), cátions divalentes como Pb podem competir com outros cátions, como o Ca. A inibição do canal de cálcio pelo Pb poderia surgir do bloqueio do canal ou devido ao transporte competitivo do Pb (SHARMA e DUBEY, 2005; MARSCHNER, 2012). Independentemente da causa, os dados desse trabalho indicam que, em girassol, o efeito deletério do Pb sobre a nutrição do Ca só ocorreu a partir de 0,6 mM de Pb.

O cálcio é um elemento fundamental na manutenção da integridade celular, pois como um íon divalente o Ca tanto forma complexos intramoleculares como liga moléculas em complexos intermoleculares (PILBEAM e MORLEY, 2007). Ele também é necessário na formação do fuso mitótico durante a divisão celular e na síntese de novas paredes celulares em células recém divididas. Ele também é necessário para a integridade física e função normal das membranas e, mais recentemente, tem sido considerado como um mensageiro secundário para várias respostas das plantas aos sinais hormonais e ambientais (HOPKINS e HÜNER, 2009; TAIZ e ZEIGER, 2013). Os dados desse trabalho sugerem que a redução dos teores de Ca^{+2} pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento induzida pelo Pb nas plantas de girassol.

O teor de magnésio nas folhas e nos caules diminuiu linearmente com o incremento de Pb na solução nutritiva, de forma que, no tratamento de 0,8 mM Pb os teores desse nutriente foram 31 e 46% menores que os do controle (Figura 3). Nas raízes, os teores de Mg apresentaram um comportamento quadrático negativo, diminuindo drasticamente (58%) apenas no tratamento de 0,8 mM Pb. Esta redução dos teores de Mg pode estar relacionada com as reduções nas concentrações das clorofilas *a* e *b* observados no capítulo 1.

Semelhante ao observado neste trabalho, o tratamento com concentrações inferiores a 0,3 mM de Pb não afetou os teores de Mg nas raízes de mudas de ipê-roxo (Paiva et al., 2003). Huang e Cunningham (1996) observaram que o Pb reduziu

a concentração de Mg na parte aérea de plantas de milho e de *Ambrosia artemisiifolia*. Lamhamdi et al. (2013) verificaram que concentrações maiores que 1,5 mM de Pb diminuíram significativamente os teores de Mg na parte aérea e raízes de mudas de trigo e espinafre.

Nas células vegetais, os íons Mg têm um papel específico na ativação da maioria das enzimas envolvidas na respiração, fotossíntese e síntese de DNA e RNA (TAIZ e ZEIGER, 2013). Em adição, ele possui papel estrutural na molécula de clorofila, na estabilização de proteínas, ribossomos, ácidos nucleicos e membranas e é crítico nas reações envolvendo o ATP (HOPKINS e HÜNER, 2009). Visto que o Mg é um componente integral das clorofilas e dos processos enzimáticos do metabolismo energético, sua nutrição inadequada interfere diretamente na assimilação de carbono e nas transformações de energia (MERHAUT, 2007). Considerando que ambos, o crescimento e os teores de Mg foram afetados pela presença do Pb no meio de cultivo, as reduções nos teores de Mg em todas as partes das plantas indicam um efeito de antagonismo entre Mg e o Pb nos sítios de absorção (IMO, 2012). Dessa forma, é provável que a redução nos teores desse nutriente induzida pelo Pb tenha sido um importante fator afetando o metabolismo das plantas de girassol e, conseqüentemente, reduzindo seu crescimento.

Solutos orgânicos

As variações nos teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres, proteínas solúveis e prolina livre nas folhas e raízes são apresentadas na Figura 4.

Os teores de carboidratos solúveis apresentaram resposta quadrática positiva nas folhas, aumentando 42% apenas no nível 0,8 mM de Pb. Nas raízes não foi observado efeito do Pb nos teores destes compostos. Os aminoácidos livres aumentaram linearmente nas folhas e diminuíram linearmente nas raízes. Dessa forma, no nível 0,8 mM de Pb as equações indicam um aumento de 76% nos teores destes compostos nas folhas e uma redução de 28% nas raízes. As proteínas solúveis nas folhas apresentaram um comportamento quadrático. Assim, no nível 0,8 mM de Pb foi observado uma redução de 42%, em contraste com as raízes onde o incremento de Pb proporcionou um aumento linear de aproximadamente 10 vezes nas proteínas solúveis em relação ao controle. Os teores de prolina livre aumentaram quadraticamente nas folhas e raízes. Dessa forma, nas folhas e raízes

das plantas do tratamento de 0,8 mM Pb, os teores de prolina foram, respectivamente, cerca de 80 e 1,5 vezes mais elevados que nas controle.

Vários estudos têm reportado a redução no conteúdo de água dos tecidos em plantas cultivadas na presença de chumbo (PATRA et al. 2004; SHARMA e DUBEY, 2005). Nesse cenário, a exposição a íons metálicos potencialmente tóxicos induz o ajustamento osmótico, principalmente devido ao acúmulo de carboidratos solúveis (COSTA e SPITZ, 1997) e aminoácidos livres (BHARDWAJ et al., 2009). Neste trabalho, o aumento nos teores foliares dos carboidratos solúveis, aminoácidos livres e prolina induzido pelo estresse sugere, então, um mecanismo de ajustamento osmótico resultante da diminuição na disponibilidade hídrica induzida pelo estresse de Pb. Em contraste, a observação que os teores desses solutos não aumentaram nas raízes pode ter limitado a absorção de água e seu fluxo para a parte aérea, comprometendo o balanço hídrico nos tratamentos de estresse.

O aumento da concentração de aminoácidos livres nas folhas também sugere um mecanismo de desintoxicação através da quelação do metal pesado por estes compostos. Os quelantes contribuem para a desintoxicação, aumentando a tolerância das plantas aos níveis tóxicos dos íons metálicos (GASIC e KORBAN, 2006) e já está bem estabelecido que os aminoácidos podem ser mobilizados em resposta à toxidez de Pb para formar complexos com este metal (MAESTRI et al., 2010; POURRUT et al., 2011; MANARA, 2012).

A observação que o aumento na concentração de aminoácidos livres nas folhas ocorreu concomitantemente ao decréscimo na concentração de proteínas solúveis sugere a ocorrência de proteólise induzida pelo estresse por Pb. Bhardwaj et al. (2009) também reportaram que o aumento de Pb e Cd diminuiu as proteínas solúveis nas folhas de *Phaseolus vulgaris*. Por outro lado, nas raízes o aumento das proteínas solúveis ocorreu paralelamente à diminuição nos aminoácidos livres, sugerindo que, nesta parte da planta, houve um incremento da síntese protéica. Considerando-se que as raízes estão diretamente expostas ao contaminante, é provável que este aumento seja o resultado da indução das proteínas do estresse (LAMHAMDI et al., 2010). Neste contexto, podem ser incluídas as fitoquelatinas e as metalotioneínas, importantes classes de peptídeos quelantes de metais pesados nas plantas (POURRUT et al., 2011; MANARA, 2012). O estresse por Pb também aumentou os teores de proteínas, incluindo as fitoquelatinas, em *Ceratophyllum demersum* L. (MISHRA et al., 2006).

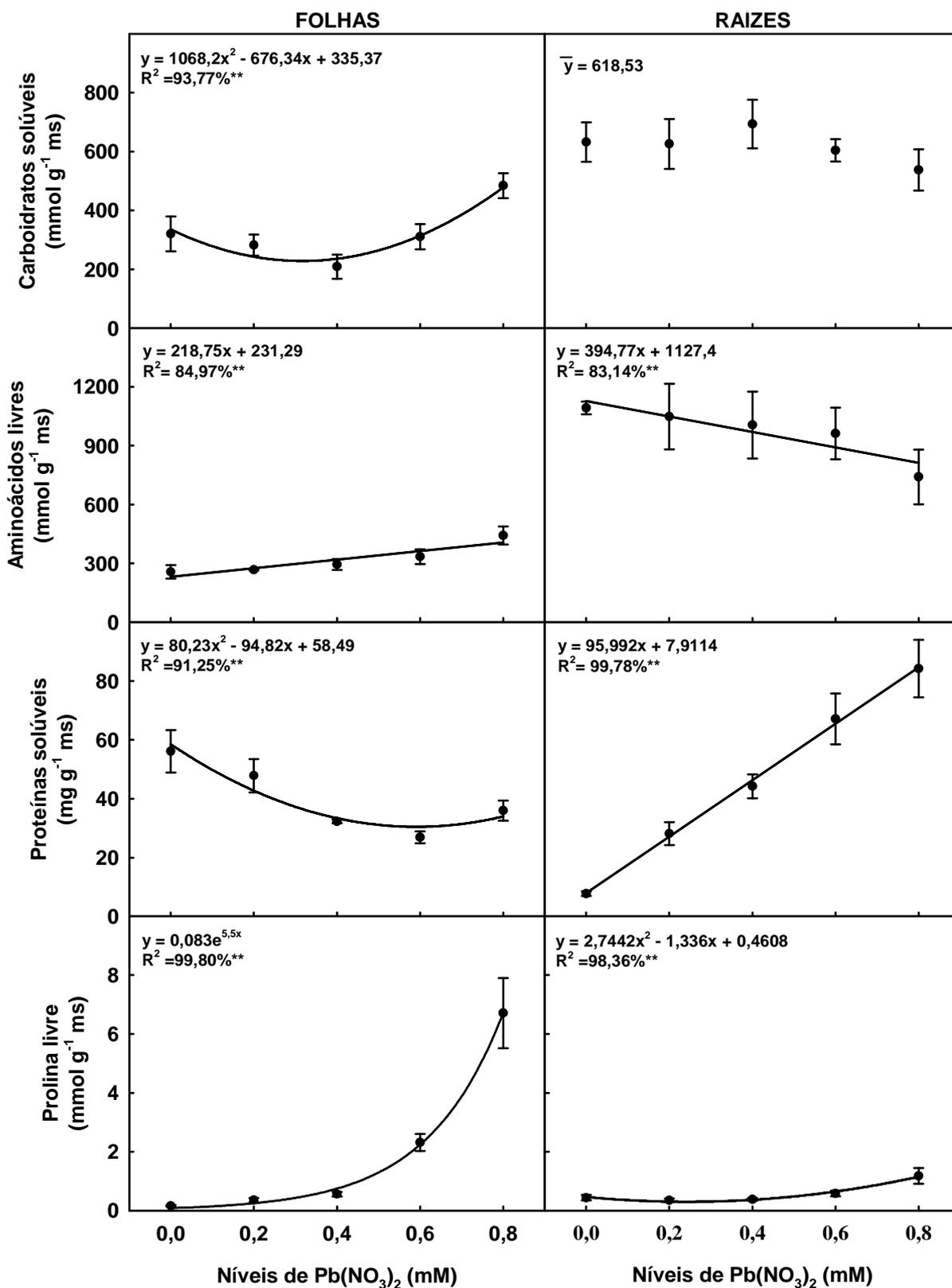


Figura 4. Teores de carboidratos solúveis, aminoácidos livres, proteínas solúveis e prolina livre em folhas e raízes de plantas de girassol cultivadas em casa de vegetação por 16 dias em solução nutritiva contendo níveis crescentes de Pb(NO₃)₂. *Significativo a $P \leq 0,05$; **significativo a $P \leq 0,01$.

Entre os solutos orgânicos estudados, a prolina foi o que mais aumentou com as concentrações de Pb na solução nutritiva, indicando que o acúmulo de prolina pode ser um bom indicador bioquímico do estresse por Pb em girassol. O aumento da biossíntese de prolina tem sido considerado desempenhar um papel importante na tolerância das plantas ao Pb (SHARMA e DUBEY, 2005; QURESHI et al. 2007; POURRUT et al., 2011). Lamhamdi et al. (2013) verificaram que os teores de prolina aumentaram nas folhas de trigo e espinafre, quando as plantas foram expostas a concentrações crescentes de chumbo. Segundo Verbruggen e Hermans (2008) o teor de prolina pode ser variável de espécie para espécie podendo apresentar valores 100 vezes maiores nas plantas submetidas ao estresse quando comparadas às plantas controles. Esse acúmulo está correlacionado à tolerância ao estresse, sendo a concentração deste aminoácido, geralmente mais elevada nas plantas tolerantes que nas sensíveis (ASHRAF e FOOLAD, 2007).

Há diferentes opiniões sobre os mecanismos pelos quais a prolina reduz os efeitos tóxicos dos metais. Ela pode atuar como reserva de carbono e nitrogênio e desintoxicadora do excesso de amônia (KAVI KISHOR et al., 2005), osmoprotetora e estabilizadora de proteínas (SHARMA e DUBEY, 2005), quelante de metal (MANARA, 2012), inibidora da peroxidação lipídica e removedora de radicais livres (WHITE, 2012).

Os dados mostram que a presença do chumbo na solução nutritiva alterou significativamente a concentração dos principais grupos de solutos orgânicos celulares, evidenciando, alterações metabólicas importantes resultantes da presença deste metal tóxico no ambiente celular. Essas alterações no metabolismo podem, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento induzida pelo Pb.

Conclusão

Os resultados obtidos mostraram que o girassol é tolerante à concentração de até 0,6 mM Pb no meio de cultivo. Eles também mostraram que os teores de N, P e K não apresentaram relação com a toxidez de Pb. Em contraste, o Pb induziu o desequilíbrio nutricional de Ca e de Mg, o que pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento induzida pelo metal no meio de cultivo. O Pb também alterou substancialmente a concentração dos principais grupos de solutos orgânicos celulares indicando alterações no metabolismo celular decorrentes do estresse. Os resultados também indicaram que os teores de Ca e Mg podem ser utilizados como

indicadores nutricionais e os de prolina como indicador bioquímico da toxidez por Pb em girassol.

Agradecimentos

À CAPES e UFRB pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

Referências

- AKINCI, I. E.; AKINCI, S.; YILMAZ, K. Response of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to lead toxicity: Growth, element uptake, chlorophyll and water content. *African Journal of Agricultural Research*, Lagos, v. 5, n. 6, p. 416-423, 2010.
- ANDRADE, M. G.; MELO, V. F.; GABARDO, J.; SOUZA, L. C. P.; REISSMANN, C. B. Metais pesados em solos de área de mineração e metalurgia de chumbo. I – fitoextração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v. 33, n. 6, p. 1879-1888, 2009.
- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany*, Elmsford, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.
- AUGUSTO, A. S.; BERTOLI, A. C.; CANNATA, M. G.; CARVALHO, R.; BASTOS, A. R. Bioacumulação de metais pesados em *Brassica juncea*: Relação de toxicidade com elementos essenciais. *Revista Virtual de Química*, Niterói, v. 6, n. 5, p. 1221-1236, 2014.
- AZAD, H. N.; SHIVA, A. H.; MALEKPOUR, R. Toxic Effects of Lead on Growth and Some Biochemical and Ionic Parameters of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Seedlings. *Current Research Journal of Biological Sciences*, Taiwan, v. 3, n. 4, p. 398-403, 2011.
- BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, The Hague, v. 39, n.1, p. 205-207, 1973.

- BERGMANN, W. *Nutritional disorders of plants: development, visual and analytical diagnosis*. New York: G. Fischer, 1992. 741 p.
- BERTOLI, A. C.; CARVALHO, R.; CANNATA, M. G.; BASTOS, A. R. R.; AUGUSTO, A. S. Toxidez do chumbo no teor e translocação de nutrientes em tomateiro. *Revista Biotemas*, Florianópolis, v. 24, n. 4, p. 7-15, 2011.
- BHARDWAJ, P.; CHATURVEDI, A. K.; PRASAD, P. Effect of Enhanced Lead and Cadmium in soil on Physiological and Biochemical attributes of *Phaseolus vulgaris* L. *Nature and Science*, New York, v. 7, n. 8, p. 63-75, 2009.
- BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Ensaio para determinar o (Bio) disponibilidade de Pb em solos contaminados. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 394-400, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.
- CASTRO, C.; CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; LEITE, R. M. B. V. C.; KARAM, D.; MELLO, H. C.; GUEDES, L. C. A.; FARIAS, J. R. B. *A cultura do girassol*. Londrina: EMBRAPA, CNPSo. (Circular técnica, 13), 38p, 1997.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. *Levantamentos de safra*. 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 04 mar. 2015.
- COSTA, G.; SPITZ, E. Influence of cadmium on soluble carbohydrates, free aminoacids, protein content of in vivo cultured *Lupinus albus*. *Plant Science*, Limerick, v.128, n. 2, p. 131-140. 1997.
- COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. *Silva Lusitana*, Portugal, v. 15, n. 1, p. 103-117, 2007.
- DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

- EVANGELISTA, A. R.; LIMA, J. A. Utilização de silagem de girassol na alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DE FORRAGENS CONSERVADAS. *Anais...* Maringá: UEM/CCA/DZO, 2001. p.177-217.
- FAITHFULL, N. T. *Methods in agricultural chemical analysis: a practical handbook*. Wallingford: CABI Publishing, 2002, 262 p.
- FERREIRA, D. F. *SISVAR 4.6 sistema de análises estatísticas*. Lavras: UFLA, 2003.
- GASIC, K.; KORBAN, S. S. Heavy Metal Stress. In: RAO, K.V.M.; RAGHAVENDRA, A.S.; REDDY, K.J. (Eds.) *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. Dordrecht, Springer, 2006. pp. 219-254.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Station Bull*, California, v. 347, n. 1, p. 1-32, 1950.
- HOPKINS, WILLIAM G., HÜNER, N. P. A. *Introduction to plant physiology*. Hoboken, John Wiley & Sons Inc. 4th ed. 2009. 503 p.
- HUANG, J. W.; CUNNINGHAM, S. D. Lead phytoextraction: species variation in lead uptake and translocation. *The New Phytologist*, EUA, v. 134, n. 1, p. 75-84, 1996.
- IMO, M. Analysis of Nutritional Interactions in Cropping Systems. In: SHARMA, P. A.; ABROL, V. *Crop Production Technologies*, (Ed). InTech: Rijeka, Croatia, 2012, p. 221-242.
- JONES, J. B. *Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis*. Printed in the United States of America. CRC. Press, p. 205-206, 2001.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2000. 331 p.
- KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. *Trace elements in soils and plants*. 3. ed. Flórida: CRC Press, 2001. 413 p.
- KAVI KISHOR, P. B.; SANGAM, S.; AMRUTHA, R. N.; SRI LAXMI, P.; NAIDU, K. R.; RAO, K. R. S. S.; RAO, S.; REDDY, K. J.; THERIAPPAN, P.; SREENIVASULU, N. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher

- plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, Bangalore, v. 88, n. 3, p. 424-438, 2005.
- KIBRIA, M. G.; ISLAM, M.; OSMAN, K. T. Effects of lead on growth and mineral nutrition of *Amaranthus gangeticus* L. and *Amaranthus oleracea* L. *Soil & Environment*, Pakistan, v. 28, n. 1, p. 1-6, 2009.
- LAMHAMDI, M., BAKRIM, A., AARAB, A., LAFONT, R., SAYAH, F. A comparison of lead toxicity using physiological and enzymatic parameters on spinach (*Spinacia oleracea*) and wheat (*Triticum aestivum*) growth. *Moroccan Journal of Biology*, Marrocos, v. 6, n. 7, p. 64-73, 2010.
- LAMHAMDI, M.; GALIOU, O. E. L.; BAKRIM, A.; NÓVOA-MUÑOZ, J. C.; ARIAS-ESTÉVES, M.; AARAB, A.; LAFONT, R. Effect of lead stress on mineral content and growth of wheat (*Triticum aestivum*) and spinach (*Spinacia oleracea*) seedlings. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Arábia, v. 20, n. 1, p. 29-36, 2013.
- MACEDO, L. S.; MORRIL, W. B. B. Origem e comportamento dos metais fitotóxicos: Revisão de Literatura. *Tecnologia & Ciência Agropecuária*, João Pessoa, v. 2, n. 2, p. 29-38, 2008.
- MAESTRI, E.; MARMIROLI, M.; VISIOLI, G.; MARMIROLI, N. Metal tolerance and hyperaccumulation: costs and trade-offs between traits and environment. *Environmental and Experimental Botany*, Elmsford, v. 68, n. 1, p. 1-13, 2010.
- MALAR, S.; VIKRAM, S. S.; FAVAS, P. J. C.; PERUMAL, V. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. *Botanical Studies*, Taiwan, v. 55, n. 54, p. 1-11, 2014.
- MAŁKOWSKI, E.; KURTYKA, R.; KITA, A.; KARCZ, W. Accumulation of Pb and Cd and its effect on Ca distribution in maize seedlings (*Zea Mays* L.). *Polish Journal of Environmental Studies*, Polônia, v. 14, n. 2, p. 203-207, 2005.
- MANARA, A. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. In: FURINI, A. (Eds.). *Plants and Heavy Metals*. New York: Springer, 2012. pp. 27-53.

- MARSCHNER, P. *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. 3. ed. Londres: Academic Press, 2012. 651 p.
- MERHAUT, D. J. Magnesium. In: BARKER, A.V.; PILBEAM, D.J. *Handbook of plant nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 2007. pp.145-181.
- MISHRA, S., SRIVASTAVA, S., TRIPATHI, R., KUMAR, R., SETH, C., GUPTA, D., Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. *Chemosphere*, Inglaterra, v. 65, n. 6, p. 1027-1039, 2006.
- PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J.O. Influência da aplicação de doses crescentes de chumbo sobre o teor e o conteúdo de nutrientes em mudas de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). *Scientia Forestalis*, Piracicaba, n. 61, p. 40-48, 2002.
- PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. G.; SIQUEIRA, J. O.; FERNANDES, A. R.; MIRANDA, J. R. P. Influência de doses crescentes de chumbo sobre o teor e o conteúdo de nutrientes e Pb em mudas de ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa* (Mart.) Standl.). *Revista Árvore*, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 151-158, 2003.
- PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, Elmsford v. 52, n. 3, p. 199-223, 2004.
- PEREIRA, M. P.; PEREIRA, F. J.; RODRIGUES, L. C. A.; BARBOSA, S.; CASTRO, E. M. Fitotoxicidade do chumbo na germinação e crescimento inicial de alface em função da anatomia radicular e ciclo celular. *Revista Agro@ambiente On-line*, Boa Vista, v. 7, n. 1, p. 36-43, 2013.
- PILBEAM, D. J., MORLEY, P.S. Calcium. In: BARKER, A. V.; PILBEAM, D. J. *Handbook of plant nutrition*. Boca Raton: CRC Press, 2007. Pp. 121-144.
- POSCHENRIEDER, C.; BARCELÓ, J. Water relations in heavy metal stressed plants. In: Prasad M. N. V. (Ed.). *Heavy Metal Stress in Plants: From Biomolecules to Ecosystems*, Berlin/Heidelberg: Springer, 2006. pp. 249–270.

- POURRUT, B.; SHAHID, M.; DUMAT, C.; WINTERTON, P.; PINELLI, E. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v. 213, p. 113-136, 2011.
- QURESHI, M., ABDIN, M., QADIR, S., IQBAL, M. Lead-induced oxidative stress and metabolic alterations in *Cassia angustifolia* Vahl. *Biologia Plantarum*, Praga, v. 51, n. 1 p. 121-128. 2007.
- ROMEIRO, S.; LAGÔA, A. M. A.; FURLANI, P. R.; ABREU, C. A. de; PEREIRA, B. F. F. Absorção de chumbo e potencial de fitorremediação de *Canavalia ensiformes*. *Bragantia*, Campinas, v. 66, n. 2, p. 327-334, 2007.
- SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Campos dos Goytacazes, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.
- SOUZA, E. P. S.; SILVA, I. F.; FERREIRA, L. E. Mecanismos de tolerância a estresses por metais pesados em plantas. *Revista Brasileira de Agrociência*, Pelotas, v. 17, n. 2, p.167-173, 2011.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 954 p.
- VAMERALI, T.; BANDEIRA, M; MOSCA, G. Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environmental Chemistry Letters*, Vitoria, v. 8, n. 1 p. 1-17, 2010.
- VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C. Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, Berlin, v. 35, n. 4, p. 753-759, 2008.
- WEATHERBURN, M. W. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 39, n. 8, p. 971-974, 1967.
- WHITE, P. J. Heavy Metal Toxicity in Plants. In: SHABALA, S. (Ed.) *Plant Stress Physiology*. Oxfordshire: CAB International, 2012. pp. 210-237.
- YEMM, E. W.; COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 80, p. 209-213, 1955.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta pesquisa permitem confirmar que o girassol é tolerante até a concentração de 0,6 mM Pb no meio de cultivo. Dessa forma, pode ser utilizado em solos em que a contaminação não exceda este limite. O incremento de Pb na solução nutritiva reduziu progressivamente os teores de todos os pigmentos no girassol. A redução dos teores de pigmentos pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento do girassol sob estresse por Pb.

Os teores de N, P e K analisados no girassol, não apresentaram relação com a toxidez de Pb. Em contraste, o Pb induziu o desequilíbrio nutricional de Ca e de Mg, o que pode, ao menos em parte, explicar a redução do crescimento induzida pelo metal no meio de cultivo. O Pb também alterou substancialmente a concentração dos principais grupos de solutos orgânicos celulares indicando alterações no metabolismo celular decorrentes do estresse. Isto está associado com a tolerância ao Pb em plantas de girassol.

Pode-se inferir que os resultados desta pesquisa indicaram que os teores de Ca e Mg podem ser utilizados como indicadores nutricionais e os de prolina como indicador bioquímico da toxidez por Pb em girassol.

Os resultados desse trabalho poderão dar continuidade a novas pesquisas com girassol com o intuito de selecionar genótipos que apresentem tolerância diferenciada ao chumbo (Pb), com vistas a um melhor entendimento dos mecanismos de tolerância ao estresse por esse metal pesado em girassol. Estes dados também podem subsidiar pesquisas que investiguem o papel de indicadores nutricionais, fisiológicos e bioquímicos de tolerância do girassol ao Pb, bem como sua utilização em programas de melhoramento genético desta espécie.