

SUSCEPTIBILIDADE DO CULTIVO DO TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) NA ACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E MERCÚRIO – UMA ABORDAGEM GEOQUÍMICA, ECOFISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA

CLARA AYUME ITO DE LIMA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

OUTUBRO – 2017

SUSCEPTIBILIDADE DO CULTIVO DO TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM* L.) NA ACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E MERCÚRIO – UMA ABORDAGEM GEOQUÍMICA, ECOFISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA

CLARA AYUME ITO DE LIMA

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cristina Maria Magalhães de Souza
(LCA/UENF)

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Claudia Lopes Prins
(LFIT/CCTA)

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

OUTUBRO – 2017

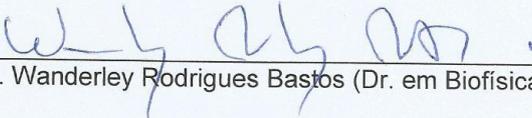
SUSCEPTIBILIDADE DO CULTIVO DO TOMATE (*SOLANUM LYCOPERSICUM*; *SOLANACEAE*) NA ACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E MERCÚRIO – UMA ABORDAGEM GEOQUÍMICA, ECOFISIOLÓGICA E BIOQUÍMICA

CLARA AYUME ITO DE LIMA

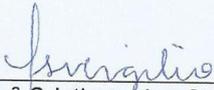
Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de doutor em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em: 11 / 10 / 17

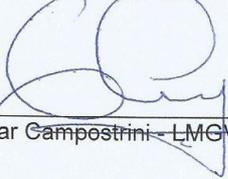
Comissão Examinadora:



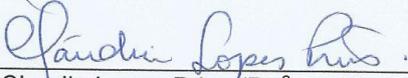
Prof.º Wanderley Rodrigues Bastos (Dr. em Biofísica) – LABGEO/UNIR



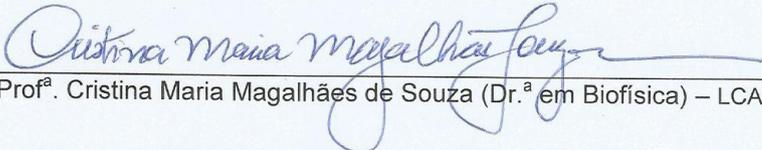
Prof.ª Dr.ª Cristiane dos Santos Vergilio – DBIO/CCENS/UFES



Prof.º Dr. Eliemar Campestri – LMGV/UENF



Prof.ª. Prof.ª Claudia Lopes Prins (Dr.ª em Produção Vegetal) – LFIT/UENF (Coorientadora)



Prof.ª. Cristina Maria Magalhães de Souza (Dr.ª em Biofísica) – LCA/UENF (Orientadora)

iv

**“Eu sou um universo de átomos e
ainda assim, um átomo no
universo.”**

Richard P. Feynman

Dedico a quem dedicou tanto por mim, meus pais Jair e Tânia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, pelo suporte, palavras animadoras nos momentos de tristeza e por entenderem os momentos de ausência. Essa caminhada até aqui não teria sentido sem ter com quem compartilhar a alegria. Ao meu namorado Gedison por todo apoio, carinho, companheirismo e paciência.

Agradeço a minha orientadora Prof. Dr^a. Cristina Maria Magalhães de Souza, por todo conhecimento e paciência ao longo dessa etapa.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Cláudia Lopes Prins, pela orientação, por ter enriquecido com seu conhecimento e sugestões para o bom andamento do projeto.

Aos companheiros de laboratório, Annaliza, Lucas, Inácio, Daniel, Dayana e Bruno, minha gratidão por sermos uma equipe unida e sempre pronta a ajudar um ao outro.

Ao Laboratório de Ciências Ambientais (UENF) pelo suporte logístico e determinações químicas.

Aos técnicos de laboratório do LCA e ao técnico Ederaldo do LSOL.

Agradeço ao Técnico da EMATER/Cambuci, Sr. Ademir, pelo auxílio nas coletas de amostras nos plantios em Cambuci/RJ.

À FAPERJ pelo fomento para desenvolvimento desse projeto.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

Lista de Abreviações.....	VII
Lista de Tabelas	
Capítulo 1.....	X
Capítulo 2.....	X
Capítulo 3.....	X
Lista de Figuras	XI
Capítulo 1.....	XI
Capítulo 2.....	XI
Capítulo 3.....	XI
Resumo.....	XIII
Abstract.....	XV
1. Introdução Geral.....	18
2. Ocorrência de Mercúrio e Cádmio em Áreas Agrícolas.....	19
2.1 Mercúrio e Cádmio em Fertilizantes	19
2.2 Mercúrio e Cádmio em Agroquímicos e Corretivos	23
2.3 Propriedades Químicas dos Solos Agrícolas e Biodisponibilidade	24
2.3.1. Mercúrio	25
2.3.2. Cadmio.....	26
3. Fatores de Translocação e Diferenças entre Culturas.....	27
4. Efeitos do Mercúrio e Cádmio em Plantas	28
4.1 Efeito do Mercúrio em Plantas.....	28
4.2 Efeito do Cádmio em Plantas.....	30
4.3 Estudos comparativos da exposição de plantas ao mercúrio e ao cádmio	32
5. Objetivo	
5.1 Objetivo Geral.....	34
CAPÍTULO 1: “Differences in Bioaccumulation and Translocation of Cd and Hg in Tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) in southeastern Brazil”.....	35
CAPÍTULO 2: “Respostas Ecofisiológicas do Tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) exposto a mercúrio e cádmio em condições experimentais. ”.....	65
CAPÍTULO 3: “Estudo comparativo da acumulação e resposta antioxidativa do tomateiro (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) exposto ao mercúrio e ao cádmio”.....	84
6. Discussão Geral.....	110
7. Considerações Finais.....	113
8. Referências Bibliográficas.....	114

LISTA DE ABREVIATÖES

A – taxa fotossintética líquida

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BAF – Bioaccumulation Factor

CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

Cd – Cádmió

CdCl₂ – Cloreto de Cádmió

CH₃Hg⁺ - MetilMercúrio

C_i - concentração de CO₂ subestomático

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

Cu - cobre

d.w. – dry weight

E - transpiração

EF – Enrichment Factor

EROs – espécies reativas de oxigênio

EPA - Environmental Protection Agency

FAO – Food and Agriculture Organization

Fe - ferro

FT – Fator de Transferência

F_v/F_m - eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II

G_s - condutância estomática

Hg – Mercúrio

HgCl₂ – cloreto de mercúrio

GPX – guaiacol peroxidase

Mg - Magnésio

NPQ - *quenching* não fotoquímico

NPK – fertilizantes NPK – nitrogênio – fósforo - potássio

P₂O₅ – Pentóxido de difósforo

Pb - chumbo

POX – peroxidase

PS II – fotossistema II

SOD – superóxido desmutase

TF – transference factor

TDI - tolerable daily intake

Zn - zinco

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense

Lista de Tabelas

Introdução Geral

Tabela 1 – Concentração de cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) em fertilizantes.....	22
Tabela 2 – Teores de Cd e Hg em agroquímicos e corretivos utilizados no Brasil e no mundo.....	24
Tabela 3 – Fatores de Translocação (FT) para cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) em diferentes culturas.....	28

Capítulo 1

Table 1 – Accuracy and detection threshold of the analytical method.....	41
Table 2 – Concentration of Cd and Hg (mg kg^{-1}) in the materials studied; tolerable daily intake (TDI) and estimated daily intake (EDI) values ($\mu\text{g day kg}^{-1}$).....	52

Capítulo 2

Tabela 1 – Efeitos da exposição à Cd e Hg na taxa fotossintética líquida –A, Condutância Estomática – Gs, Concentração de CO_2 subestomática -Ci, Transpiração –E; Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Fv/Fm) e o teor de metais nas folhas de tomateiro cultivados em solos com tratamento de Cd (0; $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$; $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$; $6,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e Hg (0; $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$; 12 mg kg^{-1} ; 24 mg kg^{-1}).....	74
--	----

Capítulo 3

Tabela 1. Teores de cádmio e mercúrio em solos, folhas e raízes do cultivo de tomateiro realizado em casa de vegetação, durante um período de três e nove semanas.....	92
Tabela 2. Isoformas da guaiacol peroxidase expressas em folhas e raízes de tomateiro expostos à Cd e Hg durante três e nove semanas.....	94
Tabela 3. Isoformas da superóxido desmutase expressas em folhas e raízes de tomateiro expostos à Cd e Hg durante três e nove semanas.....	96

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Fig. 1 – Conteúdo de cádmio em reservas de rochas fosfatadas em relação ao teor de fósforo.....	20
--	----

Capítulo 1

Figure 1 – Collection areas in northwestern state of Rio de Janeiro, Brazil.....	40
---	----

Figure 2 – Mass (μg) of Cd (2A) and Hg (2B) in roots, green fruit, ripe fruit, and rhizosphere of tomato plants and plantations. Lowercase letters compare tests of one element in different plant parts.....	44
---	----

Figure 3 – (A) Concentration of Cd in rhizosphere versus concentration of Zn in roots; (B) concentration of Hg in rhizosphere and concentration of Fe in roots.....	45
--	----

Figure 4 - Bioaccumulation and translocation factors of Cd and Hg in the materials studied; lowercase letters compare the translocation factors of one element; uppercase letters compare the bioaccumulation factors of different elements.....	47
---	----

Figure 5 – Concentration of Zn (mg g^{-1}) in rhizosphere versus concentration of Cd in roots.....	49
--	----

Figure 6 – Enrichment factor of Cd and Hg in tomato plantations; lowercase letters compare enrichment factors of different elements in the same collection area.....	50
---	----

Capítulo 3

Figura 1. Atividade da guaiacol peroxidase (GPX) em folhas e raízes em relação aos tratamentos com Cd e Hg utilizados nos cultivos em casa de vegetação. 1A- Tratamento com Cd, 3ª Semana; 1B- Tratamento com Cd, 9ª Semana; 1C- Tratamento com Hg, 3ª Semana; 1D- Tratamento com Hg, 9ª Semana.....	93
---	----

Figura 2. Géis nativos para a atividade da guaiacol peroxidase (GPX) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Hg no período de três semanas (Figuras 2A e 2B) e nove semanas (Figuras 2C e 2D). Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – 0,2mg kg ⁻¹ de Hg; Linha 3 – 12mg kg ⁻¹ de Hg; Linha 4 – 24mg kg ⁻¹ de Hg.....	95
Figura 3. Gel nativo para a atividade da guaiacol peroxidase (GPX) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Cd no período de três semanas. Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – 0,2mg kg ⁻¹ de Cd; Linha 3 – 3mg kg ⁻¹ de Cd; Linha 4 – 6mg kg ⁻¹ de Cd.	95
Figura 4. Gel nativo para a atividade da superóxido desmutase (SOD) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Hg no período de três semanas (Figuras 4A e 4B) e nona semana (Figuras 4C e 4D). Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – 0,2mg kg ⁻¹ de Hg; Linha 4 – 24mg kg ⁻¹ de Hg. Os indivíduos do tratamento de 12mg kg ⁻¹ de Hg não sobreviveram até a nona semana.....	97
Figura 5. Gel nativo para a atividade da superóxido desmutase (SOD) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Cd no período de três semanas (Figuras 5A e 5B) e nove semanas (5C e 5D). Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – 0,2mg kg ⁻¹ de Cd; Linha 3 – 3mg kg ⁻¹ de Cd; Linha 4 – 6mg kg ⁻¹ de Cd.....	97
Figura 6: Sintomas visuais das raízes de plantas do tratamento com (A) Cd nos solos, expostas a um período de três e nove semanas; (B) com Hg nos solos, expostas a um período de três e nove semanas. As plantas do tratamento com 12mg kg ⁻¹ não chegaram até o final do experimento.....	100

RESUMO

A presença de elementos traços em solos agrícolas tem chamado a atenção de órgãos ambientais nacionais e internacionais, pois a ingestão desses elementos é considerada uma das principais vias de entrada no organismo dos seres humanos. O Cd e o Hg estão entre os principais elementos traços listados como altamente tóxicos aos seres vivos e ambos são estudados em relação aos seus efeitos nos diferentes organismos e compartimentos. O presente estudo teve como objetivo verificar a mobilidade e a bioacumulação de Cd e Hg em plantios de tomateiro, comparando seu comportamento no sistema solo-planta e na resposta das plantas à sua toxicidade. No Capítulo 1, foram avaliadas as concentrações de Cd e Hg em solos e plantas cultivadas no campo, utilizando-se amostras vegetais (folhas, raízes e frutos) e solo coletadas em quatro áreas de plantio de tomate no Noroeste do estado do Rio de Janeiro. Embora os teores de Hg e Cd nos solos não tenham ultrapassado os limites permissíveis, foi observado que os teores de Cd em grande parte dos frutos estava acima do permitido pela legislação internacional. Esse resultado foi relacionado ao uso de agroquímicos de aplicados diretamente nas folhas e frutos, que pode ter contribuído para o incremento do teor desses elementos na parte aérea do tomate. Além disso, observou-se que o Cd possui maior mobilidade em relação ao Hg, uma vez que o Cd absorvido pelas raízes foi transportado em maior quantidade para as folhas. No Capítulo 2, foram abordados aspectos ecofisiológicos em um cultivo de tomate desenvolvido em casa de vegetação, onde foram adicionados ao solo concentrações de CdCl_2 ($0,2\text{mg kg}^{-1}$, $3,0\text{ mg kg}^{-1}$ e $6,0\text{mg kg}^{-1}$) e de HgCl_2 ($0,2\text{ mg kg}^{-1}$, 12mg kg^{-1} e 24mg kg^{-1}). Os teores de $3,0\text{ mg kg}^{-1}$ de Cd e 12 mg kg^{-1} de Hg foram escolhidos pois são os valores permissíveis para esses elementos em solos agrícolas pela legislação brasileira. Os resultados mostraram que os tratamentos com Hg induziram um menor efeito nos parâmetros ecofisiológicos medidos nas folhas do tomateiro, provavelmente devido a maior retenção desse elemento nas raízes, e conseqüentemente, minorando os efeito na fotossíntese e na fluorescência da planta. Já o Cd foi translocado em maior quantidade e teve efeito mais pronunciado na condutância estomática e na transpiração das folhas, podendo ter relação ao acúmulo desse elemento nos estômatos. O Capítulo 3 abordou os efeitos bioquímicos produzidos pelo Cd e Hg tendo como base o mesmo experimento. O Hg induziu a expressão de mais isoformas de GPX e SOD do que as plantas expostas ao Cd. A raiz foi a estrutura em que mais isoformas foram expressas, tanto no experimento com Cd quanto com Hg, evidenciando que a retenção desses elementos nas raízes gerou um efeito tóxico maior do que nas folhas.

Palavras-chave: tomate, bioacumulação, metais pesados, contaminação.

ABSTRACT

The presence of heavy metals in agricultural soils currently has attracted the attention of national and international environmental agencies, since the ingestion of these elements is considered one of the main routes of entry into the human body. Cd and Hg are among the main trace elements listed as highly toxic to living beings and both are studied in relation to their effects on different organisms and compartments. The aim of this study was to verify the mobility and bioaccumulation of Cd and Hg in tomato plants, comparing their behavior in the soil-plant system and the response of plants to their toxicity. In Chapter 1, concentrations of Cd and Hg in soils and plants evaluated, using plant (leaves, roots and fruits) and soil samples collected in four areas of tomato planting in the Northwest of the state of Rio de Janeiro. Although Hg and Cd contents in the soils did not exceed the permissible limits, it was observed that Cd contents in most of fruits were above the allowed by international legislation. This result was related to agrochemicals application directly on leaves and fruits, which may have contributed to the increase of these elements content in aerial part of tomato. In addition, it was observed that Cd has greater mobility in relation to Hg, since Cd absorbed by roots was transported in greater quantity to leaves. In Chapter 2, ecophysiological aspects were discussed in a greenhouse tomato crop cultivation, where concentrations of CdCl₂ (0.2 mg kg⁻¹, 3.0 mg kg⁻¹ and 6.0 mg kg⁻¹) were added to the soil, and HgCl₂ (0.2 mg kg⁻¹, 12 mg kg⁻¹ and 24 mg kg⁻¹). The contents of 3.0 mg kg⁻¹ of Cd and 12 mg kg⁻¹ of Hg were chosen because they are the permissible values for these elements in agricultural soils under Brazilian legislation. The results showed that the treatments with Hg induced a lower effect on the ecophysiological parameters measured in tomato leaves, probably due to the higher retention of this element in the roots, and consequently, reducing the effect on photosynthesis and plant fluorescence. Cd was translocated in greater quantity and had a more pronounced effect on the stomatal conductance and on transpiration of leaves. Chapter 3 discussed the biochemical effects produced by Cd and Hg based on the same experiment. Hg induced expression of more GPX and SOD isoforms than plants exposed to Cd. Root was the structure in which more isoforms were expressed, both in Cd and Hg experiments, evidencing that retention of these elements in roots generated more toxic effect than on leaves.

Keywords: tomato, bioaccumulation, heavy metals, contamination.

ESTE ESTUDO

Essa dissertação é composta de (1) uma introdução geral, onde é abordado o tema da relação solo-planta na absorção e translocação do Hg e Cd em tomateiro, bem como seus efeitos, (2) estudo contendo os resultados referentes às comparações na absorção e translocação de Hg e Cd em plantios de tomate (3) a resposta ecofisiológica do tomateiro exposto à concentrações de Hg e Cd no solo baseadas na legislação brasileira e (4) a resposta bioquímica do tomateiro exposto ao Hg e ao Cd.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Os metais cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) ocupam a terceira e a sétima posição, respectivamente, da Lista de Substâncias Perigosas (SPL) desenvolvida pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2015) que ranqueia elementos e substâncias químicas em relação a frequentes casos de toxicidade e risco à saúde humana.

Naturalmente, esses elementos são encontrados no ambiente em baixas concentrações na crosta da Terra ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd e $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg) (Kabata-Pendias, 2010) e, embora ambos pertençam ao grupo 12 da tabela periódica (antigo 2B), os compostos químicos de maior toxicidade são de natureza inorgânica para o Cd (CdCl_2) e orgânica para o Hg (CH_3Hg^+), caracterizando algumas propriedades químicas diferenciadas (Weggler *et al.*, 2004; Kabata-Pendias, 2010).

As principais fontes de Hg e Cd que contribuem para a manutenção dos teores naturais desses elementos nos solos são a atividade vulcânica e o intemperismo de rochas (Pirrone *et al.*, 2010; Driscoll *et al.*, 2013), especificamente as rochas fosfatadas para o Cd.

Atividades antrópicas como a industrialização, agricultura e mineração (Camargo *et al.*, 2000) aumentam a circulação desses elementos nas Bacias de Drenagem, por meio de uma gama de substâncias químicas de natureza e propriedade diferentes. O fator de enriquecimento é uma estimativa muito utilizada para avaliar a influência de atividades antrópicas no incremento do teor de elementos traços em solos (Likuku *et al.*, 2013). No caso específico da agricultura, a aplicação de insumos agrícolas ou agroquímicos contribuem com um fator de enriquecimento de Cd acima de 5 para solos agrícolas, enquanto para o Hg, esse fator de enriquecimento está na ordem de 2 (Gimeno-García *et al.*, 1996; Loska *et al.*, 2004;).

O aumento da concentração de elementos traço nos solos característicos de atividade agrícola já foi reportado por vários autores (Sun *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016). O uso contínuo de agroquímicos é uma importante via de entrada de metais pesados aos solos, uma vez que esses elementos fazem parte da composição química dessas matérias primas e que não são eliminados durante

o seu processo de produção, através do uso de outras substâncias ou reagentes utilizados na fabricação dos agroquímicos (Ramalho *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2014). Comparando a concentração de metais pesados em solos agrícolas e de áreas verdes, Mirzaei *et al.* (2015) reportaram uma concentração média de Cd para as áreas agrícolas 3 vezes maior ($0,3 \text{ mg kg}^{-1}$) em relação às áreas verdes ($0,1 \text{ mg kg}^{-1}$). Nuñez *et al.* (2006) analisaram o teor de Cd em solo de um plantio de pimentão (*Capsicum Annum* L.) e observaram um aumento significativo do início ($1,56 \text{ kg ha}^{-1}$) para o final do cultivo ($2,79 \text{ kg ha}^{-1}$). Wei & Yang (2010) reportaram valores médios de Hg ($0,24 \text{ mg kg}^{-1}$) e Cd ($0,43 \text{ mg kg}^{-1}$) em solos agrícolas de doze cidades chinesas acima dos teores médios considerados de referência para os solos da região $0,065 \text{ mg kg}^{-1}$ (Hg) e $0,097 \text{ mg kg}^{-1}$ (Cd), atribuindo esse incremento ao uso de pesticidas e fertilizantes. Gimeno-Garcia *et al.* (1996) estimaram uma contribuição de Cd para solos agrícolas da Espanha de $1,47 \text{ g}^{-1} \text{ ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$ a partir do uso de fertilizantes; Wang *et al.* (2016) reportaram o enriquecimento de Cd em cerca de $0,26 \text{ g}^{-1} \text{ ha}^{-1}$ pela utilização de fertilizante do tipo NPK em solos agrícolas chineses. Esses teores têm relação com o consumo intenso de P_2O_5 para adubação de solos agrícolas, que podem incrementar os teores de metais e atingir suas concentrações máximas permitidas nos solos (Campos *et al.*, 2005). No Brasil, Freitas *et al.* (2009) estimaram que para cada 100kg de P_2O_5 aplicados, há uma adição de até $1,5 \text{ g ha}^{-1}$ de Cd.

2. OCORRÊNCIA DE MERCÚRIO E CÁDMIO EM ÁREAS AGRÍCOLAS

2.1. Mercúrio e Cádmio em Fertilizantes

Os fertilizantes fosfatados são substâncias utilizadas na atividade agrícola como fonte de nutrientes para as plantas, contribuindo para o aumento da produtividade dessas culturas (Ramalho *et al.*, 2000). As rochas fosfatadas são utilizadas como matéria prima para a produção dos fertilizantes, que possuem em sua composição química elementos traço, que varia de acordo com a origem da rocha fosfatada e do processo de produção (Carnelo *et al.*, 1997; Lugon-Molin

et al., 2006). Cerca de 40 países são produtores de rochas fosfatadas no mundo, sendo os principais EUA, Marrocos e China (Aydin *et al.*, 2010). Segundo Cohen et al (2011), as principais reservas de rochas fosfatadas contêm teores acima de 50mg Cd por Kg⁻¹ de P, enquanto as reservas de menor teor apresentam concentrações menores que 10 mg Cd por Kg⁻¹ de P (**Figura 1**). A variação dos teores de Cd dependente da origem da rocha foi reportada por Molina *et al.* (2009), que verificaram em fertilizantes de origem mexicana, concentrações de Cd treze vezes maiores do que os produzidos nos EUA. O teor de Cd em rochas fosfatadas brasileiras (Tabela 1) é um dos mais baixos quando comparados aos produzidos nos demais países (Camargo et al., 2000; Mendes et al., 2006). Campos *et al.* (2005) compararam os teores de Cd em fosfatados de rocha com origem no Brasil e importadas, reportando valor médio mais baixo nos fosfatos nacionais (8,7 mg kg⁻¹) em relação aos fosfatos importados (77mg kg⁻¹). Em levantamento realizado por Mehmood *et al.* (2009), os teores globais de Cd em rochas fosfatadas variam entre 0,1 e 60 mg kg⁻¹.

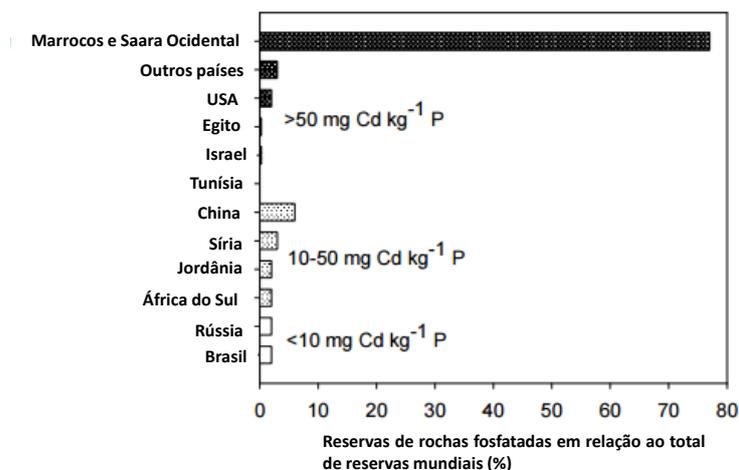


Figura 1. Conteúdo de cádmio em reservas de rochas fosfatadas em relação ao teor de fósforo. Adaptado de Cohen et al. (2011)

Poucos autores determinaram o teor de Hg em rochas fosfatadas, porém alguns estudos têm relacionado o incremento do teor desse elemento ao uso de fertilizantes (Chen et al., 2013). Jackson *et al.* (1986) reportaram valores de Hg em rochas fosfatadas de diferentes fontes variando entre 0,025 e 1,1 mg kg⁻¹. Senesi et al. (1999) reportaram que as concentrações de Hg em fertilizantes são

baixas, em comparação aos demais elementos traço, como o Cd, porém o uso contínuo desse composto pode afetar significativamente o teor de Hg nos solos.

A maior importância dos fertilizantes tem relação com o consumo intenso de P_2O_5 para adubação de solos agrícolas, que podem incrementar o teor de metais e atingir as concentrações máximas permitidas nos solos (Campos *et al.*, 2005). Alguns estudos no Brasil (Tabela 1) reportaram valores acima do permitido de Cd para fertilizantes por órgãos nacionais e internacionais, o que pode ocasionar em problemas na exportação dos produtos, uma vez que os locais onde são cultivados possuem valores limites de metais diferentes do país para o qual será exportado. O Brasil é o quarto consumidor de fertilizantes no mundo, utilizando em 2008 cerca de 700.000 toneladas dessa substância e o sétimo produtor de fosfato (Albuquerque *et al.*, 2005). Grande parte dos fertilizantes importados pelo Brasil é oriunda do Marrocos (24%), Rússia (21%), Estados Unidos (17%), China (16%) e Israel (12%) (Cella & Rossi, 2010). Gabe & Rodella (1999) reportaram valores de Cd em fertilizantes utilizados por agricultores de São Paulo variando de 1,8 a 3,0 mg kg⁻¹.

Na **Tabela 1** estão dispostos os teores de Cd em fertilizantes de diferentes locais do mundo em um amplo intervalo de variação, com o maior valor sendo 30.000 vezes mais elevado do que o menor teor reportado (0,01 mg kg⁻¹). Para o Hg, os valores de fertilizante tiveram uma variação de quatro vezes em relação ao menor teor reportado (0,275 mg kg⁻¹). Segundo Gupta *et al.* (2014), a aplicação de fertilizantes fosfatados contribuiu com 54-58% do cádmio no ambiente. No mesmo estudo, os autores estimam que o uso desses fertilizantes (aproximadamente 20 kg P ha⁻¹) leva a uma adição de cerca de 0,01 g ha⁻¹ ano⁻¹ de Hg. Em uma escala mundial, Nriagu & Pacyna (1988) estimaram que a adição global de Cd no solo por fertilizantes é de 30.000 a 250.000 kg ano⁻¹ de Cd.

Tabela 1. Concentração de cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) em fertilizantes.

Local	Fertilizante	Cd (mg kg ⁻¹)	Hg (mg kg ⁻¹)	Referência
América ⁽¹⁾	Fertilizantes Comercializados (n=7)	12,3	-	Molina et al. (2009)
	Fertilizantes (n=7)	*ND-56,8	-	Carnelo et al. (1997)
Europa ⁽²⁾	Fertilizantes Fosfatados (n=196)	0,7-42	-	Nziguheba & Smolders (2008)
	Superfosfato	0,1-2,2	0,4-1,2	Senesi et al (1999)
	Superfosfato	0,2	-	Osztoics et al (2005)
	Fertilizantes (n=3)	0,01-2,22	-	Gimeno-Garcia et al (1996)
Ásia ⁽³⁾	Fertilizantes Fosfatados (n=108)	2,6	-	Feng et al (2009)
	NPK fertilizante 15-5-5	-	1,2	Zhao & Wang (2010)
	Fertilizante Fosfatado	-	0,275	Wang et al. (2016)
	Superfosfato de cálcio	-	5,1	Zhao & Wang (2010)
Brasil	Superfosfato Simples	-	0,32	de Jesus et al (2013)
	Fertilizantes Fosfatados (n=36)	19,6	-	Valle (2012)
	Superfosfato Triplo	4,4	-	Amaral-Sobrinho et al (1992)
	NPK	0,14-50,92	-	Lugon-Moulin et al (2006)
	Superfosfato Triplo	1,7	-	Camargo et al (2000)
	Fertilizantes Fosfatados (n=18)	0,67-42,9	-	Bizarro et al (2008)
	Fertilizantes (n=5)	4-323	-	Gonçalves Junior et al (2000)
	Superfosfato	1,8-3	-	Gabe & Rodella (1999)
Superfosfato Triplo	28	-	Mendes et al (2006)	
Europa	Rochas Fosfatadas	18,3	-	Osztoics et al (2005)
Nova Zelândia	Rochas Fosfatadas	28	3,41	Taylor et al. (2016)
Ásia (3)	Rocha Fosfatadas	7,2	-	Sabiha-Javied et al (2009)
	Rocha Fosfatadas	7,72	-	Aydin et al (2010)
Brasil	Rochas Fosfatadas	8,7	-	Campos et al (2005)
EUA		10	-	AAPFCO (2011)**
EUA	LMPFF	4	-	CDFCA (1998)***
Japão e China		8	5	Adaptado de Malavolta & Morais (2006)
Canadá ⁽⁴⁾	LMPF	20	5	CFIA (1997)****
Brasil ⁽⁵⁾	LMPF	20	0,2	Brasil (2006)*****

*ND - 0,2 µg.L⁻¹

**The Association of American Plant Food

*** California Department of Food and Agriculture;

**** Canadian Food Inspection Agency

***** Ministério da Agricultura Brasileiro - Teores para fertilizantes com até 5% de P₂O₅

(1) Argentina, Chile;

(2) Espanha, Itália;

(3) China, Paquistão, Turquia;

(4) LMPFF= Limite Máximo Permissível para Fertilizante Fosfatado

(5) LMPF = Limite Máximo Permissível para Fertilizante

Alguns autores calcularam o impacto da contaminação do metal baseado na frequência de uso de fertilizantes. Vale & Alcarde (2003) estimaram que de acordo com as concentrações de Cd encontradas em um dos fertilizantes analisados seriam necessárias 62 aplicações para que o nível de toxicidade de Cd nos solos atingisse o limite de 1 mg kg⁻¹. No mesmo estudo, avaliando outro fertilizante do tipo —frita, 14 aplicações seriam necessárias para atingir a concentração tóxica de Cd em solos. Campos *et al.* (2005) quantificaram o teor

de cádmio em fertilizantes comercializados na região Sul do Brasil e estimaram que o uso contínuo dessas substâncias poderia aumentar a concentração de Cd em solos após 111 aplicações, atingindo o valor limite estipulado pela CETESB (3 mg kg^{-1}). Em estudo realizado por Freitas *et al.* (2009), o fertilizante fosfato de Gafisa apresentou uma alta concentração de Cd (35 mg kg^{-1}), sendo necessário 197 aplicações para alterar os teores do solo e ultrapassar os níveis propostos pela CETESB.

A quantidade de agroquímicos utilizada em um plantio irá variar de acordo com o tipo de cultivo e as necessidades encontradas para o bom desenvolvimento destes (por exemplo, uso de fertilizantes para o incremento do teor de nutrientes ou o uso de pesticidas em frutos com maior incidência de pragas). Um exemplo é o cultivo do tomate, cuja produção brasileira em 2013 atingiu 38 milhões de toneladas, sendo a região Sudeste responsável por 36,3% (IBGE, 2014). Esse tipo de cultivo é de curta duração, economicamente atrativo, além do alto valor nutritivo agregado ao fruto. Porém, os plantios de tomate são vulneráveis ao ataque de pragas e doenças causado por diferentes microorganismos, exigindo a aplicação de pesticidas com frequência, muitas vezes utilizado em excesso ou de forma inapropriada (Santos *et al.*, 2015). O período de carência do uso de pesticidas nas culturas de tomateiro, por exemplo, é de 14 a 30 dias, mas muitas vezes esse tempo não é respeitado (Filho *et al.*, 2009). Dessa forma, a presença de resíduos dessas substâncias é inevitável, assim como dos metais que fazem parte de sua composição química (Lozowicka *et al.*, 2015). Santos *et al.* (2002) reportaram que a aplicação de agroquímicos na parte aérea do tomateiro incrementaram o teor de Cd em folhas e frutos.

2.2. Mercúrio e Cádmio em Agroquímicos e Corretivos

O consumo de pesticidas no Brasil em plantios de hortaliças compreendeu cerca de 19% do mercado mundial de agroquímicos (ANVISA, 2013). Destaca-se dentre os diversos tipos de agroquímicos, o uso de herbicidas como um dos mais utilizados na agricultura brasileira (Conceição, 2000; Ferreira *et al.*, 2014). Os elementos traço fazem parte da composição química de agroquímicos, podendo atuar tanto como impurezas quanto constituintes ativos dessas substâncias (Alloway, 1990).

Poucos estudos determinam a concentração de Hg e Cd em corretivos do solo e agroquímicos (**Tabela 2**), que incluem inseticidas, herbicidas e fungicidas, comparativamente aos fertilizantes. Senesi et al. (1999) verificaram teores de Cd em pesticidas doze vezes maiores em produtos da Europa em relação aos utilizados no Brasil.

Tabela 2. Teores de Cd e Hg em agroquímicos e corretivos utilizados no Brasil e no mundo.

		(mg kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)	
Europa	Pesticida (n=3)	1,38-1,94	-	Gimeno-Garcia et al (1996)
	Calcário	0,04-0,1	0,05	Senesi et al (1999)
Brasil	Pesticidas	0,3	0,086	Zoffoli et al (2013)
	Inseticida	-	1,75	Campos (2003)
	Fungicida	-	1,74-3,47	Campos (2003)
	Corretivos Agrícolas (n=65)	4,25	-	Valle (2012)

2.3. Propriedades químicas dos solos agrícolas e a biodisponibilidade de mercúrio e cádmio

A fração biodisponível do solo é a fração na qual os metais podem ser rapidamente mobilizados da solução do solo e portanto considerada de maior importância para os organismos (Intawongse & Dean, 2006). No solo, o Hg e o Cd ocorrem em várias formas químicas, podendo estar presente como íons livres (Hg²⁺ ou Cd²⁺), além de associados a moléculas ou a ânions, os quais vão determinar os graus de disponibilidade na solução do solo. O Hg e o Cd podem estar associados preferencialmente aos ânions cloreto ou sulfeto, gerando compostos inorgânicos; também pode formar compostos orgânicos ao se ligar com o carbono (Tangahu *et al.*, 2011).

As propriedades físicas e químicas do solo têm papel fundamental na biodisponibilidade de metais pesados presentes nas diferentes frações geoquímicas que compõem essa matriz (Wang *et al.*, 2012). Os solos agrícolas tropicais são normalmente ácidos, com baixa saturação de bases, baixa concentração de nutrientes, intensificando a necessidade de corrigir sua fertilidade com o uso de agroquímicos. Propriedades dos solos como o pH, teor de matéria orgânica, óxidos de Fe e Mn e de argilas, bem como a capacidade de troca catiônica (CTC) são associados com a mobilidade e disponibilidade de

metais, pois influenciam os processos de adsorção desses elementos (Zeng *et al.*, 2011). Ao longo do plantio, as propriedades químicas podem ser modificadas, pois são utilizadas quantidades diferentes de agroquímicos, a cada ciclo de cultivo (Mendes *et al.*, 2010).

O pH do solo é um dos principais fatores que influenciam a disponibilidade de elementos traço para as plantas (Grant *et al.*, 1998; Chaves *et al.*, 2008). De maneira geral, solos de pH baixo tendem a apresentar uma maior disponibilidade de metais para as plantas, aumentando sua absorção por esses organismos, pois nessas condições há uma diminuição das cargas superficiais (dependentes do pH) de óxidos de Fe, Al e Mn e conseqüentemente, diminuindo a quelação desses metais (Adriano *et al.*, 2002). Com o aumento do pH dos solos, há o aumento das cargas negativas da superfície dos minerais de carga variável originadas da desprotonação dos componentes do solo, e conseqüentemente, mais metais traços podem ser retidos ou adsorvidos (Azura *et al.*, 2012).

As partículas finas do solo (silte e argila) possuem uma alta capacidade de retenção de cádmio e mercúrio, devido a sua área de superfície, que permite a adsorção desses elementos, diminuindo sua disponibilidade (Srinivasarao *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2015). A superfície argilosa apresenta carga negativa (onde há a presença de grupamentos - OH), que facilita a adsorção de íons positivamente carregados (Bradl, 2004).

2.3.1. Mercúrio

O teor médio de Hg em solos é de 0,03 mg kg⁻¹, porém em áreas com uso de fungicidas, essas concentrações podem variar de 9,4 a 11,5 mg kg⁻¹ (He *et al.*, 2005; Kabata-Pendias, 2010). Os solos têm um papel importante na biogeoquímica do Hg, onde o metal se mantém–imobilizado por um elevado tempo de residência, diminuindo seu transporte para ambientes aquáticos ou de ser absorvido por organismos. Em sistemas agrícolas, o manejo do solo e a adição de agroquímicos pode afetar a fração disponível desse elemento, representando um risco potencial de contaminação ambiental e toxicidade aos seres vivos (Senesi *et al.*, 1999).

Rozanski et al (2016) reportaram que o Hg biodisponível em diferentes tipos de solos variou entre 0,28 a 2,45% do teor total. Em estudo desenvolvido por Soares e colaboradores (2015) em solos do Sudeste do Brasil, foi observada uma correlação positiva entre o teor de Hg e o pH, demonstrando que em solos mais alcalinos, a mobilidade desse elemento tende a diminuir. A adsorção de Hg tende a aumentar em solos com pH entre 7 e 9 (Xu *et al.*, 2014). Em pH ácido, o Hg pode estar adsorvido a matéria orgânica; em pH alcalino ou neutro, se liga a componentes minerais, tais como os óxidos de Fe e argilas. Solos acidificados como os tropicais, favorecem a dessorção de mercúrio, aumentando sua disponibilidade para as plantas (Jing et al., 2007).

Em relação à granulometria, as partículas finas como a argila possuem um papel importante na retenção de Hg nos solos, pois possuem uma superfície específica que permitem a adsorção do metal (Oliveira et al., 2007). Soares *et al.* (2015) verificaram que em solos de mata do RJ e MG, a distribuição do mercúrio foi influenciada principalmente pelo teor de argila e pelo pH, e os teores foram maiores em amostras de solo com maior percentual de frações finas.

2.3.2. Cádmio

O teor médio de Cd em solos pode variar de 0,06 a 4,3 mg k⁻¹, tendo os solos agrícolas situados no intervalo de concentração entre 0,01 a 2 mg kg⁻¹ (Kabata-Pendias, 2010). O Cd pode estar presente como íon livre Cd²⁺ (forma biodisponível) ou complexado a ácidos húmicos e fúlvicos (Taylor & Percival, 2001). Mendes et al. (2006) verificaram que o incremento do teor biodisponível de Cd no solo teve relação direta com a forma química em que esse elemento estava presente no fertilizante.

O aumento do pH foi reportado como principal fator a influenciar a diminuição na concentração de Cd em plantios de trigo e cevada (Oliver *et al.*, 1996; Adams *et al.*, 2004), como observado em grãos de trigo (Oliver *et al.*, 1996) e sementes de aveia (Page et al., 1987). Isso ocorre porque em solos com pH acima de 7,5, há a redução da mobilidade do Cd. Em experimento realizado por Whitten & Ritchie (1991), a disponibilidade de Cd para as plantas aumentou em função da diminuição do pH. A prática da calagem é muito utilizada para correção

da acidez do solo, e pode influenciar a disponibilidade desse elemento para as plantas (Matos *et al.*, 2001; Joris *et al.*, 2012). O Ca^{2+} afeta a absorção do Cd pelas plantas, uma vez que esses dois elementos possuem raios iônicos semelhantes e competem pelos mesmos transportadores de membrana das raízes (Martin & Kaplan, 1998).

A granulometria dos solos afeta a disponibilidade de Cd em menor proporção do que o pH (Appel & Ma, 2002). Oliveira *et al.* (2005) reportaram uma menor absorção de Cd em grãos de arroz cultivados em solos ricos em argila, óxidos e matéria orgânica.

Segundo Kabata-Pendias (2010), a presença do cloreto forma complexos com o Cd, aumentando sua fitodisponibilidade. Mani *et al.* (2007) verificaram que houve um aumento na concentração de Cd em grãos de girassóis em solos ricos em Cl^- ($1,12\text{mg kg}^{-1}$) quando comparado aos sem Cl^- ($0,41\text{mg kg}^{-1}$). Em solos com pH elevado as formas insolúveis ligadas ao carbonato e ao fosfato predominam, enquanto em pH variando de 4,5 a 5,5, aumenta a disponibilidade do Cd na solução do solo (Kabata-Pendias, 2010).

3. Fatores de translocação e diferença entre culturas

As plantas cultivadas em solos cujas concentrações de elementos traços estão abaixo dos limites permissíveis podem não apresentar sintomas visíveis, mas ainda sim traços desses elementos podem ser transferidos para as partes comestíveis, caracterizando uma importante via de exposição humana a esses elementos (Nogueirol *et al.*, 2016). O fator de translocação solo-planta de metais pesados (FT) é reportado em vários estudos, podendo ser utilizado para avaliar a transferência do metal do solo para as diferentes partes da planta (Bortey-Sam *et al.*, 2015; Islam *et al.*, 2015). Utilizando-se valores reportados em diferentes estudos para Hg e Cd, o fator de translocação foi calculado e comparado entre diferentes culturas (**Tabela 3**).

Tabela 3. Fatores de Translocação (FT) para cádmio (Cd) e mercúrio (Hg) em diferentes culturas.

Local	Cultura	FT Cd	FT Hg	Referência
Albânia	Pimenta	0,12	-	Al-Hwaiti & Al-Khashman (2015)
	Tomate	0,12	-	Al-Hwaiti & Al-Khashman (2015)
Bangladesh	Cenoura	0,013	-	Islam et al (2015)
	Tomate	0,015	-	Islam et al (2015)
China	Alface	0,03	0,007	Zhuang et al (2009)
	Alho Poró	-	0,006	Chang et al. (2014)
	Espinafre	-	0,005	Zheng et al (2007)
	Repolho	-	0,001	Zheng et al (2007)
	Tomate	0,09	0,004	Zhuang et al. (2009)
Grécia	Batata	0,13	-	Golia et al (2008)
	Tomate	0,09	-	Golia et al (2008)
Brasil	Cana de Açúcar	0,89	0,56	Segura-Muñoz et al (2006)
	Feijão de Vagem	0,06	-	Santos et al (2003)
	Tomate	0,05	-	Santos et al (2002)
Casa de Vegetação	Cenoura	0,77	-	Intawongse & Dean (2006)
	Tomate	2,41	-	Gharaibeh et al (2016)

De maneira geral, observa-se que para o Cd, os fatores de translocação foram maiores para o tomate. Os vegetais folhosos como a alface e o espinafre apresentaram os maiores valores de FT para o Hg, embora, segundo os autores, este valor pode estar relacionado com a deposição atmosférica, e não com as vias clássicas de absorção, uma vez que o Hg absorvido do solo se acumula principalmente nas raízes (Zheng *et al.*, 2007; Ali & Al-Qahtani, 2012; Li *et al.*, 2017). Comparado ao Hg, o FT determinado para Cd foi maior, demonstrando que esse elemento é mais facilmente absorvido pelas plantas (Chang *et al.*, 2014). Chojnacka *et al.* (2005) avaliando a disponibilidade de metais pesados para cultivos de trigo, reportaram um FT cerca de 8 vezes maior para o Cd (31) em comparação ao Hg (4).

4. Efeitos do mercúrio e cádmio em plantas

4.1. Efeito do Mercúrio em plantas

Kabata-Pendias (2010) reportaram concentrações de Hg em plantas variando entre 0,0006 a 0,086 mg kg⁻¹ e relacionaram os teores à espécie vegetal cultivada e a proximidade a fontes de emissão desse elemento. Após a aplicação de fungicidas, a concentração de Hg variou entre 0,1 a 6,8 mg kg⁻¹ em folhas de

batata e 0,05 a 0,17 mg kg⁻¹ em grãos de trigo. Segundo Madeira (2013) o intervalo de concentração de Hg considerado fitotóxico é de 1 a 3mg kg⁻¹ e os principais mecanismos de repostas são observados na fisiologia ou a nível celular e bioquímico.

Na semente, o Hg atua no endosperma, que são tecidos ricos em grupamento sulfidrilas, formando com o enxofre ligações do tipo –S-Hg-S (Patra & Sharma, 2000; Amin & Latif, 2015). Ao expor sementes de *Arabidopsis thaliana* à diferentes concentrações de Hg, Li *et al.* (2005) observaram que o desenvolvimento da semente foi alterado devido a toxicidade do metal. Contrariamente, Jamal *et al.* (2006) reportaram uma maior germinação de sementes de trigo cultivadas em solução nutritiva contendo HgCl₂ (entre 25 a 100 ppm de Hg) porém, as plântulas tiveram um baixo crescimento de raiz e folhas. O efeito do Hg na germinação dependerá da concentração que a semente estará exposta; o Hg pode ter positiva ou nenhuma influência na germinação a baixas concentrações, e em altas concentrações reduzem-na. Muhammad *et al.* (2015) verificaram que sementes de feijão-mungo (*Vigna radiata*) expostas à 1mM de Hg em solução nutritiva não tiveram efeito significativo na sua germinação, porém quando expostas à 3mM, uma redução nesse processo foi observada.

Segundo Cho *et al.* (2000), o Hg pode induzir a deficiência nutricional pela redução da absorção e transporte de elementos essenciais como o Ca²⁺ (possui papel importante na parede celular), Mg²⁺ (atua como componente da clorofila) e K⁺ (cofator de enzimas). Calgaroto *et al.* (2016) verificaram o aumento do conteúdo de P em folhas e raízes de ginseng-brasileiro (*Pfaffia glomerata*) expostos a solução nutritiva contendo Hg, relacionando esse comportamento à imobilização do P pelo Hg nos tecidos da planta. Israr *et al.* (2006) reportaram uma diminuição na biomassa de plântulas de *Sesbania drummondii* expostas a Hg, podendo estar relacionada ao gasto energético na defesa ao estresse oxidativo, antes reservado para o crescimento da plântula. Os danos celulares causados pelo Hg podem compreender a mudança na permeabilidade das células da membrana, interferindo na absorção de elementos essenciais, pois fazem uso e competem pelos mesmos canais iônicos de absorção nas raízes (Azevedo & Rodriguez, 2012).

A alteração na atividade das enzimas antioxidativas induzidas pelo Hg já foi estudada em diversas plantas como o arroz (Ushimaru et al., 1999), mostarda (Shiyab et al., 2008) e tomate (Cho & Park, 1999; Cho & Park, 2000). Ao expor plantas de trigo a diferentes tratamentos com Hg (10 μM e 25 μM), Sahu *et al.* (2012) verificaram que a atividade da SOD foi mais intensa nas plantas expostas à concentração mais baixa de Hg, além do que sua atividade diminuiu na concentração mais alta. Os autores relacionaram essa menor atividade da SOD a menor capacidade de desmutar as espécies reativas de oxigênio em concentrações altas de Hg. Plântulas de pepino cultivadas em soluções contendo 50 μM Hg tiveram um aumento na atividade das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX) e catalase em relação ao controle, porém o efeito antioxidante destas não foi suficiente quando a planta foi exposta à 250 e 500 μM de Hg (Cargnelutti et al, 2006). Dessa forma, algumas enzimas podem estar relacionadas apenas à exposição aguda de baixas concentrações de Hg, pois sua ação antioxidante não consegue minimizar ou remover os efeitos tóxicos produzidos pelo Hg na planta.

4.2. Efeito do Cádmio em plantas

Segundo Chen *et al.* (2011), quando a concentração de Cd nos tecidos das plantas atinge valores entre 3 e 30 mg kg^{-1} , os efeitos fitotóxicos são visíveis, ocorrendo sintomas como a diminuição do crescimento, clorose e raízes escurecidas. Os teores naturais de Cd nos tecidos das plantas variam de 0,05 a 0,2 mg kg^{-1} . A presença desse elemento em baixas concentrações na planta pode não conferir a formação de sintomas visuais, porém efeitos a nível celular e fisiológico podem ser observados.

Em sementes, a presença de Cd pode influenciar o crescimento e o desenvolvimento das plântulas ou a taxa de germinação (Patnaik & Mohanty, 2013). He *et al.* (2008) verificaram que o desenvolvimento das plântulas de arroz cujas sementes foram cultivadas em soluções contendo Cd, teve a formação de raízes com deformações e coloração escura. He et al. (2014) reportaram uma redução na germinação de sementes de arroz (*Oryza sativa*), bem como uma

diminuição da biomassa e do crescimento das raízes e folhas das plântulas expostas ao Cd (100 μ M).

A exposição ao Cd pode interferir na concentração e composição nutricional das plantas, e elementos como o Zn, Ca, Mg e K podem ter seus teores reduzidos em folhas, uma vez que o Cd possui um efeito antagônico na absorção desses elementos. Elementos que possuem propriedades físico-químicas similares irão competir por sítios de ligação e transportadores na célula e, se tratando de elementos essenciais, a substituição desses pelo Cd pode causar efeitos danosos ao funcionamento da planta, como por exemplo, a deficiência de Fe nas folhas de plantas expostas ao Cd que pode causar a clorose nessas estruturas (Das et al., 1997).

Em estudo realizado por Gonçalves *et al.* (2009), plântulas de batata expostas a concentrações de Cd (0, 50, 100, 150 e 200 μ M) por 7 dias, tiveram uma diminuição do conteúdo de clorofila e na atividade fotossintética. Wang *et al.* (2009) reportaram uma diminuição no rendimento quântico máximo (F_v/F_m), em plântulas de milho cultivadas em uma solução contendo 5 μ M de Cd por 96 horas. Parâmetros fotossintéticos como o quenching não fotoquímico e o rendimento quântico máximo (F_v/F_m) são muito utilizados para verificar os efeitos do estresse em plantas, pois são determinações não destrutivas e que conseguem detectar as alterações metabólicas da fotossíntese (Araus *et al.*, 1998). A enzima rubisco faz parte do Ciclo de Calvin e catalisa a carboxilação da ribulose 1,5 bifosfato e sua oxigenação (Mishra & Dubey, 2005). A toxicidade causada pelo Cd inibe a atividade dessa enzima, a partir da associação desse metal com o grupamento -SH presente na rubisco (Lidon & Henriques, 1991), como visto em experimentos com plantas expostas à Cd, como as ervilhas (Romero-Puertas *et al.*, 2002) e a cevada (Siborova, 1988).

Em relação à resposta antioxidante da planta sob estresse, compostos enzimáticos e não enzimáticos são reportados em diferentes estudos. Sobrino-Plata *et al.* (2013) verificaram que a atividade da glutathione redutase e a produção de fitoquelatinas foi intensificada em plantas expostas ao Cd. Em plântulas de arroz, o efeito do Cd na atividade da catalase foi reduzido quando cultivadas em solução com concentração de 500 μ M de Cd, enquanto a atividade da guaiacol peroxidase aumentou, estando essa mudança relacionada à

substituição das enzimas participantes ou inibição da síntese enzimática (Shah et al., 2001). A exposição de plântulas de rabanete ao Cd levou a um aumento na atividade da catalase, glutathione redutase e das isoenzimas da SOD (Vitoria et al., 2001). Comparado ao controle, Cho & Kim (2003) verificaram uma diminuição da atividade da SOD em plântulas de tomate expostas ao Cd por 9 dias em solução contendo 100 μM de CdCl_2 e um aumento na atividade da catalase. Até as 12 primeiras horas de exposição ao Cd em solução contendo 25 μM de CdCl_2 , plântulas de tomate apresentaram um aumento na atividade da SOD e catalase, mas após esse tempo, a atividade dessa enzima foi prejudicada a partir do aumento do tempo de exposição prolongada à condição de estresse produzida pelo Cd (Chamseddine et al., 2009).

4.3. Estudos comparativos da exposição de plantas ao mercúrio e ao cádmio

Quando comparadas as respostas de mostarda (*Brassica juncea*) ao Hg e Cd, Sheetal et al. (2016) verificaram que, no tratamento com Hg (25 e 50 mg kg^{-1}), houve uma diminuição da biomassa, do teor de clorofila e da taxa de fotossíntese quando comparadas às plantas expostas ao Cd (5 e 10 mg kg^{-1}). A clorose das folhas em plantas é reportada como um sintoma comum de plantas em resposta ao estresse provocado pela exposição ao Hg como a mostarda (Dunagan et al., 2007); no Cd, esse sintoma é reportado em mostarda (Jiang et al., 2004; Ebbs & Uchil, 2008), girassol (Di Cagno et al., 2001) e milho (Root et al., 1975). A clorose das folhas pode estar relacionada com a substituição do Mg da molécula de clorofila pelo Cd e Hg, diminuindo a eficiência da fotossíntese e alterando a estrutura dos cloroplastos (Wang et al., 2009). Sobrino-Plata et al. (2014) verificaram uma maior mudança no *quenching* não fotoquímico (NPQ) em *Arabidopsis thaliana* expostas ao Cd em comparação as plantas tratadas com Hg, pois o Hg é acumulado principalmente nas raízes, enquanto o Cd é mobilizado facilmente para as folhas, onde ocorre a fotossíntese.

No experimento realizado por Hammed et al. (2011), o tratamento crônico resultou em uma maior expressão da superóxido desmutase (SOD) e glutathione redutase (GR) nas plantas de quiabo (*Abelmoschus esculentus* L.) expostas ao

Cd em comparação ao Hg, embora a catalase tenha diminuído sua atividade em ambos os tratamentos. Ortega-Villasante *et al.* (2007) analisaram a resposta da exposição de alfafa ao Cd e ao Hg em um curto período de tempo (24 horas) e observaram que o Hg causou um efeito tóxico mais rapidamente que o Cd, induzindo a formação de EROs e intensificando a atividade enzimática. Sheetal *et al.* (2016) reportaram um aumento na atividade das enzimas antioxidantes da SOD e POX tratamentos com 50 mg kg⁻¹ de Hg em relação as plantas expostas ao Cd (5 e 10 mg kg⁻¹).

Em estudo realizado por Sobrino-plata *et al.*, (2009), plantas de alfafa foram expostas a Hg e Cd e produziram um maior teor de ácido ascórbico nos tratamento de 30 µM de Cd. Esse metabólito foi relacionado à exposição de plantas a doses mais tóxicas de metais em ervilhas (Rodríguez-Serrano *et al.*, 2006), alfalfa (Zhou *et al.*, 2009) e trigo (Paradiso *et al.*, 2008). Essa acumulação ou diminuição de metabólitos como os açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, prolina, entre outros, representa uma das respostas ao estresse causado por metais e dependem do estágio de crescimento, tempo de exposição ao metal e concentração desse elemento (Roychoudhury *et al.*, 2012).

5. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o grau de exposição a que estão submetidos os cultivos de tomate relativos à contaminação por Hg e Cd em condições naturais e experimentais, sob aspectos geoquímicos, ecofisiológicos e bioquímicos.

Capítulo 1 - Differences in Bioaccumulation
and Translocation of Cd and Hg in Tomato
(*Solanum lycopersicum*) in Southeastern Brazil

***Differences in Bioaccumulation and Translocation of Cd and Hg in Tomato
(Solanum lycopersicum) in southeastern Brazil***

ABSTRACT

Food is the main source of highly toxic metals like mercury (Hg) and cadmium (Cd). This study evaluated the accumulation and translocation of Cd and Hg in the soil/plant system in four tomato plantations and assessed the risk associated with consumption. Forty soil samples (rhizosphere) and 120 samples of plant material (leaf, ripe fruit, green fruit, and roots) were collected. Bioaccumulation and translocation processes and soil enrichment were estimated. The bioaccumulation factor of Cd was approximately five times higher than that of Hg, indicating the presence of labile chemical species that are easily translocated to the aerial parts of the plant and underlining the strong association between Cd in roots and Zn in rhizosphere. About 93% of the Cd accumulated in roots reached aerial parts. For Hg the value was 48.6%, indicating poor mobility of the metal and different uptake routes. Although Cd and Hg levels were analyzed in approximately 83% of the rhizosphere samples, the concentrations obtained do not affect soil use. Levels of Cd in tomatoes were over 17 times higher than the maximum residual level in 57.5% of ripe fruits and in 27.5% of green tomatoes. However, the estimated daily intake did not confirm this risk, based on exposure of the population.

Keywords agricultural soil - bioaccumulation factor – health hazard – Toxicity

INTRODUCTION

Food consumption is one of the main exposure routes to highly toxic metals, like mercury (Hg) and cadmium (Cd), ranked third and seventh elements in health hazard to humans by the US Environmental Protection Agency (EPA).¹

While Cd has been associated with toxicity in liver and bones, Hg is linked with neurotoxic and teratogenic effects, mainly the methylated form of the metal.²

Due to its relevance in human nutrition and growing consumption trend worldwide,³ tomato (*Solanum lycopersicum*) reached global importance in 2009, when demand was observed to be 81% higher compared with the previous 20 years.⁴ More specifically, today Brazil is the world's ninth tomato-producing country, and the first in Latin America.⁵ The Brazilian southeastern region comes first both in production and sales figures, with 80% of the domestic market.⁶

The use of phosphate fertilizers is the main source of both Cd⁷ and Hg⁸⁻⁹ in tomato plantations. However, the susceptibility of plants to pests and disease, which requires significant amounts of agrochemicals to control¹⁰ and crop rotation practices (with sugarcane, for instance) also affect the levels of these metals in tomato. Together, these factors expose soils to noxious substances that threaten production.¹¹⁻¹² In Brazil Câmara et al.¹³ observed that the use of organomercury fungicides is behind the persistent contamination of sugarcane plantations with Hg, even as late as two years after the ban on these compounds in the country. Another study reported the use of 53 agrochemical brands in southeastern Brazil, with 12 kinds of these chemicals used on average in a farm in the region, mostly fungicides and insecticides. Some of these compounds were classified as moderately and highly toxic by Brazil's health and environmental authorities. Acute risk estimates (indicating contamination within 24 h of ingestion of food treated with agrochemicals) associated with vegetables (that account for over 70% of the foods consumed by the Brazilian population) were calculated and published by these authorities¹⁴. Levels in tomato plantations were irrelevant, but the report did not take into consideration the toxicity caused by elements present

at trace levels and potentially associated with agrochemicals.

Total concentrations of a metal in soils are used as indicators of environmental quality. Nevertheless, bioaccumulation factor (BAF) and translocation factor (TF) estimates are often used to determine the capacity of the plant to uptake a chemical element.¹⁵ In another study, tomato was classified as a plant that hyperaccumulates Cd, with levels were above 100 mg kg⁻¹ in aerial parts of the plant.¹⁶

While TF indicates the mobility of trace metals inside the plant (which depends on a series of processes, like xylem and phloem flow and storing, accumulation, and immobilization by chelating agents), BAF is the ratio of total analyte level in plant parts to the levels in soil, and enables to assess the differences in bioavailability in these compartments.¹⁷⁻¹⁸ Despite the hypothesis that Cd is more easily translocated from roots to aerial parts of the tomato plant due to the similarity with essential elements, Liñero et al.¹⁹ observed Cd and Hg accumulation in tomato roots, when Cd levels and mobility were higher and lower, respectively, compared to Hg.

In this scenario, the present study evaluated (i) the soil-plant mobility of Cd and Hg, (ii) the interaction between Cd and Hg with essential elements of plants, (iii) the accumulation of Cd and Hg in different plant parts, and (iv) the levels of Cd and Hg in tomato and the relationship they have with diet in four large tomato production and trade regions in southern Brazil.

EXPERIMENTAL

Study area and sample collection

This study was carried out in two long-time tomato-producing regions in

northwestern state of Rio de Janeiro, Brazil, (the municipalities of Varre-Sai and Cambuci, at 700 m a.s.l and 35 m a.s.l., respectively; Fig. 1). Climate in both regions is tropical wet, and the soils derive from acidic crystalline basement mostly. However, most tomato plantations are established on less common eutrophic ultisols that derive from neutral rocks associated with basic sedimentary and metasedimentary rocks.²⁰

Four tomato plantations were included (one in Varre-Sai, 41°46'03" W, 20°51'40" S; three in Cambuci, 21°35'59.0"S 41°58'49.3"W; 41°59'08" W, 21°35'31" S, and 41°58' 54" W, 21°35'56" S). Ten collection sites were defined in each, where one tomato plant was collected considering five biological materials: (i) rhizosphere, (ii) roots, (iii) leaves, (iv) green fruit, and (v) ripe fruit, when present. In total, 40 rhizosphere and 120 plants were collected, stored in plastic bags at room temperature, and labelled. Samples were collected in December 2014 (Varre-Sai) and August 2015 (Cambuci), during the tomato harvesting period.

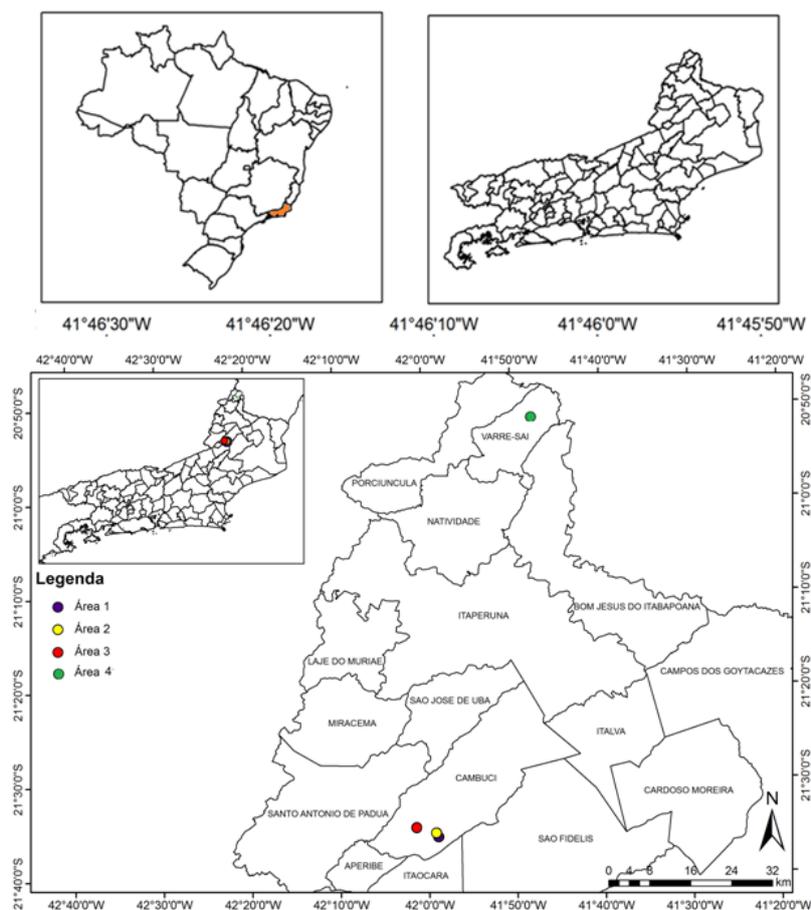


Fig. 1 Collection areas in northwestern state of Rio de Janeiro, Brazil.

Sample processing

In the laboratory, rhizosphere samples were left to dry, clods were broken, sieved through a 2-mm mesh, lyophilized (LioTop L108), and macerated in mortar and pestle. Next, samples were digested according to Santos et al.²¹ Briefly, a 0.5-g dry sample was weighed in a PTFE tube, 8 mL of a 3:1 HCl 37%:HNO₃ 65% mixture were added, and digestion proceeded in a microwave system (Mars X-Press, CEM) for 25 min (a 10-min ramp-up to 95°C and a 15-min hold at 95°C) at 1600 W. The product was allowed to cool and the final extract was obtained by filtering through Whatman grade 40 paper. The extract was completed to a final 50-mL volume with ultrapure water (MilliQ).

Each plant material was lyophilized and homogenized the same way as the rhizosphere, but digestion was carried out as in Silva-Filho et al²² Sheehan et al²³ Rea et al.²⁴ A 0.2-g dry sample was weighed in a Teflon tube (X-Press). Then, 4 mL ultrapure water were added (MilliQ) followed by 2 mL hydrogen peroxide 30% and 6 mL of a 1:1 H₂SO₄ 97%:HNO₃ 65% mixture. Digestion ensued in a microwave system (Mars X-Press, CEM) (a 5-min ramp-up to 95°C and a 25-min hold at 95°C) at 1600 W. As above, the product was allowed to cool and the final extract was obtained by filtering through Whatman grade 40 paper. The extract was completed to a final 50-mL volume with ultrapure water (MilliQ).

All digestion steps were carried out in triplicate for each set of 40 samples, and included negative controls. Precision was 15% and accuracy was calculated according to the reference samples in Table 1.

Table 1 Accuracy and detection threshold of the analytical method.

ACCURACY		Cd	Hg	Zn	Fe
Apple Leaf 1515 NIST	Measured value (mg.kg ⁻¹)	ND	0.042±0,005	11.8±0,5	81±3
	Certified Value (mg.kg ⁻¹)	0.013 ± 0.002	0.044±0.004	12.5 ± 0,3	83 ± 5
	Recovery (%)	ND	94.3	94.7	97.3
	Detection Limits (mg.kg ⁻¹)	0.1	0.002	0.7	1.5
Sediment MESS 3 NRCC	Measured value (mg.kg ⁻¹)	0.23±0,01	0.084±0,008	58±6	4183±115
	Certified Value (mg.kg ⁻¹)	0.24 ± 0.01	0.091±0.009	59 ± 8	4340 ± 111
	Recovery (%)	96	92	99	96
	Detection Limits (mg.kg ⁻¹)	0.05	0.001	0.3	0.7

Importantly, all glassware was previously decontaminated in three 24-h stages using Extran 5%, HCl 5%, and HNO₃ 5% sequentially; then, all material was rinsed in deionized water and in ultrapure water (MilliQ). All reactants used in the digestion process were of analytical grade (Merck).

Determination of Metals

In brief, Hg concentration in samples was determined in a mercury analyzer (QuickTrace M-7500, CETAC), and Cd, Fe, and Zn levels were analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES 720 ES, Varian).

Bioaccumulation, translocation, and enrichment factors

BAF was calculated considering the ratio of analyte level in plant to that in rhizosphere ($BAF = \frac{\sum \text{element}_{\text{plant}}}{\sum \text{element}_{\text{rhizosphere}}}$) and the ratio of analyte level in root to that in rhizosphere ($BAF = \frac{\sum \text{element}_{\text{root}}}{\sum \text{element}_{\text{rhizosphere}}}$)²⁵ while TF was calculated considering the following ratios between Cd and Hg levels in samples: $TF_{\text{leaf/root}}$, $TF_{\text{green fruit/leaf}}$, $TF_{\text{ripe fruit/leaf}}$.²⁶ Both factors were calculated using the actual mass of each analyte in each material collected and ruling out the effect of dilution.

The enrichment factor (EF) was used as defined by Gresens²⁷, that is, a double ratio normalized to a reference chemical element. In this study, iron (Fe) was used as reference element, and the reference Fe, Cd, and Hg levels in soils were obtained from Rempe et al.²⁸ and Fadigas et al.²⁹

EF was calculated using the equation:

$$EF = (C_e \div C_e^{RV}) \div (C_{Fe} \div C_{Fe}^{RV})$$

where

C_e = concentration of the chemical element studied in soil sample

C_e^{RV} = reference value of the chemical element studied in soil

C_{Fe} = iron concentration in soil sample

C_{Fe}^{RV} = reference value of Fe concentration in soil

As a classification system, EF values between 0.5 and 1.5 indicated trace elements from weathering of rocks, while values above 1.5 indicated that the main source of an element is anthropic. The higher the EF value, the higher the anthropic influence.³⁰

Estimation of dietary intake (EDI)

Estimations of dietary intake (EDI) of Cd and Hg in tomato fruit were obtained based on Ihedioha and Okoye.³¹ In the analysis of Cd and Hg levels in tomato and the relationship they have with diet, mean weight of human individuals was 62.5 kg, while the mean daily tomato consumption adopted was 6.6 g, according to data published by IBGE.³²

Statistical analysis

Differential statistics and linear regression were conducted using the R software.³³ Comparisons between plant tissues and soils were carried out using ANOVA and the Tukey test *a posteriori*, and P-values are given. When necessary, data were transformed using a maximum likelihood function (MASS, in the R software) to meet the ANOVA requirements.

RESULTS AND DISCUSSION

Cd and Hg levels in samples

Current mass-based bioaccumulation pattern of Cd and Hg in the tomato plant parts analyzed considering levels of the metals in the rhizosphere and ruling out the effect of dilution is presented in Fig 2.

Mean Cd levels in rhizosphere and plant parts did not vary statistically, indicating a strong interaction between rhizosphere and roots and that the absorption route of the metal by tomato plants is efficient (Fig. 2A). For Hg, levels in rhizosphere were statistically higher than in roots (0.71 μg and 0.27 μg , respectively; $p < 0.05$). Importantly, Hg levels in the other plant parts analyzed were lower than the value observed in roots. Also, the levels of the metal in green tomatoes were comparable to those observed in leaves and ripe fruits (Fig. 2B).

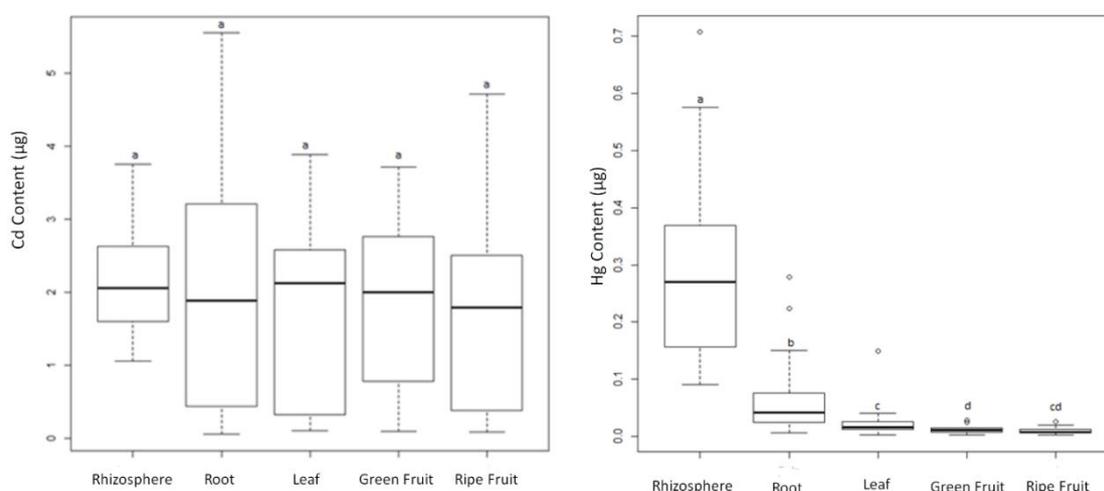


Fig. 2 Mass (μg) of Cd (2A) and Hg (2B) in roots, green fruit, ripe fruit, and rhizosphere of tomato plants and plantations. Lowercase letters compare tests of one element in different plant parts.

Taken together, the fact that Hg levels in the rhizosphere were statistically higher than in roots and the observation that these structures contained higher

levels of the metal compared with leaves and fruit suggest that roots retain and immobilize Hg. In other words, roots restrict the circulation of the metal in other parts of the tomato plant.

Research has shown that roots act as a barrier to the translocation of toxic metals to aerial part plants.³⁴⁻³⁵ Moreover, other authors have reported an antagonistic relationship between Cd and zinc (Zn), noting that lower Zn levels are absorbed by roots when Cd levels in soils are high.³⁶ But an opposite relationship was observed for Fe and Hg.³⁷ The results of the present study, indicated the threshold levels of Cd and Hg (0.4 mg kg^{-1} and 80 mg kg^{-1} , respectively) in soils that affect the absorption of Zn and Fe, causing nutritional imbalance in tomato plants (Fig. 3A and 3B).

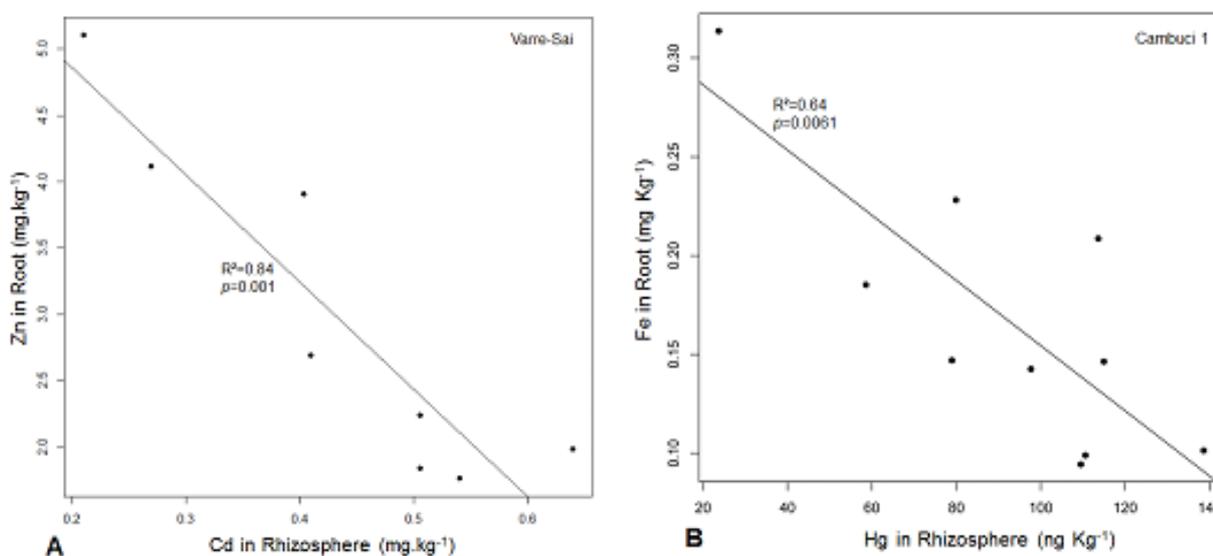


Fig. 3 (A) Concentration of Cd in rhizosphere versus concentration of Zn in roots; (B) concentration of Hg in rhizosphere and concentration of Fe in roots.

Another important aspect is that these findings indicate the existence of strong geochemical interactions in the rhizosphere that reduce the levels of

bioavailable Hg to roots: only a small portion of the metal is detected in soil solutions. Most Hg occurs adsorbed on minerals, mainly Fe and manganese (Mn) oxides and hydroxides, but the metal also forms complexes with organic compounds in soils.³⁸ The geochemical compatibility between Cd and Zn in rhizosphere and the mobility of Zn promote the translocation of Cd from rhizosphere to roots based on weak adsorption processes involving organic matter, silicates, and oxides.³⁹

Bioaccumulation and translocation factors

Fig. 4 shows the BAF and FT values calculated for Cd and Hg in the samples analyzed.

The BFA calculated considering the influence of rhizosphere on tomato plants was statistically higher ($p < 0.05$) for Cd (1.13), compared with Hg (0.24). BAF values above 1 indicate that the plant has a strong bioaccumulation potential.¹⁸ In addition, the approximately five times higher BFA value of Cd indicate the existence of labile forms, easily incorporated by plants.⁴⁰ Despite the fact that mean Cd level in soil was approximately seven times higher than that of Hg, mean $BAF_{\text{root/rhizosphere}}$ values were the lowest for both metals, when compared with other plant parts. Interestingly, Chang et al.⁴¹ observed that the BAF of Cd in leafy vegetables was 30 times as high as the value calculated for Hg in the same material, while Lei et al.⁴² reported that wheat grains bioaccumulate Cd preferably, as opposed to Hg.

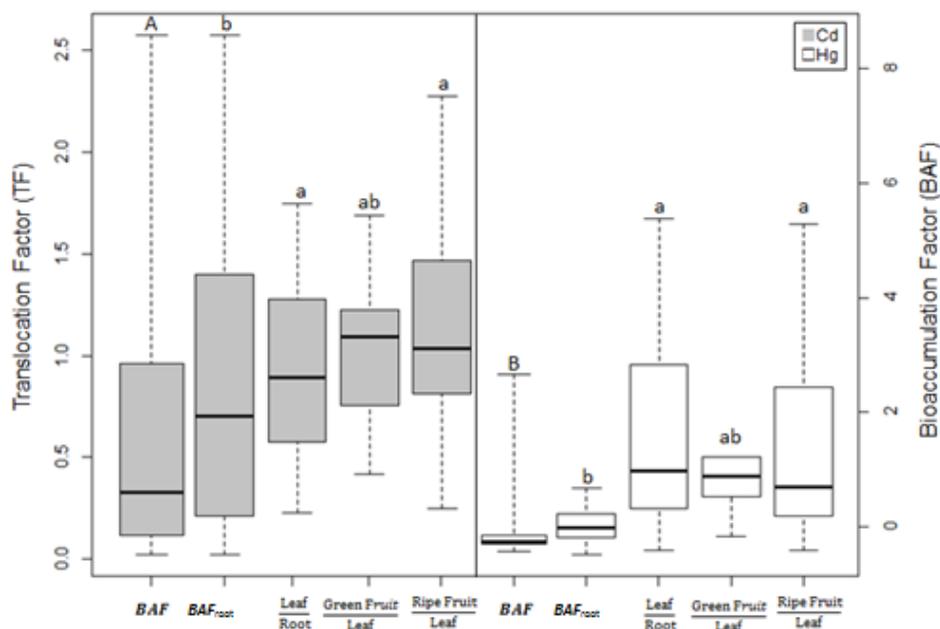


Fig. 4 Bioaccumulation and translocation factors of Cd and Hg in the materials studied; lowercase letters compare the translocation factors of one element; uppercase letters compare the bioaccumulation factors of different elements.

Statistically, the TF values calculated for Cd and Hg exhibited similar patterns: $TF_{\text{leaf/root}}$ did not differ from $TF_{\text{ripe fruit/leaf}}$, while $TF_{\text{green fruit/leaf}}$ was comparable to the other values.

Approximately 93% of the Cd absorbed by roots reached aerial tomato plant parts (leaf or fruit), while only 48.6% of the Hg bioaccumulated in roots was translocated to aerial parts. For Cd, mean $TF_{\text{green fruit/leaf}}$ was the highest, followed by $TF_{\text{leaf/root}}$, $TF_{\text{ripe fruit/leaf}}$. For Hg, the highest mean TF value was $TF_{\text{leaf/root}}$, followed by $TF_{\text{green fruit/leaf}}$ and $TF_{\text{ripe fruit/leaf}}$.

As a rule, the mobility of trace elements in plants varies with the chemical characteristics of the element studied and of soils, and is promoted by the formation of complexes with amides and phytochelatins.⁴³ On the other hand, mobility may involve important physiological processes such as the translocation

of the element from roots to aerial parts by xylem and the xylem-phloem transportation mechanism, which redistributes an element more selectively in a plant.⁴⁴ Also, Malavolta⁴⁵ argues that metals that are not considered micronutrients have low mobility in phloem, forming high molecular weight organic complexes. Bioaccumulation of Hg in tomato plants was comparatively high, as a result of the formation of complexes in roots that adsorb onto the walls of root cells, which in turn is an important indicator of the tolerance of a plant to the toxic metal.⁴⁶⁻⁴⁷ Nonetheless, Burzynski⁴⁸ and Cho and Park⁴⁹ believe that this may lead to mineral deficiency in plants, blocking the association of ions such as Ca^{2+} , Mg^{2+} , and K^+ .

In an experiment with tomato seedlings exposed to 2 mg L^{-1} Hg, Cho and Park⁴⁹ observed that only 2% of the metal was translocated to leaves. Other studies have shown that Hg accumulation in aerial plants depends on translocation and on the absorption of the metal from the atmosphere, mainly in its vapor phase⁵⁰⁻⁵¹.

Contrasting with Hg, the translocation of Cd from roots to aerial parts is high. The geochemical association between Zn and Cd (Fig. 5) indicates that Zn limits Cd uptake by tomato plants only when its concentration in the rhizosphere is high (100 mg kg^{-1}).

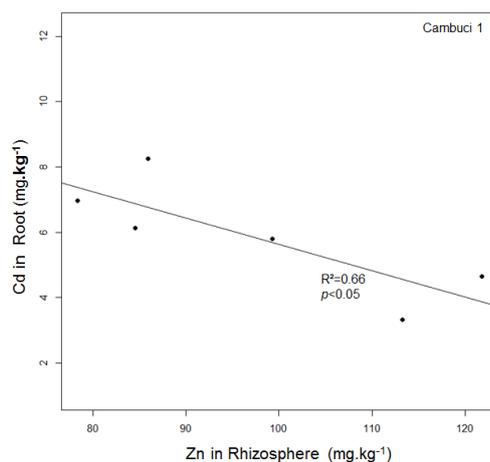


Fig. 5 Concentration of Zn (mg g^{-1}) in rhizosphere versus concentration of Cd in roots.

Using a nutrient solution, Sbartaí et al.⁵² reported the low influence of low Zn levels (3.3 mg L^{-1}) on Cd uptake (11.2 mg L^{-1}) by roots and leaves of tomato plants. Yet, the authors also note that, when Zn levels increase (33 mg L^{-1} Zn), Cd uptake by roots decrease. According to another study, Cd levels between 5 mg kg^{-1} and 20 mg kg^{-1} are toxic to plants, which are low, compared to the values observed for Zn (100 mg kg^{-1} to 500 mg kg^{-1}).¹⁵

The competition between essential and toxic elements for binding sites in various plant structures such as the cytoplasmic membrane and cell walls may influence the distribution of these toxic metals.⁵³⁻⁵⁴ The translocation route of Cd is narrowly associated with the routes of Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , and Mn^{2+} , which is translocated by a variety of specific transporter proteins, like those of the ZIP and NRAMP families.⁵⁴⁻⁸ Clemens⁵⁵ observed that Cd^{2+} is translocated opportunistically, since the channels used for uptake are not very specific. NRAMP proteins are considered generalist transporters, due to their potential to translocate Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+} .⁵⁴

All EF values calculated for the two study areas were below the value that indicates anthropic origin of Cd (EF > 1.5) (Fig. 6).

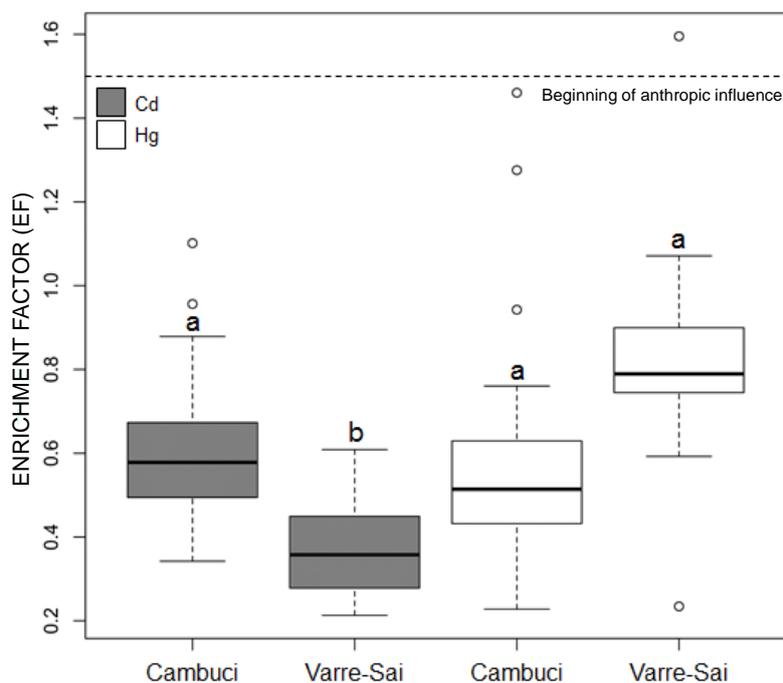


Fig. 6 Enrichment factor of Cd and Hg in tomato plantations; lowercase letters compare enrichment factors of different elements in the same collection area.

Although the mean EF for Hg in Varre-Sai was 1.5 times as high as that observed for the metal in Cambuci, this difference was not statistically significant ($p < 0.05$). However, the EF for Cd in Varre-Sai was statistically different from the value observed for Cambuci, which was 1.6 times higher ($p < 0.05$).

The Hg concentrations in the rhizosphere samples collected in Varre-Sai (Table 2) were statistically higher than the values observed for Cambuci ($p < 0.05$). This may be associated with the more effective circulation of Hg in the region.⁵⁶⁻⁵⁷ Sugarcane plantations near the collection area may be the source of Hg vapor, since plantations are burnt before harvest to remove leaves, which

have no commercial value and make cutting more difficult.⁵⁸ In addition, Varre-Sai is located on mountainous terrain, which may work as a physical barrier that reduces deposition and the circulation of atmospheric Hg across longer distances.

Regulations for soil

The mean Cd level in soil was higher than the mean Hg level (Table 2). All Hg and Cd concentrations observed in soil samples were below both the prevention interval, which indicates harmful changes concerning soil quality (between 0.5 mg kg⁻¹ and 1.0 mg kg⁻¹) and the intervention range, which signals human health hazards (3 mg kg⁻¹ and 12 mg kg⁻¹), as defined by Brazilian regulation.⁵⁹ On the other hand, 75% of soil samples failed to meet the standard defined in China (0.3 mg kg⁻¹),⁶⁰ where the limit are lower possibly due to the mining history in Asia.

Regulations for fruit

In total, 80 fruits were analyzed. Cd levels exceeded the maximum residual level (MRL) established by FAO (0.67 mg kg⁻¹d.w.)⁶¹ in 57.5% of ripe fruit and in 27.5% of green tomatoes. The limit value defined by FAO is twice as high as the MRL stipulated in Brazilian⁶² (which specifically includes plants of the *Solanacea* genus like tomato, eggplant, and pepper, for instance) and Chinese regulation,⁶³ which are both 0.33 mg kg⁻¹ (d.w.). Eleven ripe tomato samples had Cd levels below the national MRL; in the other samples, concentrations of the metal were as much as 17 times higher than the acceptable value.

Table 2: Concentration of Cd and Hg (mg kg^{-1}) in the materials studied; tolerable daily intake (TDI) and estimated daily intake (EDI) values ($\mu\text{g day kg}^{-1}$).

Concentrations (mg kg^{-1} p.s.)										
Sample Areas	Cd					Hg				
	Rhizosphere	Root	Leaf	Green Fruit	Ripe Fruit	Rhizosphere	Root	Leaf	Green Fruit	Ripe Fruit
Varre Sai (Confidence interval)	$0.44 \pm 0.13^{\text{aB}}$ 0.21 - 0.64	$3.21 \pm 1.4^{\text{aA}}$ 1.76 - 5.26	$2.91 \pm 1.18^{\text{aA}}$ 1.38 - 4.69	$2.44 \pm 1.11^{\text{aA}}$ 1.41 - 4.28	$2.76 \pm 0.63^{\text{aA}}$ 1.87 - 3.94	$0.09 \pm 0.03^{\text{aA}}$ 0.02 - 0.13	$0.12 \pm 0.03^{\text{aA}}$ 0.06 - 0.18	$0.02 \pm 0.02^{\text{aB}}$ <DL - 0.04	$0.01 \pm 0.01^{\text{aB}}$ <DL - 0.01	$0.01 \pm 0.002^{\text{aB}}$ 0.01 - 0.02
Cambuci (Confidence Interval)	$0.43 \pm 0.16^{\text{aA}}$ 0.21 - 0.75	$2.99 \pm 3.57^{\text{aA}}$ 0.06 - 15.06	$2.64 \pm 3.75^{\text{aA}}$ 0.06 - 17.74	$1.58 \pm 1.6^{\text{aA}}$ 0.0.9 - 5.71	$1.88 \pm 1.62^{\text{bA}}$ 0.11 - 4.04	$0.04 \pm 0.02^{\text{bAB}}$ 0.01 - 0.08	$0.07 \pm 0.08^{\text{bA}}$ 0.02 - 0.35	$0.03 \pm 0.03^{\text{aBC}}$ 0.01 - 0.19	$0.02 \pm 0.01^{\text{aCD}}$ <DL - 0.03	$0.01 \pm 0.01^{\text{aD}}$ <DL - 0.03
Legislation (mg kg^{-1} p.s.)										
Maximum Residual Level (MRL)	1 ⁽⁵⁹⁾			0.67 ⁽⁶¹⁾		0.5 ⁽⁵⁹⁾				-
	3 ⁽⁵⁹⁾			0.33 ⁽⁶²⁾		12 ⁽⁵⁹⁾				-
	0.3 ⁽⁶⁰⁾			0.33 ⁽⁶³⁾		0.3 ⁽⁶⁰⁾				0.066 ⁽⁶³⁾
Daily Intake (EDI) ($\mu\text{g dia}^{-1} \text{kg}^{-1}$)										
Estimated Daily Intake				0.029						0.0002
Tolerable Daily Intake				1 ⁽⁶⁴⁾						1.6 ⁽⁶⁴⁾

*Letras minúsculas comparam as concentrações do mesmo elemento químico em matrizes iguais de diferentes locais de coleta.

*Letras maiúsculas comparam as concentrações do mesmo elemento químico em diferentes tecidos do mesmo local de coleta.

CONAMA (2009)⁽⁵⁹⁾ - National Council of the Environment (Brazil) - Valor de Prevenção (VP) = concentração acima da qual podem existir alterações prejudiciais à qualidade do solo.

CONAMA (2009)⁽⁵⁹⁾ - National Council of the Environment (Brazil) - Valor de Intervenção (VI) = concentração acima da qual existem riscos potenciais à saúde humana sob exposição genérica

CEPA (1990)⁽⁶⁰⁾ - Chinese Environmental Protection Administration

ANVISA (2013)⁽⁶²⁾ - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Brasil - Valores de concentração do gênero Solanácea (tomate, berinjela, pimenta, entre outras)

FAO (2009)⁽⁶¹⁾ - Food and Agriculture Organization of the United Nations

China (2014)⁽⁶³⁾ - National Food Safety Standard of Maximum Levels of Contaminants

WHO (1992)⁽⁶⁴⁾

DL= Detection Limit

In a study carried out in Cambuci, Carvalho et al.⁶⁵ conducted interviews and discovered that at least 47% of farmers in the region often use chlorpyrifos, an insecticide, during growth and ripening of tomatoes to protect crops against disease and pests. In addition, the authors draw attention to two other critical aspects of tomato farming that may pose additional hazards: the use of mixtures of chemicals and extra applications there after rain or when diseases emerge, which sometimes may exceed three a week.

Based on Chinese regulation⁶³ all Hg concentrations observed in fruit samples were below to 0.066 mg kg⁻¹d.w., since it was not found lines adopted by other countries.

Estimated daily intake

Vegetables are an important source of nutrients to humans and are considered one of the main exposure routes to trace elements, accounting for roughly 90% of the total uptake of elements.⁶⁶ Food security has sparked considerable interest, and maximum Cd and Hg tolerable daily intake (TDI) acceptable have been established by the World Health Organization (WHO),⁶⁴ namely 1 µg day kg⁻¹ and 1.6 µg day kg⁻¹.⁶³ In the present study, although Cd levels in tomatoes exceeded the MRL established by Brazilian regulation, estimated daily intake (EDI) values are below the recommended values of Cd (mean: 0.029 µg day kg⁻¹) and mercury (mean: 0.0002 µg day kg⁻¹), not posing any hazard to human health.

Conclusion

Approximately 93% of the Cd accumulated by roots reached aerial parts of tomato plants (leaf and fruit), while only 46% of Hg was translocated, indicating the lower mobility of the metal and the possible existence of different uptake routes for the

two elements. Although Cd and Hg were measured in 83% of rhizosphere samples, the concentration intervals calculated do not suggest harmful changes to soil quality, underscored by the low EF obtained, which were all below the limit indicating anthropic influence. Since 57.5% of ripe fruit and in 27.5% of green tomatoes exceeded MRL of Cd established by FAO regulation by over 17 times, indicating that tomatoes represent a health hazard. However, EDI values did not confirm this hypothesis, considering the general population.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the Laboratory of Environmental Sciences of the State University of the North of Rio de Janeiro (Laboratório de Ciências Ambientais, LCA, da Universidade Estadual Norte Fluminense, UENF) for metal determinations. C.M.M. Souza received financial support from the Carlos Chagas Filho Research Support Foundation of the State of Rio de Janeiro (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, FAPERJ; C-26/111.368/2012).

REFERENCES

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). U.S. Department of Health and Human Services. Priority list of hazardous substances. Digital report (2015).<https://www.atsdr.cdc.gov/spl/>. Accessed 4 Dec 2016.
2. Vieira C, Morais S, Ramos S, Delerue-Matos C, Oliveira MBPP, Mercury cadmium lead and arsenic levels in three pelagic fish species from the Atlantic Ocean: Intra and inter-specific variability and human health risks for consumption. *Food Chem Toxicol* **49**:923-932 (2011).
3. Gratão PL, Resposta de plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) ao cádmio. PhD thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade São Paulo, Piracicaba, Brazil (2008).
4. Food and Agriculture Organization of The United Nations (FAOSTAT), World Productivity (2013). <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Accessed 04 Set 2017.
5. Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE). Anthropometry and nutritional status of children, adolescents and adults in Brazil (2009). http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_e_ncaa/defaulttabzip_brasil.shtm Accessed 18 September 2017.
6. Brazilian Company of Agricultural Research (EMBRAPA), Tomato crop (for table) I, Plantar Collection 5. National Horticultural Research Center EMBRAPA SPI, Brasilia, Brazil (1993).
7. Lugon-Moulin N, Ryan L, Donini P, Rossi L, Cadmium content of phosphate fertilizers used for tobacco production. *Agron Sustain Dev* **26** (3) pp.151-155 (2006).

8. Zhao X, Wang D, Mercury in some chemical fertilizers and the effect of calcium superphosphate on mercury uptake by corn seedlings (*Zea mays* L.). *J Environ Sci* **22**:1184-1188 (2010).
9. Zoffoli H, Amaral-Sobrinho NMB, Luisi MV, Zonta, Marcon G, Tólon-Becerra A, Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's Southern Region. *Environ Monit Assess* **185**:2423-2437(2013).
10. Machado Neto AS, Viabilidade agroeconômica da produção de tomate de "mesa" sob diferentes sistemas de cultivo e manejo de adubação. PhD thesis, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goyacazes, Rio de Janeiro, Brazil(2014).
11. Luo L, Ma Y. Zhang S, Wei D, Zhu YG, An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. *J Environ Manag* **90**:2524–2530 (2009).
12. Marcos Filho J, Ferraz AC, Efeitos do tratamento de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) arroz (*Oryza sativa* L.) e soja [*Glycine max* (L.) Merrill] com alguns fungicidas não mercuriais. *An Esc Super Agric Luiz Queiroz* **32**:497-507(1975).
13. Camara VM, Campos RC, Perez MA, Tambelini AT, Klein CH, Teores de mercúrio no cabelo: um estudo comparativo em trabalhadores da lavoura de cana-de-açúcar com exposição pregressa aos fungicidas organo-mercuriais no município de Campos-RJ. *Cad Saúde Púb [online]* **2**:359-372(1986).
14. National Health Surveillance Agency (ANVISA). Program of analysis of residues of agrochemicals in food. Report of the analyzes of samples monitored in the period from 2013 to 2015 246p. (2016).
15. Kabata-Pendias, A Trace elements in soils and plants, 4th ed., Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Raton, FL (2010).

16. Silva AA, Identificação de espécies hiperacumuladoras e prospecção de genes relacionados à tolerância de plantas a cádmio. PhD thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (2010).
17. Kachenko AG, Singh B, Heavy metal contamination in vegetables grown in urban and metal smelter contaminated sites in Australia. *Water Air Soil Pollut* **169**:101–23(2006).
18. Chojnacka K, Chojnacki A, Górecka H, Górecki H, Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *Sci Total Environ* **337**:175-182 (2005).
19. Liñero O, Ciudad M, Carrero JA, Nguyen C, Diego A Accumulation and translocation of essential and nonessential elements by tomato plants (*Solanum lycopersicum*) cultivated in open-air plots under organic or conventional farming techniques. *J Agric Food Chem*, **63**(43):9461-9470 (2015).
20. Behring SB, Influência do manejo do solo e da dinâmica da água no sistema de produção do tomate de mesa: subsídios a sustentabilidade agrícola do Noroeste Fluminense. PhD thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (2007).
21. Santos EJ, Herrmann AB, Frescura VLA, Curtius AJ, Simultaneous determination of As, Hg, Sb, Se and Sn in sediments by slurry sampling axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry using on-line chemical vapor generation with internal standardization. *J. Anal. At. Spectrom*, **20**: 538-543 (2005).
22. Silva-Filho EV, Machado W, Oliveira RR, Sella SM, Lacerda LD, Mercury deposition through litterfall in an Atlantic Forest at Ilha Grande, Southeast Brazil.

Chemosphere, **65**: 2477-2484 (2006).

23. Sheehan KD, Fernandez IJ, Kahl JS, Amirbahman A, Litterfall mercury in two forested watersheds at Acadia National Park, Maine, USA. *Water Air Soil Pollut* **170**(1): 249-265 (2006)

24. Rea AW, Lindberg SE, Scherbatskoy T, Keller GJ, Mercury accumulation in foliage over time in two northern mixed-hardwood forests. *Water Air Soil Pollut* **133**:49-67 (2002).

25. Yoon J, Cao X, Zhou Q, Ma QL, Accumulation of Pb Cu and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site. *Sci. Total Environ.* **368**: 456–464 (2006).

26. Zu YQ, Li Y, Chen JJ, Chen HY, Qin L, Schwartz C, Hyperaccumulation of Pb Zn and Cd in herbaceous grown on lead–zinc mining area in Yunnan China. *Environ Int* **31**:755–762 (2005).

27. Gresens RL, Composition-volume relationships of metasomatism. *Chem Geol* **2**:47-55 (1967).

28. Rempe EF, Amorim LA, Vasconcelos Neto R, Information Collection on mercury including environmental standards in Brazil. 4th Meeting of the Mercury Lamps Working Group. Technical Chamber of Health Environmental Sanitation and Waste Management of the National Environment Council. Department of Environmental Health Surveillance and Occupational Health Brasília, Brazil (2010).

29. Fadigas SF, Amaral Sobrinho NB, Mazur N, Anjos LHC, Freixo AA, Proposição de valores de referência para a concentração natural de metais pesados em solos brasileiros. *Rev Bras Eng Agríc Ambien* **10**:699-705(2006).
30. Zhang J, Liu CL, Riverine composition and Estuarine Geochemistry of Particulate Metals in China – Weathering Features Anthropogenic Impact and Chemical Fluxes. *Estuarine Coastal and Shelf Science Lett.* **54**: 1051- 1070 (2002).
31. Ihedioha JN, Okoye COB, Dietary intake and health risk assessment of lead and cadmium via consumption of cow meat for an urban population in Enugu State Nigeria. *Ecotoxicol Environ Saf* **93**:101–106 (2013).
32. Brazilian Institute of Geography and Statistics (IBGE), household per capita food purchase per group, subgroups and products. Family Budget Research in 2008-2009 (2010). Available from, Accessed March 15, 2016.
33. R Core Team, R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria (2016). Available from. Accessed April 10, 2016.
34. Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML, Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol* **17**(1): 21-34 (2005).
35. Patra M, Sharma A, Mercury toxicity in plants. *Botanical Review* **66**: 379-422 (2000).

36. Tkalec M, Stefanic PP, Cvjetko P, Sikic S, Pavlica M, Balen B, The effects of cadmium-Zinc interactions on biochemical responses in tobacco seedlings and adult plants. *Plos One* **9** (1): 1-13 (2014).
37. Calgaroto NS, Nicoloso FT, Pereira LB, Cargnelutti D, Antes FF, Dressler VL, Nutritional disorder in *Pfaffia glomerata* by mercury excess in nutrient solution. *Cienc Rural St Maria* **46**:279-285(2016).
38. Malavolta E, Manual of mineral nutrition of plants. Ceres, São Paulo (2006).
39. McBride MB, Environmental chemistry of soils. Oxford University Press, New York (1994).
40. Cui Y, Zhang X, Zhu Y, Does copper reduce cadmium uptake by different rice genotypes? *J Environ Sci* **20** (3):332-338 (2008).
41. Chang CY, Yu HY, Chen JJ, Li FB, Zhang HH, Liu CP, Accumulation of heavy metals in leaf vegetables from agricultural soils and associated potential health risks in the Pearl River Delta, South China. *Environmental Monitoring and Assessment* **186** (3):1547-1560 (2014).
42. Lei L, Liang D, Yu D, Chen Y, Song W, Li J, Human health risk assessment of heavy metals in the irrigated area of Jinghui Shaanxi China in terms of wheat flour consumption. *Environ Monit Assess* **187**:647 (2015).
43. Dortas C, Sah R, Brown PH, Zeng Q, Hu H, Remobilização de micronutrientes e elementos tóxicos em plantas superiores. In: Ferreira ME et al. (eds) Micronutrientes

e elementos tóxicos na agricultura. Potafos, Jaboticabal, São Paulo, Brazil pp 43-51(2001).

44. Marschner H, Mineral nutrition of higher plants. 2nd edn. Academic Press, London (1995).

45. Malavolta E, Fertilizers and their environmental impact. Produquímica, São Paulo (1994).

46. Moreno FN, Anderson CWN, Stewart RB, Robinson BH, Phytofiltration of mercury-contaminated water: Volatilisation and plant-accumulation aspects. *Environ Exp Bot* **62**:78-85 (2008).

47. Cavallini A, Natali L, Durante M, Maserti B, Mercury uptake distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf) plants. *Sci Tot En* **233/234**:119–127 (1999).

48. Burzynski M, The influence of lead and cadmium on the absorption and distribution of potassium calcium magnesium and iron in cucumber seedlings. *Acta Physiol Plant* **9**:229–238 (1987).

49. Cho CH, Park JO, Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plants Sci* **156**:1-9 (2000).

50. Azevedo R, Rodriguez E, Phytotoxicity of mercury in plants: a review. *J Bot*: 6 pages (2012).

51. Suszcynsky EM, Shann JR, Phytotoxicity and accumulation of mercury in tobacco subjected to different exposure routes. *Environ Toxicol Chem* **14**:61–67 (1995).

52. Sbartai H, Djebbar MR, Sbartai I, Berrabbah H, Bioaccumulation of cadmium and zinc in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Comptes Rendus Biol* **335**:585-593 (2012).
53. McLaughlin MJ, Singh BR, Cadmium in Soils and Plants. In: McLaughlin M.J., Singh B.R. (eds) Cadmium in Soils and Plants. *Developments in Plant and Soil Sciences* Springer, Dordrecht **85**: 1-9. (1999).
54. Nazar R, Iqbal N, Masood A, Iqbal M, Khan R, Syeed S, Khan NA, Cadmium toxicity in plants and role of mineral nutrients in its alleviation. *Am J Plants Sci* **3**:1476-1489 (2012).
55. Clemens S, Toxic metal accumulation responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochim* **8**:707-1719 (2006).
56. Sousa WP, Carvalho CEV, Carvalho CCV, Suzuki MS, Mercury and organic carbon distribution in six lakes from the North of the Rio de Janeiro State. *Braz Arch Biol Technol* **47**:139-145 (2004).
57. Azevedo LS, Almeida MG, Bastos WR, Suzuki MS, Recktenvald MCNN, Bastos MTS, Vergílio CS, de Souza CMM, Organotropism of methylmercury in fish of the southeastern of Brazil. *Chemosphere* **185**:746-753 (2017).
58. Lacerda LD, Paraquetti HHM, Rezende CE, Silva LFF, Silva Filho EV, Marins RV, Ribeiro MG, Mercury concentrations in bulk atmospheric deposition over the coast of Rio de Janeiro Southeast Brazil. *J Braz Chem Soc* **13**:165-169 (2002).
59. National Council for the Environment (CONAMA) Resolution No. 420 of 28 December 2009. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>.

Accessed 28 Dec 2016.

60. Chinese Environmental Protection Administration (CEPA) Elemental background values of soils in China. Environmental Science Press of China, Beijing (1990).

61. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) CODEX general standard for contaminants and toxins in food and feed, CODEX STAN 193-1995. http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/livestockgov/documents/1_CXS_193e.pdf (2009). Accessed 27 Jan 2017.

62. National Health Surveillance Agency (ANVISA), Provides for the MERCOSUR Technical Regulation on Maximum Limits of Inorganic Contaminants in Foods. Resolution RDC n. 42, of August 29, 2013, ANVISA, Brasilia, Brazil.

63. National Food Safety Standard of Maximum Levels of Contaminants in Foods (CHINA).Beijing.[https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Maximum%20Levels%20of%20Contaminants%20in%20Foods%20 Beijing China%20 %20Peoples%20Republic%20of%2012-11-2014.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Maximum%20Levels%20of%20Contaminants%20in%20Foods%20%20Beijing%20China%20%20Peoples%20Republic%20of%2012-11-2014.pdf) (2014). Accessed 27 Jan 2017.

64. World Health Organization (WHO), Assessment of dietary intake of chemical contaminants. WHO/HPP/FOS/92.6, UNEP/GEMS/92.F2, United Nations Environmental Program (1992).

65. Carvalho CRF, Ponciano NJ, de Souza CLM, Levantamento dos agrotóxicos e manejo na cultura do tomateiro no município de Cambuci, RJ. *Cienc Agríc Rio Largo* **14**:15-28 (2016).

66. Khan UM, Malik RN, Muhammad S, Ullah F, Qadir A, Healthy risk assessment of consumption of heavy metals in Market food crops from Sialkot and Gujranwala Districts, Pakistan. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal* **21** (2):327-337 (2015).

Capítulo 2 - Respostas Ecofisiológicas do Tomateiro (*Solanum lycopersicum L.*) exposto a mercúrio e cádmio em condições experimentais.

RESUMO

A bioacumulação de elementos traço pelas plantas pode causar alterações na fisiologia desses vegetais. Para comparar os efeitos de Hg e Cd nas plantas, tomateiros foram cultivados em solos contendo 0; 0,2; 3,0 e 6,0 mg kg⁻¹ de Cd e 0; 0,2; 12 e 24 mg kg⁻¹ de Hg, durante um período de três e nove semanas em casa de vegetação. Os teores de Cd e Hg em folhas foram monitorados, além dos parâmetros de trocas gasosas como a taxa fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*G_s*), concentração de CO₂ subestomático (*C_i*) e a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (*F_v/F_m*). O Cd nas folhas se relacionou inversamente com os parâmetros *G_s* e *E*. Os valores de *A* foram reduzidos sem haver inibição, com o aumento do tempo de exposição ao Cd. Para o Hg, as plantas tiveram redução na *E*, *C_i* e *F_v/F_m* quando expostas à 24 mg kg⁻¹ na nona semana, sem haver redução na *A*. A exposição crônica do tomateiro ao Hg e ao Cd gerou efeitos diferentes nos parâmetros ecofisiológicos da planta, porém nenhum efeito drástico foi evidenciado, sendo possível considerar o tomateiro como uma espécie tolerante aos efeitos tóxicos de Hg e Cd nessas concentrações.

Palavras Chave: tomate; bioconcentração; mercúrio; cádmio; ecofisiologia.

1. INTRODUÇÃO

O tomate (*Solanum lycopersicum* L.) é a espécie mais importante do grupo das hortaliças, cuja produtividade média no Brasil, segundo levantamento do DIEESE (2010), representou uma participação de 3,1% no mercado global em 2008, o que conferiu ao país o 8º lugar no ranking da produção mundial. Considerada uma espécie cosmopolita possui uma ampla capacidade de adaptação as diferentes condições climáticas, e por isso é cultivada no mundo todo, embora as chuvas, a variação de temperatura e a umidade relativa do ar interfiram na fitossanidade, facilitando o desenvolvimento de doenças fúngicas e bacterianas.

O uso contínuo de agroquímicos em áreas agrícolas é considerado como uma das principais fontes de elementos potencialmente fitotóxicos (Nagajyoti *et al.*, 2010; Verkleji, 1993). Tanto o Cd quanto o Hg têm sido descritos como constituintes de fertilizantes (preferencialmente os fosfatados no caso do Cd) (Pereira *et al.*, 2011), enquanto os herbicidas e fungicidas de sementes são enriquecidos por Hg (Cavallini *et al.*, 1999; Ross e Stewart, 1962). No Brasil, é reportado o uso de grandes quantidades de pesticidas no cultivo desse vegetal, muitas vezes de forma inadequada e excessiva (Ramalho *et al.*, 2000). Além disso, outros estudos reportaram teores de Hg em pesticidas acima do permitido pela legislação do país ou do uso de substâncias com princípio ativo proibido (Santos *et al.*, 2015; Lorenz *et al.*, 2014).

As modificações causadas pelo Cd e Hg em plantas estão relacionadas as alterações morfológicas e estruturais (diminuição da biomassa e do crescimento foliar e radicular), além dos distúrbios observados nas funções fisiológicas e bioquímicas, como clorose nas folhas e escurecimento nas raízes, diminuição na absorção de nutrientes, mudanças no balanço hídrico e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (Daud *et al.*, 2009; Benavides *et al.*, 2005; Kastori *et al.*, 1992). Além disso, estudos que visam comparar os efeitos da exposição de plantas a Cd e Hg indicam haver diferenças nos mecanismos de fitotoxicidade desses elementos em alfalfa (*Medicago sativa*), milho (Rellán-Álvarez *et al.*, 2006) e *Silene vulgaris* (Ortega-Villasante *et al.*, 2005; Sobrino-Plata *et al.*, 2013).

A fotossíntese é um processo essencial para as plantas e também é sensível aos efeitos tóxicos de Cd e Hg, sendo essas mudanças verificadas principalmente por meio do parâmetro taxa fotossintética líquida (*A*). Essa alteração tem relação com a

inibição da cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto, a inibição de enzimas do Ciclo de Calvin ou diminuição no conteúdo e danos nas clorofilas (Burzynski & Zurek, 2007). Segundo Mishra e Dubey (2005) entre os principais efeitos do Cd na fotossíntese está a redução no teor de clorofila, diminuição da atividade da enzima Rubisco e alteração nos fotossistemas I e II; enquanto para o Hg, os principais efeitos incluem mudanças nos fotossistemas I e II e alterações nas proteínas dos cloroplastos.

A maioria dos estudos que buscam avaliar a resposta das plantas à exposição de elementos traço utilizam concentrações acima da média de circulação nos sistemas abertos (Vitoria et al., 2001). O uso de concentrações elevadas nesses experimentos tem como objetivo induzir, com maior intensidade, os efeitos tóxicos dos metais, porém não reflete a resposta de plantas cultivadas em condições ambientais (Kopittke et al., 2010). Os valores de investigação propostos pela legislação para solos agrícolas foram calculados com base nos riscos potenciais à saúde humana, além de garantir que não haja a inibição do crescimento e das capacidades reprodutivas das plantas, porém não se leva em consideração as diferentes vias de respostas à toxicidade desses elementos comprometendo diferentes partes da planta e que os solos brasileiros apresentam composições variáveis dentre as suas variadas classificações (Alvarenga, 2014). Portanto, estudos para verificar os efeitos dessas concentrações em diferentes produções agrícolas passam a ser necessários como resposta à exposição aos elementos traço e que conseqüentemente, podem sinalizar a qualidade do ambiente. O presente estudo utilizou os valores permissíveis de Cd e Hg em solos agrícolas (baseado nos valores de investigação) estabelecidos pela legislação brasileira, a fim de avaliar os seus efeitos nas trocas gasosas e na eficiência fotoquímica do tomateiro, por meio de experimentos realizados em casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Experimento

Vasos plásticos, com volume aproximado de 11 litros (n=42), foram previamente envolvidos com papel alumínio e preenchidos com 8 quilos de solo, coletados em Cambuci-RJ. O experimento foi conduzido em triplicata para cada tratamento e partindo de um padrão tritisol (merck) de CdCl₂ e HgCl₂ foram obtidas

três concentrações de Cd ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$; $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$; $6,0 \text{ mg kg}^{-1}$) e de Hg ($0,2 \text{ mg kg}^{-1}$; 12 mg kg^{-1} ; 24 mg kg^{-1}), respectivamente, para contaminação da solução do solo. Três amostras controle também foram consideradas. As concentrações de $3,0 \text{ mg kg}^{-1}$ Cd e 12 mg kg^{-1} de Hg foram baseadas em valores orientadores para solos agrícolas determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), segundo a Resolução N°420 de 2009 (CONAMA, 2009). As concentrações $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg e $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd foram definidas a partir dos valores em que esses elementos são encontrados na região de estudo. As concentrações de 6 mg kg^{-1} de Cd e 24 mg kg^{-1} de Hg foram o dobro dos valores propostos pelo CONAMA (2009).

Em cada vaso foi transplantada uma plântula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) do cultivar *Dominador*. Após o transplante, as plantas foram regadas diariamente, utilizando-se uma bandeja por baixo de cada vaso, procurando evitar a contaminação no ambiente pelos metais. Após o final da drenagem, a água percolada era devolvida para o vaso, evitando-se perdas. A retirada das folhas de cada vaso (N=3) foi feita durante a terceira e a nona semana do experimento. A cada coleta, as folhas foram separadas, secas por liofilização (Liofilizador L108 – Liotop) e maceradas utilizando-se nitrogênio líquido.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação situada na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), no município de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, durante o período de Agosto a Outubro de 2015. As variáveis climáticas (temperatura e umidade relativa) foram monitoradas durante os 2 períodos de coleta: Agosto/2015, referente à terceira semana do experimento ($T_{\text{média}} = 24,9^{\circ}\text{C}$; umidade relativa = 53,2%) e Outubro/2015, referente à coleta da nona semana ($T_{\text{média}} = 29,4^{\circ}\text{C}$; umidade relativa = 52,8%).

Metodologias de Digestão

Alíquotas de 0,2g de material vegetal seco foram colocadas em tubos de teflon (X-Press), adicionando-se 4mL de água ultrapura, 2mL de H_2O_2 30% e 6mL da mistura H_2SO_4 96%: HNO_3 65% (1:1), metodologia de Sheehan et al (2006), Silva-Filho et al (2006) e Rea et al (2002). A digestão ocorreu em microondas (Mars Xpress microwave, CEM), durante 30 minutos (5 minutos até atingir 95°C e 25 minutos a temperatura constante de 95°C) com potência de 1600W.

Determinação de Cd e Hg

A determinação do Cd foi feita em ICP-OES (Optical Emission Spectrometer – Varian, 720-ES) com limite de detecção de 0,25 mg kg⁻¹. O Hg foi determinado no ICP-AES (Liberty Series II), com limite de detecção de 0,07 mg kg⁻¹. Todas as concentrações foram expressas em mg kg⁻¹ (peso seco).

Controle de Qualidade Analítica

Toda a vidraria foi previamente descontaminada ao longo de 3 etapas de 24 h: Extran 5%, HCl 5% e HNO₃ 5%. Ao final do processo o material foi lavado com água deionizada e água ultrapura. Para todos os métodos de digestão foram utilizados reagentes com grau de pureza (Merck), aplicadas réplicas (triplicata, para cada conjunto de 40 amostras) e brancos analíticos. A precisão entre as réplicas foi de 15% e a exatidão calculada de acordo com a amostra certificada Apple Leaf 1515 (NIST), com recuperação média de 98% para Cd e 94,3% para Hg.

Medidas das Trocas Gasosas e Eficiência Fitoquímica

As determinações incluíram a medida da taxa fotossintética líquida (*A*), condutância estomática (*g_s*) e concentração de CO₂ subestomático (*C_i*) no analisador de gás por infravermelho (IRGA), modelo LI-6400 (LI-COR, Lincon), utilizando-se fonte de luz artificial de 1000 μmol m⁻² s⁻¹. As análises de trocas gasosas foram realizadas no período entre 8h00 e 11h00 da manhã. As medições foram realizadas à condição de pleno sol, utilizando-se um Termo-higrômetro (910.15 CHH/ Alla Brasil).

A análise de fluorescência compreendeu a determinação da eficiência fotoquímica máxima (*F_v/F_m*) nas folhas utilizando-se um fluorímetro Pocket PEA (Plant Efficiency Analyser) cujas amostras foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos com o auxílio de pinças, admitindo-se a abertura total dos centros de reação. Um pulso forte de luz foi fornecido por um conjunto de LED'S com comprimento de onda de 650nm na superfície da amostra para fornecer iluminação homogênea de 3000 μmoles m⁻² 1s⁻¹. A avaliação foi realizada nas mesmas folhas em que foram medidas as trocas gasosas (N=3).

Análises Estatísticas

A diferença das variáveis mensuradas entre tratamentos e tempos de experimentação foi avaliada por uma ANOVA seguida de teste de Tukey *a posteriori*. Os dados foram transformados utilizando-se uma função de verossimilhança máxima (MASS package; Venables & Ripley, 2002), quando necessário, para atender as premissas da ANOVA (linearidade, homocedasticidade e normalidade). Um erro de 5% foi assumido para avaliar a significância dessas diferenças. Todas as análises foram executadas no sistema R (R CoreTeam, 2017).

3. RESULTADOS

Teores de Cd e Hg nas Folhas

Os maiores teores de Cd ($27,4 \text{ mg kg}^{-1}$) e Hg ($18,6 \text{ mg kg}^{-1}$) foram encontrados nas folhas da nona semana, expostas aos tratamentos de 6 mg Cd kg^{-1} e 24 mg Hg kg^{-1} , respectivamente (Tabela 1). As plantas expostas à 12 mg Hg kg^{-1} não sobreviveram até o final do experimento (nove semanas). As concentrações de Cd e Hg em todas as folhas das plantas controle foram abaixo do limite de detecção de $0,25 \text{ mg kg}^{-1}$ e $0,07 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente.

Comparando-se os teores de Cd nas folhas, apenas o valor referente ao tratamento com 6 mg kg^{-1} de Cd apresentou diferença significativa dos demais tratamentos. A variação entre os teores de Cd no tratamento de 6 mg kg^{-1} foi cerca de quatro vezes maior do que o teor encontrado no tratamento de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ (nona semana), enquanto para a terceira semana, essa variação foi duas vezes maior (Tabela 1).

No tratamento com Hg, o incremento do teor desse elemento nas folhas entre os tratamentos $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ e 24 mg kg^{-1} foi cerca de 68 e 50 vezes, da terceira até a nona semana, respectivamente (Tabela 1).

Ecofisiologia do Tomateiro

As plantas expostas ao Cd tiveram uma diminuição da taxa fotossintética líquida (*A*) durante a nona semana, principalmente na concentração de 6 mg kg^{-1} , uma redução de 17% em relação à *A* do controle (**Tabela 1**). Ainda assim, o processo de

fotossíntese apenas foi reduzido, sem que houvesse a inibição da A nas plantas expostas ao Cd. Os valores da condutância estomática (G_s) referentes à nona semana foram reduzidos em cerca de oito vezes em relação à terceira semana (**Tabela 1**). Não foi observada diferença significativa nas concentrações de CO_2 subestomática (C_i) entre as semanas, porém nos tratamentos com 3 e 6 mg kg^{-1} de Cd da nona semana houve redução nos valores de C_i . Não houve diferença significativa do rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) entre os tratamentos ao longo do tempo de exposição.

Não foi observado um padrão de variação das medidas de A nas plantas expostas ao Hg em relação à concentração de Hg nas folhas (**Tabela 1**). Na nona semana, o valor do G_s reduziu em cerca de seis vezes relativamente à terceira semana para todos os tratamentos. Os valores de C_i foram maiores nas plantas dos tratamentos $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ e 24 mg Hg kg^{-1} durante a nona semana (**Tabela 1**). Diferenças significativas nos valores de F_v/F_m foram observadas apenas na nona semana, entre os tratamentos de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ e 24 mg kg^{-1} de Hg. Durante a nona semana houve uma redução significativa no valor de E , nas plantas expostas à 24 mg kg^{-1} de Hg.

4. DISCUSSÃO

Cadmio

Os efeitos prejudiciais provocados na fisiologia dos tecidos de plantas vasculares devido ao acúmulo de elementos traço têm sido reportados na literatura (Jana, 1988). A taxa fotossintética líquida é considerada um parâmetro importante na indicação de estresse causado por elementos traço por vários autores (Chen et al., 2011), cuja redução é observada em diferentes plantas agrícolas expostas ao Cd, como o tomate (Baszynski et al., 1980; Dong et al., 2005), cevada (González e Lobo, 2013) e arroz (He et al., 2013). A interferência do Cd na fotossíntese de plantas é consequência de uma série de efeitos deletérios no aparato fotossintético, incluindo a redução no teor de clorofila, alterações estruturais no cloroplasto e mudanças em algumas etapas da cadeia transportadora de elétrons e na atividade da Rubisco (Gratão et al., 2009). Porém, neste estudo a exposição das plantas ao Cd resultou apenas em uma diminuição da A , principalmente na concentração de 6 mg kg^{-1} , o que está de acordo com Mendelssohn et al. (2001). No presente estudo, o efeito da

toxicidade do Cd nas plantas foi mais significativo na E e G_s , e diminuíram ao longo do tempo de exposição.

É reportado que a redução significativa na G_s pode ser observada na presença de concentrações de Cd que não afetam a A ou nos parâmetros fotoquímicos da fluorescência da clorofila a (Guimarães et al., 2008). Da mesma forma que o presente estudo, Haag-Kerwer et al. (1999) reportaram um efeito mais pronunciado da exposição de *Brassica juncea* ao Cd ($25\mu\text{M L}^{-1}$) na E em relação a A , assim como Dias et al (2013), também verificaram uma diminuição da A em folhas de alface cultivadas em meio hidropônico contendo Cd ($10\ \mu\text{M Cd}(\text{NO}_3)_2$), porém o efeito foi mais significativo na G_s e E .

Além disso, a queda da A nesse estudo pode estar relacionada a diminuição da G_s , como observado em macrófitas aquáticas expostas a $0,25$ e $50\ \text{mg kg}^{-1}$ de Cd (Souza et al. 2009). É provável que isso ocorra devido a influência do Cd na absorção de outros nutrientes, podendo alterar o balanço hídrico da planta (Das et al., 1997).

Quando há uma diminuição na G_s , a diminuição da concentração interna de CO_2 tem relação com a manutenção da atividade metabólica de fixação de CO_2 (Raschke, 1979), o que corrobora com o presente estudo, visto que foi observada uma redução do C_i quando ocorreu queda na A nas plantas expostas ao Cd. O baixo valor da G_s pode ter sido influência da interação direta do Cd nas células guarda dos estômatos, diminuindo a difusão de CO_2 e conseqüentemente, sua redução para ser utilizado na fotossíntese (Dong et al., 2005). Poschenrieder et al., (1989) reportaram que um dos efeitos do Cd nas plantas é induzir o fechamento dos estômatos. Vitória et al. (2003) verificaram o fechamento dos estômatos em folhas de plântulas de rabanete expostas à CdCl_2 ($1\ \text{mM}$) durante um período de 48h. Os tomateiros tiveram um aumento no teor de Cd em suas folhas na terceira semana, porém a partir disso, houve um decréscimo. A translocação de Cd para a parte aérea das plantas pode ser mediada pela transpiração, pois é através desse processo que ocorre a absorção de minerais juntamente com a água dos solos (Tangahu et al., 2011; Liu et al., 2016). Logo, é possível que a diminuição da evapotranspiração pelas plantas tenha reduzido também o transporte de Cd das raízes para as folhas ao longo do experimento.

Tabela 1: Efeitos da exposição à Cd e Hg na taxa fotossintética líquida –A, Condutância Estomática – G_s, Concentração de CO₂ subestomática -C_i, Transpiração –E; Rendimento quântico máximo do fotossistema II (F_v/F_m) e o teor de metais nas folhas de tomateiro cultivados em solos com tratamento de Cd (0; 0,2 mg kg⁻¹; 3,0 mg kg⁻¹; 6,0 mg kg⁻¹) e Hg (0; 0,2 mg kg⁻¹; 12 mg kg⁻¹; 24 mg kg⁻¹). Letras minúsculas comparam o teor do mesmo elemento em tratamentos diferentes de uma mesma semana.

Metal	Tempo (Semana)	Tratamento (mg kg ⁻¹)	Taxa Fotossintética (A) $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Condutância Estomática (G _s) $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Concentração Interna de CO ₂ (C _i) $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Rendimento Quântico Máximo do Fotossistema II (F _v /F _m)	Transpiração (E) $\text{mol. H}_2\text{O. s}^{-1}$	Metal nas folhas (mg kg ⁻¹) P. S.
Cd	3	Control	24,53 ± 1,64 ^a	0,492 ± 0,080 ^a	289,8 ± 17,41 ^a	0,849 ± 0,003 ^a	5,98 ± 0,62 ^a	ND
		0,2	24,19 ± 3,92 ^a	0,351 ± 0,022 ^{ab}	260,6 ± 19,92 ^a	0,850 ± 0,001 ^a	5,20 ± 0,32 ^a	4,12 ± 1,14 ^b
		3	23,34 ± 6,63 ^a	0,264 ± 0,191 ^b	248,1 ± 27,90 ^a	0,832 ± 0,017 ^a	4,29 ± 2,22 ^a	7,6 ± 0,9 ^b
		6	28,21 ^a	0,445 ± 0,191 ^{ab}	262,0 ± 26,72 ^a	0,844 ± 0,007 ^a	6,27 ± 2,23 ^a	10,9 ± 0,226 ^b
	9	Control	22,30 ± 3,05 ^a	0,045 ± 0,014 ^c	270,0 ± 68,91 ^a	0,829 ± 0,023 ^a	1,22 ± 0,61 ^b	ND
		0,2	21,10 ± 4,12 ^a	0,062 ± 0,006 ^c	321,0 ± 59,28 ^a	0,829 ± 0,037 ^a	0,96 ± 0,36 ^b	5,7 ± 4,9 ^b
		3	22,34 ± 1,02 ^a	0,039 ± 0,010 ^c	240,4 ± 52,53 ^a	0,837 ± 0,012 ^a	1,50 ± 0,41 ^b	6,1 ± 2,4 ^b
		6	18,40 ± 5,65 ^a	0,042 ± 0,008 ^c	241,1 ± 57,24 ^a	0,828 ± 0,019 ^a	1,05 ± 0,07 ^b	27,4 ^a
Hg	3	Control	16,94 ± 8,75 ^a	0,172 ± 0,116 ^a	199,4 ± 30,76 ^b	0,834 ± 0,017 ^{ab}	3,28 ± 1,78 ^a	ND
		0,2	25,39 ± 7,20 ^a	0,335 ± 0,174 ^a	223,9 ± 30,56 ^{ab}	0,832 ± 0,015 ^{ab}	5,36 ± 1,90 ^a	0,23 ± 0,2 ^c
		12	22,11 ± 5,77 ^a	0,260 ± 0,081 ^a	233,2 ± 15,66 ^{ab}	0,838 ± 0,001 ^{ab}	4,75 ± 1,04 ^a	2,64 ± 1,02 ^{bc}
		24	19,33 ± 7,47 ^a	0,290 ± 0,156 ^a	260,0 ± 17,40 ^{ab}	0,824 ± 0,019 ^{ab}	4,86 ± 1,79 ^a	15,7 ± 8,2 ^{ab}
	9	Control	20,52 ± 4,59 ^a	0,031 ± 0,001 ^b	237,2 ± 92,13 ^{ab}	0,829 ± 0,023 ^{ab}	1,15 ± 0,08 ^b	ND
		0,2	28,00 ± 0,98 ^a	0,036 ± 0,001 ^b	297,2 ± 19,74 ^{ab}	0,851 ± 0,008 ^a	1,04 ± 0,47 ^b	0,35 ^c
		12	----	----	----	----	----	----
		24	19,21 ± 6,17 ^{ab}	0,059 ± 0,001 ^b	350,2 ± 101,3 ^a	0,801 ± 0,023 ^b	0,73 ± 0,35 ^b	18,6 ^a

A razão F_v/F_m mede a eficiência no uso da radiação fotoquímica, ou seja, a assimilação do carbono, sendo um parâmetro utilizado para verificar perturbações no aparato fotossintético. Observou-se que F_v/F_m não foi afetada significativamente nas plantas de tomate expostas ao Cd durante todo o experimento e dessa forma, a presença desse metal não afetou negativamente a fase fotoquímica da fotossíntese. Resultados semelhantes foram reportados no estudo realizado com as macrófitas *Thypha domingensis* Pers. e *Spartina alterniflora* Loisel, sendo concluído que a razão F_v/F_m é menos sensível ao estresse ocasionado por Cd quando comparado a A , não sendo, portanto, um bom indicador fisiológico da fitotoxicidade a Cd (Mendelssohn et al. 2001). Da mesma forma, Di Cagno et al (2001) não verificaram mudanças nos valores de F_v/F_m em girassóis (*Helianthus annuus*) cultivados na presença de Cd. Em experimento realizado por Delpérée & Lutts (2008) os autores também observaram que a exposição de tomateiro ao Cd não provocou mudanças na razão F_v/F_m . Os autores relacionaram esse resultado à ação de mecanismos antioxidantes que foram eficientes ao reduzir os efeitos do Cd no fotossistema II (PS II).

Mercúrio

Em relação à exposição das plantas de tomate ao Hg observou-se que o aumento do C_i na planta foi diretamente proporcional ao aumento do Hg nas folhas. De acordo com Burzynski & Klobus (2004), o aumento na concentração de C_i nas folhas de pepino tratadas com Pb, Cu e Cd teve relação com a mudança na demanda da fase bioquímica da fotossíntese, associado à senescência dos tecidos das plantas.

No presente estudo, os valores de A não indicaram nenhuma variação significativa nem entre os diferentes tratamentos nem ao longo do tempo de exposição. Israr et al. (2006) também reportaram que o cultivo de plântulas de *Sesbania drummondii* em concentrações de Hg acima de 10 mg kg⁻¹ não causaram efeitos inibitórios na A , o que possivelmente está relacionado com um mecanismo antioxidante eficiente.

Apesar de não ter sido observada diferença significativa nos valores encontrados para F_v/F_m ao longo do tempo de exposição houve uma redução significativa da razão, nas plantas expostas à 24 mg de Hg kg⁻¹, durante a nona semana. Um efeito conhecido, relativo à fitotoxicidade do Hg, é a inibição da cadeia de transporte de elétrons, afetando principalmente o PSII. Segundo Patra & Shama (2000) um dos primeiros efeitos da toxicidade do Hg nas plantas é a inibição do transporte de elétrons

da fotossíntese, como o centro de reação do PSII, além de reagir com grupamentos fosfato, presentes no ATP e ADP.

Comparação entre os Metais

A absorção de elementos traço pelas plantas pode ser influenciada por alguns fatores como a característica da espécie e a sua fase de crescimento, pela concentração dos elementos no solo e o grau de biodisponibilidade para a incorporação no material vegetal (Kabata Pendias, 2010). O acúmulo e o transporte desses elementos ao longo da planta podem apresentar variações entre os metais (Zhang et al., 2009). O Cd é um elemento absorvido mais facilmente do que o Hg, pois utiliza os mesmos canais transportadores de elementos essenciais como o Ca^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} (López-Climent et al., 2014). O Hg é acumulado principalmente nas raízes, onde se liga aos grupamentos sulfidrilas (SH^-) e fosfatos presentes nas células das raízes, diminuindo sua mobilidade. É reportado que as raízes atuam como barreiras a absorção de Hg (Prata et al., 2000). Porém, quando a planta é exposta a elevadas concentrações de Hg no solo, as folhas também podem ter um incremento nas concentrações de Hg (Kabata Pendias, 2010). No presente estudo, comparando os teores de Cd e Hg encontrados nas folhas das plantas expostas à $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ observa-se que a absorção de Cd foi cerca de dezessete vezes maior do que a de Hg. De forma semelhante ao presente estudo, Rellán-Álvarez et al (2006) também verificaram um teor mais elevado de Cd do que Hg em folhas de milho (*Zea mays*) cultivadas em solução contendo $6 \mu\text{M}$ e $30\mu\text{M}$, para ambos os metais. Ao comparar os efeitos da exposição de Cd e Hg por alfalfa (*Medicago sativa*), Sobrino-Plata et al., (2014) reportaram que a planta acumulou ambos os metais em maior quantidade nas raízes, porém o teor de Cd na parte aérea foi maior do que o de Hg.

Segundo Kloke et al. (1984), concentrações entre 5 e 10 mg kg^{-1} de Cd em plantas podem produzir efeitos danosos. Macnicol & Beckett (1985) reportaram que concentrações entre 10 e 20 mg kg^{-1} de Cd são consideradas críticas para as plantas. No presente estudo, os teores de Cd nas folhas das plantas variaram de $4,12$ a $27,4 \text{ mg kg}^{-1}$, ultrapassando os valores fitotóxicos propostos pela literatura para o Cd. A concentração de 3 mg kg^{-1} de Cd foi utilizada a partir da resolução CONAMA N° 420 (2009), que propôs esse valor como referência para solos agrícolas, e a partir das

quais não há risco para a saúde humana. Nesse tratamento, o teor de Cd nas folhas foi igual a 7,6 mg kg⁻¹ na terceira semana e 6,1 mg kg⁻¹ na nona semana, valores acima dos reportados como fitotóxicos. Cherif et al. (2011) reportaram concentração de Cd acima da encontrada no presente estudo em folhas de tomateiro (27,4 mg kg⁻¹) que apresentaram sintomas como redução no crescimento e clorose das folhas.

Os teores de Hg nas folhas variaram de 0,043 a 18,6 mg kg⁻¹ correspondendo a 42% acima dos valores fitotóxicos propostos por Kloke et al. (1984), que variam entre 0,5 e 1 mg kg⁻¹ de Hg. Macnicol & Beckett (1985) reportaram que concentrações entre 1 e 8 mg kg⁻¹ de Hg são consideradas críticas para as plantas. Os teores de Hg nas folhas das plantas expostas a 12 e 24 mg kg⁻¹ ultrapassaram esses limites. No tratamento de 12 mg kg⁻¹, definido a partir da resolução CONAMA N° 420 (2009), o teor nas folhas foi de 2,64 mg kg⁻¹ considerado acima dos valores que podem produzir efeitos tóxicos nas plantas, o que pode induzir na queda de produtividade desses cultivos. Em experimento realizado por Cho & Park (2000), folhas de plântulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) com concentrações entre 12,8 mg kg⁻¹ e 33,7 mg kg⁻¹ evidenciaram efeitos tóxicos como diminuição da biomassa da planta e redução no teor de clorofila nessas estruturas.

5. CONCLUSÃO

Do ponto de vista fisiológico, os tratamentos para ambos os metais não induziram efeitos drásticos no tomateiro cultivado nos intervalos de concentração propostos. Embora essas concentrações tenham favorecido a redução da atividade fotossintética da planta, sem haver inibição, esta pode ser considerada como tolerável ao estresse causado pela exposição a esses elementos.

As concentrações intermediárias de Hg e Cd utilizadas nos tratamentos em solos e baseadas nos valores permissíveis da legislação brasileira foram translocadas até a parte aérea da planta, sendo acumuladas em concentrações consideradas como fitotóxicas.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA), pela determinação dos metais e ao Laboratório de Melhoramento Genético Vegetal (LMGV), pela determinação dos parâmetros ecofisiológicos, ambos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). C.M.M. Souza recebeu suporte financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) – FAPERJ E-26/111.368/2012.

7. REFERÊNCIA

ALVARENGA, I. F. S. (2014). Fisiologia e ecotoxicologia de espécies vegetais para a determinação do valor de prevenção de cádmio em solos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, 180p.

BASZYNSKI, T.; WAJDA, L.; KROL, M.; WOLINSKA, D.; KRUPA, Z.; TUKENDORF, A. (1980). Photosynthetic activities of cadmium-treated tomato plants. *Physiol. Plant*, 48, 365-370.

BENAVIDES, M. P.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Plant Physiology*, 17(1): 21-34.

BURZYNSKI M, ZUREK A. (2007). Effects of copper and cadmium on photosynthesis in cucumber cotyledons. *Photosynthetica*, 45:239–244.

BURZYNSKI, M.; KLOBUS, G. (2004). Changes of photosynthetic parameters in cucumber leaves under Cu, Cd and Pb stress. *Photosynthetica*, 42(4): 505-510.

CAVALLINI, A.; NATALI, L.; DURANTE, M.; MASERTI, B. (1999). Mercury uptake, distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf) plants, *Science of the Total Environment*, vol. 243-244, 119-127p.

CHEN, X.; WANG, J.; SHI, Y.; ZHAO, M. Q.; CHI, G. Y. (2011). Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. *Botanical Studies*, 52, 41-46.

CHERIF, J.; MEDIOUNI, C.; AMMAR, W. B.; JEMAL, F. (2011). Interactions of zinc and cadmium toxicity in their effects on growth and in antioxidative systems in tomato plants (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Environmental Sciences*, 23(5): 837-844.

CHO, U.; PARK, J. (2000). Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, 156(1)1-9.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. (2009). RESOLUÇÃO Nº420, DE 28 DE DEZEMBRO DE 2009. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620> Acesso 23 Ago 2017.

DAS, P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environmental pollution*, 98(1), 29-36.

DAUD, M. K.; VARIATH, M. T.; ALI, S.; NAJEEB, U.; JAMIL, M.; HAYAT, Y.; DAWOOD, M.; KHAN, M. I.; ZAFFAR, M.; CHEEMA, S. A.; TONG, X. H.; ZHU, S. (2009). Cadmium-induced ultramorphological and physiological changes in leaves of two transgenic cotton cultivars and their wild relative. *J. Hazard. Mater.* 168, 614–625.

DELPÉRIÉE, C.; LUTTS, S. (2008). Growth inhibition occurs independently of cell mortality in tomato (*Solanum lycopersicum*) exposed to high cadmium concentrations. *Journal of integrative plant biology*, 50(3):: 300-310.

DI CAGNO, R.; GUIDI, L.; DE GARA, L.; SOLDATINI, G. F. (2001). Combined cadmium and ozone treatments affect photosynthesis and ascorbate-dependent defences in sunflower. *New Phytologist Trust*, vol. 151(3): 627-636.

DIAS, M. C.; MONTEIRO, C. MOUTINHO-PEREIRA, J.; CORREIA, C.; GONÇALVES, B.; SANTOS, C. (2013). Cadmium toxicity affects photosynthesis and plant growth at different levels. *Acta Physiol Plant*, 35: 1281-1289.

DIEESE. Departamento intersindical de estatística e estudos socioeconômicos. Escritório Regional de Goiás. A produção mundial e brasileira de tomate. Julho de 2010, 19p.

DONG, J.; FEI-BO, W.; ZHANG, G. (2005). Effect of cadmium on growth and photosynthesis of tomato seedlings. *Journal of Zhejiang University, SCIENCE*, 6B(10):974-980.

GONZÁLEZ, A.; LOBO, M. C. (2013). Growth of four varieties of barley (*Hordeum vulgare* L.) in soils contaminated with heavy metals and their effects on some physiological traits. *American Journal of Plant Sciences*, 4, 1799-1810.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; ROSSI, M. L.; MARTINELLI, A. P.; PERES, L. E. P.; MEDICI, L. O.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2009). Differential ultrastructural changes in tomato hormonal mutants exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 67, 387–394.

GUIMARÃES, M. A.; SANTANA, T. A.; SILVA, E. V.; ZENZEN, I. L.; LOUREIRO, M. E. (2008). Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Tropica: Ciências Agrárias e Biológicas*, n. 3, pag. 58.

HAAG-KERWER, A.; SCHÄFER, H. J.; HEIS, S.; WALTER, C.; RAUSCH, T. (1999). Cadmium exposure in *Brassica juncea* causes a decline in transpiration rate and leaf expansion without effect on photosynthesis. *J. Exp. Bot.*, 50: 1827-1835.

HE, J.; REN, Y.; ZHU, C.; JIANG, D. (2013). Change of photosynthetic gas exchange and chlorophyll fluorescence of Cd-sensitive mutant rice in response to Cd stress. *Advanced Materials Research*, Vols 807-809, pp 336-341.

ISRAR, M.; SAHI, S.; DATTA, R.; SARKAR, D. (2006). Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, 65: 591-598.

KABATA PENDIAS, A. (2010). Trace elements in soils and plants. 4th Ed., Taylor and Francis Group, 534p.

KASTORI, R.; PETROVIC, M.; PETROVIC, N. (1992) Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *J. Plant Nutr.* 15, 2427–2439.

KLOKE, A.; SAUERBECK, D. R.; VETTER, H. (1984). The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains, in *Changing Metal Cycles and Human Health*, Nriagu, J. O., ed., Dahlem, Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin, 113.

KOPITTKE, P. M.; BLAMEY, F. P. C.; ASHER, C. J.; MENZIES, N. W. (2010). Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. *Experimental Botany*, Vol 61 (4): 945-954.

LIU, H.; WANG, H.; MA, Y.; WANG, H.; SHI, Y. (2016). Role of transpiration and metabolism in translocation and accumulation of cadmium in tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). *Chemosphere*, 144, 1960-1965.

LÓPEZ-CLIMENT M. F.; ARBONA, V.; PÉREZ-CLEMENTE, R. M.; ZANDALINAS, S. I.; GÓMEZ-CADENAS, A. (2014). Effect of cadmium and calcium treatments on phytochelatin and glutathione levels in citrus plants. *Plant Biology* 16:79–87.

LORENZ, J. G.; COSTA, L. L. F.; SUCHARA, E. A.; SANT'ANNA, E. S. (2014). Multivariate optimization of the QuEChERS-GC-ECD method and pesticide investigation residues in apples, strawberries, and tomatoes produced in Brazilian south. *J. Braz. Chem. Soc.* [online], vol.25, n.9, pp.1583-1591.

MACNICOL, R. D.; BECKETT, P. H. T. (1985). Critical tissue concentrations of potentially toxic elements, *Plant Soil*, 85, 107.

MENDELSSOHN, I. A.; McKEE, K. L.; KONG, T. (2001). A comparison of physiological indicators of sublethal cadmium stress in wheat plants. *Environmental and Experimental Botany*, Vol 46(3): 163-175.

MISHRA, S., & DUBEY, R. S. (2005). Heavy metal toxicity induced alterations in photosynthetic metabolism in plants. *Handbook of photosynthesis*, 2, 845-863.

NAGAJYOTI, P. C., LEE, K. D., & SREEKANTH, T. V. M. (2010). Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 8, 199–216.

ORTEGA-VILLASANTE, C.; RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; CAMPO, F. F. D.; CARPENA-RUIZ, R. O.; HERNÁNDEZ, L. E. (2005). Cellular damage induced by cadmium and Mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, n. 418, 2239-2251.

PATRA, M.; SHARMA, A. (2000). Mercury Toxicity in Plants. *Botanical Review*, 66(3), 379-422.

PEREIRA, B. F. F.; ROZANE, D. E.; ARAÚJO, S. R.; BARTH, G.; QUEIROZ, R. J. B.; NOGUEIRA, T. A. R.; MORAES, M. F.; CABRAL, C. P.; BOARETTO, A. E.; MALAVOLTA, E. (2011). Cadmium availability and accumulation by lettuce and rice. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35(2), 645-654.

POSCHENRIEDER, C.; GUNSÉ, B.; BARCELÓ, J. (1989). Influence of cadmium on water relations, stomatal resistance and abscisic acid content in expanding bean leaves. *Plant Physiol*; 90:1365–1371.

PRATA, F., LAVORENTI, A., REGITANO, J. B., & TORNISIELO, V. L. (2000). Degradação e adsorção de diuron em solos tratados com vinhaça. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24(1).

RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRILHO, N. M. B.; VELLOSO, A. C. X. (2000). Contaminação da microbacia de Caetés com elementos traço pelo uso de agroquímicos. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Vol. 35, n.7, 1289-1303p.

RASCHKE, K. (1979). Movements using turgor mechanisms: Movements of stomata. In: HAUPT, W.; FEINLEIB, M.E. (Ed.). *Encyclopedia of plant physiology*. Berlin: Springer-Verlag, v.7, p.383-441.

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.Rproject.org/>.

REA, A. W.; LINDBERG, S. E.; SCHERBATSKOY, T.; KELLER, G. J. (2002). Mercury accumulation in foliage over time in two northern mixed-hardwood forests. *Water Air Soil Pollut* **133**:49-67.

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

ROSS, R. G.; STEWART, D. (1962). Movement and accumulation of in apple tree and soil. *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 42, 280-285.

SANTOS, G. M. A. D. A.; TEIXEIRA, L. J. Q.; PEREIRA JÚNIOR, O. S.; SANTOS, A. R.; FRONZA, M.; SILVA, ARY G. D.; SCHERER, R. (2015). Pesticide residues in conventionally and organically grown tomatoes in Espírito Santo (Brazil). *Química Nova*, 38(6), 848-851. <https://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150051>

SHEEHAN, K. D.; FERNANDEZ, I. J.; KAHL, J. S.; AMIRBAHMAN, A. (2006). Litterfall mercury in two forested watersheds at Acadia National Park, Maine, USA. *Water Air Soil Pollut* **170**(1): 249-265.

SILVA-FILHO, E. V.; MACHADO, W.; OLIVEIRA, R. R.; SELLA, S. M.; LACERDA, L. D. (2006). Mercury deposition through litterfall in an Atlantic Forest at Ilha Grande,

Southeast Brazil. *Chemosphere*, **65**: 2477-2484.

SOBRINO-PLATA, J.; HERRORO, J.; CARRASCO-GIL, S.; PEREZ-SANZ, A.; LOBO, C.; ESCOBAR, C.; MILLÁN, R.; HERNÁNDEZ, L. E. (2013). Specific stress responses to cadmium, arsenic and mercury appeared in the metallophyte *Silene vulgaris*. Royal Society of Chemistry, RSC Advances, 3: 4736–4744.

SOBRINO PLATA, J.; MEYSSEN, D.; CUYPERS, A. HERNÁNDEZ, L. E. (2014). Glutathione is a key antioxidant metabolite to cope with mercury and cadmium stress. *Plant Soil*, 377: 369-381.

SOUZA, V. L., SILVA, D. D. C., SANTANA, K. B., MIELKE, M. S., ALMEIDA, A. F., MANGABEIRA, P. A. O.; ROCHA, E. A. (2009). Efeitos do cádmio na anatomia e na fotossíntese de duas macrófitas aquáticas. *Acta Botanica Brasilica*, 23(2), 343-354.

TANGAHU, B. V.; ABDULLAH, S. R. S.; BASRI, H.; IDRIS, M.; ANUAR, N.; MUKHLISIN, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, Volume 2011, Article ID 939161, 31 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/939161>

VENABLES, W. N. & RIPLEY, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S*. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN -387-95457-0.

VERKLEJI, J. A. S. (1993). The effects of heavy metals stress on higher plants and their use as bio monitors. 1993. In P. C. Nagajyoti, K. D. Lee, T. V. M. Sreekanth (Eds.), *Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review*. *Environmental Chemistry Letters*, 8,199–216.

VITÓRIA, A. P.; RODRIGUEZ, A. P. M.; CUNHA, M.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2003). Structural changes in radish seedlings exposed to cadmium. *Biologia Plantarum*, 47(4): 561-568.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2001). Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 701-710.

ZHANG, Z.; LU, X.; WANG, Q.; ZHENG, D. (2009). Mercury, Cadmium and Lead Biochemistry in the Soil-Plant-Insect System in Huludao City. *Bull Environmental Contamination Toxicology*, 83: 255-259.

Capítulo 3 - Estudo Comparativo da Acumulação e Resposta Antioxidativa do Tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) exposto ao Mercúrio e ao Cádmio

RESUMO

O acúmulo de metais pesados nos vegetais pode causar o aumento de espécies reativas de oxigênio, que devem ser reduzidas pela ação de enzimas antioxidativas. Para verificar a resposta antioxidativa à exposição de Cd e Hg, tomateiros cultivados em solos com adição independente de Cd (0; 0,2; 3,0 e 6,0 mg kg⁻¹) e Hg (0; 0,2; 12 e 24 mg kg⁻¹) foram expostos durante três e nove semanas. O teor de Cd e Hg, a atividade enzimática da superóxido desmutase (SOD) e guaiacol peroxidase (GPX) foram avaliadas em folhas e raízes. A atividade das enzimas foi alterada principalmente nas raízes e onde a maior parte do Cd e Hg absorvido foi retido. Nas folhas, a GPX teve um aumento no tratamento com 3,0 mg Cd kg⁻¹, na terceira semana. No tratamento com 12 mg Hg kg⁻¹ houve uma redução na atividade dessa enzima. A presença do Cd intensificou a expressão das isoformas da SOD em folhas e raízes, a partir de 3,0 mg Cd kg⁻¹, porém esse número foi reduzido com aumento do tempo de exposição. Contrariamente, o Hg reduziu o número de isoformas da SOD com o

aumento do tempo de exposição. Conclui-se que em comparação ao Cd, o Hg teve um efeito fitotóxico maior nos tomateiros, identificado pela menor número de isoformas de ambas as enzimas com o aumento do tempo de exposição.

Palavras Chave: enzimas; estresse oxidativo; contaminação; espécies reativas de oxigênio

1. INTRODUÇÃO

A produção de alimentos em larga escala tem demandado não apenas o aumento do uso de fertilizantes, que suprem a deficiência de nutrientes em solos de uma variedade de cultivos, como o de agroquímicos (herbicidas, fungicidas), necessários ao combate de doenças (Zavatti & Abakerli, 1999). A associação de metais tóxicos como o Hg e o Cd em ambas as classes de compostos potencializam o risco de consumo dos vegetais, principalmente em cultivares como o tomate, que além de demandar, em larga escala, o uso de agroquímicos, (Wang et al., 2005) situa-se no grupo das 10 hortaliças mais consumidas, que somadas, correspondem a 81% do volume produzido no país (ABCSEM, 2011).

A concentração do metal tóxico, a qual a planta está exposta, é um dos fatores que determinam a sua acumulação e/ou translocação, além do estágio de desenvolvimento da planta, do tempo de exposição e a forma química do elemento. Por outro lado, em solos com baixa regulação do sistema rizosfera/raiz, associada aos mecanismos de translocação eficientes, o estresse induzido pode alterar mecanismos bioquímicos fundamentais, como a funcionalidade das células fotossintéticas (Bolwell et al., 2002).

Outros efeitos do acúmulo de Cd e Hg pelas plantas é o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), em resposta à formação da condição de estresse oxidativo. Embora as EROs possam causar danos celulares, como a oxidação de proteínas e nos lipídios de membrana, também são consideradas como moléculas sinalizadoras no sistema de defesa da planta, que é composto por metabólitos como a glutatona e o ascorbato e enzimas como a superóxido desmutase, peroxidases e catalases (Bolwell et al., 2002; Dean et al., 1993). A avaliação da atividade de enzimas antioxidantes de plantas expostas ao Cd já foi

reportada para trigo (Arshad et al., 2015), tomate (Gratão et al., 2015), ginseng (Marques & Soares, 2011) e rabanete (Vitória et al., 2001). Enquanto para Hg, a resposta de enzimas antioxidativas foi verificada para tomate (Cho & Park, 2000) e trigo (Li et al., 2013).

Grande parte dos experimentos reportados sobre o tema é estruturado na técnica da hidroponia e sob a indução de estresse agudo, não levando em conta a complexidade da matriz do solo e os níveis médios mundial, regional ou ainda os níveis permitidos por órgãos reguladores.

A legislação brasileira estabelece os teores de 3 e 12 mg kg⁻¹ para Cd e Hg em solos agrícolas, respectivamente, acima dos quais poderá haver riscos à saúde humana (CONAMA, 2009). Diversos países têm estabelecido concentrações limites de elementos traço em solos, como medida para assegurar potenciais riscos à saúde humana. Porém, segundo Fernández-Calviño et al. (2017) a legislação estabelece o valor limite de toxicidade de um elemento a partir de sua concentração total no solo, porém esse valor pode não conferir uma relação entre o que está no solo e o que está disponível para a planta absorver. Além disso, avaliar a resposta de plantas às concentrações propostas pela legislação em solos permite entender o que é possível ser absorvido e a resposta antioxidante gerada pela presença desses elementos nas folhas e raízes. Esse trabalho visa avaliar e diferenciar o acúmulo de Cd e Hg no tomateiro, além de relacionar o efeito desses metais na atividade de enzimas antioxidativas guaiacol peroxidase e superóxido desmutase e no crescimento dessas plantas, por meio de experimento em casa de vegetação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Experimento

Vasos plásticos, com volume aproximado de 11 litros (n=42), foram previamente envolvidos com papel alumínio e preenchidos com 8 quilos de solo. O experimento foi conduzido em triplicata para cada tratamento utilizando-se padrão tritisol (merck) de CdCl₂ (0,2 mg kg⁻¹; 3,0 mg kg⁻¹; 6,0 mg kg⁻¹ g g⁻¹) e de HgCl₂ (0,2 mg kg⁻¹; 12 mg kg⁻¹; 24 mg kg⁻¹) para contaminação da solução do solo. Três amostras controle também foram consideradas. As concentrações de 3,0 mg kg⁻¹ Cd e 12 mg

kg⁻¹ de Hg foram baseadas em valores orientadores para solos agrícolas determinados pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), segundo a Resolução N°420 de 2009 (CONAMA, 2009).

Em cada vaso foi transplantada uma plântula de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) do cultivar *Dominador*. Após o transplante, as plantas foram regadas diariamente, utilizando-se uma bandeja por baixo de cada vaso, procurando evitar a contaminação no ambiente pelos metais. Após o final da drenagem, a água percolada era devolvida para o vaso, evitando-se perdas. A retirada das folhas, raízes e solos de cada vaso (N=3) foi feita durante a terceira e nona semana do experimento. A cada coleta, o material vegetal era seco por liofilização (Liofilizador L108 – Liotop) e macerado utilizando-se nitrogênio líquido.

O experimento foi conduzido em casa de vegetação situada na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), no município de Campos dos Goytacazes, norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, durante o período de Agosto a Outubro de 2015. As variáveis climáticas (temperatura e umidade relativa) foram monitoradas durante os 2 períodos de coleta: Agosto/2015, referente à terceira semana do experimento ($T_{\text{média}} = 24,9^{\circ}\text{C}$; umidade relativa = 53,2%) e Outubro/2015, referente à coleta da nona semana ($T_{\text{média}} = 29,4^{\circ}\text{C}$; umidade relativa = 52,8%).

Metodologias de Digestão

Material Vegetal

Alíquotas de 0,2g de material vegetal seco foram colocadas em tubos de teflon (X-Press), adicionando-se 4mL de água ultrapura, 2mL de H₂O₂ 30% e 6mL da mistura H₂SO₄ 96%: HNO₃ 65% (1:1), metodologia de Sheehan et al (2006), Silva-Filho et al (2006) e Rea et al (2002). A digestão ocorreu em microondas (Mars Xpress microwave, CEM), durante 30 minutos (5 minutos até atingir 95°C e 25 minutos a temperatura constante de 95°C) com potência de 1600W.

Solo

A metodologia de digestão foi baseada em Santos et al. (2005). A cada 0,5 g de amostra seca e pesada em tubo teflon (X-Press) foram adicionados 8 mL da mistura 3HCl 37%: 1HNO₃ 65% e o processo conduzido em um sistema de microondas modelo Mars Xpress (CEM) por 25 minutos (10 minutos até atingir 95 °C e 15 minutos com temperatura constante de 95 °C) na potência de 1600 W. Após resfriamento, o extrato final foi filtrado em papel Whatman 40 e aferido a 50 mL com água ultrapura.

Determinação de Cd e Hg

A determinação do Cd foi feita em ICP-OES (Optical Emission Spectrometer – Varian, 720-ES) com limite de detecção de 0,25 mg kg⁻¹ para plantas e 0,1 mg kg⁻¹ para solos. O Hg foi determinado no ICP-AES (Liberty Series II), com limites de detecção iguais a 0,07 mg kg⁻¹ para planta e 0,03 mg kg⁻¹ para o solo. Todas as concentrações foram expressas em mg kg⁻¹ (peso seco).

Controle de Qualidade Analítica

Toda a vidraria foi previamente descontaminada ao longo de 3 etapas de 24 h: Extran 5%, HCl 5% e HNO₃ 5%. Ao final do processo o material foi lavado com água deionizada e água ultrapura. Para todos os métodos de digestão foram utilizados reagentes com grau de pureza (Merck), aplicadas réplicas (triplicata, para cada conjunto de 40 amostras) e brancos analíticos. A precisão entre as réplicas foi de 15%. Os percentuais de recuperação dos métodos de digestão para o material vegetal e o solo utilizando-se amostras certificadas foram, respectivamente: Apple Leaf 1515 (NIST), 98% para Cd e 94,3% para Hg e Mess3 NRCC, 96% para Cd e 92% para Hg.

Atividade Enzimática

Extração e Quantificação de Proteínas

O tecido foliar foi macerado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 contendo polivinilpolipirrolidona (PVPP) (10% do peso fresco total do tecido). O material foi centrifugado a 10 000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante analisado.

A quantificação de proteínas solúveis no extrato foi realizada segundo Bradford (1976). Uma curva padrão com BSA foi confeccionada de acordo com as instruções do “Kit BioRad Protein Assay”. Essa curva foi projetada em um gráfico de Abs 595 nm x µg de proteína. O teor de proteínas solúveis presente em cada extrato foliar foi determinado em relação ao gráfico da curva padrão.

Análise da atividade da guaiacol peroxidase (GPX)

Atividade in vitro

A atividade da guaiacol peroxidase foi avaliada pela taxa de oxidação de guaiacol a tetraguaiacol por monitoramento do acréscimo na absorbância medida a 470 nm ($\epsilon = 26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), como descrito por Rios-Gonzalez e colaboradores (2002) com algumas adaptações. A caracterização do pH ótimo da atividade guaiacol-peroxidásica (GPX) foi feita utilizando-se tampões de reação citrato pH 3,0-5,0 fosfato de sódio pH 6,0-7,0 e Tris base pH 8,0-9,0, todos 50 mM, com 0,08% de H₂O₂ e 10 mM de guaiacol. A reação foi iniciada após a adição do extrato protéico e o meio de reação sem o extrato serviu como branco. A atividade GPX foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína e o experimento foi repetido três vezes.

Atividade in gel

Para a detecção da atividade GPX em gel, as proteínas presentes no extrato foram separadas por PAGE segundo Laemmli (1970) em gel 10%, porém sob condições não desnaturantes (na ausência de SDS e β -mercaptoetanol). A corrida foi realizada a 4°C e a 150 V, por aproximadamente 1,5 h. Para a revelação, após a corrida eletroforética, o gel foi equilibrado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0 por 20 minutos e incubado por 30 minutos no mesmo tampão contendo 0,08% de H₂O₂ e 10 mM de guaiacol. Ao longo do tempo de incubação observou-se o surgimento de uma coloração amarronzada no local correspondente à banda da peroxidase, devido à oxidação do guaiacol a tetraguaiacol catalisada por essa enzima.

Análise da atividade da superóxido dismutase (SOD) in gel

A atividade da SOD em gel foi analisada após a separação eletroforética em PAGE, conforme Laemmli (1970) em condições não desnaturantes, a uma temperatura de 4°C, a 150 V e em gel 8%, por cerca de 1,5 h. Após serem lavados com água deionizada, os géis foram incubados por 30 min à temperatura ambiente em um meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 50mM (pH 7,8), EDTA 1mM, riboflavina 0,05 mM, NBT 0,1 mM e TEMED 0,3% (v/v). No fim desse período, os géis foram retirados do meio de reação, lavados com água deionizada e iluminados submersos em água até o aparecimento de uma coloração arroxeadada nesses géis, em contraste com as bandas incolores, referentes à atividade da SOD. Para interromper a reação, os géis foram transferidos para uma solução de ácido acético 6% (v/v). Antes desse tratamento, entretanto, o gel foi cortado em três pedaços: o primeiro foi corado para SOD conforme descrito anteriormente; o segundo e o terceiro, porém, foram incubados por 20 min em 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,8), contendo 2 mM de KCN e em 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,8), contendo 5 mM de H₂O₂, respectivamente. Ao final dos 20 min, ambos os pedaços foram novamente lavados em água deionizada e, então corados para a atividade da SOD. Esse método, descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) foi adaptado de Vitória e colaboradores (2001).

Análises Estatísticas

A diferença das variáveis mensuradas entre tratamentos e tempos de experimentação foi avaliada por uma ANOVA seguida de teste de Tukey *a posteriori*. Os dados foram transformados utilizando-se uma função de verossimilhança máxima (MASS package; Venables & Ripley, 2002), quando necessário, para atender as premissas da ANOVA (linearidade, homocedasticidade e normalidade). Um erro de 5% foi assumido para avaliar a significância dessas diferenças. Todas as análises foram executadas no sistema R (R CoreTeam, 2017).

3. RESULTADOS

Teores de Cd e Hg na planta

As maiores concentrações médias de Cd foram encontradas em folhas das plantas expostas à 6mg kg⁻¹. Durante a terceira semana, o acúmulo de Cd nas raízes acompanhou o aumento do teor de Cd nos solos utilizados nos tratamentos (**Tabela 1**). Porém, a translocação da raiz para a folha foi cerca de cinco vezes maior no tratamento com 6mg kg⁻¹ de Cd, enquanto para os demais tratamentos, a translocação foi cerca de duas vezes maior. Na nona semana, os valores nas folhas e raízes foram semelhantes, com exceção do tratamento de 3mg kg⁻¹.

O maior teor de Hg foi encontrado em raízes do tratamento com 24mg kg⁻¹ e as proporções raiz/folha na terceira e nona semanas foram semelhantes, em torno de 80 vezes. Na nona semana, a absorção das raízes foi cerca de 120 vezes maior do que as folhas do tratamento com 24mg kg⁻¹ porém, menos de 1,2% do Hg absorvido pelas raízes foi transportado para as folhas. As plantas do tratamento de 12mg kg⁻¹ de Hg não sobreviveram até o final do experimento.

As concentrações médias de Cd e Hg nas folhas e nas raízes aumentaram da terceira para a nona semana com o aumento do teor de ambos os metais no solo. A translocação de Cd foi maior do que a do Hg, uma vez que, cerca de 36% do Cd acumulado nas raízes, chegou até as folhas, enquanto 16% do Hg absorvido pelas raízes chegou até a parte aérea da planta.

Tabela 1. Teores de cádmio e mercúrio em solos, folhas e raízes do cultivo de tomateiro realizado em casa de vegetação, durante um período de três e nove semanas. Letras minúsculas comparam o teor do mesmo elemento em tratamentos diferentes, de uma mesma semana e da mesma matriz.

Tratamento	Teor (mg kg ⁻¹)					
	3 ^a Semana			9 ^a Semana		
	Solo	Folha	Raiz	Solo	Folha	Raiz
Controle	0,17±0,08 ^c	ND	1,1 ± 0,07 ^b	0,17 ± 0,08 ^c	ND	1,2 ± 0,07 ^b
0,2 Hg	0,4± 0,1 ^b	0,2 ± 0,2 ^c	1,6 ± 0,2 ^b	0,4 ± 0,1 ^c	0,4 ^c	1,4 ± 1,2 ^b
12 Hg	9,6± 6,6 ^a	2,6 ± 1.02 ^{bc}	381,8 ± 75,6 ^{ab}	6±1,6 ^b	-----	-----
24 Hg	13,1± 6,5 ^a	15,7 ± 8,2 ^{ab}	1329,4 ± 732,7 ^a	11,9± 9,3 ^a	18,6 ^a	1448,4 ± 770,9 ^a
Controle	0,2 ± 0,03 ^c	ND	ND	0,2 ± 0,03 ^c	ND	ND
0,2 Cd	0,5± 0,01 ^b	4,12 ± 1,14 ^a	6,99 ^a	0,5± 0,02 ^b	5,7 ± 4,9 ^a	6,8 ± 1,4 ^a
3 Cd	0,5± 0,07 ^{ba}	7,6 ± 0,9 ^a	11,4 ± 5,4 ^a	0,5± 0,006 ^b	6,1 ± 2,4 ^a	16,9 ± 4,7 ^a
6 Cd	0,6± 0,2 ^a	10,9 ± 0.226 ^a	16,1 ^a	0,6± 0,1 ^a	27,4 ± 26,7 ^a	26,7 ± 12,3 ^a

Efeito do Cd e Hg na atividade antioxidante GPX

A atividade enzimática da GPX foi maior em raízes do que em folhas (Figura 1) para os dois metais em todos os tratamentos. A atividade dessa enzima nas folhas se manteve praticamente constante durante todo o experimento, com exceção do Cd na nona semana (**Figura 1**).

Para as folhas das plantas do tratamento com Hg, embora a atividade tenha diminuído com o aumento da concentração de Hg no solo, não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos utilizados (**Figura 1C** e **Figura 1D**).

Nos tratamentos com Cd, a atividade da GPX diferiu significativamente entre controle e os demais tratamentos na terceira semana (**Figura 1A**). A atividade dessa enzima observada no tratamento com $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ foi diferente estatisticamente do valor encontrado para 6 mg kg^{-1} . Na nona semana, a atividade observada nas raízes foi significativamente diferente para todos os tratamentos, enquanto nas folhas houve uma redução a partir do tratamento de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd, com diferença significativa da atividade das plantas expostas à 6 mg kg^{-1} .

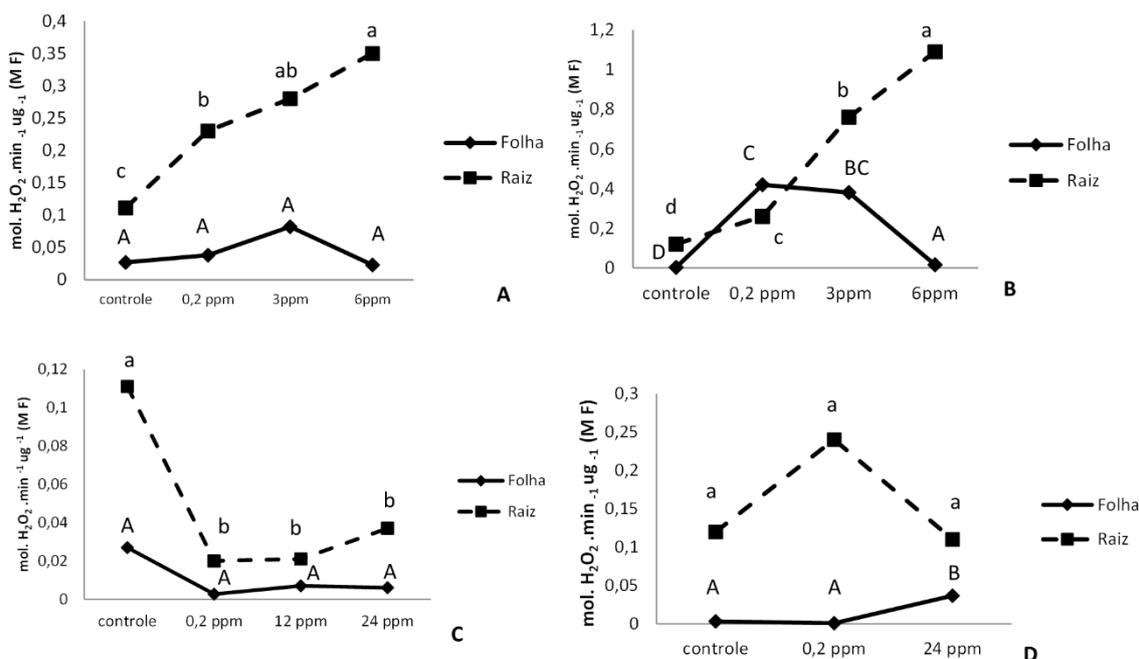


Figura 1. Atividade da guaiacol peroxidase (GPX) em folhas e raízes em relação aos tratamentos com Cd e Hg utilizados nos cultivos em casa de vegetação. 1A- Tratamento com Cd, 3ª Semana; 1B- Tratamento com Cd, 9ª Semana; 1C- Tratamento com Hg, 3ª Semana; 1D- Tratamento com Hg, 9ª Semana.

Ensaio Enzimático GPX

No tratamento com Hg, mudanças foram observadas de acordo com o órgão e o tempo de exposição (Tabela 2). Na terceira semana, foram observadas duas bandas de isoformas (GPX I e GPX III) a partir do tratamento com 12mg kg⁻¹ de Hg (**Figura 2A**). Nas raízes, cinco bandas de isoformas (GPX I a GPX V) estiveram presentes nas raízes em todos os tratamentos, incluindo o controle. No tratamento de 0,2mg kg⁻¹ de Hg, houve uma diminuição na expressão das isoformas GPX III, GPX IV e GPX V, em relação ao controle (**Figura 2B**). No tratamento de 12mg kg⁻¹ e 24 mg kg⁻¹ de Hg, houve um aumento na atividade da GPX IV e GPX V (**Figura 2B**). Durante a nona semana, a situação se inverteu, com mais isoformas sendo expressas na folha (GPX I, GPX II, GPX III e GPX IV) nas concentrações de 0,2 e 24 mg kg⁻¹ de Hg, enquanto nas raízes, duas isoformas foram observadas, sendo a GPX I só expressa no tratamento de 12 mg kg⁻¹ e de 24 mg kg⁻¹ de Hg (**Figura 2C e 2D**).

Tabela 2. Isoformas da guaiacol peroxidase expressas em folhas e raízes de tomateiro expostos à Cd e Hg durante três e nove semanas.

Metal	Tratamento	3ª Semana					9ª Semana				
		GPX I	GPX II	GPX III	GPX IV	GPX V	GPX I	GPX II	GPX III	GPX IV	GPX V
Hg	Controle							X	X		
	Folhas 0,2 mg kg ⁻¹						X	X	X	X	
	12 mg kg ⁻¹	X		X					MORTA		
	24 mg kg ⁻¹	X		X			X	X	X	X	
	Raiz Controle	X	X	X	X	X				X	
	0,2 mg kg ⁻¹	X	X	X	X	X	X		X		
	12 mg kg ⁻¹	X	X	X	X	X			MORTA		
24 mg kg ⁻¹	X	X	X	X	X	X		X			
Cd	Controle	X	X							X	
	Folhas 0,2 mg kg ⁻¹	X	X				X		X		
	3 mg kg ⁻¹	X	X				X		X		
	6 mg kg ⁻¹	X	X				X		X		
	Raiz Controle	X	X	X				X			
	0,2 mg kg ⁻¹	X	X	X			X	X	X		
	3 mg kg ⁻¹	X	X	X			X	X	X		
6 mg kg ⁻¹	X	X	X			X	X	X			

Para o experimento com Cd, a atividade da GPX apresentou o maior número de isoformas nas raízes, independentemente do tempo de exposição (**Tabela 2**). Porém, a atividade da GPX III foi mais intensa durante a terceira semana (**Figura 3B**). Nas folhas, o aumento do teor de Cd nos tratamentos gerou a expressão de duas isoformas, ressaltando uma alta atividade da GPX III, quando comparada ao controle (**Figura 3A**). Na nona semana, não houve registro de atividade da GPX I nas folhas das plantas controle, evidente, porém, proporcionalmente ao aumento da concentração do tratamento (**Figura 3C**). A GPX nas raízes também apresentou três isoformas, porém a atividade da GPXII foi mais intensa (**Figura 3D**).

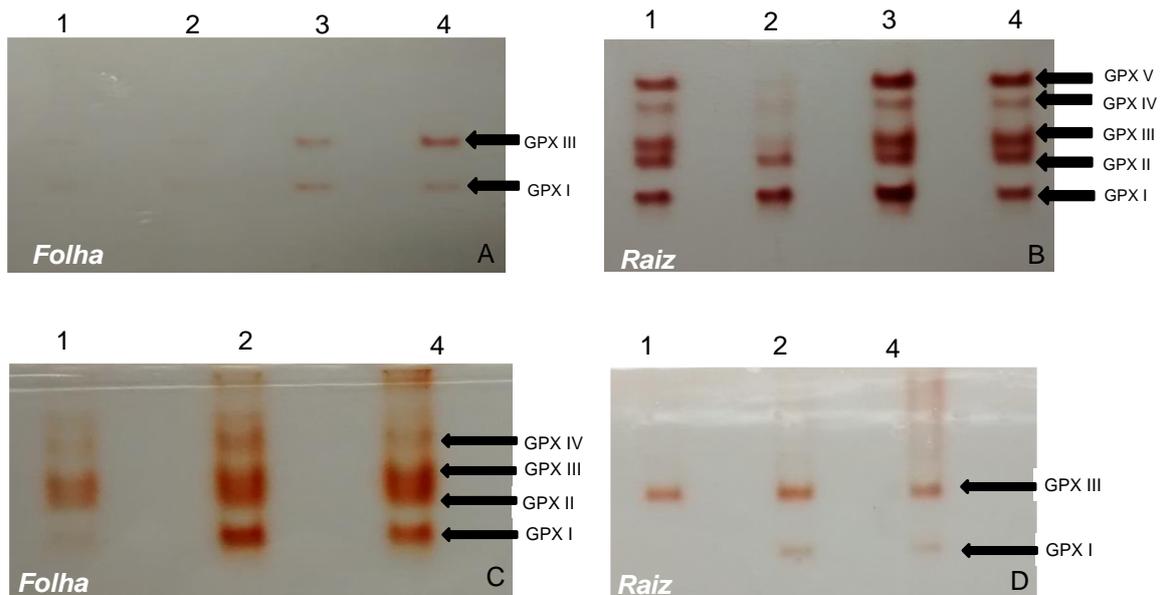


Figura 2. Géis nativos para a atividade da guaiacol peroxidase (GPX) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Hg no período de três semanas (Figuras 2A e 2B) e nove semanas (Figuras 2C e 2D). Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – $0,2\text{mg kg}^{-1}$ de Hg; Linha 3 – 12mg kg^{-1} de Hg; Linha 4 – 24mg kg^{-1} de Hg.

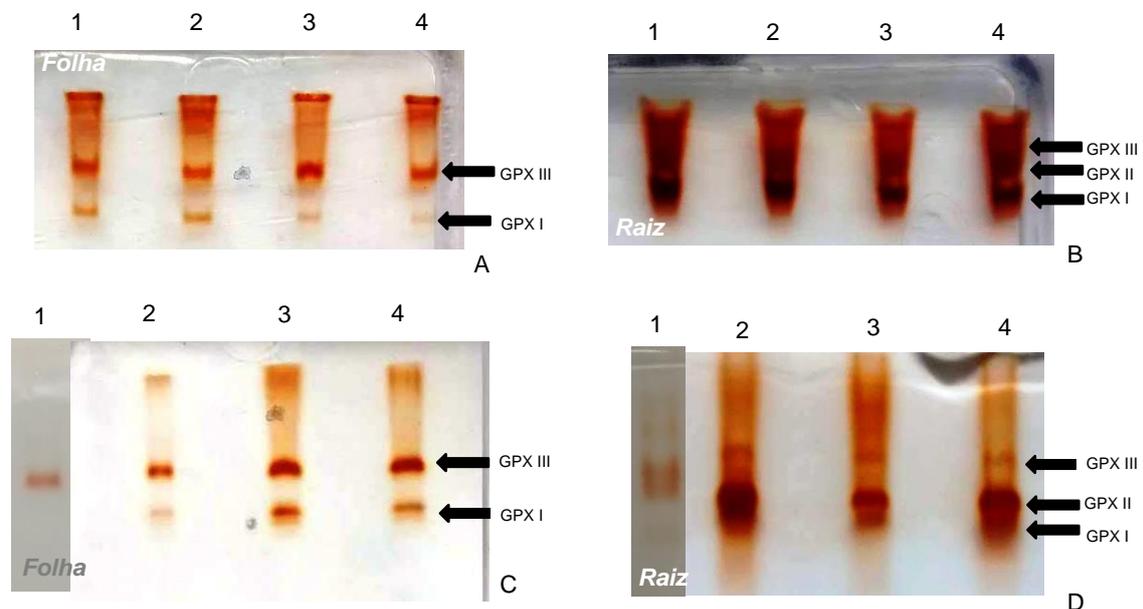


Figura 3. Gel nativo para a atividade da guaiacol peroxidase (GPX) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Cd no período de três semanas. Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – $0,2\text{mg kg}^{-1}$ de Cd; Linha 3 – 3mg kg^{-1} de Cd; Linha 4 – 6mg kg^{-1} de Cd.

Ensaio Enzimático SOD

Durante a terceira semana, foram expressas duas isoformas da SOD, SOD I e SOD II nas folhas de todos os tratamentos (**Tabela 3**), porém sem diferença na intensidade da expressão enzimática para os dois metais estudados (**Figura 4A**). As raízes apresentaram as mesmas isoformas, porém a SOD II não foi ativa no controle e $0,2\text{mg kg}^{-1}$ de Hg e a expressão da SOD I foi mais intensa a partir da 12 mg kg^{-1} Hg (**Figura 4B**). Na nona semana, as folhas apresentaram as mesmas duas isoformas, enquanto as raízes apenas uma, a SOD II (**Tabela 3**). Nas folhas, a SOD II não apresentou alteração na intensidade, e nas raízes, houve um aumento da sua expressão (**Figura 4C e 4D**).

Tabela 3. Isoformas da superóxido desmutase expressas em folhas e raízes de tomateiro expostos à Cd e Hg durante três e nove semanas.

Metal	Tratamento	3ª Semana			9ª Semana		
		SOD I	SOD II	SOD III	SOD I	SOD II	SOD III
Hg	Folhas	Controle	X	X		X	X
		$0,2\text{mg kg}^{-1}$	X	X		X	X
		12 mg kg^{-1}	X	X			MORTA
		24 mg kg^{-1}	X	X		X	X
	Raiz	Controle	X				X
		$0,2\text{mg kg}^{-1}$	X				X
		12 mg kg^{-1}	X	X			MORTA
		24 mg kg^{-1}	X	X			X
Cd	Folhas	Controle		X	X	X	X
		$0,2\text{mg kg}^{-1}$		X	X	X	X
		3 mg kg^{-1}	X	X	X	X	X
		6 mg kg^{-1}	X	X	X	X	X
	Raiz	Controle					X
		$0,2\text{mg kg}^{-1}$					X
		3 mg kg^{-1}	X	X			X
		6 mg kg^{-1}	X	X			X

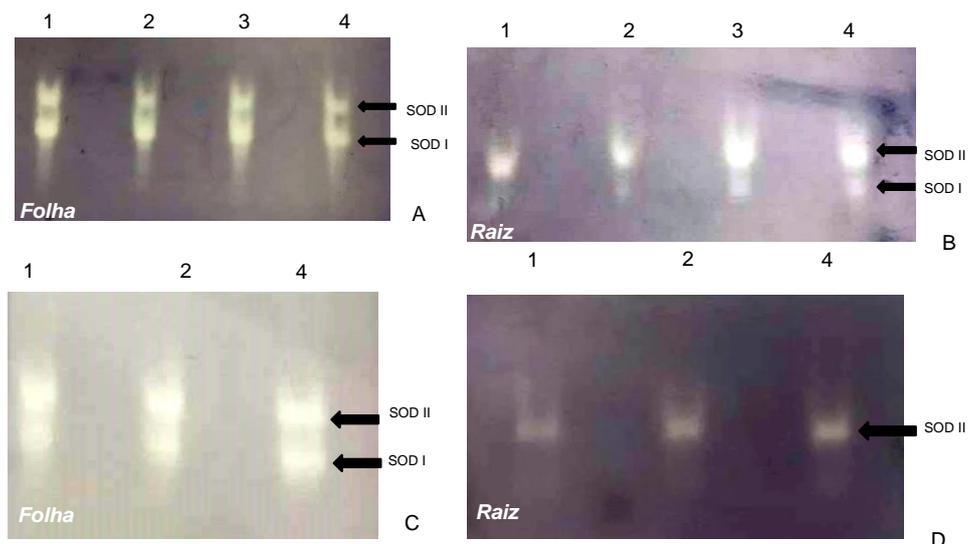


Figura 4. Gel nativo para a atividade da superóxido desmutase (SOD) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Hg no período de três semanas (Figuras 4A e 4B) e nona semana (Figuras 4C e 4D). Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – $0,2\text{mg kg}^{-1}$ de Hg; Linha 4 – 24mg kg^{-1} de Hg. Os indivíduos do tratamento de 12mg kg^{-1} de Hg não sobreviveram até a nona semana.

No tratamento com Cd, durante a terceira semana foram expressas três isoformas da SOD, SOD I, SOD II e SOD III nas folhas, enquanto nas raízes, apenas as bandas referentes à SOD I e SOD II foram observadas (**Figura 5A e 5B**). Na nona semana, duas isoformas da SOD foram detectadas nas folhas, SOD II e III, enquanto nas raízes, apenas uma, a SOD II (**Figura 5C e 5D**).

Em relação a intensidade da expressão da SOD, em todas as partes da planta e tempo de exposição, houve um aumento discreto da atividade em relação ao teor de Cd no tratamento.

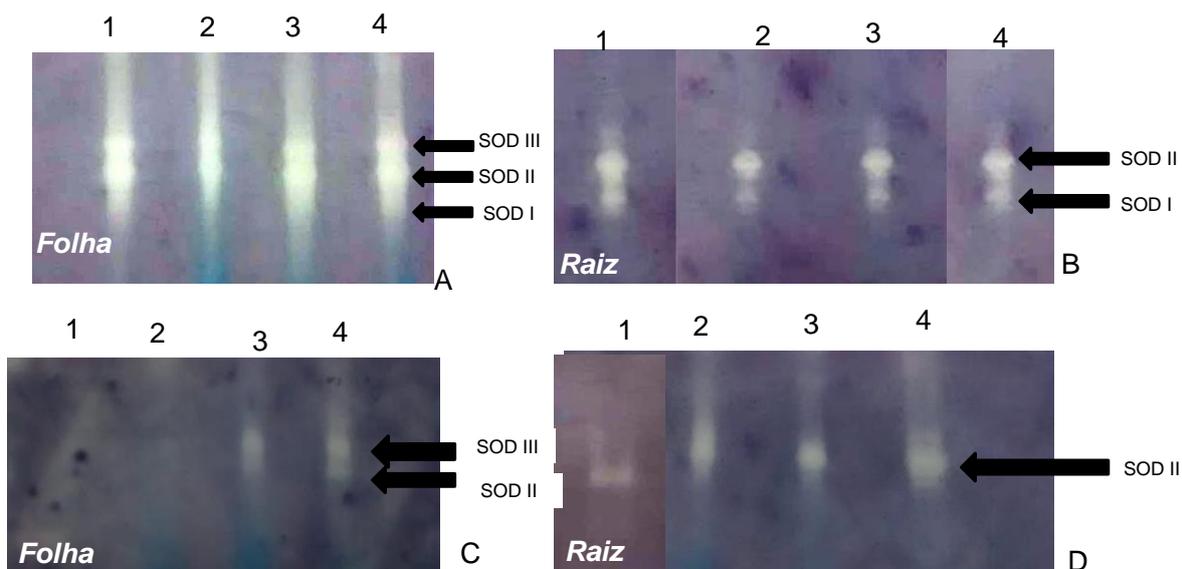


Figura 5. Gel nativo para a atividade da superóxido desmutase (SOD) de raiz e folhas de tomateiro, expostos ao Cd no período de três semanas (Figuras 5A e 5B) e nove semanas (5C e 5D). Quantidades iguais de proteína foram adicionadas ao gel. Linha 1 – Controle; Linha 2 – 0,2mg kg⁻¹ de Cd; Linha 3 – 3mg kg⁻¹ de Cd; Linha 4 – 6mg kg⁻¹ de Cd.

Sintomas visuais do Cd e Hg nas raízes

Os aspectos visuais observados nas raízes de tomateiros expostos aos tratamento com Cd e Hg em diferentes concentrações e tempo de exposição são demonstrados nas **Figuras 6A e 6B**.

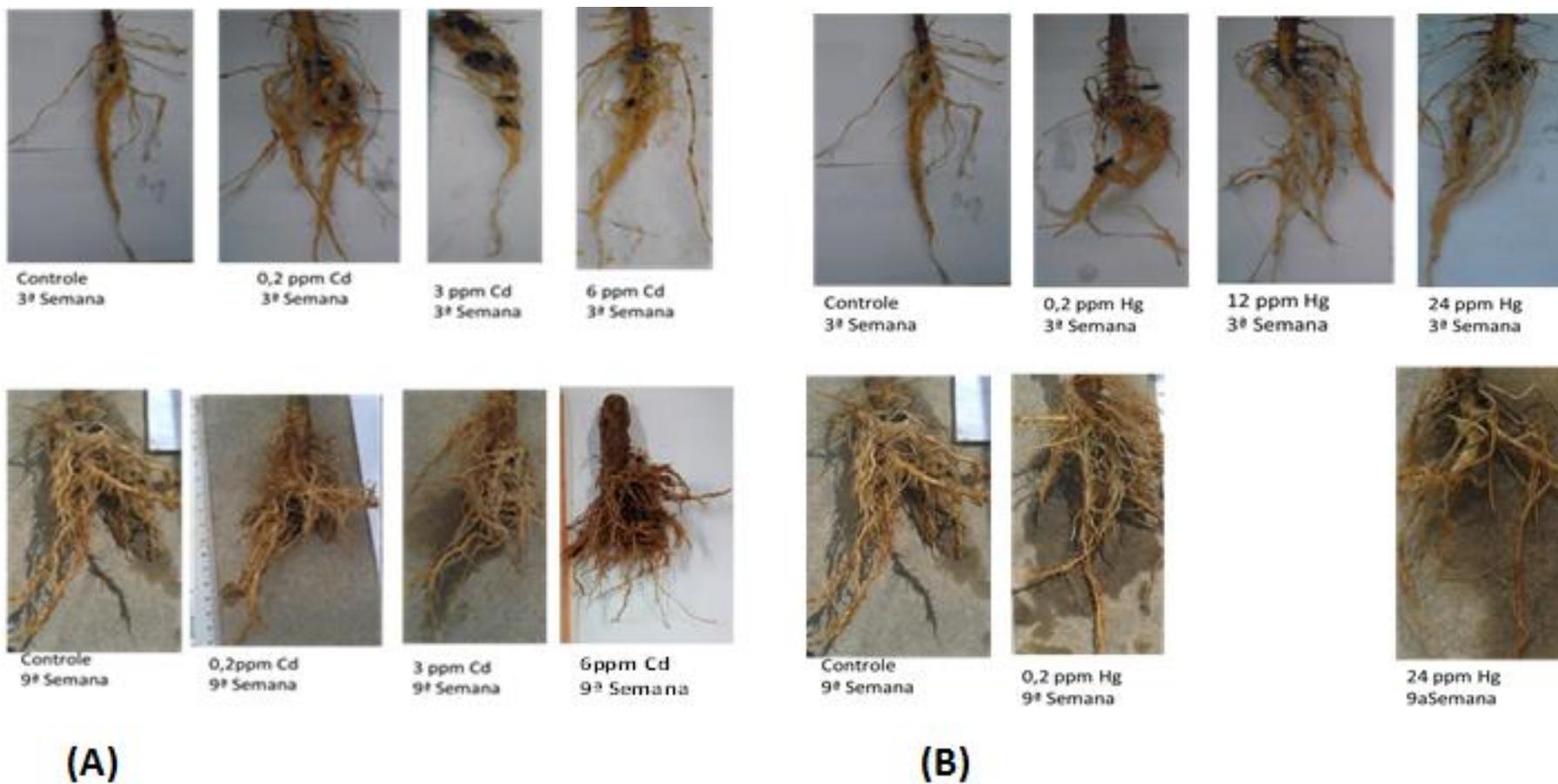
As raízes das plantas expostas a um maior tempo e concentração tanto de Cd quanto de Hg) reduziram de tamanho em relação aos respectivos controles. Comparando os tratamento controle e 6 mg kg⁻¹ na nona semana, a redução foi de 20%, enquanto para o Hg, essa redução foi de 35%. Não foi observada alteração de cor em nenhuma das raízes das plantas submetidas ao tratamento com contaminação.

4. DISCUSSÃO

Os efeitos tóxicos do acúmulo de Cd e Hg nas plantas são observados principalmente nas raízes. Segundo Lux et al (2010), a presença de Cd no solo,

dependendo da concentração a que as plantas estão expostas, pode alterar a anatomia das raízes e seu crescimento. Nas plantas do tratamento de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd, as raízes tiveram um maior crescimento lateral em comparação às plantas controle. Enquanto para o tratamento com 6 mg kg^{-1} (nona semana), o crescimento das raízes diminuiu cerca de 20% em relação à raiz controle. Estudo realizado por Vitória et al (2003) reportou um aumento no crescimento das raízes de rabanete expostas ao Cd, justificado pelos autores como consequência da deposição de material composto por células mortas nas raízes que impede a absorção de água, levando a produção de novas raízes. Porém, quando expostas à altas concentrações de Cd, há uma redução no crescimento das raízes, causado pela desintegração das células corticais (Lux et al., 2010). Para o Hg, não foram observadas mudanças nos tamanhos das raízes durante a terceira semana nas plantas de todos os tratamentos. A indução no crescimento de plantas pela exposição à baixas concentrações de substâncias reconhecidamente tóxicas é chamado de efeito hormético (Aina et al., 2007). Cargnelutti et al (2006) verificaram um aumento no peso seco das raízes de plântulas de pepino expostas à $500 \mu\text{M}$ durante 10 e 15 dias. O efeito tóxico da exposição ao Hg em altas concentrações (24 mg kg^{-1}) e por um período mais longo, causou reduções em cerca de 35% no crescimento e no alongamento das raízes das plantas, quando comparado ao controle. Altas concentrações de Hg induzem efeitos fitotóxicos visíveis nas raízes e na fisiologia das plantas, verificado em alfalfa (Zhou et al., 2007; Ortega-Villasante et al., 2005). Da mesma forma, Cho & Park (2000) verificaram uma redução no crescimento das raízes de tomate com o excesso do teor de Hg, relacionado à danos causados nas células radiculares.

Figura 6: Sintomas visuais das raízes de plantas do tratamento com (A) Cd nos solos, expostas a um período de três e nove semanas; (B) com Hg nos solos, expostas a um período de três e nove semanas. As plantas do tratamento com 12mg kg^{-1} não chegaram até o final do experimento



A presença de Cd e Hg nas plantas induz a formação de uma condição de estresse oxidativo e das respostas da defesa antioxidativa, que tem como consequência o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Enzimas como a superóxido desmutase (SOD) e guaiacol peroxidase (GPX) atuam para reduzir as espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2 . A SOD é uma das primeiras enzimas a atuar no processo de desintoxicação cujo mecanismo de atuação está relacionado a desmutação do O_2^- em H_2O_2 e H_2O . O produto resultante da ação da SOD, H_2O_2 , ainda é uma forma tóxica e é eliminado pela ação da GPX (Marques & Soares, 2011).

No presente estudo, a atividade da GPX aumentou nas folhas nos tratamentos com ambos os metais, porém mais isoformas foram expressas nas raízes. Nas plantas do tratamento com Hg, houve uma variação em relação ao tempo de exposição: durante a terceira semana, cinco isoformas da GPX foram induzidas nas raízes, enquanto nas folhas foram apenas duas. Já na nona semana, o número de isoformas da GPX foi igual a dois, enquanto nas folhas, foram quatro isoformas. Já para o Cd, três isoformas foram expressas nas raízes enquanto nas folhas, foram duas. Comparativamente, o efeito gerado pela exposição ao Hg foi mais tóxico do que o causado pelo Cd, devido ao maior número de isoformas geradas. Shaw et al (1995) verificaram que a atividade da GPX em feijão mungo (*Phaseolus aureus*) foi maior nas plantas expostas ao Hg do que aquelas sob a ação do Cd.

Para a SOD, houve uma diminuição na quantidade isoformas expressas nas raízes nos tratamentos com Cd e Hg, durante a nona semana. Somente nas folhas expostas ao Hg apresentou uma banda da isoforma SOD III. Ammar et al. (2008) também verificaram a indução de uma nova isoforma em folhas de tomate expostos ao Cd, em comparação às isoformas estimuladas em raízes. A redução do número de isoformas da SOD nas raízes nos tratamentos com Cd e Hg durante a nona semana pode ter relação com a inibição dessas enzimas nessa estrutura. O mesmo foi observado para as raízes de *Atriplex codonocarpa* expostas ao Hg por Lomonte et al. (2010), cuja atividade reduziu com o aumento do teor de Hg nas raízes. Essa redução foi associada pelos autores à diminuição na produção de SOD, cuja atividade frente à intensificação da condição de estresse, não foi eficiente e desta forma, inativados. Outros

estudos também reportaram a redução da atividade da SOD com o aumento da exposição ao Cd em trigo (Milone et al., 2003) e ervilha (Rodríguez-Serrano et al., 2006).

Diferenças na translocação de metais pesados podem ser observadas de acordo com o tipo de metal, a espécie da planta cultivada e a concentração do metal no solo (Singh et al., 2004). De modo em geral, as raízes são consideradas como a principal via de entrada de metais na planta e onde grande parte dos elementos absorvidos fica retido, diminuindo sua translocação para a parte aérea, porém, dependendo do metal, sua mobilidade pode ser maior ou menor ao longo da planta (Liu et al., 2008).

O Hg e o Cd possuem um comportamento diferente quando absorvido pelos vegetais, uma vez que o Cd possui uma maior mobilidade na planta. O Cd é um cátion divalente, que se assemelha a outros elementos essenciais da planta como o Fe^{2+} , Ca^{2+} e Mg^{2+} , e por essa similaridade, utiliza os mesmos transportadores de membrana presentes nas raízes e é absorvido mais facilmente (Perfus-Barbeoch et al., 2002). Assim como o presente estudo, Liñero et al (2015) também reportaram uma maior translocação de Cd das raízes para a parte aérea de tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Da mesma forma, Liu et al (2007) verificaram uma maior absorção de Cd do que de Hg pelas raízes de arroz (*Oryza sativa*). O Hg é absorvido pelas plantas porém, fica retido em maior quantidade nas raízes, criando uma barreira para sua translocação até a parte aérea (Tangahu et al., 2011; Beauford et al., 1977). Esse comportamento do Hg é relacionado à sua afinidade com grupamentos SH- presentes nas membranas das células das raízes, que se ligam ao Hg e o retém nas raízes (Wang & Greger, 2004). Porém, quando as plantas são expostas à altas concentrações de Hg nos solos, o teor desse elemento nas folhas pode ser incrementado (Kabata-Pendias, 2010; Cavallini et al., 1999). Sendo assim, as altas concentrações de Hg nas folhas (observados na terceira semana), quando comparadas as de Cd, podem ser reflexo do teor utilizado nos solos nos tratamentos de contaminação com Hg (24mg kg^{-1}) que foram maiores do que nos tratamentos de Cd (6mg kg^{-1}). Porém, mesmo com o maior teor de Hg nas folhas, a translocação de Cd foi cerca de duas vezes maior do que a de Hg.

Em relação aos teores de 12mg kg^{-1} de Hg, que é o valor permissível para esse metal em solos agrícolas (CONAMA 420/2009), as folhas do tomateiro apresentaram um teor igual

a $2,6 \text{ mg kg}^{-1}$. O valor encontrado no presente estudo foi maior do que o intervalo entre $0,5$ e 1 mg kg^{-1} de Hg proposto por Kloke et al (1984) como valores fitotóxicos para as plantas. Nos tratamentos com 3 mg kg^{-1} de Cd no solo, os teores encontrados na folha ($7,6 \text{ mg kg}^{-1}$ e $6,1 \text{ mg kg}^{-1}$) estiveram acima do valor de 4 mg kg^{-1} , reportado por Macnicol & Beckett (1985) como a concentração crítica que causa efeito tóxico nas plantas. Ainda assim, não foram observados efeitos nas partes aéreas, mas uma redução no crescimento radicular da planta, podendo ter relação com o maior acúmulo desses metais nas raízes. Esse efeito é problemático, pois a raiz é uma estrutura importante para as plantas, e a redução de seu crescimento pode atrapalhar a produtividade dos cultivos agrícolas. Nacke et al (2013) afirmam que os valores propostos pela Resolução CONAMA N°420 permitem que haja um incremento no teor desses elementos nos solos agrícolas através do uso de agroquímicos, sendo necessária uma discussão mais ampla a respeito dos valores permissíveis. Os valores foram baseados nos riscos à saúde humana, porém, por meio do presente estudo, não levando em consideração os efeitos fitotóxicos, importantes para a produtividade das plantas. Sousa (2015) também utilizou doses de Cd baseadas nos valores de investigação propostos pelo CONAMA (0 ; $1,5$; 3 ; 9 e 30 mg kg^{-1} de Cd) em solos de cultivo de trigo, observando efeitos negativos no teor foliar de alguns micronutrientes como o K, e no desenvolvimento da planta. Alvarenga (2014) cultivou quatro espécies vegetais sensíveis ao Cd (arroz, rabanete, feijão e milho), expondo-as à concentrações, tomando como base os valores de referência de qualidade, prevenção e investigação propostos pelo CONAMA para esse metal. Nesse estudo, mesmo considerando o valor de referência de qualidade ($0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ de Cd) no qual considera-se um solo limpo, houve alterações na atividade das enzimas SOD, catalase e ascorbato peroxidase em relação ao controle. Ainda existem poucos trabalhos que buscam verificar o efeito dos teores de elementos traço propostos pela legislação brasileira para solos. Esses estudos são necessários, uma vez que deve-se buscar os teores que possam assegurar a qualidade dos produtos agrícolas cultivados nesses solos, a produtividade dos cultivares e a segurança da saúde humana.

5. CONCLUSÃO

Embora efeitos visuais na parte aérea da planta não tenham sido observados, a resposta antioxidante foi uma ferramenta eficiente para verificar as alterações causadas pela presença do Cd e Hg no tomateiro.

O acúmulo de mercúrio e cádmio nas raízes induziu efeitos negativos nessas estruturas, como a diminuição do crescimento e ramificação radicular. Além dos efeitos visuais, ambos os metais induziram efeitos tóxicos nas plantas, observados pelas mudanças nas atividades das enzimas antioxidativas SOD e GPX. As raízes, estruturas onde houve um maior acúmulo de Cd e Hg nas plantas, exibiram uma menor quantidade de isoformas da SOD, podendo estar relacionada à diminuição da sua capacidade em atuar nesta condição de toxicidade. A GPX apresentou mais isoformas nas plantas do tratamento com Hg do que nas plantas do tratamento com Cd.

6. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Laboratório de Ciências Ambientais (LCA), pela determinação dos metais e ao Laboratório de Biotecnologia (LBT), pela determinação das variáveis bioquímicas, ambos da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). C.M.M. Souza recebeu suporte financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) - FAPERJ; C-26/111.368/2012.

7. REFERÊNCIAS

AINA, R.; LABRA, M.; FUMAGALLI, P.; VANNINI, C.; MARSONI, M. (2007). Thiolpeptide level and proteomic changes in response to cadmium toxicity in *Oryza sativa* L. roots. *Environ Exp Bot*, 59:381–392.

ALVARENGA, I. F. S. (2014). Fisiologia e ecotoxicologia de espécies vegetais para a determinação do valor de prevenção de cádmio em solos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, 180p.

AMMAR, W.B.; NOUAIRI, I.; ZARROUK, M.; GHORBEL, M.H.; JEMAL, F. (2008). Antioxidative response to cadmium in roots and leaves of tomato plants. *Biologia Plantarum* 52: 727-731.

ARSHAD, M.; ALI, S.; NOMAN, A.; RIZWAN, M.; FARID, M.; IRSHAD, M. K. (2015). Phosphorus amendment decreased cadmium (Cd) uptake and ameliorates chlorophyll contents, gas, exchange attributes, antioxidants, and mineral nutrients in wheat (*Triticum aestivum* L.) under Cd stress. *Archives of Agronomy and Soil Science*, Vol. 62, No. 4, 533–546.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DO COMÉRCIO DE SEMENTES E MUDAS (ABCSEM). Projeto para levantamento dos dados socioeconômicos da cadeia produtiva de hortaliças no Brasil 2010/2011. Campinas: ABCSEM, 2011. Disponível em: <http://www.abcsem.com.br/docs/direitos_resevados.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2016.

BASTOS, W. R.; MALM, O.; PFEIFFER WOLFGANG, C.; CLEARY, D. (1998) Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon, Brazil. *Ciênc. cult. (São Paulo)*, 50(4): 255-260.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. (1971). Superoxide dismutases: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.

BEAUFORD, W.; BARBER, J.; BARRINGER, A. R. (1977). Uptake and distribution of mercury within higher plants. *Physiologia Plantarum*, 39(4): 261–265.

BOLWELL, G. P.; BINDSCHEDLER, L. V.; BLEE, K. A.; BUTT, V. S.; DAVIES, D. R.; GARDNER, S. L.; GERRISH, C.; MINIBAYEVA, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany*, 53, 1367–1376.

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

CARGNELUTTI, D.; TABALDI, L. A.; SPANEVELLO, R. M.; JUCOSKI, G. O.; BATTISTI, V.; REDIN, M.; LINARES, C. E. B.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; NICOLOSO, F. T.; MORSCH, V. M.; SCHETIINGER, M. R. C. (2006). Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*, 65, 999-1006.

CAVALLINI, A.; NATALI, L.; DURANTE, M.; MASERTI, B. (1999). Mercury uptake, distribution and DNA affinity in durum wheat (*Triticum durum* Desf.) plants. *The Science of the total environment*, 243: 119-127.

CHO, U.; PARK, J. (2000). Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, 156. 1-9.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução N°420 de 28 de Dezembro de 2009. Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620> Acessado 17 Agosto 2017.

DEAN, R. T.; GIESEG, S.; DAVIES, M. (1993). Reactive species and their accumulation on radical-damaged proteins. *Trends in Biological Sciences*, 18,437–441.

FERNÁNDEZ-CALVINO, D.; PÉREZ-RODRIGUEZ, M. P.; NÓVOA-MUÑOZ, J. C.; ESTÉVEZ, M. A. (2017). Is the total concentration of a heavy metal in soil a suitable tool for assessing the environmental risk? Considering the Case of Copper. *Journal of Chemical Education*, 94(8): pp 1133–1136. DOI: 10.1021/acs.jchemed.7b00105

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; TEZOTTO, T.; CARVALHO, R. F. F.; ALVES, L. R.; PETERS, L. P.; AZEVEDO, R. A. (2015). Cadmium stress antioxidant responses and root-to-shoot communication in grafted tomato plants. *Biometals*; 28(5):803-816.

KABATA-PENDIAS, A. (2010). Trace elements in soils and plants. 4th Edition, CRC press, 520p.

KLOKE, A.; SAUERBECK, D. R.; VETTER, H. (1984). The contamination of plants and soils with heavy metals and the transport of metals in terrestrial food chains, in *Changing Metal Cycles and Human Health*, Nriagu, J. O., ed., Dahlem, Konferenzen, Springer-Verlag, Berlin, 113.

LAEMMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

LI, Y.; SUN, H.; LI, H.; YANG, L.; YE, B.; WANG, W. (2013). Dynamic changes of rhizosphere properties and antioxidant enzyme responses of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) grown in

Chemosphere, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.05.063>

LIÑERO, P.; CIADAD, M.; CARRERO, J. A.; NGUYEN, C.; DE DIEGO, A. (2015). Accumulation and translocation of essential and nonessential elements by tomato plants (*Solanum lycopersicum*) cultivated in open-air plots under organic or conventional farming techniques. *Journal of agricultural and food chemistry*,

LIU, W. X.; SHEN, L. F.; LIU, J. W.; WANG, Y. W.; LI, S. R. (2007). Uptake of toxic heavy metals by rice (*Oryza sativa* L.) cultivated in the agricultural soil near Zhengzhou City, People's Republic of China. *Bull Environmental Contamination Toxicology*, 79: 209-213.

LIU, W. X.; LIU, J. W.; WU, M. Z.; LI, Y.; ZHAO, Y.; LI, S. R. (2008). Accumulation and translocation of toxic heavy metals in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) growing in agricultural soil of Zhengzhou, China. *Bull Environmental Contamination Toxicology*, 82: 343-347.

LOMONTE, C.; SGHERRI, C.; BAKER, A. J. M.; KOLEV, S. D.; NAVARI-IZZO, F. (2010). Antioxidative response of *Atriplex codonocarpa* to Mercury. *Environmental and Experimental Botany*, 69, 9-16.

LUX, A.; MARTINKA, M.; VACULIK, M.; WHITE, P. J. (2010). Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, vol. 62(1): 21-377.

MACNICOL, R. D.; BECKETT, P. H. T. (1985). Critical tissue concentrations of potentially toxic elements. *Plant and Soil*, 85, 107-129.

MARQUES, T. C. L. S.; SOARES, A. M. (2011). Antioxidant system of ginseng under stress by cadmium. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)*, Piracicaba, v. 68, n. 4, p. 482-488.

MILONE, M. T.; SGHERRI, C.; CLIJSTERS, H.; NAVARRI-IZZO, F. (2003). Antioxidant responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 265-276.

NACKE, H.; GONÇALVES Jr, A. C.; SCHWANTES, D.; NAVA, I. A.; STREY, L.; COELHO, G. F. (2013). Availability of heavy metals (Cd, Pb, and Cr) in Agriculture from commercial fertilizers. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 64(4): 537-544.

ORTEGA-VILLASANTE, C.; RELLÁN-ÁLVAREZ, R.; CAMPO, F. F.; CARPENA-RUIIZ, R.; HERNÁNDEZ, L. E. (2005). Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. *Journal of Experimental Botany*, vol. 56(418): 2239-2251.

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

R CORE TEAM (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.Rproject.org/>.

REA, A. W.; LINDBERG, S. E.; SCHERBATSKOY, T.; KELLER, G. J. (2002). Mercury accumulation in foliage over time in two northern mixed-hardwood forests. *Water Air Soil Pollut* **133**:49-67.

RIOS-GONZALES, K.; ERDEI, L.; LIPS, H. (2002). The activity of antioxidant enzymes in maize and sunflower seedlings as affected by salinity and different nitrogen sources. *Plant Science* 162: 923-930.

RODRÍGUEZ-SERRANO, M.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; ZABALZA, A.; CORPAS, F. J.; GÓMEZ, M.; DEL RÍO, L. A.; SANDALIO, L. M. (2006). Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment*, 29, 1532-1544.

SANTOS, E. J.; HERRMANN, A. B.; FRESCURA, V. L. A.; CURTIUS, A. J. (2005). Simultaneous determination of As, Hg, Sb, Se and Sn in sediments by slurry sampling axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry using on-line chemical vapor generation with internal standardization. *J. Anal. At. Spectrom*, 20: 538-543.

SHAW, B. P. (1995). Effects of Mercury and cadmium on the activities of antioxidative enzymes in the seedlings of *Phaseolus aureus*. *Biologia Plantarum*, 37(4): 587-596.

SHEEHAN, K. D.; FERNANDEZ, I. J.; KAHL, J. S.; AMIRBAHMAN, A. (2006). Litterfall mercury in two forested watersheds at Acadia National Park, Maine, USA. *Water Air Soil Pollut* **170**(1):

249-265.

SILVA-FILHO, E. V.; MACHADO, W.; OLIVEIRA, R. R.; SELLA, S. M.; LACERDA, L. D. (2006). Mercury deposition through litterfall in an Atlantic Forest at Ilha Grande, Southeast Brazil. *Chemosphere*, **65**: 2477-2484.

SINGH, S.; SINHA, S.; SAXENA, R.; PANDEY, K.; BHATT, K. (2004). Translocation of metals and its effects in the tomato plants grown on various amendments of tannery waste: evidence for involvement of antioxidants. *Chemosphere*, **57**, 91-99.

SOUSA, R. F. B. (2015). Parâmetros nutricionais, morfofisiológicos e fitodisponibilidade de metais nas culturas de crambe e trigo cultivadas em solos contaminados. Dissertação de mestrado, Univerdade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Marechal Cândido Rondon, 111p.

TANGAHU, B. V.; ABDULLAH, S. R. S.; BASRI, H.; IDRIS, M.; ANUAR, N.; MUKHLISIN, M. (2011). A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. Hindawi Publishing Corporation, International Journal of Chemical Engineering, vol. 2011, Article ID 939161, 31pages.

VENABLES, W. N. & RIPLEY, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN -387-95457-0.

VITÓRIA, A. P.; RODRIGUEZ, A. P. M.; CUNHA, M.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. (2003). Structural changes in radish seedlings exposed to cádmium. *Biologia Plantarum*, **47**(4): 561-568.

VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. (2001). Antioxidant enzymes responses in cadmium radish tissues. *Phytochemistry*, **57**: 701-710.

ZHOU, Z. S.; HUANG, S. Q.; GUO, K.; MEHTA, S. K.; ZHANG, P. C.; YANG, Z. M. (2007). Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *Inorg Biochem* **101**:1–9.

WANG, X.; SATO, T.; XING, B.; TAO, S. (2005). Health risks of heavy metals to the general public in Tianjin, China via consumption of vegetables and fish. *Science of the total environment*, 350: 28-37.

WANG, Y.; GREGER, M. (2004). Clonal differences in Mercury tolerance, accumulation and distribution in willow. *Journal of Environmental Quality*, 33, 1779-1785.

ZAVATTI, L. M.; ABARKERLI, R. B. (1999). Resíduos de agrotóxicos em frutos de tomate. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34 (3): 473-480.

6. DISCUSSÃO GERAL

O incremento do teor de metais pesados nos solos agrícolas tem despertado o interesse, pois esses elementos podem ser acumulados pelas plantas cultivadas nesse ambiente e uma vez bioacumulados pelos vegetais, podem causar efeitos tóxicos ao serem ingeridos. No presente estudo, as concentrações de Cd e Hg determinadas nos solos de plantio de tomate não ultrapassaram os valores máximos para solos agrícolas, estipulados pela legislação brasileira (CONAMA, 2009). Porém, foi observado que os teores de Cd em quase 95% frutos analisados esteve acima do limite máximo permitido para esse contaminante (Brasil, 2013), chegando a um valor de cerca de cinco vezes maior do que o limite proposto. Esse resultado pode estar relacionado ao uso de agroquímicos cuja aplicação é realizada diretamente nas folhas e frutos, podendo gerar um consequente incremento no teor de Cd nessas estruturas do vegetal. Cakmak et al. (2000) afirmam que a deposição de Cd na superfície das folhas pode ser absorvido e transportado para as raízes e parte aérea da planta.

O consumo constante de vegetais contendo Cd, mesmo em baixas concentrações, pode gerar efeitos crônicos, como o câncer, danos nas funções renais e doenças cardiovasculares (Hiroaki et al., 2013; Sharma & Agrawal, 2005). Além do risco potencial à saúde humana, a presença de Cd acima dos limites permissíveis pode prejudicar a qualidade dos produtos e dificultar a comercialização desses elementos para outros países (Liu et al., 2013). Segundo Peijnenburg et al. (2000), um dos principais problemas do Cd em relação aos demais metais é que os teores que podem gerar riscos à saúde humana estão abaixo dos níveis fitotóxicos.

Em relação ao Hg, os teores encontrados nos frutos estudados não puderam ser comparados em relação aos valores permissíveis, pois a legislação brasileira só determina tais valores para alimentos como peixes, crustáceos etc. A legislação chinesa determina um valor limite de Hg total em vegetais frescos igual a $0,066 \text{ mg kg}^{-1}$, onde nenhum dos teores de Hg encontrados no presente estudo ultrapassou esse valor (China, 2014). Embora o presente e outros estudos tenham detectado teores de Hg em frutos acima dos permissíveis pela legislação chinesa, outras legislações se limitam apenas a estabelecer valores para frutos do mar e peixes. A ingestão de Hg através do consumo de peixes e frutos do mar podem ser estimadas em $2,3 \text{ ng dia}^{-1}$ enquanto outras fontes (cereais e vegetais) contribuem com cerca de $0,3 \text{ ng dia}^{-1}$ (Goyer, 1996). Dessa forma, mesmo que em menor grau, a ingestão desses alimentos podem causar riscos à saúde humana e conseqüentemente, ser acumulado ao longo da cadeia alimentar (Holmes et al., 2009).

A translocação de Cd e Hg verificada nas amostras de campo foi similar ao verificado nas amostras do experimento, onde ambos os metais foram acumulados principalmente nas raízes. Contudo, foi observado um comportamento diferente desses dois metais em relação ao seu transporte e retenção nas diferentes estruturas das plantas. O Cd teve uma maior translocação da raiz para a parte aérea do que o Hg, pois é um metal que possui uma maior mobilidade na planta, graças à sua similaridade com outros elementos essenciais como o Ca^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} (Eller & Brix, 2016). Já grande parte do Hg absorvido ficou retido nas raízes, e apenas uma pequena parte foi translocada para a parte aérea. Segundo Kabata-Pendias (2010), o Hg está fortemente adsorvido à partículas do solo enquanto o Cd presente no solo é mais móvel e facilmente bioacumulado pelas plantas.

As plantas cultivadas nos solos tratados com as soluções de HgCl_2 e CdCl_2 , nas concentrações de 12 mg kg^{-1} e 3 mg kg^{-1} , respectivamente, apresentaram concentrações acima das reportados pela literatura como fitotóxicas. Porém, poucos sintomas visuais nas plantas foram observados, como a clorose nas folhas ou redução da biomassa aérea, sendo verificado apenas efeitos a nível ecofisiológico e bioquímico. Assim, mais estudos são necessários para determinar o possível papel do tomateiro como espécie tolerante à presença

de elementos traço e que pode ser cultivada em ambientes contaminados, atuando na biorremediação desses ambientes.

A visão integrada entre a resposta bioquímica e ecofisiológica encontrada no presente estudo permite entender e comparar melhor os efeitos do Hg e Cd nas plantas. No presente estudo, a exposição prolongada a um maior teor de Hg nos solos (24 mg de Hg kg⁻¹), gerou um maior acúmulo de teor de Hg nas raízes de tomateiro, gerou uma redução no valor da eficiência quântica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) e transpiração (E). A razão F_v/F_m reflete a máxima eficiência com que a luz, absorvida pelo complexo antena do fotossistema II, é convertida em energia química. Danos no PSI inibem o fluxo normal de elétrons, gerando o acúmulo destes e desbalanço do gradiente de prótons (Seppanen et al., 1998). Em resposta à redução de F_v/F_m , outras vias podem atuar como um mecanismo de dissipação de elétrons e reduzindo a produção de EROs, como a fotorrespiração. A fotorrespiração é uma via que também atua na proteção do aparelho fotossintético aos danos fotooxidativos, porém uma de suas consequências é a produção de espécies reativas de oxigênio, como o O_2^- e H_2O_2 (Schwanz et al., 1996). Ainda assim, a redução de F_v/F_m não foi suficiente para causar a fotoinibição e a diminuição não foi significativa, demonstrando que o dreno de energia de certa forma foi eficiente (Foyer et al., 2009; Takahashi et al., 2007). Porém, um dos produtos da fotorredução é a formação de H_2O_2 , que é reduzida pela guaiacol peroxidase (GPX). A proteção oxidativa para a redução da H_2O_2 foi acompanhada de um maior número de isoformas da GPX e SOD na terceira semana. Nas raízes, quatro isoformas (GPX II, GPX III, GPX IV e GPX V) foram expressas mais intensamente. Com o aumento do tempo de exposição (nove semanas), houve uma redução da atividade nas raízes e nas isoformas da GPX nas raízes. Da mesma forma, as isoformas da SOD foram reduzidas nas raízes durante a nona semana. Essa redução nas isoformas indica que essas duas enzimas não tiveram eficiência na tolerância ao estresse durante um maior período, causando maior distúrbio que na terceira semana.

No experimento com Cd, os efeitos fitotóxicos causados por esse metal pareceram ser menores do que o gerados pelo Hg. As plantas do tratamento com Cd não tiveram redução no valor de F_v/F_m , porém a taxa fotossintética foi reduzida, ainda que não inibida. Ainda assim,

houve uma redução na transpiração e na condutância estomática. A atividade da GPX foi aumentada com o incremento no teor de Cd nas raízes. Nas folhas, esse aumento da ação da GPX ocorreu principalmente no teor do solo do tratamento com 3 mg kg^{-1} . O aumento do teor de Cd nas folhas e raízes provocou o fechamento dos estômatos e conseqüentemente a redução da transpiração e da condutância estomática, ambos processos mediados pelos estômatos. Leita et al (1995) reportaram que o efeito fitotóxico de Cd nas plantas envolve inicialmente um efeito indireto na abertura dos estômatos e em seguida, o Cd age diretamente nas células-guarda e causa severa inibição no crescimento das raízes que limita a absorção de água e promove o fechamento dos estômatos. Ainda assim, o número de isoformas da GPX expressas não foi alterado nas raízes e folhas ao longo do experimento, porém a SOD reduziu a quantidade de isoformas ativadas com a maior exposição ao Cd.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os teores de Cd e Hg nos solos dos plantios de tomate estudados não ultrapassaram os limites permissíveis pela legislação brasileira, porém as concentrações de Cd nos frutos foi maior do que os estipulados pela legislação brasileira e internacional. Esse resultado é importante pois demonstra a necessidade de medidas para minimizar a entrada desse elemento no sistema solo-planta através da aplicação de agroquímicos, bem como a monitoração do teor desse elemento em solos agrícolas.
- Os valores limites de Hg e Cd são baseados nos teores totais desses elementos, não levando em consideração as formas biodisponíveis, que são mais relevantes quando se trata de solos agrícolas. Sugere-se que os limites permissíveis possam ser baseados nos teores disponíveis desses elementos, verificando a absorção e o acúmulo por plantas agrícolas e as alterações causadas na fisiologia do vegetal.
- Verifica-se que poucos órgãos, tanto nacional quanto internacional, levam em consideração a importância dos vegetais como via de entrada para o Hg na cadeia alimentar, embora os diversos estudos confirmem a presença desse elemento em diferentes cultivares.

- As folhas das plantas dos tratamentos com 3mg kg^{-1} de Cd e 12 mg kg^{-1} de Hg (valores permissíveis estipulados pela legislação brasileira) apresentaram concentrações acima das consideradas pela literatura como fitotóxica, em que pode haver efeitos nas plantas que não trazem benefícios para os agricultores (como a redução no crescimento radicular, por exemplo).
- O Cd e Hg tiveram comportamento diferente nas plantas e da mesma forma, seus efeitos variaram, em relação aos mecanismos ecofisiológicos da planta e bioquímicos. De maneira geral, o tratamento com Hg teve um efeito mais intenso nas enzimas antioxidantes SOD e GPX do que nas plantas com tratamento com Cd. Porém, devido a maior translocação para a parte aérea, o Cd teve efeito em diferentes parâmetros ecofisiológicos, como a condutância estomática e a transpiração.
- Para próximos estudos de fitotoxicidade de elementos traço, sugere-se que o tomateiro seja a espécie escolhida, dado seu possível papel como planta tolerante ao efeito de Cd e Hg, por um período maior do que o realizado pelo presente estudo. Além disso, outras análises são necessárias como por exemplo, análise de microscopia das células de raízes e folhas.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAPFCO (2011). Association of American Plant Food Control. AAPFCO's Statement of Uniform Interpretation and Policy (SUIP) #25: the heavy metal rule. Disponível em: <http://www.aapfco.org/aapfcorules.html>.

ADAMS, M. L.; ZHAO, F. J.; MCGRATH, S. P.; NICHOLSON, F. A.; CHAMBERS, B. J. (2004). Predicting cadmium concentrations in wheat and barley grain using soil properties. J. Environ. Qual., 33:532– 541.

- ADRIANO, D. C.; BOLAN, N. S.; KOON, B. J.; NAIDU, R.; LELIE, D.; VANGRONSVELD, J.; WENZEL, W. W. (2002) Natural remediation processes bioavailability interactions in contaminated soils. 17th WCSS Symposium 14–21, Thailand, 42, 501.
- ALBUQUERQUE, G. A. S. C.; AZAMBUJA, R. S. L.; LINS, F. A. F. (2005). Rochas e minerais industriais: usos e especificações. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Centro de Tecnologia Mineral – Ministério da Ciência e Tecnologia.
- AL-HWAITI, M.; AL-KHASHMAN, O. (2015). Health risk assessment of heavy metals contamination in tomato and green pepper plants grown in soils amended with phosphogypsum waste materials. *Environ Geochem Health*, 37:287–304.
- ALI, M.; AL-QAHTANI, K. M. (2012). Assessment of some heavy metals in vegetables, cereals and fruits in Saudi Arabian markets. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 38. 31–37. 10.1016/j.ejar.2012.08.002.
- ALLOWAY, B. J. (1990). Soil processes and the behaviour of metals. In: Alloway, B. J. (Ed.). *Heavy metals in soils*. Glasgow: Blackie and Son, 7-27.
- AMARAL-SOBRINHO, N. M. B.; COSTA, L. M.; OLIVEIRA, C.; VELLOSO, A. C. X. (1992). Metais pesados em alguns fertilizantes e corretivos. *R. Bras. Ci. Solo*, 16:271-276.
- AMIN, A.; LATIF, Z. (2015). Phytotoxicity of Hg and its Detoxification through Microorganisms in Soil. *Adv. Life Science*, 2(2): pp: 98-105.
- ANVISA. (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/monografias/index.htm>>
- APPEL, C.; MA, L. (2002). Concentration, pH, and surface charge effects on cadmium and lead sorption in three tropical soils. *Journal of Environmental Quality*, 31: 581-589.
- ARAUS, J. L.; AMARO, T.; VOLTAS, J.; NAKKOUL, H.; NACHIT, M M. (1998). Chlorophyll fluorescence as a selection criterion for grain yield in durum wheat under Mediterranean conditions. *Field Crops Research*, 55,209-223.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry (2015). Detailed Data Table for the 2015. Priority List of Hazardous Substances that Will be the Subject of Toxicological Profiles. Disponível em <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/> Acesso em 18 Jun 2016.

AYDIN, I.; AYDIN, F.; SAYDUT, A.; GULHAN, B.; HAMAMCI, C. (2010). Hazardous Metal Geochemistry of Sedimentary Phosphate Rock Used for Fertilizer (Mazıdag, SE Anatolia, Turkey). *Microchemical Journal*. 96. 247-251.

AZEVEDO, R.; RODRIGUEZ, E. (2012). Phytotoxicity of Mercury in plants: a review. *Journal of Botany*, Vol. 2012, 1-6.

AZURA, A. A.; FAUZIAH, C. I.; SAMSURI, A. W. (2012). Cadmium and Zinc Concentrations in Soils and Oil Palm Tissues as Affected by Long-Term Application of Phosphate Rock Fertilizers. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 21:5, 586-603.

BIZARRO, V. G.; MEURER, E. J.; TATSCH, F. R. P. (2008). Cadmium contents of phosphate fertilizers marketed in Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.38, n.1, p.247-250.

BORTEY-SAM, N.; NAKAYAMA, S. M. M.; AKOTO, O.; IKENAKA, Y.; FOBIL, J. N.; BAIDOO, E.; MIZUKAWA, H.; ISHIZUKA, M. (2015). Accumulation of Heavy Metals and Metalloid in Foodstuffs from Agricultural Soils around Tarkwa Area in Ghana, and Associated Human Health Risks. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12, 8811-8827.

BRADL, H. B. (2004). Adsorption of heavy metal ions on soils and soils constituents. *Journal of Colloid and Interface Science*, 277, 1–18.

BRASIL. (2013). Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). Relatório de atividades de 2011 e 2012. Gerência-Geral de Toxicologia. Disponível em <http://www.portal.anvisa.gov.br> Acessado em 26 Maio 2015.

BRASIL. (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO - RDC Nº 42, DE 29 DE AGOSTO DE 2013. Disponível: em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2013/rdc0042_29_08_2013.html

BRASIL (2006). Instrução Normativa DAS No 27, 05 de Junho de 2006. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacao/in-sda-27-de-05-06-2006-alterada-pela-in-sda-07-de-12-4-16-republicada-em-2-5-16.pdf> Acesso em 01 Setembro 2017.

CDFa. (1998). California Department of Food and Agriculture. Development of risk-based concentrations for arsenic, cadmium, and lead in inorganic commercial fertilizers: prepared by Foster Wheeler Environmental Corp. Sacramento, 1998. Disponível em <http://www.cdfa.ca.gov/>

CAKMAK, I.; WELCH, R. M.; HART, J.; NORVELL, W. A.; OZTURK, L.; KOCHIAN, L. V. (2000). Uptake and retranslocation of leaf-applied cadmium (¹⁰⁹Cd) in diploid, tetraploid and hexaploid wheats. *Journal of Experimental Botany*, vol. 51 (343): 221-226.

CALGAROTO, N. S.; NICOLOSO, F. T.; PEREIRA, L. B.; CARGNELUTTI, D.; ANTES, F. G.; DRESSLER, V. L. (2016). Nutritional disorder in *Pfaffia glomerata* by Mercury excess in nutrient solution. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 46, n. 2, 279-285.

CAMARGO, M. S.; ANJOS, A. R. M.; ROSSI, C.; MALAVOLTA, E. (2000). Adubação fosfatada e metais pesados em latossolo cultivado com arroz. *Scientia Agricola*, v.57, n.3, p.513-518.

CAMPOS, M. L.; SILVA, F. N.; FURTINI NETO, A. E.; GUILHERME, L. R. G.; MARQUES, J. J.; ANTUNES, A. S. (2005). Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.40, n.4, p.361-367.

CAMPOS, V. (2003). Trace Elements in Pesticides. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34(9-10): 1261-1268.

CARGNELUTTI, D.; TABALDI, L. A.; SPANEVELLO, V. R. M.; JUCOSKI, G. O.; BATTISTI, V.; REDIN, M.; LINARES, C. E. B.; DRESSLER, V. L.; FLORES, E. M. M.; NICOLOSO, F. T.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. (2006). Mercury toxicity induces oxidative stress in growing cucumber seedlings. *Chemosphere*, 65: 999-1006.

CARNELO, L. G.; MIGUEZ, S. R.; MARBAN, L. (1997). Heavy metals input with phosphate fertilizers used in Argentina. *Science of the Total Environment*, vol 204(3): 245-250.

CELLA, D.; ROSSI, M.C.L. (2010). Análise do mercado de fertilizantes no Brasil. *Interface Tecnológica*, 7 (1): 41-50.

CETESB. (2001). Relatório de estabelecimento de valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. São Paulo, 247p.

CFIA (1997). Canadian Food Inspection Agency. Standards for Metals in Fertilizers and Supplements. Disponível em: <http://www.inspection.gc.ca/plants/fertilizers/trade-memoranda/t-4-93/eng/1305611387327/1305611547479>

CHAGAS, R. M. (2007). Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 82p.

CHAMSEDDINE, M.; WIDED, B. A.; GUY, H.; MARIE-EDITH, C.; FATMA, J. (2009). Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regul*, 57:89-99.

CHAVES, L. H. G.; SOUZA, R. S.; TITO, G. A. (2008). Adsorção de zinco em argissolos do estado da Paraíba: efeito do pH. *Revista Ciência Agronômica*, v.39, n.4, p.511-516.

CHANG, C. Y., YU, H. Y., CHEN, J. J., LI, F. B., ZHANG, H. H., & LIU, C. P. (2014). Accumulation of heavy metals in leaf vegetables from agricultural soils and associated potential health risks in the Pearl River Delta, South China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(3), 1547–1560.

CHEN, X.; WANG, J.; SHI, Y.; ZHAO, M. Q.; CHI, G. Y. (2011). Effects of cadmium on growth and photosynthetic activities in pakchoi and mustard. *Botanical Studies*, 52, 41-46.

CHEN, J.; SHIYAB, S.; HAN, F. X.; MONTS, D. L.; WAGGONER, C. A.; YANG, Z.; SU, Y. (2009). Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Pteris vittata* and *Nephrolepis exaltata*. *Ecotoxicology*, 18: 110-121.

CHEN, W.; CHANG, A. C.; WU, L. (2007). Assessing long-term environmental risks of trace elements in phosphate fertilizers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 48-58.

CHO, U.; KIM, I. (2003). Effect of cadmium on oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in tomato seedlings. *The Korean Journal of Ecology*, 26(3):115-121.

CHO, U. H.; PARK, J. O. (2000). Mercury-induced oxidative stress in tomato seedlings. *Plant Science*, 156(1), 1-9.

CHO, U. H.; PARK, J. O. (1999). Changes in hydrogen peroxide content and activities of antioxidant enzymes in tomato seedlings exposed to mercury. *Journal of Plant Biology*, 42(1): 41-48.

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKI, A. H.; GÓRECKA, H.; GÓRECKI, H. (2005). Bioavailability of heavy metals from polluted soils to plants. *The Science of the total environment*. 337. 175-82. 10.1016/j.scitotenv.2004.06.009.

COHEN, Y.; KIRCHMANN, H.; ENFALT, P. (2011). Yariv Cohen, Holger Kirchmann and Patrik Enfält (2011). *Management of Phosphorus Resources – Historical Perspective, Principal Problems and Sustainable Solutions, Integrated Waste Management - Volume II*, Mr. Sunil Kumar (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/18276.

CONCEIÇÃO, M. Z. (2000). Segurança nas aplicações de herbicidas. In: *Anais Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas.

EBBS, S.; UCHIL, S. (2008). Cadmium and zinc induced chlorosis in Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czern) involves preferential loss of chlorophyll b. *Photosynthetica*, 46 (1): 49-55.

ELLER, F.; BRIX, H. (2016). Influence of low calcium availability on cadmium uptake and translocation in a fast-growing shrub and a metal-accumulating herb. *AoB Plants*, 8, plv 143. <http://doi.org/10.1093/aobpla/plv143>

DAS P.; SAMANTARAY, S.; ROUT, G. R. (1997). Studies on cadmium toxicity in plants: a review. *Environ Pollut*, 98:29–36.

DI CAGNO, R.; GUIDI, L.; STEFANI, A.; SOLDATINI, G. F. (1999). Effects of cadmium on growth of *Helianthus annuus* seedlings: physiological aspects. *New Phytol*, 144(1): 65–71.

DRISCOLL, C. T.; MASON, R. P.; CHAN, H. M.; JACOB, D. J.; PIRRONE, N. (2013). Mercury as a Global Pollutant: Sources, Pathways, and Effects. *Environmental Science & Technology*, 47, 4967–4983.

DUNAGAN, S. C.; GILMORE, M. S.; VAREKAMP, J. C. (2007). Effects of mercury on visible/near infrared reflectance spectra of mustard spinach plants (*Brassica rapa* P.). *Environmental pollution*, 148,301-311.

FENG, Q.; TAI, P.; LI, P.; GUO, Y.; FU, S. (2009). Role of sulfur in cadmium accumulation of *Tagetes erecta* L. *Journal of Plant Nutrition*, 32(6):919–928. doi: 10.1080/01904160902870697.

FERREIRA, J. V. R.; PECKLE, B. A.; SILVA, A. S.; GOMES, A. S.; SANTANA, V. M.; DIREITO, I. C. N. (2014). Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura. *Cadernos UNIFOA*, Edição nº 24, 87-103.

FILHO, J. S. R.; MARIN, J. O. B.; FERNANDES, P. M. (2009). Os agrotóxicos na produção de tomate de mesa na região de Goianópolis, Goiás. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 39(4): 307-316.

FREITAS, E. V. S.; NASCIMENTO, C. W. A.; GOULART, D. F.; SILVA, J. P. S. (2009). Disponibilidade de cádmio e chumbo para milho em solo adubado com fertilizantes fosfatados. *R. Bras. Ci. Solo*, 33:1899-1907.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Fertilizer use by crop in Brazil.

FOYER, C. H.; BLOOM, A. J.; QUEVAL, G.; NOCTOR, G. (2009). Photorespiratory metabolism: genes, mutants, energetics, and redox signaling. *Annual Review Plant Biol.*, 60: 455-484.

GABE, U.; RODELLA, A. A. (1999). Trace elements in Brazilian agricultural limestones and mineral fertilizers. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 30:5-6, 605-620.

GHARAIBEH, M. A.; ALBALASMEH, A. A.; MARSEHNER, B.; SALEEM, Y. (2016). Cadmium Uptake and Translocation of Tomato in Response to Simulated Irrigation Water Containing Elevated Concentrations of Cadmium and Zinc in Clayey Soil. *Water Air Soil Pollut*, 227:133.

- GIMENO-GARCIA, E.; ANDREU, V.; BOLUDA, R. (1996). Heavy metals incidence in the application of inorganic fertilizers and pesticides to rice farming soils. *Environmental Pollution*, 92 (1): 19-25.
- GOLIA, E. E.; DIMIRKOU, A.; MITSIOS, I. K. (2008). Influence of some soil parameters on heavy metals accumulation by vegetables grown in agricultural soils of different soil orders. *Bull Environmental Cont. Toxicol.*, 81: 80-84.
- GONÇALVES, L. F.; TABALDI, L. A.; CARGNELUTTI, D.; PEREIRA, L. B.; MALDANER, J.; BECKER, A. G.; ROSSATO, L. V.; RAUBER, R.; BAGATINI, M. D.; BISOGNIN, D. A.; SCHETINGER, M. R. C.; NICOLOSO, F. T. (2009) Cadmium-induced oxidative stress in two potato cultivars. *Biometals*, 22: 779-792.
- GONÇALVES JÚNIOR, A. C.; LUCHESE, E. B.; LENZI, E. (2000) Avaliação da fitodisponibilidade de cádmio, chumbo e crômio, em soja cultivada em Latossolo Vermelho Escuro tratado com fertilizantes comerciais. *Química Nova*, 23:173-177.
- GRANT, C. A.; BUCKLEY, W. T.; BAILEY, L. D.; SELLES, F. (1998). Cadmium accumulation in crops. *Canadian Journal of Plant Science*, 78(1): 1-17.
- GRATÃO, P. L. (2003). Análise da resposta antioxidativa de células de *Nicotiana tabacum* cv BY-2 submetidas ao cádmio. Dissertação de mestrado, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 109p.
- GOYER, R. A. (1996). Toxic effects of metals. New York: McGraw-Hill Companies, p. 691–736.
- GUPTA, D. K.; CHATTERJEE, S.; DATTA, S.; VEER, S.; WALTHER, C. (2014). Role of phosphate fertilizers in heavy metal uptake and detoxification of toxic metals. *Chemosphere*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.030>
- HAMMED, A.; QADRI, T. N.; MAHMOODUZZAFAR; SIDDIQII, T. O.; IQBAL, M. (2011). Differential activation of the enzymatic antioxidant of *Abelmoschus esculentus* L. under CdCl₂ and HgCl₂ exposure. *Brazilian Society of Plant Physiology*, 23(1): 45-55.

HE, J., REN, Y., CHEN, X.; CHEN, H. (2014). Protective roles of nitric oxide on seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.) under cadmium stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 108, 114–119.

HE, J. Y., C. ZHU, Y. F., REN, Y. P.; YAN, C.; CHENG, D.; JIANG, A.; SUN, Z. N. (2008). Uptake, subcellular distribution, and chemical forms of cadmium in wild-type and mutant rice. *Pedosphere*, 18(3):371-377.

HE, Z. L.; YANG, X. E.; STOFFELLA, P. J. (2005). Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Vol. 19 (2-3): 125-140.

HIROAKI, I.; MOTOKI, I.; NORIE, S.; RIBEKA, T.; YOSHIO, K.; SHIRO, Y. (2013). Dietary cadmium intake and breast cancer risk in Japanese women: a case–control study. *J Hazard Mater.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.12.049>.

HOLMES, P.; JAMES, K. A. F.; LEVY, LL. S. (2009). Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Science of the Total Environment*, 408, 171-182.

IBGE. (2014). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE); Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, 24:1-124.

ISLAM, S.; AHMED, K.; AL-MAMUN, H. (2015). Metal speciation in soil and health risk due to vegetables consumption in Bangladesh. *Environ Monit Assess*, 187:288.

ISRAR, M.; SAHI, S.; DATTA, R.; SARKAR, D. (2006). Bioaccumulation and physiological effects of Mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*, 65: 591-598.

INTAWONGSE, M.; DEAN, J. R. (2006). Uptake of heavy metals by vegetable plants grown on contaminated soil and their bioavailability in the human gastrointestinal tract. *Food Additives and Contaminants*, 23:1, 36-48.

de JESUS, R. M.; SILVA, L. O.; CASTRO, J. T.; DE AZEVEDO NETO, A. D.; DE JESUS, R. M.; FERREIRA, S. L. (2013). Determination of mercury in phosphate fertilizers by cold vapor atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 106, 293-297.

KABATA-PENDIAS, A. (2010). Trace elements in soils and plants. 4th Edition, CRC press, 520p.

KALAJI, H. M.; GUO, P. Chlorophyll fluorescence: a useful tool in barley plant breeding programs. In: SÂNCHEZ, A.; GUTIERRES, S. J. Photochemistry Research Progress. New York: Nova Science Publishers, chapter 12, p. 439-463.

KHAN, A.; KHAN, S.; KHAN, M. A.; QAMAR, Z.; WAQAS, M. (2015). The uptake and bioaccumulation of heavy metals by food plants, their effects on plants nutrients, and associated health risk: a review. *Environ Sci Pollut Res*, 22:13772–13799.

JACKSON, M.; HANCOCK, D.; SCHULZ, R.; TALBOT, V.; WILLIAMS, D. (1986) Rock phosphate – the source of mercury pollution in a marine ecosystem at Albany, Western-Australia. *Mar Environ Resear* 18:185–202.

JAMAL, S. N.; IQBAL, M. Z.; ATHAR, M. (2006). Evaluation of Two Wheat Varieties for Phytotoxic Effect of Mercury on Seed Germination and Seedling Growth. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 71, No. 2 (41-44).

JIANG, X. J.; LUO, Y. M.; LIU, Q.; LIU, S. L.; ZHAO, Q. G. (2004). Effects of cadmium on nutrient uptake and translocation by Indian Mustard. *Environmental Geochemistry and Health*, 26(2), 319-324.

JING, Y. D.; HE, Z. L.; YANG, X. E. (2007). Effects of pH, organic acids, and competitive cations on mercury desorption in soils. *Chemosphere*, 69(10), 1662-1669.

JORIS, H. A. W.; FONSECA, A. F.; ASAMI, V. Y.; BRIEDIS, C.; BORSZOWSKI, P. R.; GARBUIO, F. J. (2012). Adsorção de metais pesados após calagem superficial em um Latossolo Vermelho sob sistema de plantio direto. *Revista Ciência Agronômica*, v. 43 (1): 1-10.

LEITA, L.; MARCHIOL, L.; MARTIN, M.; PERESSOTTI, A.; DELLE VEDOVE, G.; ZERBI, G. (1995). Transpiration dynamics in cádmium-treated soybean (*Glycine max* L.) Plants. *Journal Agronomy & Crop Science*, 175, 153-156.

- LI, R.; WU, H.; DING, J.; FU, W.; GAN, L.; LI, Y. (2017). Mercury pollution in vegetables, grains and soils from areas surrounding coal-fired power plants. *Nature Scientific Reports*, 7:46545, DOI: 10.1038/srep46545.
- LI, W.; KHAN, M. A.; YAMAGUCHI, S.; KAMIYA, Y. (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 46:45–50.
- LIDON, F. C.; HENRIQUES, F. S. (1991) Limiting step in photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. *Journal of Plant Physiology*, 138 (1), 115-118.
- LIKUKU, A. S.; MMOLAWA, K. B.; GABOUTLOELOE, G. K. (2013). Assessment of heavy metal enrichment and degree of contamination around the copper-nickel mine in the Selebi Phikwe Region, Eastern Botswana. *Environment and Ecology Research*, 1(2): 32-40.
- LIU, X.; SONG, Q.; TANG, Y.; LI, W.; XU, J.; WU, J.; WANG, F.; BROOKES, P. C. (2013). Human health risk assessment of heavy metals in soil-vegetable system: a multi-medium analysis. *Science of the Total Environment*, 530-540. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.064>
- LOSKA, K.; WIECHULA, D.; KORUS, I. (2004). Metal contamination of farming soils affected by industry. *Environment International*, 30, 159 – 165.
- LOZOWICKA, B.; ABZEITOVA, E.; SAGITOV, A.; KACZYNSKI, P.; TOLEUBAYEV, K.; LI, A. (2015). Studies of pesticide residues in tomatoes and cucumbers from Kazakhstan and the associated health risks. *Environment Monit Assessment*, 187(10):609.
- LUGON-MOULIN, N.; MARTIN, F.; KRAUSS, M. R.; RAMEY, P.B.; ROSS, I. L. (2006). Cadmium concentration in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) from different countries and its relationship with other elements. *Chemosphere* 2006; 63:1074–1086.
- Madeira, L. F. (2013). Teores de mercúrio em plantas do Cerrado senso restrito da Estação Ecológica Águas Emendadas, Distrito Federal. Universidade de Brasília, Trabalho de Conclusão de Curso de Licenciatura em Ciências Naturais. UnB Planaltina, 17p.

MALAVOLTA, E.; MORAIS, M. F. (2006). Sobre a sugestão dos metais pesados tóxicos em fertilizantes e sobre a portaria 49 de 25/04/2005 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento. *Informações Agronômicas*, Piracicaba, v. 114, 10-14.

MANI, D.; SHARMA, B.; KUMAR, C. (2007). Phytoaccumulation, interaction, toxicity and remediation of cadmium from *Helianthus annuus L.* (sunflower). *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 79(1), 71-79.

MARTIN, H. W.; KAPLAN, D. I. (1998). Temporal changes in cadmium, thallium, and vanadium mobility in soil and phytoavailability under field conditions. *Water, Air, & Soil Pollution*, 101(1), 399-410.

MATOS, A. T.; FONTES, M. P. F.; COSTA, L. M.; MARTINEZ, M. A. (2001). Mobility of heavy metals as related to soil chemical and mineralogical characteristics of Brazilian soils. *Environmental Pollution*, 111: 429-435.

MEHMOOD, T., CHAUDHRY, M. M., TUFAIL, M., & IRFAN, N. (2009). Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchemical Journal*, 91(1), 94-99.

MENDES, A. M. S.; DUDA, G. P.; NASCIMENTO, C. W. A. DO; LIMA, J. A. G.; MEDEIROS, A. D. L. (2010). Acúmulo de metais pesados e alterações químicas em Cambissolo cultivado com meloeiro. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 14(8), 791-796.

MENDES, A. M. S.; DUDA, G. P.; NASCIMENTO, C. W. A.; SILVA, M. O. (2006). Bioavailability of cadmium and lead in soil amended with phosphorus fertilizers. *Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)*, v.63, n.4, p.328-332.

MILONE, M. T.; SGHERRI, C.; CLIJSTERS, H.; NAVARI-IZZO, F. (2003). Antioxidative responses of wheat treated with realistic concentration of cadmium. *Environmental and Experimental Botany*, 50, 265-276.

MISHRA, S.; DUBEY, R. S. (2006). Inhibition of ribonuclease and protease activities in arsenic exposed rice seedlings: role of proline as enzyme protectant. *Journal of Plant Physiology*, 163(9): 927-936.

MIRZAEI, R.; TEYMOURZADE, S.; SAKIZADEH, M.; GHORBANI, H. (2015). Comparative study of heavy metals concentration in topsoil of urban green space and agricultural land uses. *Environmental Monit. Assess*, 187: 741.

MOLINA, M.; ABURTO, F.; CÁLDERAN, R.; CAZANGA, M.; ESCUDEY, M. (2009). Trace element composition of selected fertilizers used in Chile: phosphorus fertilizers as a source of long-term soil contamination. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 18:4, 497-511.

MUHAMMAD, Z.; MARIA, K. S.; MOHAMMAD, A.; MUHAMMAD, S.; ZIA-UR-REHMAN, F.; MUHAMMAD, K. (2015). Effect of mercury on seed germination and seedling growth of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 19(2): 191-199.

NOGUEIROL, R. C.; MONTEIRO, F. A.; GRATÃO, P. L.; SILVA, B. K. A.; AZEVEDO, R. A. (2016). Cadmium Application in Tomato: Nutritional Imbalance and Oxidative Stress. *Water Air Soil Pollut*, 227:210.

NRIAGU, J. O.; PACYNA, J. M. (1988) Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils with trace metals. *Nature*, v.333, p.134-139.

NZIGUHEBA, G.; SMOLDERS, E. (2008). Inputs of trace elements in agricultural soils via phosphate fertilizers in European countries. *The Science of Total Environment*, 390: 53-57.

NUÑEZ, J. E. V.; SOBRINHO, N. M. B. A.; MAZUR, N. (2006) Sistemas de preparo de solo e acúmulo de metais pesados no solo e na cultura do pimentão (*Capsicum annum* L.). *Ci. Rural*, 36: 113-119.

OLIVER, D.P.; TILLER, K.G.; CONYERS, K.M.; SLATTERY, W.J.; ALSTON, A.M.; MERRY, R.H. (1996) Effectiveness of liming to minimise uptake of cadmium by wheat and barley grain grown in the field. *Australian Journal of Agricultural Research*, 47: 1181–1193.

OLIVEIRA, L. C. D.; SERUDO, R. L.; BOTERO, W. G.; MENDONÇA, A. G. R.; SANTOS, A. D.; ROCHA, J. C.; DA SILVA, F. (2007). Distribuição de mercúrio em diferentes solos da bacia do médio Rio Negro-AM: influência da matéria orgânica no ciclo biogeoquímico do mercúrio. *Química nova*, 274-280.

OLIVEIRA, C.; MOURA, B. A. S. N.; SANTOS, M. V.; MAZUR, N. (2005). Efeitos da aplicação do lodo de esgoto enriquecido com cádmio e zinco na cultura do arroz. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29, 109-116.

ORTEGA-VILLASANTE, C.; HERNÁNDEZ, L. E.; RELLÁN-ALVAREZ, R.; CAMPO, F. F.; CARPENA-RUIZ, R. O. (2007). Rapid alteration of cellular redox homeostasis upon exposure to cadmium and mercury in alfalfa seedlings. *New Phytologist*, 176: 96–107.

OSZTOICS, E.; CSATHÓ, P.; RADIMSZKY, L. (2005). Investigations on the effect of Algerian rock phosphate and single superphosphate, V: The effects of soil properties and P forms on the Cd-, Cr-, Co-, Ni-, Sr-, Mn-, Al-, and Mo- content of spring barley (*Hordeum vulgare*) in a pot trial. *Agrokemia és Talajtan*, 54: 105-120.

PAGE, A.L.; CHANG, A. C.; EL-AMAMY, M. (1987). Cadmium levels in soils and crops in the United States. In *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*. T.C. Hutchinson and K.M. Meema (eds.) SCOPE 31. John Wiley & Sons Ltd. p. 119-146.

PARADISO, A.; BERARDINO, R.; PINTO, M. C.; DI TOPPI, L. S.; STORELLI, M. M.; TOMMASI, F.; GARA, L. (2008). Increase in ascorbate-Glutathione metabolism as local and precocious systemic responses induced by cádmium in durum wheat plants. *Plant & Cell Physiology*, 49(3): 362-374.

PATNAIK, A.; MOHANTY, B. K. (2013). Toxic effect of mercury and cadmium on germination and seedling growth of *Cajanus cajan* L (Pigeon Pea). *Scholars Research Library*, 4:3, 123-126.

- PATRA, M.; SHARMA, A. (2000). Mercury toxicity in plants. *Botanical Review*, v.66, p.379-422.
- PEIJNENBURG, W.; BAERSELMAN, R.; DE GROOT, A.; JAGER, T.; LEENDERS, D.; POSTHUMA, L. & van VEEN, R. (2000). Quantification of metal bioavailability for lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 430:420-430.
- PIRRONE, N.; CINNIRELLA, S.; FENG, X.; FINKELMAN, R. B.; FRIEDLI, H. R.; MASON, R.; MUKHERJEE, A. B.; STRACHER, G. B.; STREETS, D. G.; TELMER, K. (2010). Global mercury emissions to the atmosphere from anthropogenic and natural sources. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 10, 5951-5964.
- RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; VELLOSO, A. C. X. (2000). Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. *Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.7, 1289-1303.
- RAMALHO, J. F. G. P.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; VELLOSO, A. C. X. (1999). Acúmulo de metais pesados em solos cultivados com cana-de-açúcar pelo uso contínuo de adubação fosfatada e água de irrigação.
- ROMERO-PUERTAS, M. C.; PALMA, J. M.; GÓMEZ, M.; DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M. (2002). Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant, Cell & Environment*, 25(5), 677-686.
- ROOT, R. A.; MILLER, R. J.; KOEPPE, D. E. (1975). Uptake of cadmium – its toxicity and effect on the iron-to-zinc ratio in hydroponically grown corn. *Journal of Environmental Quality*, 4: 473-476.
- ROZANSKI, S. L.; CASTEJON, J.M. P.; FERNÁNDEZ, G. G. (2016). Bioavailability and mobility of Mercury in selected profiles. *Environmental Earth Science*, 75; 1065
- ROYCHOUDHURY A.; BASU, S.; SENGUPTA, D. N (2012). Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. *Acta Physiol Plant*, 34:835–847. doi: 10.1007/s11738-011-0881-y

SABIHA-JAVIED, M. T.; CHAUDHRY, M. M.; TUFAIL, M.; IRFAN, N. (2009). Heavy metal pollution from phosphate rock used for the production of fertilizer in Pakistan. *Microchem J.*, 91:94–99. doi: 10.1016/j.microc.2008.08.009.

SANITÀ DI TOPPI, L.; GABRIELLI, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*, 41, 105-130.

SANTOS, G. M. A. D. A.; TEIXEIRA, L. J. Q.; PEREIRA JUNIOR, O. S.; SANTOS, A. R.; FRONZA, M. (2015). Pesticide residues in conventionally and organically grown tomatões in Espírito Santo (Brazil). *Quimica Nova*, 38(6): 848-851.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. (2003). Consequências do manejo do solo na distribuição de metais pesados em um agrossistema com feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.). *R. Bras. Ci. Solo*, 27: 191-198.

SANTOS, F. S.; AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; MAZUR, N. (2002). Influencia de diferentes manejos agrícolas na distribuição de metais pesados no solo e em plantas de tomate. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:535-543.

SAHU, G. K.; PADHYAY, S.; SAHOO, B. B. (2012). Mercury induced phytotoxicity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) plants. *Physiol Mol Biol Plants*, 18(1):21–31.

SEGURA-MUÑOZ, S. I.; SILVA, O. A.; NIKAIDO, M.; TREVILATO, T. M. B.; BOCIO, A.; TAKAYANAGUI, A. M. M.; DOMINGO, J. L. (2006). Metal levels in sugar cane (*Saccharum* spp.) samples from an area under the influence of a municipal landfill and a medical waste treatment system in Brazil. *Environmental International*, 32(1): 52-57.

SENESI, G. S.; BALDASSARE, G.; SENESI, N.; RADINA, B. (1999). Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere* 39, 343 – 377.

SEPPANEN, M. M.; MAJAHARJU, M.; SOMERSALO, S.; PEHU, E. (1998). Freezing tolerance, cold acclimation and oxidative stress in potato: Paraquat tolerance is related to acclimation but it's a poor indicator of freezing tolerance. *Physiologia Plantarum*, Oxford, v.2, 454-460.

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

SHARMA, R. K.; AGRAWAL, M. (2005). Biological effects of heavy metals: An overview. *Journal of Environmental Biology*, 26(2): 301-313.

SHEETAL, K. R.; SINGH, S. D; ANAND, A.; PRASAD, S. (2016). Heavy metal accumulation and effects on growth, biomass and physiological process in mustard. *Indian Journal of Plant Physiology*, 21(2): 219-223.

SHIYAB, S.; CHEN, J.; FENGXIANG, X. H.; DAVID, L. M.; FANK, B. M.; MENGMENG, G.; YI, S.; MOTASIM, A. M. (2008). Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) *Environ Toxicol*, 24: 462–471.

SIBOROVA, M. (1988) Cd²⁺ ions affect the quaternary structure of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from barley leaves. *Biochem Physiol Pflanz* 183:371–378

SOARES, L. C.; LINHARES, L. A.; EGREJA, F. B.; WINDMOLLER, C. C.; YOSHIDA, M. I. (2015). Mercúrio em Solos da Região Sudeste do Brasil sem Influência Antropogênica e sua Correlação com as Características Químicas e Físicas. *Revista Brasileira de Ciência do solo*, vol. 39: 3, 903-914.

SOBRINO-PLATA, J.; MEYSEN, D.; CUYPERS, A.; ESCOBAR, C.; HERNÁNDEZ, L. E. (2014). Glutathione is a key antioxidant metabolite to cope with mercury and cadmium stress. *Plant soil*.

SOBRINO-PLATA, J.; HERRERO, J.; CARRASCO-GIL, S.; PÉREZ-SANZ, A.; LOBO, C.; ESCOBAR, C.; MILLAN, R.; HERNÁNDEZ, L. E. (2013). Specific stress responses to cadmium, arsenic and mercury appear in the metallophyte *Silene vulgaris* when grown hydroponically. *RSC Adv.*, 3, 4736–4744.

SOBRINO-PLATA, J.; ORTEGA-VILLASANTE, C.; FLORES-CÁCERES, M. L.; ESCOBAR, C.; DEL CAMPO, F. F.; HERNÁNDEZ, L. E. (2009). Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere*, 7: 946-954.

SRINIVASARAO, C.; GAYATRI, S. R.; VENKATESWARLU, B.; JAKKULA, V. S.; WANI, S. P.; SAHRAWAT, K. L.; RAJASEKHARA RAO, B. K.; MARIMUTHU, S.; KRISHNA, G. G. (2013). Heavy metals concentration in soils under rainfed agro-ecosystems and their relationship with soil properties and management practices. *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, Vol 11, Issue 7, 1959-1972.

SUN, C.; LIU, J.; WANG, Y.; SUN, L.; YU, H. (2013). Multivariate and geostatistical analyses of the spatial distribution and sources of heavy metals in agricultural soil in Dehui, Northeast China. *Chemosphere*, 92: 517-523.

TAKAHASHI, S.; BAUWE, H.; BADGER, M. (2007). Impairment of the photorespiratory pathway accelerates photoinhibition of photosystem II by suppression of repair process and not acceleration of damage process in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 144, 487-494.

TANGAHU, B. V.; ABDULLAH, S. R. S.; BASRI, H.; IDRIS, M.; ANUAR, N.; MUKHLISIN, M. (2011). A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. *International Journal of Chemical Engineering*, vol. 2011, Article ID 939161, 31 pages, 2011.

TAYLOR, M.; KIM, N.; SMIDT, G.; BUSBY, C.; MCNALLY, S.; ROBINSON, B.; KRATZ, S.; SCHNUG, E. (2016). Trace element contaminants and radioactivity from phosphate fertilizer. *Phosphorus in Agriculture: 100% Zero*. 231-266 p. DOI 10.1007/978-94-017-7612-7_12.

TAYLOR, M.D.; PERCIVAL, H.J. (2001). Cadmium in soil solutions from a transect of soils away from a fertilizer bin. *Environ. Pollut.* 113:35–40.

USHIMARU, T.; KANEMATSU, S.; SHIBASAKA, M.; TSUJI, H. (1999). Effect of hypoxia on the antioxidative enzymes in aerobically grown rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum*, 107(2), 181-187.

VALE, F.; ALCARDE, J. C. (2003). Avaliação química de fertilizantes com micronutrientes tipo fritas. *Revista Brasileira Ciência Solo*, 27: 165-170.

VALLE, L. A. R. (2012). Avaliação de elementos-traço em fertilizantes e corretivos. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Lavras, 75p.

- VITÓRIA, A. P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R.A. (2001). Antioxidant enzymes responses to cadmium in radish tissues. *Phytochemistry* 57: 701-710.
- WANG, Q.; ZHANG, J.; ZHAO, B.; MA, D.; ZHANG, H. (2016). The accumulation and transfer of arsenic and mercury in the soil under a long-term fertilization treatment. *Journal of Soil and Sediments*, 16: 427-437.
- WANG, C.; JI, J.; YANG, Z.; CHEN, L.; BROWNE, P.; YU, R. (2012) Effects of soil properties on the transfer of cadmium from soil to wheat in the Yangtze River Delta Region, China—a typical industry–agriculture transition area. *Biol Trace Elem Res*.
- WANG, H.; ZHAO, S. C.; LIU, R. L.; ZHOU, W.; JIN, J. Y. (2009). Changes of photosynthetic activities of maize (*Zea mays* L.) seedlings in response to cadmium stress. *Photosynthetica*, vol 47(2): 277-283.
- WANG, G.; SU, M.Y.; CHEN, Y.H.; LIN, F.F.; LUO, D. & GAO, S.F. (2006). Transfer characteristics of cadmium and lead from soil to the edible parts of six vegetable species in Southeastern China. *Environ. Pollut.*, 144:127-135.
- WEI, B.; YANG, L. (2010). A review of heavy metal contaminations in urban soils, urban road dusts and agricultural soils from China. *Microchemical Journal*, 94: 99–107.
- WEGGLER, K.; MCLAUGHLIN, M. J.; GRAHAM, R. D. (2004). Effect of Chloride in Soil Solution on the Plant Availability of Biosolid-Borne Cadmium. *J Environ Quality*, 33:496–504.
- WHITTEN, M. G.; RITCHIE, G. S. P. (1991). A comparison of soil tests to predict the growth and nodulation of subterranean clover in aluminium-toxic topsoils. *Plant and Soil*, 136(1): 11-24.
- XU, J.; KLEJA, D. B.; BIESTER, H.; LAGERKVIST, A.; KUMPIENE, J. (2014). Influence of particle size distribution, organic carbon, pH and chlorides on washing of mercury contaminated soil. *Chemosphere*, 109, 99-105.
- ZENG, F.; ALI, S.; ZHANG, H.; OUYANG, Y.; QIU, B.; WU, F.; ZHANG, G. (2011). The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants. *Environmental Pollution*, 159(1): 84-91.

- ZHANG, J.; WANG, Y.; LIU, J.; LIU, Q.; ZHOU, Q. (2016). Multivariate and geostatistical analyses of the sources and spatial distribution of heavy metals in agricultural soil in Gongzhuling, Northeast China. *J. Soils Sediments*, 16: 634-644.
- ZHAO, X.; WANG, D. (2010). Mercury in some chemical fertilizers and the effect of calcium superphosphate on mercury uptake by corn seedlings (*Zea mays* L.). *Journal of Environmental Sciences*, 22 (8), 1184-1188.
- ZHENG, N.; WANG, Q.; ZHENG, D. (2007). Health risk of Hg, Pb, Cd, Zn, and Cu to the inhabitants around Huludao Zinc Plant in China via consumption of vegetables. *Science of the total environment*, 383(1), 81-89.
- ZHOU, Z. S., GUO, K., ELBAZ, A. A., & YANG, Z. M. (2009). Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environmental and Experimental*, 65, 27– 34.
- ZHUANG, P.; MCBRIDE, M. B.; XIA, H.; LI, N.; LI, Z. (2009). Health risk from heavy metals via consumption of food crops in the vicinity of Dabaoshan mine, South China. *Science of the Total Environmental*, 407: 1551-1561.
- ZOFFOLI, H. J.; AMARAL-SOBRINHO, N. M.; ZONTA, E.; LUISI, M. V.; MARCON, G.; TOLON BECERRA, A. (2013). Inputs of heavy metals due to agrochemical use in tobacco fields in Brazil's southern region. *Environ. Monit. Assess*, 185, pp. 2423–2437.