



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ELLEN APARECIDA NUNES

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE FITOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO
E ALTOS NÍVEIS DE FERTILIZAÇÃO COM NITROGÊNIO, FÓSFORO
E POTÁSSIO**

CAMPINAS

2020

ELLEN APARECIDA NUNES

**AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE FITOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO
E ALTOS NÍVEIS DE FERTILIZAÇÃO COM NITROGÊNIO, FÓSFORO
E POTÁSSIO**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do Título de
Mestra em Biologia Animal na área de
Relações Antrópicas, Meio Ambiente e
Parasitologia.*

Orientadora: PROF^a. DR^a. SARA ADRIAN LOPEZ DE ANDRADE

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ELLEN
APARECIDA NUNES E ORIENTADA PELA
PROF^a. DR^a. SARA ADRIAN LOPEZ DE
ANDRADE

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

N922a Nunes, Ellen Aparecida, 1988-
Avaliação da relação entre fitoacumulação de cádmio e altos níveis de fertilização com nitrogênio, fósforo e potássio / Ellen Aparecida Nunes. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Sara Adrián Lopez de Andrade.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Cádmio. 2. Fertilizantes fosfatados. 3. Fitoacumulação. 4. Metais pesados. I. Andrade, Sara Adrián Lopez de, 1971-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the relationship between phytoaccumulation of cadmium and high levels of fertilization with nitrogen, phosphorus and potassium

Palavras-chave em inglês:

Cadmium
Phosphatic fertilizers
Phytoaccumulation
Heavy metals

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Sara Adrián Lopez de Andrade [Orientador]
Paulo Mazzafera
Sarah Caroline Ribeiro de Souza

Data de defesa: 15-01-2020

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5166-3443>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7877991231002457>

Campinas, 15 de janeiro de 2020.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sara Adrian Lopez de Andrade

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Prof^a Dr^a. Sarah Caroline Ribeiro de Souza

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Biologia Animal da Unidade do instituto de biologia da Universidade Estadual de Campinas.

Dedicatória

*Dedico esse trabalho a todos professores e educadores que
com tanta responsabilidade e dedicação exerceram suas profissões
e atuaram na minha formação ao longo da minha vida.
Graças ao amor e atenção desses profissionais, pude me encantar
pelo conhecimento e seguir caminhos além dos
que me foram determinados por nascimento.*

Agradecimentos

Para realizar essa pesquisa contei com o apoio de algumas pessoas que de diferentes maneiras se fizeram muito necessárias e presentes durante todo o processo facilitando meu caminho, gostaria de dedica-las algumas palavras

Primeiramente agradeço à minha orientadora, professora Sara, que me acolheu em um dos piores momentos possíveis e com muito companheirismo me ajudou a encontrar novamente o caminho para a pesquisa. Por toda sua orientação, compreensão e dedicação deixo o meu muito obrigada, não seria possível concluir esse mestrado sem o seu apoio e amizade nessa jornada.

Agradeço a todo o grupo de pesquisa do laboratório de fisiologia molecular de plantas, que me auxiliaram no decorrer desta pesquisa e alternando entre a bancada e o cafezinho, contribuíram para que o LaFIMP fosse esse lugar onde posso aprender cada dia mais. Gostaria de agradecer especialmente, aos meus colegas de trabalho Rafaela, Eduardo e ao menino Igor pela atenção e disponibilidade em me ajudar e ensinar nas inúmeras vezes em que os procurei.

Agradeço ao meu marido Steven que me apoiou grandemente nos momentos difíceis que vieram durante este mestrado e me incentivou a sempre continuar investindo em mim e na minha formação. Sua parceria me recarrega e me ajuda a recuperar o foco quando tudo parece difícil demais, obrigada por todo carinho e cuidado que você me dedica. A minha família que sempre me incentivou a seguir o caminho dos estudos e também aos meus amigos que estiveram presentes na minha vida sendo pontos de apoio e conforto ao longo desses anos, muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Resumo

O cádmio (Cd), metal pesado com relativamente alta mobilidade no sistema solo-planta, possui potencial de acumulação nos vegetais, sendo esses uma das principais entradas deste metal tóxico na cadeia alimentar. Na produção intensiva de hortaliças folhosas para consumo humano, frequentemente são adicionadas quantidades excessivas de fertilizantes para garantir maior produção agrícola e alto retorno econômico. No entanto, o mal-uso de fertilizantes pode trazer inúmeros prejuízos ambientais e à saúde humana. Fertilizantes fosfatados têm sido relacionados com a contaminação dos solos com Cd, por este metal estar presente junto ao fósforo (P) nas rochas fosfatadas utilizadas para sua fabricação, enquanto o excesso de fertilizantes nitrogenados pode alterar a concentração de nitratos nas folhas e causar problemas ambientais e à saúde humana. O objetivo principal deste trabalho foi investigar a relação entre altos níveis de fertilização com nitrogênio (N), P e potássio (K) e a absorção e acúmulo de Cd e nitratos em plantas de alface, *Lactuca sativa* L., da variedade tropicalizada “Gloriosa”. Para isto foi realizado um experimento em casa de vegetação, o qual seguiu esquema fatorial 2 x 2, com 14 repetições de cada tratamento. Os tratamentos consistiram na adição ou não de 10 mg kg⁻¹ de Cd ao solo e no uso da dose recomendada e três vezes a dose recomendada (alta fertilização) de N, P e K para a cultura da alface. Foi possível confirmar que a maior dose de fertilizantes de N, P, e K teve relação significativa com o aumento de Cd na parte aérea das plantas. A alface demonstrou alta capacidade de acumulação de Cd, concentrando altos teores do metal principalmente nas folhas, evidenciando sua grande capacidade de translocação para o Cd, as concentrações de Cd de plantas expostas ao metal estiveram muito acima, entre 5,9 e 8 mg kg⁻¹ de matéria fresca (MF), dos valores de segurança alimentar determinados pela ANVISA, de 0,2 mg kg⁻¹ de MF. A variedade de alface tropicalizada estudada apresentou alta tolerância ao Cd e não foi observado nenhum sintoma visual de toxicidade por Cd ou redução importante na produção da biomassa quando cultivada em solo com Cd, o que pode representar risco de contaminação para o consumidor dessa hortaliça. As concentrações observadas para nitratos e demais compostos nitrogenados nas folhas de alface ficaram dentro dos limites adequados para a espécie estudada mesmo quando cultivadas com três vezes a dose recomendada de N.

Palavras chave: Cádmio, fertilizantes, fitoacumulação, metais pesados

Abstract

Cadmium (Cd), a heavy metal with high mobility in the soil-plant system, has the potential to accumulate in vegetables, which constitute one of the main entry points of this toxic metal into the food chain. In intensive production of leafy vegetables for human consumption, excessive amounts of fertilizers are often added to ensure higher agricultural production and high economic returns. However, misuse of fertilizers may bring numerous environment and human health damages. Phosphate fertilizers have been related to soil contamination with Cd, as it this metal is present next to phosphorus (P) in phosphate rocks used for its manufacture, while excess nitrogen fertilizers can change the concentration of nitrates in leaves and cause problems to the soil. health and environmental. The main objective of this work was to investigate the relationship between high levels of nitrogen (N), P and potassium (K) fertilization and the absorption and accumulation of Cd and nitrates in lettuce, *Lactuca sativa* L., plants of tropicalized var. "Gloriosa". For this, an experiment was carried out in a greenhouse, which followed a 2 x 2 factorial scheme, with 14 replications of each treatment. The treatments consisted of adding or not 10 mg kg⁻¹ of Cd to the soil and using the recommended dose and three times the recommended dose (high fertilization) of N, P and K for lettuce crop. It was possible to confirm that the highest dose of N, P and K fertilizers is significantly related to the increase of Cd in the shoot. Lettuce showed a high capacity of accumulation of Cd, concentrating high levels of the metal in roots, but mainly in the leaves, evidencing its great capacity of translocation to Cd, the Cd concentrations of plants exposed to the metal were much higher, between 5,9 and 8 mg kg⁻¹ fresh matter (MF), of the food safety values determined by ANVISA, of 0.2 mg kg⁻¹ MF. The variety of lettuce studied showed high tolerance to Cd and no visual symptoms of Cd toxicity or significant reduction in biomass production were observed when grown in soil with Cd, which may represent a risk of contamination for the consumer of this vegetable. The concentrations observed for nitrates and other nitrogen compounds in the lettuce leaves were within the appropriate limits for the studied species even when cultivated with three times the recommended dose of N.

Key words: Cadmium, fertilizers, phytoaccumulation, heavy metals,

Sumário

Introdução	10
Justificativa	18
Materiais e métodos	20
Delineamento experimental:	20
Preparação do solo e plantio da alface	20
Materiais biológicos, instalação e condução dos experimentos.....	23
Variáveis analisadas	23
Massa da matéria fresca e seca da parte aérea e raiz	23
Características morfológicas das raízes.....	24
Colonização micorrízica das raízes	24
Pigmentos foliares.....	24
Fluorescência da clorofila <i>a</i>	24
Concentração de nutrientes e Cd em folhas e raízes.....	25
Determinação do conteúdo de nitrato, amônio e aminoácidos livres	25
Análises estatísticas.....	26
Resultados	27
Análise química do solo.....	27
Crescimento vegetal.....	27
Colonização micorrízica.....	30
Pigmentos foliares e fluorescência da clorofila <i>a</i>	31
Concentração de cádmio em plantas de alface	31
Concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio na planta	34
Concentração de outros nutrientes na planta	37
Concentração de nitrato, amônio e aminoácidos totais nas folhas.....	37
Análise dos componentes principais.....	39
Discussão.....	41
Conclusão	48
Referências Bibliográficas	49
Anexo 1	60
Anexo 2	61

Introdução

A poluição por cádmio e suas implicações

O cádmio (Cd) é um elemento traço não essencial, sem papel conhecido no desenvolvimento ou crescimento de plantas, animais ou outros seres vivos. É considerado um metal tóxico mesmo em pequenas concentrações (Khan et al. 2015) e possui alta mobilidade no solo, podendo entrar facilmente em diferentes níveis da cadeia trófica através do sistema solo-plantas (Dalcorso et al. 2010). Desse modo a compreensão do comportamento deste metal pesado em diferentes condições ambientais, é de grande interesse para o entendimento de sua absorção e acúmulo nas plantas e os possíveis problemas relacionados com a saúde animal e ambientais derivados de seu acúmulo.

Na lista de substâncias perigosas da ATSDR (Agência para Substâncias Tóxicas e Registro de Doença), divulgada em 2017, o Cd aparece na sétima posição dentre 275, considerando fatores como frequência, toxicidade e potencial de exposição humana. O Cd possui meia vida longa no organismo humano, levando por exemplo, entre 10 e 30 anos para ser eliminado. Se acumula principalmente nos rins, fígado e ossos, causando lesão renal, necrose dos hepatócitos, descalcificação óssea, reumatismos e câncer pulmonar nos casos de contaminação por inalação (Ellis et al. 1981; Hussain et al. 1987; Nogawa et al. 1987).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) os limites de ingestão diária de Cd são de 1 µg por quilo de peso corporal (WHO, 2006), o que para uma pessoa de 70 kg representa um limite de 70 µg de Cd por dia. Uma das principais rotas de exposição humana ao Cd é o consumo de vegetais cultivados em áreas contendo altos teores desse elemento (ATSDR, 2018).

No Brasil, a legislação alimentar proposta em resolução nacional de 2013 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu os limites máximos de Cd para diferentes alimentos entre 0,01 mg kg⁻¹ e 2 mg kg⁻¹ de matéria fresca (MF). Para hortaliças o limite máximo dos valores de referência é menor ficando entre 0,05 e 0,2 mg kg⁻¹ MF. No caso da alface, *Lactuca sativa* L., o valor limite é de 0,2 mg Cd kg⁻¹ MF (ANVISA, 2013).

As fontes naturais de contaminação do ambiente por Cd são principalmente a atividade vulcânica, os incêndios florestais e a mineralização natural das rochas sedimentares e fosfáticas (Alloway, 1995, Smolders et al., 2013). Entretanto, a principal causa da contaminação e aumento das concentrações de Cd no ambiente são as atividades antrópicas (Cloquet et al. 2006). No Brasil, a Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) indica que as principais fontes antropogênicas de Cd no ambiente são o uso de fertilizantes fosfatados, a combustão de combustíveis fósseis, obras metalúrgicas, resíduos da indústria cimenteira, a aplicação de lodo de esgoto no solo, resíduos industriais, a mineração, a fundição e o processamento de minérios (CETESB, 2012).

Em solos naturais onde não há contaminação por Cd é esperado que os valores encontrados deste metal não ultrapassem a concentração de 1 mg kg^{-1} solo (Alloway 1995). Entretanto, segundo determinação dos valores de referência de qualidade dos solos para metais pesados como o Cd, divulgada pela CETESB em 2014, para ser considerado como não contaminado, a concentração de Cd no solo não deve ultrapassar os $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$ solo. Para solos agrícolas o valor limite para intervenção é de 10 mg Cd kg^{-1} e acima desse limite de concentração existe risco potencial à saúde humana (CETESB, 2014).

Nos solos agricultáveis a aplicação de fertilizantes fosfatados é feita de maneira intensiva, pois o fósforo (P) é normalmente um dos principais fatores limitantes da produção agrícola. Entretanto, a maior parte dos fertilizantes fosfatados utilizados no mundo são oriundos de rochas fosfatadas que além do P contém outros elementos, como o Cd, na sua composição (Raven and Loeppert 1997). Portanto, as aplicações sucessivas de fertilizante fosfatado podem levar ao aumento acumulativo da concentração deste metal no solo e plantas após anos de cultivo e do manejo inadequado desses insumos agrícolas (Loganathan et al. 1997; Grant and Sheppard 2008).

Em geral as plantas possuem capacidade de absorver entre 1 e 5% do Cd presente no solo (Williams and David 1973). Essa capacidade de absorção e acúmulo de Cd pelas plantas depende de diferentes características como a espécie vegetal, a variabilidade genética da planta e principalmente, da concentração de Cd disponível no solo (Andersson and Siman 1991; Loganathan et al. 1997). Embora não exista uma

legislação internacional específica que estabeleça os limites aceitáveis de Cd em fertilizantes fosfatados, por exemplo, diversos países discutem sobre o assunto e possuem legislação própria definindo os valores máximos tolerados (Grant et al. 1998).

No Brasil em 2005 foram propostos os limites de Cd para fertilizantes fosfatados de 0,75 mg de Cd por kg^{-1} de P_2O_5 , entretanto foi estabelecido em 2006 o valor máximo de 4 mg de Cd por kg^{-1} de P_2O_5 (MAPA, 2016). Entretanto, mesmo quando a disponibilidade de Cd no solo é baixa, existe o risco de ele ser acumulado em diferentes órgãos das plantas e assim entrar na cadeia alimentar. O aumento da biodisponibilidade de Cd após a aplicação de fertilizantes fosfatados foi observada em plantas de aveia, com raízes e parte aérea das plantas apresentando incrementos na concentração de Cd, mesmo nos casos onde não foi possível detectar Cd no solo (Gonçalves et al. 2008), mostrando a capacidade de biomagnificação das plantas.

O cultivo extensivo de hortaliças como a alface e outras folhosas demanda manejo nutricional do solo para obtenção de biomassa/produção vegetal adequada à comercialização. Isso inclui frequentemente práticas culturais que favoreçam a produção rápida e volumosa, como a irrigação e a aplicação de fertilizantes, especificamente aqueles formulados com N, P e K, que fornecem os principais nutrientes: nitrogênio (N), P e potássio (K) às plantas (Sosa et al. 2012). Atualmente, para atingir os padrões de produção comercial da alface no Brasil com $14,5 \text{ t ha}^{-1}$, são utilizados aproximadamente $157,4 \text{ kg ha}^{-1}$ de fertilizantes N, P e K (Tavares et al., 2019). Existem evidências que as práticas de fertilização feitas em campos agrícolas aumentam os níveis de nutrientes a níveis muito acima dos exigidos para o crescimento das plantas (Vitousek et al. 2009). Esse uso excessivo de fertilizantes pode levar a graves problemas ambientais como emissão de gases estufa, eutrofização das águas ou à salinização do solo (Endo et al. 2011). Uma outra questão associada à aplicação excessiva de fertilizantes nitrogenados é que o seu uso intensivo pode causar o acúmulo de nitrato nas plantas o que pode ter implicações negativas para a saúde humana e animal (Pavlou et al. 2007; Katan 2009).

Algumas plantas acumulam nitrato nas raízes e/ou na parte aérea quando a absorção de N, na forma de nitrato, excede sua necessidade ou capacidade metabólica (Umar and Iqbal 2007). As plantas de alface podem acumular elevadas

quantidades de nitrato nas folhas, representando risco de intoxicação aos consumidores (Beninni et al. 2002). No Brasil ainda não existe legislação específica para regulamentar os limites máximos de nitrato em hortaliças e o valor limite para os teores de nitrato em alface estão baseados nos índices europeus. Considerando os índices estabelecidos pela União Europeia, plantas de alface produzidas em casa de vegetação devem ter limites máximos de 3.500 mg kg⁻¹ MF no período de verão e de 4.500 mg kg⁻¹ MF para as plantas produzidas no período de inverno (McCall and Willumsen 1998).

O nitrato é, em princípio, inofensivo à saúde, mas após o seu consumo, pode ser influenciado por processos microbiológicos que o convertem em nitrito, o qual pode causar metemoglobinemia, ou a incapacidade da hemoglobina se ligar ao oxigênio no sangue. Ainda o consumo excessivo de nitrato tem caráter tóxico em seres humanos e outros animais pela sua redução a nitrito e sua posterior conversão em nitrosaminas e nitrosamidas no estômago, ambas com atividade carcinogênica. Essas substâncias também podem causar deficiências na absorção e transporte de oxigênio ao transformar a hemoglobina do sangue em ferrihemoglobina (Addiscott and Benjamin 2006).

Culturas como a alface e outras hortaliças folhosas são especialmente suscetíveis ao acúmulo de nitrato nos vacúolos das células foliares por causa dos altos níveis de N utilizados na sua produção comercial. Por este motivo algumas instituições internacionais, como a OMS limitam a concentração de nitratos em folhas frescas de plantas como alface. Em 1996 o *Joint Expert Committee on Food Additives* da FAO/WHO (JECFA FAO/WHO, 1996) estabeleceu os valores de referência para a ingestão diária aceitável, sem risco para a saúde de 3,65 mg dia⁻¹ por kg de peso para nitratos e de 0,07 mg dia⁻¹ por kg de peso para nitritos (JECFA FAO/WHO, 1996).

Desse modo, temos na produção agrícola atual um cenário onde o uso excessivo de fertilizantes de N, P e K na produção de hortaliças folhosas pode representar um duplo risco à saúde da população, com a possibilidade de contaminação pelo acúmulo de Cd e de nitratos nas folhas destas plantas.

A capacidade de absorção de Cd e a sua biodisponibilidade depende não apenas da sua concentração no solo, mas de características como o pH, teor de

matéria orgânica, a capacidade de troca de cátions (CTC) e a superfície específica do solo. Dentre esses fatores, o pH do solo é o principal fator que determina a biodisponibilidade dos íons Cd^{2+} no solo, pois, ele influencia diretamente nos processos de adsorção e na especiação de metais na solução do solo (Alloway 1995).

Com o aumento da acidez do solo ocorre o aumento da atividade do cátion Cd^{2+} , pela dissolução dos óxidos e hidróxidos de ferro e seus co-precipitados com metais (Pierangeli et al. 2005). A forma química e especiação dos íons de Cd presentes na solução do solo tem maior relevância para seu efeito tóxico do que apenas sua concentração, considerando-se que os íons Cd^{2+} tem maior probabilidade de serem adsorvidos às partículas do solo que suas formas neutras e aniônicas (Alloway 1995).

Resposta e defesa dos vegetais à presença de cádmio

Para plantas em geral, as concentrações de Cd nas folhas maduras são consideradas normais quando estão entre os limites de 0,05 e 2 mg kg^{-1} MF, valores entre 5 e 30 mg Cd kg^{-1} MS são considerados excessivos ou fitotóxicos para a maioria as espécies (Meharg 2011).

Plantas crescendo em solos contaminados por Cd podem responder à sua presença exibindo sintomas de toxicidade ou desenvolvendo mecanismos de resistência que permitam seu funcionamento e sobrevivência. O acúmulo de Cd, entretanto, pode ser danoso para os organismos provocando efeitos adversos em processos biológicos do solo, em plantas, seres humanos e outros animais (Meharg 2011).

Os mecanismos de defesa contra o excesso de metais nos vegetais compreendem diferentes estratégias para absorver, excluir, acumular e/ou tolerar níveis anormalmente altos de metais. As plantas vasculares possuem diversos mecanismos para eliminar ou atenuar os efeitos nocivos do Cd, como ligação do metal à componentes da parede celular, exclusão, compartimentalização do metal em vacúolos e quelação do metal por moléculas orgânicas que complexam e reduzem a sua toxicidade no citoplasma (Prasad 1995). As plantas que toleram concentrações

altas de metais no solo, mas que não possuem capacidade de acumulação de metais são denominadas apenas tolerantes, e comumente são excludentes, tendo como estratégia a limitação da entrada de metais pesados e evitando a sua translocação para a parte aérea (Gallego et al. 2012).

Neste grupo de tolerantes e não acumuladoras, encontram-se a maior parte das espécies vegetais, as quais limitam a concentração de metais na parte aérea, usando as raízes como principal barreira à translocação dos metais para as folhas ou órgãos da parte aérea. Entretanto, algumas plantas possuem a capacidade de acumular metais na parte aérea sem apresentar danos no seu metabolismo e desenvolvimento, estas plantas denominam-se acumuladoras ou hiperacumuladoras dependendo da concentração de metal nos tecidos ou órgãos acima do solo. Para o Cd são consideradas hiperacumuladoras as plantas capazes de acumular mais de 100 mg Cd kg⁻¹ MS na parte aérea sem sofrer danos decorrentes da fitotoxicidade (Rascio and Navari-Izzo 2011).

Outra estratégia das plantas contra os efeitos negativos dos metais pesados é a sua associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) (de Andrade et al. 2008). Esses fungos ubíquos no solo, estabelecem simbiose com aproximadamente 70% de todas as espécies de plantas vasculares (Smith et al., 2010), sendo que a simbiose micorrízica, além de contribuir com a capacidade de absorção e translocação de nutrientes, pode ter efeitos positivos durante o estresse causado pelas altas concentrações de metais e outros elementos potencialmente tóxicos no solo. Elas atuam reduzindo a translocação de Cd e outros metais da raiz para a parte aérea ao aumentar a capacidade de imobilização na raiz, induzindo o sistema antioxidante ou melhorando o estado nutricional da planta (de Andrade e Silveira 2008; Jiang et al. 2016).

A simbiose com FMAs é de grande importância para plantas sob condições de estresse por excesso de Cd, uma vez que a entrada do Cd nas plantas se inicia pela absorção das raízes na grande maioria das condições ambientais, sendo normalmente esse órgão o primeiro afetado pela toxicidade, podendo mostrar mudanças na sua coloração, além de alterações morfológicas e anatômicas (Wei et al. 2012). Por outro lado, os próprios FMAs podem ser prejudicados por altas concentrações de metais no solo, diminuindo a capacidade de formação da simbiose

(de Andrade e Silveira 2004; de Almeida et al. 2008) e reduzindo a capacidade da planta se desenvolver em solos contaminados com metais.

Entre outros efeitos negativos decorrentes da exposição ao Cd, é relatada a redução na absorção e transporte de nitrato das raízes para as folhas relacionada à presença de altos níveis deste metal, com diminuição da atividade da redutase do nitrato em plântulas de ervilha expostas ao metal (Hernández et al. 1996). A toxicidade por Cd também afeta a assimilação e o metabolismo de N nas raízes (Balestrasse et al. 2003). Em *Impatiens balsamina* a presença de Cd causou a inibição da enzima Fe (III) redutase nas raízes o que foi relacionado à deficiência de ferro (Fe) e seu consequente prejuízo à fotossíntese, podendo causar clorose, queda de folhas e redução do crescimento de raízes e caules (Aidid and Okamoto 1992).

Em seu artigo de revisão, Sanità Di Toppi e Gabbrielli (1999) discorrem que ao serem expostas ao Cd, as plantas tem seu conteúdo total de clorofila e carotenoides reduzidos e ocorre aumento no mecanismo de *quenching* não fotoquímico. Durante a absorção e translocação de íons Cd^{2+} da raiz para a parte aérea, o íon compete pelos mesmos transportadores de nutrientes como o cálcio (Ca), K, Fe, magnésio (Mg), níquel (Ni), cobre (Cu) e/ou manganês (Mn), comprometendo a nutrição mineral dos vegetais (Sanità Di Toppi and Gabbrielli 1999).

Tem sido sugerido que metais não essenciais como o Cd entram nas células pelos mesmos transportadores que cátions essenciais como Fe e Ca (Cohen et al. 1998). A expressão de genes da família de transportadores *AtNramp* de *Arabidopsis thaliana* na levedura *Sacharomyces cerevisiae* levou ao aumento da sensibilidade ao Cd^{2+} e a seu acúmulo, mostrando a relação dos transportadores NRAMP 1 (natural resistance-associated macrophage protein) com o transporte de Fe, Mn e também de Cd (Zhang et al. 2018). Assim como a absorção, a translocação de Cd da raiz para a parte aérea também está regulada por várias proteínas transportadoras localizadas nas membranas plasmáticas (Clemens et al. 2013).

As plantas acumuladoras e hiperacumuladoras desenvolvem estratégias intracelulares para tolerar às altas concentrações de metais pesados a partir de processos fisiológicos que permitam esse acúmulo sem o desenvolvimento dos sintomas de toxicidade. Os mecanismos de desintoxicação do Cd em plantas incluem

a produção de peptídeos ricos no aminoácido cisteína, como o tripeptídeo glutathiona (GSH), pequenas proteínas como as metalotioneínas (MT), fitoquelatinas (PC) e defensinas (Luo and Zhang 2019).

O mecanismo de quelação dos metais pesados, envolve a complexação do metal à ligantes de alta afinidade como por exemplo as MT e PC e posteriormente o transporte e a compartimentalização desses complexos nos vacúolos, reduzindo assim a concentração do metal disponível no citosol (Cobbett and Goldsbrough 2002).

As PC possuem sua síntese rapidamente induzida na presença de metais pesados, sendo enzimaticamente produzidas utilizando a GSH como substrato (Rauser 1999). As PC formam seus complexos mais estáveis com Cd, devido a sua alta afinidade pelo enxofre dos grupos tiol e possuem relação positiva com a concentração de Cd presente na planta, aumentando sua concentração na parte aérea em resposta ao acúmulo desse metal (Park et al. 2019; Xie et al. 2019).

As MT são proteínas ricas em cisteína e estão presentes nos organismos animais e vegetais, assim como as PC, são induzidas pela presença de metais pesados, principalmente Cu, zinco (Zn) e Cd (Rauser 1999). As MT também possuem papéis associados com a reparação de membranas e ações antioxidantes (Hall 2002).

Em plantas associadas com FMAs já foi observada a redução de sintomas de estresse pela diminuição da concentração de Cd na parte aérea (Garg and Bhandari 2014; Jiang et al. 2016; Luo et al. 2017). Entretanto em estudo sobre o efeito fertilizantes de N, P e K no estabelecimento da simbiose micorrízica foi observada uma tendência à diminuição da porcentagem de colonização das plantas cultivadas com adição de fertilizantes e a redução da colonização foi relacionada aos níveis de P no solo que aumentaram significativamente (Joner 2000). Isso indica outro possível efeito negativo de altos níveis de fertilização dos solos em relação a proteção micorrízica contra acúmulo de metais na raiz das plantas.

Justificativa

A alface, *Lactuca sativa*, é considerada a principal hortaliça folhosa consumida no Brasil, sendo o 18º produto mais consumido em São Paulo. Estima-se que a alface americana represente 20% do mercado nacional para alface e o aumento de seu consumo está relacionado a expansão de lanchonetes e restaurantes *fast-food* (CEAGESP, 2019). A variedade 'Gloriosa' é uma cultivar de alface americana tropicalizada no Brasil e que apresenta resistência a períodos de altas temperaturas e alta pluviosidade, sendo adaptada ao cultivo nas condições do verão brasileiro.

O desenvolvimento adequado da alface possui uma alta demanda nutricional, sendo necessária a manutenção da fertilidade do solo devido ao alto consumo de nutrientes por esta espécie. Por isso, seu cultivo em larga escala está estreitamente associado a práticas de fertilização do solo, com fertilizantes fosfatados, nitrogenados e outros, o que pode gerar aumento da concentração de Cd nesses solos agricultáveis (Echer et al. 2016).

Alguns estudos apontaram a capacidade de acúmulo de Cd dessa hortaliça (Garate et al. 1993; Huang et al. 2003, 2004) representando assim alto risco de contaminação para a população. São necessários então, estudos que avaliem a relação entre as práticas de fertilização de solo para o plantio dessa espécie e seus efeitos na sua fisiologia assim como no acúmulo e distribuição de Cd nas plantas cultivadas em solos contaminados por Cd.

Objetivos

Este projeto tem como objetivo principal investigar a relação entre o uso de altos níveis de adubação com N, P e K e a absorção e acúmulo de Cd em plantas de alface cultivadas em solos com concentrações elevadas deste metal, assim como a influência desses fatores no desenvolvimento e fisiologia da planta.

Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito do Cd e de níveis elevados de fertilização N, P e K no crescimento e na alocação de biomassa em plantas de alface.
- Avaliar a influência de altos níveis de fertilização do solo com N, P e K na absorção e distribuição de Cd em plantas de alface.
- Avaliar o efeito do Cd e de altos níveis de fertilização no conteúdo foliar de nitratos e outros compostos nitrogenados.
- Analisar a influência que o excesso de fertilizantes N, P e K gera no estabelecimento da simbiose entre raízes e fungos micorrízicos arbusculares.

Hipóteses

- Altos níveis de fertilização com N, P e K alteram a absorção de Cd e sua translocação e acúmulo na parte aérea.
- Altos níveis de fertilização aumentam os níveis de nitrato à níveis potencialmente nocivos à saúde humana.
- O Cd diminui a concentração de nitrato e outros compostos nitrogenados nas folhas de alface.
- A absorção e translocação de Cd para a parte aérea pode influenciar negativamente o metabolismo da planta.
- O excesso de fertilizante N, P e K prejudica a simbiose entre FMAs e as raízes de alface.

Materiais e métodos

Delineamento experimental:

Foi realizado um experimento em vasos e sob condições de casa de vegetação onde plantas de alface foram cultivadas em solo com adição ou não de Cd, sob duas diferentes concentrações de solução fertilizante contendo N, P e K. O experimento seguiu esquema fatorial 2 x 2, com 14 repetições de cada tratamento, totalizando 56 parcelas experimentais.

Os tratamentos consistiram na adição (Cd 10) ou não (Cd 0) de 10 mg kg⁻¹ de Cd ao solo, e a aplicação da dose recomendada de fertilizantes N, P e K (1x NPK) ou de três vezes a dose recomendada de (3x NPK), de acordo com Trani et al. (2014), segundo modelo explicado na tabela abaixo:

Tabela 1. Esquema mostrando os tratamentos experimentais: combinação dos fatores em estudo cádmio (Cd): adição (Cd 10) ou não (Cd 0) do metal e doses de fertilização N, P e K, de uma vez (1x NPK) e três vezes (3x NPK) a dose recomendada para cultura de alface.

Tratamentos Experimentais	
Cd	N, P e K
Cd 10	1x NPK
Cd 10	3x NPK
Cd 0	1x NPK
Cd 0	3x NPK

Preparação do solo e plantio da alface

Uma amostra de solo foi coletada na região de Campinas (SP) e analisada quimicamente quanto a sua fertilidade no Centro de Solos e Recursos Ambientais do Instituto Agrônomo (IAC), seguindo protocolo estabelecido por Raij et al. (2001) (Tabela 2). Não foi necessário realizar calagem para ajuste do pH uma vez que estava ao redor de 6, o que é considerado adequado para o cultivo da alface no estado de São Paulo (Trani et al., 2014). O Cd foi adicionado às sub-amostras do solo na forma de solução aquosa de CdCl₂.5/2H₂O, na concentração de 10 mg Cd kg⁻¹ de solo. A adição de Cd foi realizada concomitantemente à aplicação dos fertilizantes N, P e K, e adicionado nos tratamentos correspondentes ao solo de cada vaso.

A aplicação de fertilizantes de N, P e K para uma (1x NPK) e três vezes (3x NPK) a dose recomendada, foi realizada de forma individual no solo de cada vaso, com 2 L de capacidade. A dose recomendada foi estabelecida considerando-se as recomendações para o cultivo da alface de 50, 320 e 120 kg ha⁻¹ de N, P₂O₅ e K₂O, respectivamente (Trani et al., 2014), e para três vezes a dose recomendada esses valores de referência foram multiplicados por três. As fontes para a adição de N, P e K foram respectivamente o sulfato de amônio [(NH₄)₂SO₄], superfosfato simples (20% de P₂O₅) e o cloreto de potássio (KCl), sendo o N e K adicionados em solução aquosa e o P em formato de pó. Os fertilizantes e o solo foram misturados manualmente vaso a vaso e o solo foi então incubado por um período de 20 dias antes do transplante das mudas de alface, com o fim de permitir a reação do Cd e dos fertilizantes de N, P e K com os constituintes do solo.

Antes do plantio foram retiradas sub-amostras de solo de cada parcela experimental e submetidas a análise química de fertilidade no Centro de solos e Recursos Ambientais do Instituto Agrônomo (IAC), seguindo protocolo estabelecido por (Raij et al., 2001), e determinou-se a disponibilidade de Cd (DTPA) no solo (Tabela 2).

Tabela 2. Análise química do solo utilizado no experimento antes (Original) e depois da adição de cádmio (+ Cd) e de fertilizantes de N, P e K em uma vez (1x NPK) e três vezes (3X NPK) a dose recomendada de N, P e K para cultura da alface.

SOLO	MO	pH	P _{res}	K _{res}	Mg _{res}	H + Al	SB	CTC	Ca _{res}	Cd	Cu	Fe	Mn	Zn	B
	g dm ⁻³	CaCl ₂	mg dm ⁻³	mmol _c dm ⁻³					mg dm ⁻³						
Original	31	5,3	13	0,8	8	17	59,8	76,8	51	nd	1,3	33	5,5	3,9	0,3
1x NPK	31	5,3	116	4,3	9	17	94,3	111,3	81	nd	1,2	28	5,2	2,4	0,3
3x NPK	30	5,2	448	8,6	9	20	127,6	147,6	110	nd	1,6	29	9,2	3,3	0,4
1x NPK + Cd	30	5,4	133	3,8	8	22	87,8	109,8	76	6,9	1,3	28	8,5	3,8	0,3
3x NPK + Cd	29	5,4	408	8,1	8	18	117,1	135,1	101	6,8	1,4	27	10,7	3,6	0,4

MO: matéria orgânica; **CTC:** capacidade de troca de cátions; **SB:** saturação por bases; **P_{res}:** fósforo resina; **K_{res}:** potássio resina; **Ca_{res}:** cálcio resina; **Mg_{res}:** magnésio resina, **nd:** não detectado.

Materiais biológicos, instalação e condução dos experimentos

O experimento foi realizado entre os meses de outubro e dezembro de 2019, em casa de vegetação do departamento de Biologia Vegetal (IB/UNICAMP) com condições naturais de luz e temperatura, atingindo temperaturas médias máximas e mínimas de 38,2 °C e 17 °C, respectivamente.

Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) americana da variedade “Gloriosa” foram previamente germinadas em bandejas plásticas com vermiculita e as plântulas mantidas sob 50% de sombreamento, por meio de sombrite, e com irrigação manual de acordo com a necessidade.

As plântulas foram transplantadas para vasos plásticos com 2 L de solo quando apresentaram de 2 a 3 folhas definitivas, deixando uma planta por vaso. A irrigação foi feita manualmente com água de torneira quando necessário e a coleta foi realizada 56 dias após a semeadura, respeitando o tempo médio de cultivo comercial da alface.

Variáveis analisadas

Massa da matéria fresca e seca da parte aérea e raiz

Na coleta as plantas foram separadas em parte aérea e raiz, a raiz foi cuidadosamente lavada em água corrente. Em seguida, foi mensurada a massa da matéria fresca da parte aérea (MFPA) a massa da matéria fresca da raiz (MFR) e a área foliar em planímetro eletrônico (Li-3100, LICOR, Nebraska, USA). Parte aérea e raiz foram secas em estufa a 60 °C, e pesadas as massas da matéria seca da parte aérea (MSPA) e da raiz (MSR).

Posteriormente foi determinado o teor de água (TA) da parte aérea e raiz das plantas pela diferença entre as massas frescas e secas de parte aérea e raiz, respectivamente, segundo o modelo abaixo e o resultado foi expresso em porcentagem.

$$TA = 100 \times \frac{(MF - MS)}{MF}$$

Características morfológicas das raízes

Na coleta raízes de oito plantas por tratamento foram lavadas e acondicionadas em vidros com etanol 50% para avaliação de características morfológicas da raiz e estimativa da colonização micorrízica. Parâmetros relacionados à morfologia das raízes foram avaliados pela análise de imagens digitalizadas em escâner (Epson Expression 12000XL, Epson America) em uma resolução de 600 dpi. através do software WinRhizo (Régent Instruments, Canada).

Foram determinados o comprimento total das raízes, área superficial e diâmetro médio ponderado, entre outras. O comprimento específico de raiz foi calculado como a razão entre comprimento de raiz e a MSR.

Colonização micorrízica das raízes

A porcentagem do comprimento das raízes colonizadas por FMAs foi estimada pelo método da lâmina, após prévia despigmentação com KOH (2,5%) e coloração da raiz com solução de azul de Tripán (0,05%) em glicerol acidificado (Phillips and Hayman 1970).

Pigmentos foliares

Foram estimados os índices de clorofila, antocianinas e flavonóis e o índice de balanço de nitrogênio (IBN), na face adaxial de folhas novas completamente expandidas de todas as plantas de cada tratamento, um dia antes da coleta, utilizando um medidor portátil de flavonóis e clorofila (DUALEX SCIENTIFIC+™ sensor, ForceA, França). O valor do IBN é gerado automaticamente pelo medidor através da razão entre o índice de clorofila e o de flavonóis.

Fluorescência da clorofila *a*

As avaliações da fluorescência da clorofila *a* foram realizadas com um fluorômetro portátil (modelo FluorPen FP100, Photon Systems Instruments, Czech Republic) utilizando sinais registrados antes e depois dos impulsos de saturação

[$\lambda < 710$ nm, PPFD $\sim 10.000 \mu\text{mol (fótons)} \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, 0,7 s] após excitação do fotossistema I (PSI) com uma fonte longa de luz [$\lambda = 735$ nm, PPFD $< 15 \text{ Wm}^{-2}$, 3,0 s].

As variáveis fotoquímicas foram estimadas um dia antes da coleta em folhas adaptadas ao escuro por 30 min usando um “clamp” e em folhas de plantas expostas à luz. Nas folhas adaptadas no escuro foram determinados o rendimento quântico potencial (F_v/F_m) e o rendimento quântico efetivo (F_v'/F_m'). Nas adaptadas a luz, foram determinados o rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Phi\text{PSII} = F_m' - F_s$) e o *quenching* não-fotoquímico (NPQ) da fluorescência.

Concentração de nutrientes e Cd em folhas e raízes

Após a pesagem da parte aérea e raiz, estas foram moídas em moinho de bancada (IKA, A11 Basic) e submetidas a digestão nítrico-perclórica ($\text{HNO}_3\text{--HClO}_4$). Nos extratos foram determinados os teores de macro, micronutrientes e Cd por espectrofotometria de emissão em plasma (ICP-OES) (JobinYvon, JY50P Longjumeau, France) (Abreu Junior et al. 2000). O nitrogênio total presente na parte aérea da planta foi determinado pelo método Kjeldahl, após digestão sulfúrica (Bremner 1960). Não foi determinado o nitrogênio das raízes, por insuficiência de tecido vegetal.

Foi estimada o fator de translocação (FT) e o fator de bioacumulação (FBA) de Cd na planta, utilizando os cálculos estabelecidos por (Rezvani and Zaefarian 2011) onde:

$$\text{FT} = \frac{\text{mg Cd kg}^{-1} \text{MS parte aérea}}{\text{mg Cd kg}^{-1} \text{MS raiz}} \quad \text{FBA} = \frac{\text{mg Cd kg}^{-1} \text{MS parte aérea}}{\text{mg Cd kg}^{-1} \text{MS solo}}$$

Determinação do conteúdo de nitrato, amônio e aminoácidos livres

Na coleta uma folha jovem completamente expandida, de oito repetições de cada tratamento, foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e posteriormente condicionada a -80°C em ultra freezer. Essas folhas foram liofilizadas e maceradas a pó fino com almofariz e pistilo, utilizando nitrogênio líquido.

Os tecidos vegetais obtidos foram submetidos à extração MCW (metanol, clorofórmio e água, 12:5:3, v:v:v) (Bieleski and Turner 1966) e a fase aquosa foi reservada para determinação dos compostos nitrogenados por diferentes metodologias colorimétricas.

O conteúdo de nitrato foi determinado pelo método do ácido salicílico de acordo com (Cataldo et al. 1975), e o conteúdo de amônio usando a reação fenol-hipoclorito pela metodologia de (McCullough 1967). A dosagem do conteúdo de aminoácidos livres foi determinado com ninhidrina seguindo a metodologia determinada por (Cocking and Yemm 1954), usando leucina como padrão.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análise de variância (Two-way ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade utilizando o programa Sisvar (Ferreira 2011). Dados expressos como porcentagem foram previamente transformados pela função raiz quadrada do arco-seno. Com o fim de identificar as variáveis que explicaram a maior proporção da variância total em resposta ao Cd e à fertilização com N, P e K foi realizada análise multivariada pela Análise dos Componentes Principais (ACP) no programa Minitab® Statistical Software versão 17.1.0 (Minitab, 2010).

Resultados

Análise química do solo

A concentração de P e K presente no solo utilizado no experimento aumentou de acordo com o esperado para o tratamento de 1x NPK e 3x NPK. Os valores de P_{resina} atingiram a concentração máxima de 133 e 448 mg dm^{-3} para os solos com adição de uma e três vezes a dose recomendada de N, P e K, respectivamente. A concentração máxima de K foi de 4,3 mmol $_c$ dm^{-3} no solo com 1x NPK e 8,6 mmol $_c$ dm^{-3} em 3x NPK. A adição de 10 mg Cd resultou em concentrações de Cd-DTPA de aproximadamente 70% da concentração total de Cd aplicada, com 6,8 mg Cd dm^{-3} de solo.

A CTC e a saturação por bases (SB) aumentaram nos solos após a adição de Cd e fertilizantes de N, P e K quando comparadas com as observadas no solo antes da aplicação dos tratamentos. A concentração de Mn disponível aumentou nos tratamentos com 3x NPK e na combinação de 1x NPK e adição de Cd. O valor máximo de 10,7 mg dm^{-3} foi obtido no solo com adição de Cd e 3x NPK. Não foram observadas alterações em outros parâmetros da fertilidade do solo.

Crescimento vegetal

A produção de biomassa da parte aérea das plantas de alface somente foi significativamente afetada pela presença de Cd quando cultivadas no solo com 3x NPK, sendo a massa e a área foliar reduzidas em comparação com as plantas que não foram expostas ao metal, como pode ser observado na Figura 1.A e 1.B.

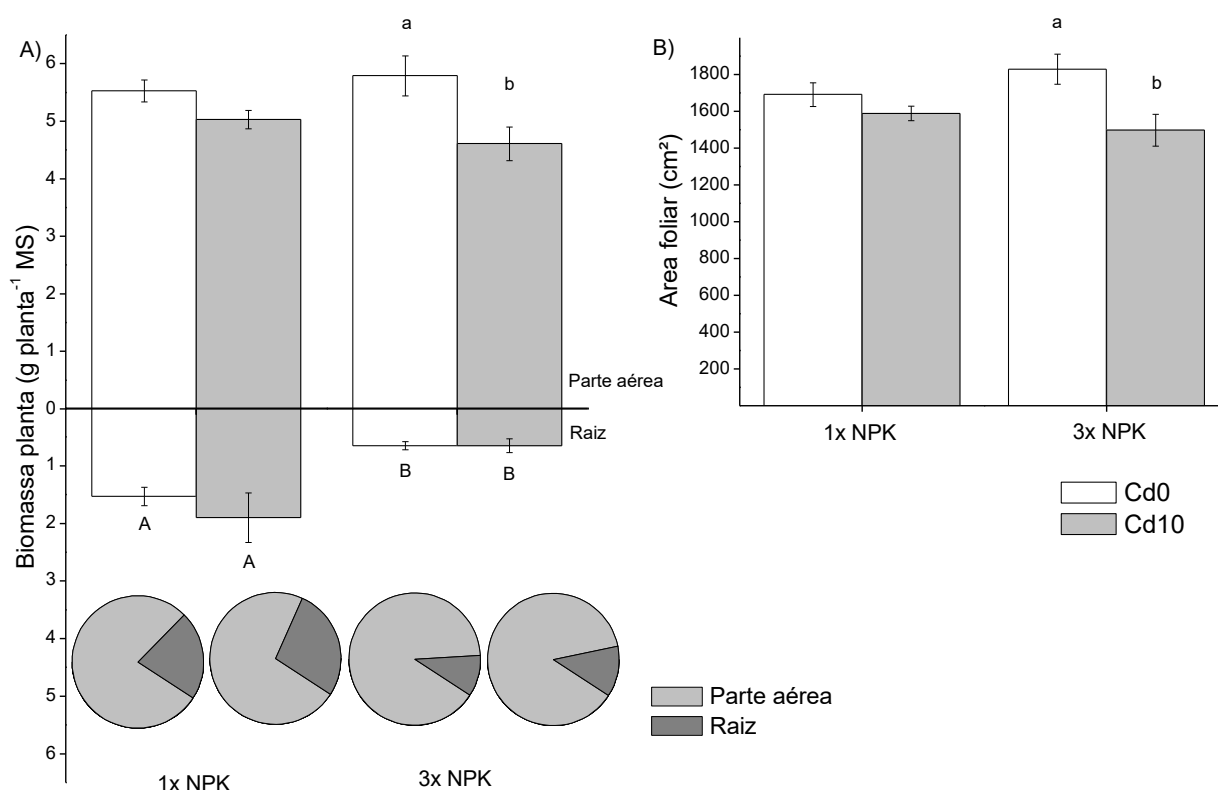


Figura 1. Produção de biomassa e razão parte aérea: raiz (A) e área foliar (B) de plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) cultivadas em solo com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes a dose recomendada para a cultura de alface. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd, dentro de cada tratamento de N, P e K e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K, dentro de cada nível de Cd pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Ausência de letras indica que não houve diferença significativa. Barras: $\pm$ erro padrão ($n = 14$).

A razão entre parte aérea e raiz (PA:R) mostrou maior alocação de biomassa para a parte aérea, principalmente nas plantas com altos níveis de fertilização (3x NPK), que apresentaram redução significativa da razão PA:R (Figura 1. A). Não houve efeito significativo do Cd na produção de biomassa das raízes (Figura 1. A).

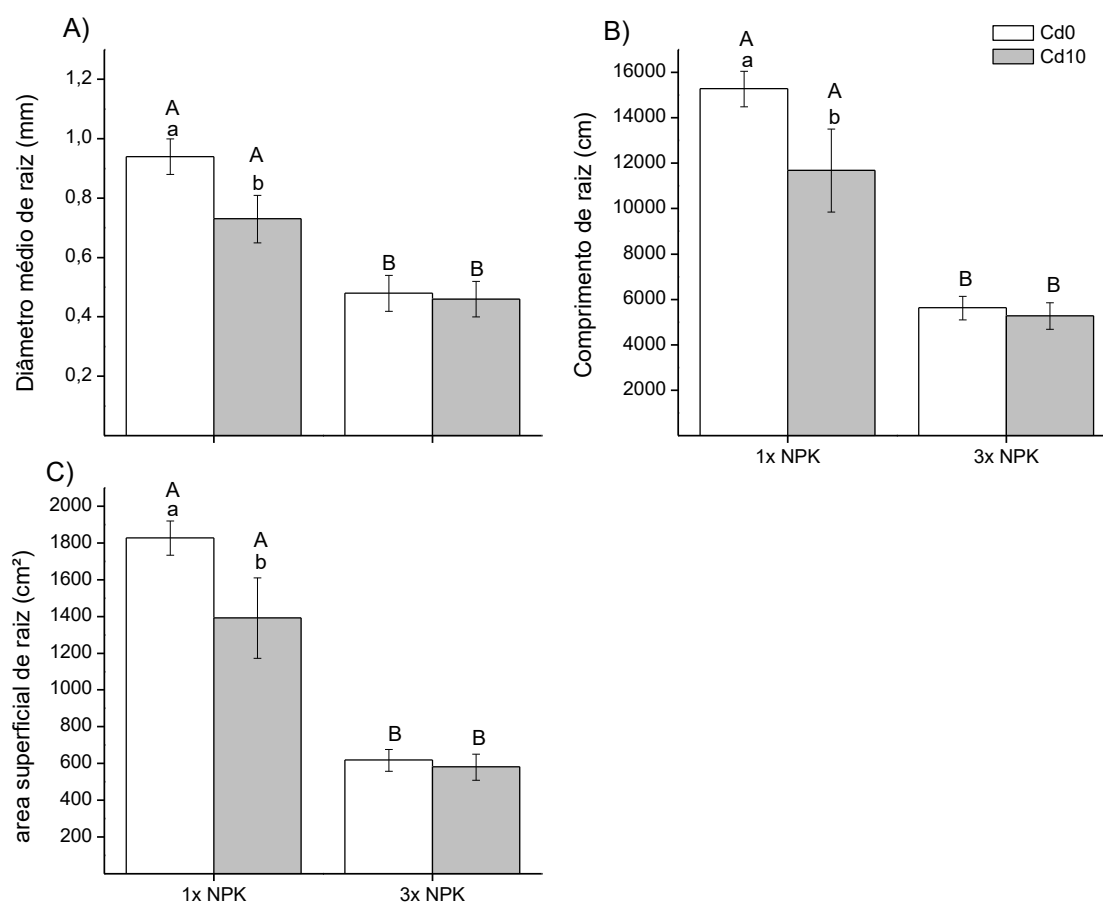


Figura 2. Características morfológicas das raízes, diâmetro médio (A), comprimento (B) e área superficial (C), de plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) cultivadas em solos com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes o recomendado para a cultura de alface. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd, dentro de cada tratamento de N, P e K e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K, dentro de cada nível de Cd pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Ausência de letras indica que não houve diferença significativa. Barras: $\pm$ erro padrão ($n = 8$).

Tanto a adição de Cd ao solo, quanto o nível de fertilização de N, P e K influenciaram de forma significativa as características relacionadas com a morfologia da raiz (Figura 2). O diâmetro médio das raízes, o comprimento total e a área superficial da raiz, apresentaram padrão similar de resposta em relação aos tratamentos estudados (Figura 2). As plantas do tratamento 3x NPK apresentaram significativamente menor comprimento, área superficial e diâmetro médio de raiz do que plantas no tratamento 1x NPK (Figura 2). As raízes de plantas cultivadas no solo com 1x NPK e na presença de Cd apresentaram redução significativa de

comprimento, área superficial e diâmetro médio em relação às plantas crescidas no solo sem Cd (Figura 2).

Tabela 3. Teor de água (%) em parte aérea e raízes de plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) crescidas em solos com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes o recomendado para a cultura de alface.

Fertilização N, P e K	Cd mg kg ⁻¹	Teor de Água (%)	
		Parte aérea	Raiz
1x NPK	0	94,48 a A	95,40 a A
	10	94,56 a B	93,40 a A
3x NPK	0	94,49 b A	94,46 a A
	10	95,10 a A	94,75 a A
CV (%)		0,33	3,96

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd, dentro de cada tratamento de N, P e K e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K, dentro de cada nível de Cd pelo teste de Tukey (P < 0,05). CV (%) – coeficiente de variação.

O teor de água na parte aérea da alface foi significativamente maior nas plantas crescidas com presença de Cd e superfertilização, com significância estatística de ambos os fatores (Tabela 3). Nas raízes o teor de água não apresentou efeito significativo de nenhum dos fatores estudados (Tabela 3).

Colonização micorrízica

As raízes das plantas não apresentaram nenhuma evidência de colonização por fungos micorrízicos arbusculares em nenhuma das condições estudadas. Estruturas típicas da associação micorrízica, como hifas intra e extrarradiculares, vesículas e arbúsculos, não foram observadas em nenhuma das condições estudadas.

Pigmentos foliares e fluorescência da clorofila *a*

As plantas crescidas em solos com 3x NPK e adição de Cd apresentaram diminuição significativa no índice de clorofila e aumento nos índices de antocianinas (Tabela 4). A diminuição no índice de clorofila esteve associada à presença do Cd no solo e o aumento da antocianina teve influência significativa do Cd e também dos altos níveis de fertilização do solo. Não houve alterações significativas no índice de flavonóis foliares (Tabela 4).

O índice de balanço de N (IBN) e os parâmetros estudados da fluorescência da clorofila *a* (NPQ, Fv/Fm, Fv'/Fm' e ϕ PSII) não apresentaram influência significativa dos fatores estudados.

Tabela 4. Índice de pigmentos, balanço de nitrogênio (IBN) e parâmetros da fluorescência da clorofila *a* em folhas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) crescidas em solos com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes o recomendado para a cultura de alface.

Fertilização NPK	Cd mg kg ⁻¹	Clor	Flav	Ant	IBN	NPQ	Fv/Fm	Fv'/Fm'	ϕ PSII
		unidade Dualex							
1x NPK	0	22,56 a A	0,44 a A	0,141 a B	51,66 a A	2,08 a A	0,731 a A	0,686 a A	0,129 a A
	10	21,55 a A	0,42 a A	0,149 a B	52,44 a A	1,93 a A	0,782 a A	0,689 a A	0,134 a A
3x NPK	0	21,84 a A	0,43 a A	0,158 b A	50,65 a A	1,69 a A	0,752 a A	0,658 a A	0,129 a A
	10	19,14 b A	0,40 a A	0,172 a A	52,96 a A	1,64 a A	0,754 a A	0,668 a A	0,134 a A
CV (%)		27,37	17,49	20,87	33,84	31,03	13,15	9,28	25,82

Clor: clorofila; **Flav:** flavonóis; **Ant:** antocianinas; **IBN:** índice de balanço de nitrogênio; **NPQ:** *quenching* não-fotoquímico; **Fv/Fm:** rendimento quântico potencial; **Fv'/Fm':** rendimento quântico efetivo; **ϕ PSII:** eficiência quântica do fotossistema II; Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd, dentro de cada tratamento de N, P e K, e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K dentro de cada nível de Cd, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV (%) – coeficiente de variação.

Concentração de cádmio em plantas de alface

A adição de Cd ao solo aumentou de forma significativa a concentração do metal nas plantas, mas plantas no solo com três vezes a dose recomendada de N, P e K apresentaram as maiores concentrações de Cd na parte aérea, chegando aos 160 mg kg⁻¹ de Cd, em termos de MS (Figura 3.A).

A concentração de Cd na raiz foi menor do que a observada na parte aérea, mas seguiu padrão similar, com concentrações de Cd maiores em plantas do tratamento de 3x NPK, que apresentaram 69 mg kg⁻¹ de MS.

A concentração de Cd em termos de massa fresca (MF) apresentou o mesmo padrão descrito para a concentração de Cd em termos de MS, com concentração de Cd de até 5,9 mg kg⁻¹ de MF em plantas crescidas com 1x NPK e 8,0 mg kg⁻¹ de MF para o tratamento de 3x NPK. (Figura 3.B).

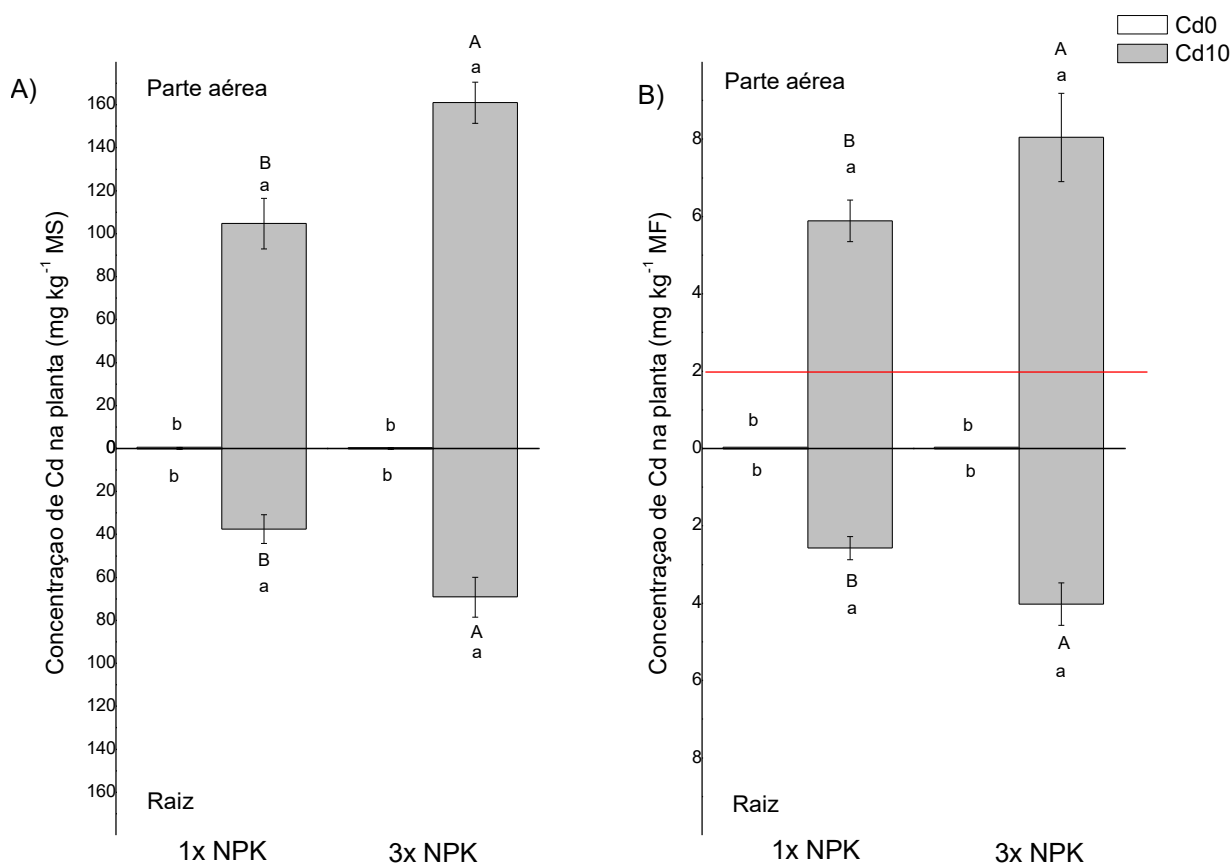


Figura 3. Concentração de cádmio em parte aérea e raiz em termos de massa seca (A) e massa fresca (B) de plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) cultivadas em solos com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) a dose recomendada para cultura de alface. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd, dentro de cada tratamento de N, P e K e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K dentro de cada nível de Cd, pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Ausência de letras indica que não houve diferença significativa. Barras: $\pm$ erro padrão ($n = 6$). Linha vermelha indica valor máximo de Cd permitido em alimentos no Brasil pela ANVISA.

Ambos grupos tiveram FTs de Cd maiores do que 1, apontando que o Cd absorvido foi significativamente translocado da raiz para a parte aérea das plantas de alface (Tabela 5).

O fator de bioacumulação (FBA) apresentou padrão inverso ao observado para o FT, com maiores valores observados nas plantas crescidas em 3x NPK do que naquelas crescidas no 1x NPK (Tabela 5). No entanto, os valores foram muito acima de 1 em ambos os casos, indicando a alta capacidade da alface em acumular Cd.

Tabela 5. Fator de translocação (FT) de Cd e fator de bioacumulação (FBA) de Cd em plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) crescidas em solos com adição de Cd (Cd 10) e com níveis de fertilização de N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes o recomendado para cultura de alface.

Fertilização	Cd	FT	FBA
NPK	mg kg ⁻¹		
1x NPK	10	3,04 A	15,14 A
3x NPK	10	2,33 A	23,67 A
	CV (%)	28,59	35,89

Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K, dentro de cada nível de Cd pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). CV (%) – coeficiente de variação.

Concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio na planta

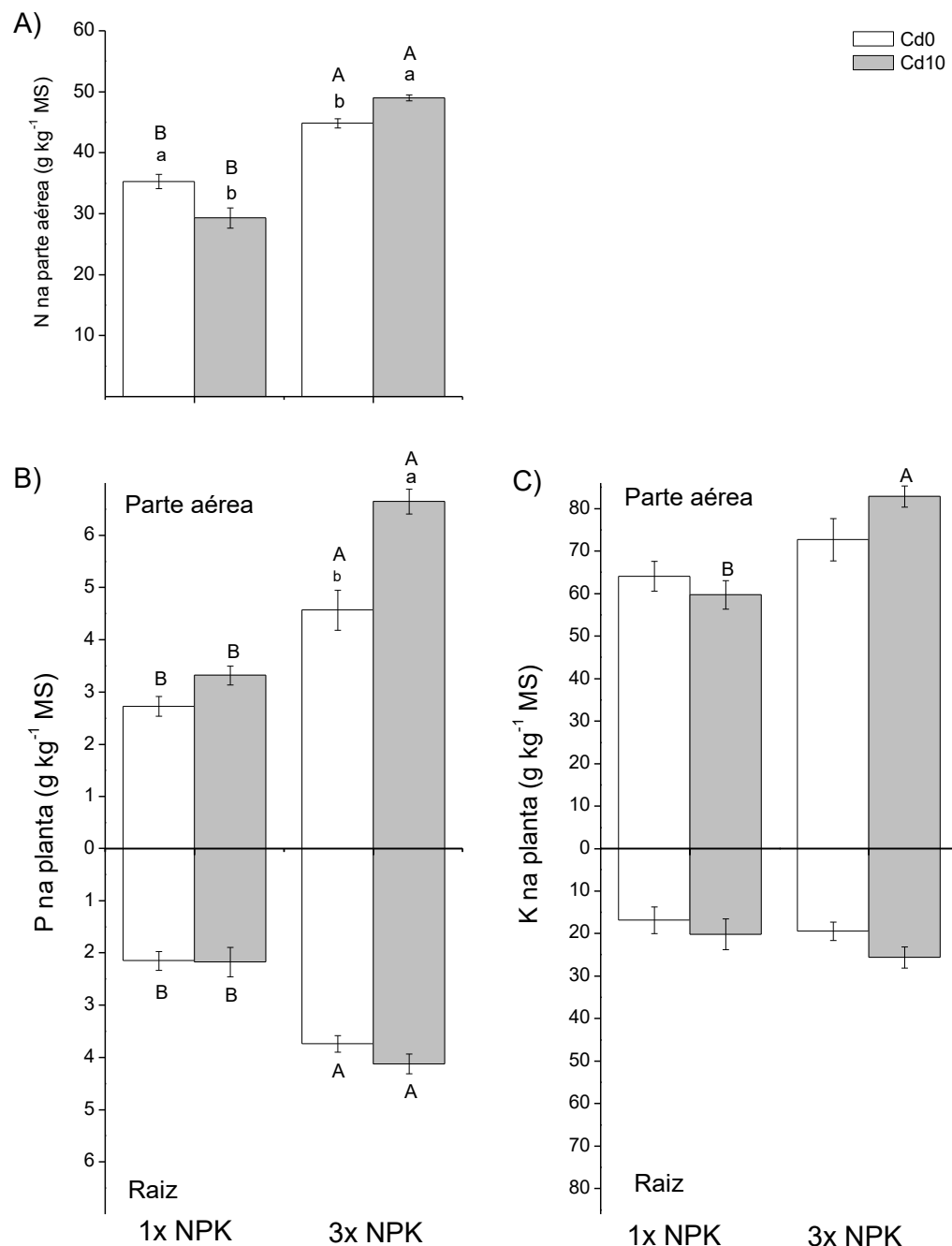


Figura 4. Concentração de nitrogênio (A) em parte aérea e concentração de, fósforo (B) e potássio (C) em parte aérea e raiz de plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) cultivadas em solos com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes o recomendado para a cultura de alface. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd dentro de cada tratamento de N, P e K e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K dentro de cada nível de Cd pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Ausência de letras indica que não houve diferença significativa. Barras: $\pm$ erro padrão ($n = 6$).

A concentração de nitrogênio na parte aérea foi significativamente maior nas plantas cultivadas em solo com 3x NPK (Figura 4 A). Dentro deste grupo que foi exposto à superfertilização do solo, a presença de Cd no solo aumentou significativamente a concentração de nitrogênio na parte aérea das plantas (Figura 4 A). Nas plantas de alface cultivadas nos níveis recomendados de fertilização de N, P e K (1x NPK) o conteúdo de nitrogênio foi significativamente menor em plantas crescidas no solo com adição de Cd (Figura 4). A concentração de nitrogênio nas raízes da alface não foi determinada.

A concentração de fósforo na parte aérea e raiz da alface foi significativamente maior em plantas cultivadas em solo com 3x NPK chegando aos valores máximos de 6,6 g kg⁻¹ e 4,6 g kg⁻¹ na parte aérea e raiz, respectivamente (Figura 4 B). A concentração de fósforo na parte aérea aumentou de forma significativa na presença do Cd no solo em plantas cultivadas com 3x NPK, apresentando aumento de 45,5 % em relação às plantas crescidas no solo sem Cd. Essa tendência também foi observada nas plantas com 1x NPK que apresentaram aumento de 22% na concentração de fósforo quando cultivadas no solo com Cd. A concentração de fósforo na raiz foi menor do que a observada na parte aérea e não teve efeito significativo do Cd (Figura 4 B).

A concentração de potássio na parte aérea apresentou aumento significativo em plantas crescidas na presença de Cd e 3x NPK, quando comparada às plantas crescidas com 1x NPK (Figura 4 C). Houve uma tendência a maiores conteúdos de potássio na parte aérea de plantas no solo superfertilizado (3x NPK). As raízes apresentaram concentrações de potássio menores do que na parte aérea e não houve influência significativa dos fatores estudados nesta variável.

Tabela 6. Concentração de Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn e B em parte aérea e raízes de plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) crescidas em solos com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização de N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes o recomendado para a cultura de alface.

Fertilização NPK	Cd	Ca	Mg	S	Fe	Mn	Cu	Zn	B
	mg kg ⁻¹	g kg ⁻¹			mg kg ⁻¹				
Parte aérea									
1x NPK	Cd 0	14,58 a A	3,52 a B	3,60 a A	288 b A	252a A	5,42 a B	58,12 a A	30,52 a A
	Cd 10	14,97 a A	3,38 a B	3,77 a B	564 a A	253a A	5,35 a B	68,12 a B	29,0 a A
3x NPK	Cd 0	10,78 a B	4,78 a A	3,53 b A	242 a A	199a B	7,03 b A	60,83 b A	27,57 b A
	Cd 10	13,10 a A	5,48 a A	4,93 a A	329 a B	251 a A	9,2 a A	94,02 a A	35,68 a A
Raiz									
1x NPK	Cd 0	8,65 a A	2,90 b A	5,13 a A	8750 a A	117a A	15,88 a A	41,17 a A	61,4 a A
	Cd 10	6,42 b A	4,33 a A	4,48 a A	9170 a A	79 a A	16,0 a A	26,27 b A	58,18 a A
3x NPK	Cd 0	7,54 a A	3,28 a A	4,84 a A	7331 a A	161 a A	12,42 a A	31,06 a B	68,66 a A
	Cd 10	5,70 b A	2,52 a B	5,52 a A	7919 a A	108 b A	14,37 a A	28,55 a A	80,38 a A
CV (%)	Parte aérea	15,65	14,47	14,92	45,61	18,00	12,36	15,15	18,16
	Raiz	19,33	28,35	23,80	31,80	35,38	27,29	22,99	31,31

Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd, dentro de cada tratamento de N, P e K e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K, dentro de cada nível de Cd pelo teste de Tukey (P < 0,05). CV (%) – coeficiente de variação.

Concentração de outros nutrientes na planta

A concentração de S, Zn, Cu e B na parte aérea da alface foi significativamente maior nas plantas crescidas no solo com adição de Cd e 3x NPK, do que em plantas no solo sem Cd e na mesma condição de fertilização de N, P e K (Tabela 6). A concentração de Fe aumentou significativamente na parte aérea das plantas crescidas no solo com Cd e 1x NPK, em relação àquelas no mesmo nível de fertilização e sem Cd. Já a concentração de cálcio (Ca) foi reduzida nas folhas de plantas crescidas com Cd e 3x NPK e sua concentração nas raízes foi significativamente reduzida na presença de Cd nos solos com 1x NPK e 3x NPK (Tabela 6).

Nas raízes de plantas cultivadas em 1x NPK e presença de Cd foi observado aumento significativo na concentração de Mg e redução significativa na concentração de Zn, enquanto para o tratamento com Cd e 3x NPK, houve redução significativa da concentração de Mn presente nas raízes (Tabela 6).

Concentração de nitrato, amônio e aminoácidos totais nas folhas

A concentração de nitrato nas folhas de alface apresentou redução significativa nas plantas que cresceram com Cd e 1x NPK em comparação com as crescidas em solo com Cd e superfertilização do solo, apresentando valores médios mínimos de 2.482 mg kg⁻¹ MS e máximos de 3.892 mg kg⁻¹ MS (Figura 5 A).

Em termos de massa fresca a concentração de nitrato apresentou padrão igual ao observado em termos de massa seca e os valores médios mínimos e máximos foram de 99 mg kg⁻¹ e 193 mg kg⁻¹ MF, respectivamente. (Figura 5 B).

A concentração de amônio apresentou padrão inverso ao observado para nitrato, com aumento significativo nas plantas crescidas com 3x NPK e sem adição de Cd, chegando ao valor máximo médio de 8,6 nmol kg⁻¹ MS (Figura 5 C).

A concentração de aminoácidos solúveis totais nas folhas de alface foi significativamente alterada pela superfertilização com N, P e K em plantas crescendo em ambos os níveis de Cd estudados, com aumento de 3,2 vezes em plantas crescendo no solo com adição de Cd e 2,5 vezes em plantas crescidas em solo sem Cd, quando comparadas ao grupo com 1x NPK, respectivamente (Figura 5 D).

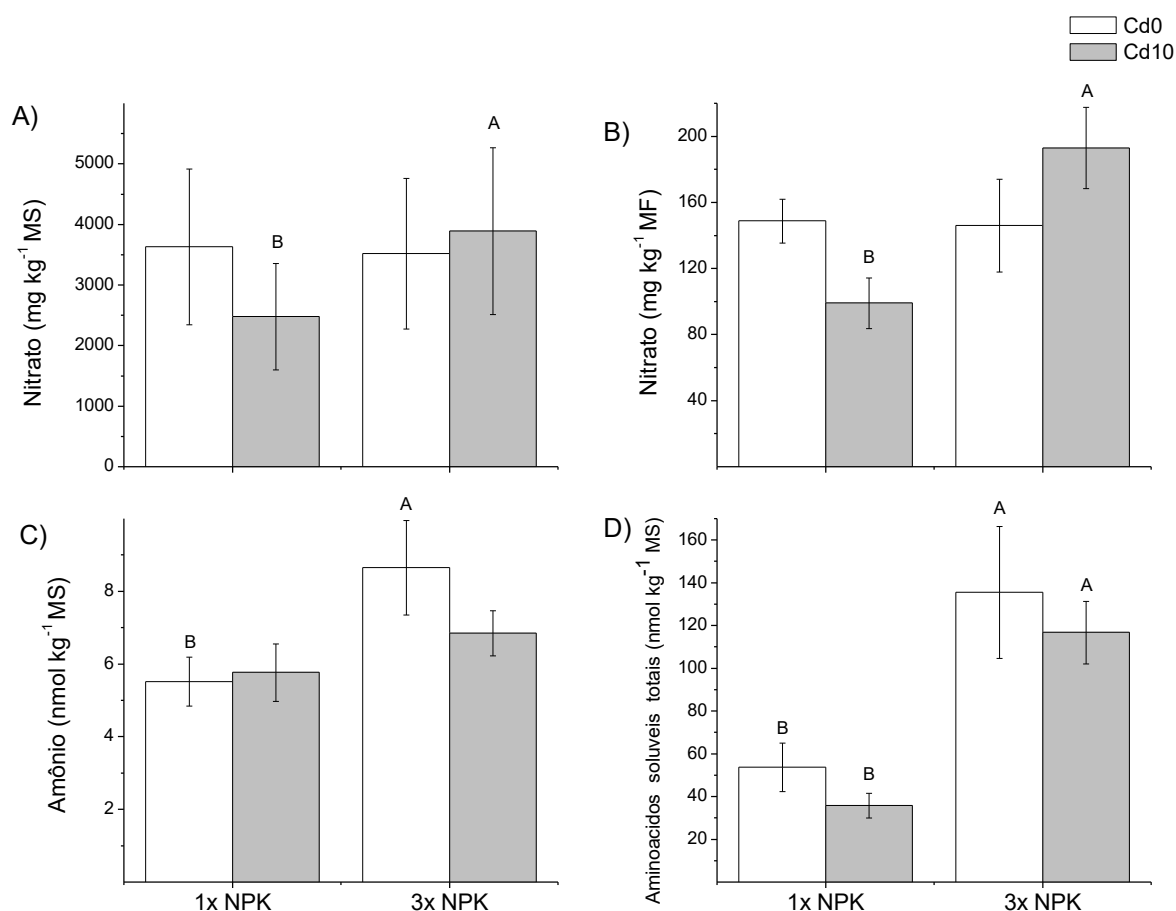


Figura 5. Concentração foliar de nitrato nas massa seca (A) e fresca (B), amônio (C) e aminoácidos solúveis totais (D) de plantas de alface (*Lactuca sativa* var. Gloriosa) cultivadas em solos com (Cd 10) e sem (Cd 0) adição de cádmio e com níveis de fertilização N, P e K de uma (1x NPK) e três (3x NPK) vezes o recomendado para a cultura de alface. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos com e sem Cd, dentro de cada tratamento de N, P e K e letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de N, P e K, dentro de cada nível de Cd pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). Ausência de letras indica que não houve diferença significativa. Barras: $\pm$ erro padrão ($n = 8$).

Análise dos componentes principais

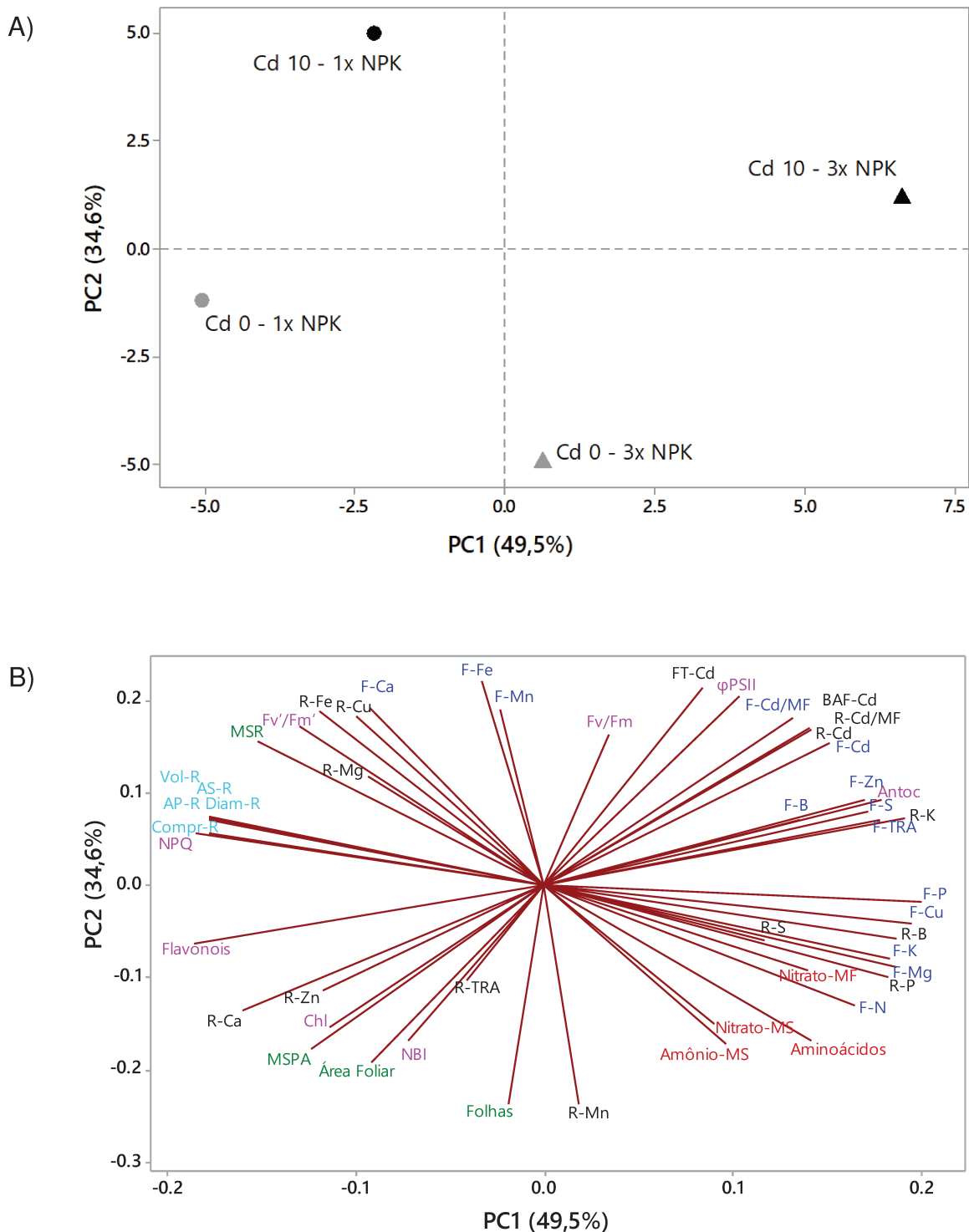


Figura 6. Agrupamento dos tratamentos experimentais por Análise de Componentes Principais (A) e gráfico bidimensional (loading plot) (B) das variáveis analisadas dispersas nos componentes 1 e 2. **Cd 0 – 1 x NPK:** Sem adição de Cd e uma vez a dose de NPK; **Cd 0 – 3 x NPK:** Sem adição de Cd e três vezes a dose de NPK; **Cd 10 – 1 x NPK:** Com adição de Cd e uma vez a dose de NPK; **Cd 10 – 3 x NPK:** Com adição de Cd e três vezes a dose de NPK.

Abreviações: **MSPA**: massa seca da parte aérea, **MSR**: massa seca de raiz, **Folhas**: número de folhas, **Chl**: concentração de clorofila, **Antoc**: concentração de antocianinas, **Vol-R**: volume de raiz, **Compr-R**: comprimento de raiz, **Diam-R**: diâmetro médio da raiz, **AS-R**: área superficial da raiz, **R-N, R-P, R-K, R-Ca, R-Mg, R-S, R-Fe, R-Mn, R-Cu, R-Zn e R-B**: concentração de nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn e B na raiz, **F-N, F-P, F-K, F-Ca, F-Mg, F-S, F-Fe, F-Mn, F-Cu, F-Zn e F-B**: concentração de nutrientes N, P, K, Ca, Mg, S, Fe, Mn, Cu, Zn e B nas folhas. **R-TRA e F-TRA**: teor relativo de água nas raízes e folhas, respectivamente, **FT-Cd**: fator de translocação do Cd, **BAF-Cd**: Fator de bioacumulação do Cd, **R-Cd/MF**: concentração de Cd por massa fresca da raiz, **R-Cd**: concentração de Cd por massa seca da raiz, **F-Cd/MF**: concentração de Cd por massa fresca da folha, **F-Cd**: concentração de Cd por massa seca da folha.

Discussão

O aumento significativo da concentração de Cd em plantas com três vezes a dose recomendada de N, P e K evidencia claramente a relação positiva existente entre a fertilização e o acúmulo do metal pela alface. Isso pôde ser afirmado pelo aumento de 53% na concentração de Cd na parte aérea e 85% do Cd na raiz das plantas crescidas no solo com alta fertilização em relação às plantas crescidas em 1x NPK (Figura 3.A).

As concentrações de Cd na parte aérea da alface, em termos de MF (Figura 3.B) chegaram a $8,05 \text{ mg kg}^{-1}$, e por tanto, ultrapassaram significativamente os limites estipulados pela ANVISA, de $0,2 \text{ mg Cd kg}^{-1}$ para a hortaliça fresca, assim como o valor máximo de 2 mg Cd kg^{-1} , que é o valor máximo permitido para conteúdo de Cd em qualquer alimento. Outra observação de interesse é que as concentrações de Cd foram maiores na parte aérea do que na raiz das plantas de alface. A alta capacidade da alface “gloriosa” em absorver, translocar e acumular o Cd na parte aérea é corroborada pelos fatores de translocação (FT) e de bioacumulação (FBA) de Cd na alface (Tabela 5), que foram ambos maiores do que 1 em plantas crescidas no solo com adição de Cd e em ambos os níveis de fertilização com N, P e K. Esses valores evidenciam a indicação dessa variedade como acumuladora de Cd (Rezvani and Zaefarian 2011), enquanto outros ensaios, conduzidos em hidroponia, demonstraram a capacidade acumulativa da alface para Cd (Benzarti et al. 2008; Zorrigh et al. 2013), com concentrações de $350 \text{ } \mu\text{g Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ para alfaces da variedade “divina” cultivadas em 330 mL de solução nutritiva contendo $15 \text{ } \mu\text{g}$ de CdCl_2 . Esses valores foram de qualquer forma bem menores aos observados no presente estudo, com concentrações de até $160 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ MS}$ na parte aérea.

O risco do consumidor ingerir níveis de Cd acima do permitido pelo consumo de alface contaminada pode ser ainda maior pelo fato da ausência de sintomas visuais de toxicidade por Cd nas folhas, como clorose, necrose e/ou desidratação, por exemplo, contrariamente aos resultados relatados por Monteiro et al., (2009) para plantas de alface lisa expostas a $100 \text{ } \mu\text{M}$ Cd em sistema de hidroponia, as quais apresentaram clorose, senescência induzida e redução da capacidade fotossintética.

Pelo observado na análise de componentes principais (Figuras 6 A e B), em geral, o efeito da adição de Cd para a alface foi mais notado nas variáveis analisadas

na parte aérea, em especial no tratamento com 3x NPK onde houve maior acúmulo de Cd nas folhas e foi observada maior magnitude das variáveis de nutrientes foliares, principalmente o Zn, S, P e K. Nas plantas crescidas com adição de Cd no solo e 1x NPK o Fe foi o nutriente de maior relevância na discriminação desse grupo, com aumento significativo da sua concentração na parte aérea.

A manutenção de um status mineral adequado possui relação com à capacidade de tolerância da planta ao estresse por Cd (Nazar et al. 2012). No geral, neste trabalho os macro e micronutrientes presentes na parte aérea ficaram dentro das faixas de concentração estabelecidas como adequadas para folhas de alface (Trani, 2007; Boletim 100, 1996) com exceção do Ca que apresentou teores levemente mais baixos que os adequados ($15\text{-}25\text{ g kg}^{-1}$) em plantas com 3x NPK e do S, Mn e Fe que foram mais altos do que o adequado ($50\text{-}150$, $1,5\text{-}2,5$ e $30\text{-}150\text{ mg kg}^{-1}$ para o Fe, S e Mn, respectivamente) (Boletim 100, 1996).

O aumento na concentração de P, K, Mg e Fe na parte aérea das plantas crescidas no solo com maior concentração de Cd pode estar relacionado com a capacidade da variedade 'Gloriosa' em absorver e usar minerais também como mecanismo de defesa contra à exposição ao Cd, usando-os também como quelantes para metais tóxicos como já foi sugerido por (Antosiewicz 1995; Haque et al. 2009; Gusman et al. 2013). O Fe, que possui papel importante na preservação do aparato fotossintético das plantas, na biossíntese da clorofila e nas reações que ocorrem no fotossistema II (PSII) (Tanaka et al. 1998; Amann et al. 2004), em plantas acumuladoras de Cd tem capacidade de estabilizar os tilacóides e atuar na manutenção de níveis dos pigmentos fotossintetizantes no cloroplasto (Qureshi et al. 2010). Enquanto o S é intimamente associado com a composição de PC e outros compostos quelantes como o tripeptídeo GSH, sua absorção e assimilação é fundamental para a sobrevivência de plantas sob estresse por Cd e outros metais (Fan et al. 2010; Gill and Tuteja 2011). O aumento na concentração desses compostos com função detoxificante pode estar associado com a ausência de sintomas visuais de toxicidade por Cd nas plantas contaminadas por Cd, assim como ao funcionamento adequado dos fotossistemas (Tabela 4). A concentração de S na parte aérea foi maior em plantas expostas ao Cd e com três vezes a dose recomendada de N, P e K. Esse aumento de S no tratamento de 3x NPK pode ser relacionado com a presença de S

na composição do supersimples utilizado como fertilizante fosfatado, mas é perceptível o efeito da interação entre a fertilização 3x NPK e a adição do Cd para o aumento na concentração de S nas plantas em comparação com as plantas que foram cultivadas sem Cd em 3x NPK. Outros trabalhos já tinham relacionado o aumento na absorção e S com a presença de metais pesados como o Cd (de Andrade and Da Silveira 2008), e sugerido a sua relação com a maior demanda de compostos ricos em tiois envolvidos na quelação dos íons Cd^{2+} (Nocito et al. 2002). Foi demonstrado em plantas de *Arabidopsis* que após o estresse por Cd a via de assimilação de S foi induzida, aumentando a transcrição de genes ATP- sulfúrilase (APS3), APS redutase (PRH19 e PRH43) e sulfito redutase (SiR), relacionados com o suprimento maior de GSH para biossíntese de PC (Harada et al. 2002). O aumento na transcrição desses genes foi positivamente relacionado com a concentração de Cd a qual a planta foi exposta (Harada et al. 2002).

O Zn é um constituinte proteico e co-fator enzimático, atuando essencialmente na regulação e atividade da estrutura de proteínas. Na absorção de Zn estão envolvidos diferentes transportadores da família ZIP, os quais fazem parte do processo de captação de cátions metálicos nas raízes, sendo possivelmente um dos componentes envolvidos na hiperacumulação de Cd (Krämer et al. 2007). O Fe por sua vez, está intimamente relacionado ao transporte de Cd compartilhando os mesmos transportadores oriundos de genes *AtNramp*, os quais podem ser induzidos e/ou modulados pelas concentrações de Fe presentes no solo (Lombi et al. 2002). Dessa forma, o aumento observado nesses nutrientes pode estar também relacionado com a atividade hiperacumuladora de Cd na variedade Gloriosa de alface.

O Mn atua nos sistemas enzimáticos da planta participando do processo de fotólise da água na fotossíntese e também na assimilação do nitrato (Tian et al, 2016). Sua disponibilidade no solo está fortemente relacionada à concentração de íons presentes no substrato, sendo mais liberado das partículas às quais está adsorvido quanto maior for o acúmulo de sais no solo (Miyazawa et al 1993). O Mn, por possuir o maior fluxo difusivo entre os micronutrientes catiônicos é possivelmente o primeiro a ser adsorvido no solo (Miyazawa et al 1993). Neste experimento o aumento na concentração de Mn observados após a adição de CdCl_2 e os fertilizantes de N, P e K ao solo (Tabela 2) refletiu na concentração de Mn na parte aérea, que estava

levemente acima do esperado para plantas de alface ($35 - 150 \text{ mg kg}^{-1}$). Esse incremento no Mn foliar pode estar relacionado com o bom funcionamento do aparato fotossintético da planta, observado pelos parâmetros da fluorescência da clorofila *a* (Tabela 4), que indicam eficiência da atividade fotoquímica, os quais não foram alterados pela presença do Cd ou pela fertilização N, P e K

De acordo com o observado na ACP (Figuras 6, A e B) a separação dos tratamentos de 1x e 3x NPK no solo teve maior magnitude para as variáveis relacionadas com a raiz, como características morfológicas e produção de biomassa, assim como para as variáveis de concentração de nitrato, amônio e aminoácidos solúveis totais nas folhas. Sendo que a adição de 3x NPK resultou em diminuição significativa da produção de raízes e aumento na concentração de compostos nitrogenados (nitratos, amônio e aminoácidos livres) na parte aérea.

O fato de incrementar em três vezes a recomendação de fertilização de N, P e K não influenciou a produção de biomassa da parte aérea da alface, que não aumentou em resposta ao acréscimo de fertilização do solo, assim como visto em outros ensaios, onde já foi demonstrado que o alto suprimento de nutrientes não aumenta a produção de biomassa foliar em alface (Albornoz and Heinrich Lieth 2015). O pequeno aumento na alocação de biomassa na parte aérea das plantas superfertilizadas (Figura 1. A) demonstra a desvantagem econômica de se investir em maiores quantidades de fertilização em detrimento de produção muito similar a adquirida nas alfaces cultivadas em 1x NPK.

O efeito negativo do Cd sobre o crescimento da planta com redução da biomassa e área foliar (Figura 1.A e 1.B), relatados por (Ci et al., 2010) foi observado somente nas plantas crescidas com a combinação entre três vezes a recomendação de N, P e K, e a adição de 10 mg Cd kg^{-1} no solo. As plantas nesse tratamento também apresentaram diminuição dos índices de clorofila e aumento de antocianinas (Tabela 4), o que pode estar relacionado com a diminuição do crescimento, além de ser indicativo do estresse causado pelo acúmulo do metal pesado nas folhas das plantas nessas condições (Lagriffoul et al. 1998; Mobin and Khan 2007; Parmar et al. 2013). O aumento significativo do TRA da parte aérea de plantas com 3x NPK e Cd, possivelmente está associado ao aumento da concentração de nutrientes observado nesse grupo de plantas, considerando-se a grande capacidade da alface em acumular

metabólitos em seus vacúolos (Byrne et al, 2002), esse acúmulo de metabólitos atuaria facilitando a entrada e acúmulo de água nos tecidos da parte aérea da alface e permitindo que a planta não tenha seu crescimento prejudicado, uma vez que o solo com maior nível de fertilização e com adição de Cd possivelmente teria maior força iônica e causaria estresse salino e osmótico nas plantas (Bartels et al, 2005).

A produção de raízes foi afetada por ambos os tratamentos com Cd e N, P e K. O efeito do Cd, entretanto, foi percebido apenas nas plantas crescidas em 1x NPK com alteração na concentração dos nutrientes Zn, Mg e Ca e diminuição nos parâmetros de morfologia radicular, em comparação às plantas crescidas em 1x NPK sem Cd. A concentração de Ca e Mn foi diminuída enquanto os valores de Mg e Zn aumentaram significativamente nas raízes expostas ao Cd. Em raízes de soja (*Glycine max*), cultivadas em 140 nmol de CdCl₂ foram observados resultados semelhantes, com aumento da concentração de Zn e pequeno aumento de Ca (Andresen et al., 2019) enquanto raízes de tomate apresentaram diminuição na concentração de Mn (Borges et al, 2019). Parâmetros da morfologia radicular (Figura 2) responderam a presença de Cd em 1x NPK, com diminuição no diâmetro médio, comprimento e área superficial das raízes. Efeito semelhante foi descrito para raízes de tomate (*Solanum lycopersicum*) expostas a solução nutritiva com 35 µM de CdCl₂ em hidroponia, as quais apresentaram redução de 75% do seu comprimento e de 50 % da área superficial em relação as raízes das plantas controle, sem Cd (Borges et al, 2019). Plantas de amendoim (*Arachis hypogaea*) expostas a 20 µM de CdCl₂ em hidroponia, também apresentaram diminuição da área superficial e comprimento da raiz, mas sem alteração do seu volume (Lu et al., 2013), assim como o observado nas raízes de alface crescidas em 1x NPK.

A alta disponibilidade de nutrientes no solo que recebeu três vezes o recomendado de N, P e K também contribuiu para a diminuição da biomassa, diâmetro, comprimento e a área superficial das raízes, sendo que neste tratamento não foi observada a influência do Cd (Figuras 1 e 2). A diminuição da raiz em resposta ao aumento de nutrientes disponíveis também foi observada em alface cultivada em hidroponia com níveis crescentes de soluções fertilizantes (Albornoz and Heinrich Lieth 2015). A diminuição da raiz em geral, está associada com a redução da partilha de recursos com às raízes em plantas cultivadas em altas disponibilidades de

nutrientes (Poorter et al. 2012). O excesso de P inorgânico no solo pode ser inibidor do crescimento primário das raízes ao atenuar a atividade meristemática, esse efeito foi observado em raízes de *Arabidopsis* cultivadas a partir de 1,25 mM de P que apresentaram arquitetura radicular mais curta, rasa e menos ramificada, acima de 2,5 mM de P foi observado também diminuição do comprimento total e da raiz primária (Shukla et al., 2017).

Neste trabalho o solo utilizado foi um solo natural não estéril, e que, por tanto, deveria possuir propágulos de FMAs nativos do solo. A ausência de simbiose micorrízica nas raízes da alface neste experimento possivelmente está relacionada às altas concentrações de P disponível no solo, tanto no tratamento com uma vez a recomendação de N, P e K, quanto no tratamento com três vezes essa dose. A adição de fertilizante fosfatado pode ter prejudicado a simbiose entre os FMAs nativos do solo e as raízes de alface, no entanto, a ausência de tratamento sem fertilização do solo nos impede afirmar que essa foi realmente a causa da ausência de micorrização das plantas. Essas concentrações de P_{resina} no solo foram de 116 e 448 mg dm⁻³, nos solos com 1x e 3 x N, P e K (Tabela 2). Condições similares de inibição da simbiose micorrízica por altos níveis de P inorgânico já foram descritas na literatura (Mosse and Phillips 1971; Graham et al. 1981; Schroeder and Janos 2005). É conhecido que plantas com status alto ou suficiente de P podem ter a iniciação da simbiose micorrízica inibida. E foi observado em plantas com a simbiose micorrízica já estabelecida, que a formação de novos arbúsculos é rapidamente inibida após a aplicação de P inorgânico, prejudicando assim a interface simbiótica onde ocorrem a troca de nutrientes entre hospede e hospedeiro. (Vierheilig et al. 2000; Kobae et al. 2016; Müller and Harrison 2019). Várias vias sinalizadoras regulam e controlam o status de fósforo na planta e a formação e desenvolvimento da simbiose micorrízica, nestas vias estão envolvidos sinalizadores hormonais, microRNAs e peptídeos (Müller and Harrison 2019).

As concentrações de N na parte aérea (Figura 4) estavam de acordo com o adequado para alface (Trani, 2007), tanto nas plantas com uma vez como em aquelas com três vezes a dose recomendada de N, P e K. Para o nitrato (Figura 5), a concentração nas folhas de alface chegaram ao valor máximo de 193 mg kg⁻¹ MF ficando dentro dos valores considerados adequados para o consumo humano (McCall

and Willumsen 1998), próximos dos valores médios de 300 mg NO₃ kg⁻¹ MF, observados em alfaces de cultivo convencional crescidas na primavera com fertilização NPK de formulação 12:12:17 (Kapoulas et al. 2017) e abaixo dos valores médios de 939 mg kg⁻¹ MS, observados em cultivo convencional no campo para plantas de alface crespas comercializadas no inverno (Beninni et al. 2002). O conteúdo de nitrato em alface pode ser modificado por efeitos sazonais, de temperatura, pluviosidade e luminosidade sendo esperadas diminuições nas concentrações em cultivos feitos no verão, durante altas luminosidades e temperaturas, devido à maior taxa de assimilação de nitrato nestas condições. Essas variações são esperadas e bem documentadas na literatura (Cantliffe 1972; Richardson and Hardgrave 1992; Kanaan and Economakis 1993; Da Luz et al. 2008).

O aumento no conteúdo de nitrato em plantas crescidas em 3x NPK e Cd em relação aos demais tratamentos, (Figura 5) pode estar associada às alterações observadas na arquitetura radicular das plantas causadas pelo Cd. Como visto em raízes de milho expostas à 10 µM de Cd, as quais apresentaram alteração na expressão de genes transportadores da família NRT/PTR, reprimindo a expressão de transportadores de NO₃⁻ de alta afinidade, enquanto os de baixa afinidade não aparentaram ser afetados pela presença de Cd (Rizzardo et al., 2012). Nas plantas crescidas em 3x NPK não foi observado efeito do Cd na morfologia radicular e o aumento na concentração de N disponível no solo possivelmente se sobrepôs ao efeito do Cd e a redução do nitrato não foi observada. O aumento significativo na concentração de aminoácidos solúveis totais nas folhas de alface cultivadas com 3x NPK sugerem maior transporte e assimilação de nitrato pela planta nessas condições experimentais.

Conclusão

Os resultados obtidos mostram que o nível de fertilização de N, P e K influencia de forma clara a absorção de Cd em plantas de alface, aumentando principalmente a concentração deste elemento na parte aérea das plantas, composta principalmente das folhas, no caso da alface. Outro aspecto que ficou evidente é a capacidade da alface como acumuladora e extratora de Cd, uma vez que acumulou maior concentração de Cd na parte aérea do que nas raízes.

A absorção e translocação de Cd para a parte aérea da alface não influenciou negativamente o metabolismo nutricional da planta e a espécie hortícola se mostrou bastante tolerante às altas concentrações de Cd no solo, sem sintomas visuais de toxicidade por Cd e com produção de biomassa, no geral, muito similar à encontrada em solos sem presença do metal. O excesso de fertilização alterou a produção e morfologia das raízes e não aumentou os níveis de nitratos, e outros compostos nitrogenados nas folhas de alface. O uso de doses de N, P e K acima das recomendadas para o cultivo da alface não reverteu em maior produção de biomassa, demonstrando não haver vantagem econômica no uso de fertilizantes acima da dose recomendada.

Os valores de FT e FBA de Cd na alface, corroboram a alta capacidade extratora da planta para esse metal pesado, colocando a planta no grupo de hiperacumuladoras para Cd, com até 160,9 mg kg⁻¹ de Cd na parte aérea. Estes resultados revelam o risco de contaminação por acúmulo de metal pesado de um produto hortícola amplamente comercializado e cujo as folhas são consumidas pela população. O acréscimo na concentração de Cd da planta em resposta ao aumento de fertilização N, P e K é um fator de grande perigo que deve ser considerado durante a produção e manejo agrícola da alface, uma vez que mesmo dentro das concentrações de Cd consideradas adequadas para solos agrícolas houve grande acúmulo do metal nas plantas cultivadas. A fim de minimizar esses riscos seria necessário então, estabelecer doses seguras de fertilização contendo N, P e K para o cultivo da alface evitar o acúmulo de Cd nessa espécie, caso o solo estivesse contaminado com o metal.

Referências Bibliográficas

- Abreu Junior CH, Muraoka T, Lavorante AF, V. FCA (2000) Condutividade elétrica, reação do solo e acidez potencial em solos adubados com composto de lixo. *Rev Bras Ciência do Solo* 24:635–647. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832000000300016>
- Addiscott TM, Benjamin N (2006) Nitrate and human health. *Soil Use Manag* 20:98–104. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2004.tb00344.x>
- Agência nacional de vigilância sanitária - ANVISA. Resolução RDC Nº 42 de 29 de agosto de 2013. Ministério da Saúde - MS. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/29081> Acesso em junho 2019
- Agency for toxic substances and disease registry – ATSDR. US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES et al. Agency for Toxic Substances & disease registry. Disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=15> Acesso em junho 2019.
- Aidid SB, Okamoto H (1992) Effects of lead, cadmium and zinc on the electric membrane potential at the xylem/symplast interface and cell elongation of *Impatiens balsamina*. *Environ Exp Bot* 32:439–448. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90056-8](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90056-8)
- Albornoz F, Heinrich Lieth J (2015) Over fertilization limits lettuce productivity because of osmotic stress. *Chil J Agric Res* 75:284–290. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392015000400003>
- Alloway BJ (ed) (1995) *Environmental Pollution 22: Heavy Metals in Soil: Trace Metals and Metalloids in Soils and their Bioavailability*, 3rd edn. Springer, Heidelberg
- Amann K, Lezhneva L, Wanner G, et al (2004) ACCUMULATION OF PHOTOSYSTEM ONE1, a member of a novel gene family, is required for accumulation of [4Fe-4S] cluster-containing chloroplast complexes and antenna proteins. *Plant Cell* 16:3084–3097. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.024935>
- Andersson A, Siman G (1991) Levels of Cd and Some Other Trace Elements in Soils And Crops as Influenced by Lime and Fertilizer Level. *Acta Agric Scand* 41:3–11. <https://doi.org/10.1080/00015129109438579>
- Andresen, E., Lyubenova, L., Hubáček, T., Bokhari, S. N. H., Matoušková, Š., Mijovilovich, A., ... & Küpper, H. (2019). Chronic exposure of soybean plants to nanomolar cadmium reveals specific additional high-affinity targets of Cd toxicity. *Journal of experimental botany*.

- Antosiewicz DM (1995) The relationships between constitutional and inducible Pb-tolerance and tolerance to mineral deficits in *Biscutella laevigata* and *Silene inflata*. *Environ Exp Bot* 35:55–69. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(94\)00026-2](https://doi.org/10.1016/0098-8472(94)00026-2)
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, 24(1), 23-58.
- Balestrasse KB, Benavides MP, Gallego SM, Tomaro ML (2003) Effect of cadmium stress on nitrogen metabolism in nodules and roots of soybean plants. *Funct Plant Biol* 30:57–64. <https://doi.org/10.1071/FP02074>
- Beninni ERY, Takahashi HW, Neves CSVJ, Fonseca IC de B (2002) Teor de nitrato em alface cultivada em sistemas hidropônico e convencional. *Hortic Bras* 20:183–186. <https://doi.org/10.1590/s0102-05362002000200013>
- Benzarti S, Mohri S, Ono Y (2008) Plant response to heavy metal toxicity: Comparative study between the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* (ecotype Ganges) and nonaccumulator plants: Lettuce, radish, and alfalfa. *Environ Toxicol* 23:607–616. <https://doi.org/10.1002/tox.20405>
- Bieleski RL, Turner NA (1966) Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. *Anal Biochem* 17:278–93. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(66\)90206-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(66)90206-5)
- Boletim 100, 1996. In: van Raij, B., Cantarella, H., Quaggio, J.A., Furlani, A.M.C. (Eds.), *Recomendações de Adubação e Calagem Para o Estado de São Paulo*. IAC, Campinas, pp. 10–12.
- Borges, K. L. R., Hippler, F. W. R., Carvalho, M. E. A., Nalin, R. S., Matias, F. I., & Azevedo, R. A. (2019). Nutritional status and root morphology of tomato under Cd-induced stress: Comparing contrasting genotypes for metal-tolerance. *Scientia horticultrae*, 246, 518-527.
- Bremner JM (1960) Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *J Agric Sci* 55:11–33. <https://doi.org/10.1017/S0021859600021572>
- Byrne C; Maher MJ; Hennerty MJ; Mahon MJ; Walshe PA. 2002. Reducing the nitrate content of protected lettuce. *Irish Agriculture and Food Development Authority*. Dublin: University College, 19 p
- Cantliffe DJ (1972) Nitrate accumulation in spinach grown under different light intensities. *Amer Soc Hort Sci J*
- Cataldo DA, Haroon MH, Schrader LE, Youngs VL (1975) Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Commun Soil Sci Plant Anal* 6:71–80. <https://doi.org/10.1080/00103627509366547>

- Ci D, Jiang D, Wollenweber B, et al (2010) Cadmium stress in wheat seedlings: Growth, cadmium accumulation and photosynthesis. *Acta Physiol Plant* 32:365–373. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0414-0>
- Clemens S, Aarts MGM, Thomine S, Verbruggen N (2013) Plant science: The key to preventing slow cadmium poisoning. *Trends Plant Sci.* 18:92–99
- Cloquet C, Carignan J, Libourel G, et al (2006) Tracing source pollution in soils using cadmium and lead isotopes. *Environ Sci Technol* 40:2525–30. <https://doi.org/10.1021/es052232+>
- Cobbett C, Goldsbrough P (2002) PHYTOCHELATINS AND METALLOTHIONEINS : Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis . *Annu Rev Plant Biol* 53:159–182. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.100301.135154>
- Cocking ec, Yemm ew (1954) Estimation of amino acids by ninhydrin. *Biochem J* 58:xii
- Cohen CK, Fox TC, Garvin DF, Kochian L V. (1998) The Role of Iron-Deficiency Stress Responses in Stimulating Heavy-Metal Transport in Plants. *Plant Physiol* 116:1063–1072. <https://doi.org/10.1104/pp.116.3.1063>
- Companhia de entrepostos e armazéns gerais de são paulo - CEAGESP. Alface americana. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/guia-ceagesp/alface-americana/> Acesso em junho 2019
- Companhia de tecnologia ambiental do estado de são paulo – CETESB. Ficha de Informação Toxicológica: Cádmio e seus compostos. Não Publicado. 2012
- Companhia de tecnologia ambiental do estado de são paulo – CETESB. Valores orientadores para solo e água subterrânea no estado de São Paulo Não Publicado. 2014
- Da Luz GL, Medeiros SLP, Manfron PA, et al (2008) A questão do nitrato em alface hidropônica e a saúde humana. *Cienc. Rural* 38:2388–2394
- Dalcorso G, Farinati S, Furini A (2010) Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal. Behav.* 5:663–667
- De Almeida EL, Marcos FCC, Schiavinato MA, et al (2008) Crescimento de feijão-de-porco na presença de chumbo. *Bragantia* 67:569–576. <https://doi.org/10.1590/s0006-87052008000300003>
- de Andrade SAL, Da Silveira APD (2008) Mycorrhiza influence on maize development under Cd stress and P supply. *Brazilian J Plant Physiol* 20:39–50. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202008000100005>

- De Andrade SAL, Da Silveira APD (2004) Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. *Pesqui Agropecu Bras* 39:1191–1198. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2004001200005>
- De Andrade SAL, Da Silveira APD, Jorge RA, De Abreu MF (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *Int J Phytoremediation* 10:1–13. <https://doi.org/10.1080/15226510701827002>
- Echer R, Lovatto P, Trecha C, Schiedeck G (2016) Alface à mesa: Implicações sócio-econômicas e ambientais da semente ao prato. *Rev Thema* 17–29. <https://doi.org/10.15536/thema.13.2016.17-29.361>
- Ellis KJ, Morgan WD, Zanzi I, et al (1981) Critical concentrations of cadmium in human renal cortex: Dose-effect studies in cadmium smelter workers. *J Toxicol Environ Health* 7:691–703. <https://doi.org/10.1080/15287398109530012>
- Endo T, Yamamoto S, Larrinaga JA, et al (2011) Status and Causes of Soil Salinization of Irrigated Agricultural Lands in Southern Baja California, Mexico. *Appl Environ Soil Sci* 2011:1–12. <https://doi.org/10.1155/2011/873625>
- Fan JL, Hu ZY, Ziadi N, et al (2010) Excessive sulfur supply reduces cadmium accumulation in brown rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Pollut* 158:409–415. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.042>
- Ferreira DF (2011) Sisvar: Um sistema computacional de análise estatística. *Cienc. e Agrotecnologia* 35:1039–1042
- Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, et al (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environ. Exp. Bot.* 83:33–46
- Garate A, Ramos I, Manzanares M, Lucena JJ (1993) Cadmium uptake and distribution in three cultivars of *Lactuca* sp. *Bull Environ Contam Toxicol* 50:709–16. <https://doi.org/10.1007/bf00194666>
- Garg N, Bhandari P (2014) Cadmium toxicity in crop plants and its alleviation by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi: An overview. *Plant Biosyst* 148:609–621. <https://doi.org/10.1080/11263504.2013.788096>
- Gill SS, Tuteja N (2011) Cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Signal Behav* 6:215–222. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14880>
- Gonçalves VC, Meurer EJ, Tatsch FRP, et al (2008) Biodisponibilidade de cádmio em fertilizantes fosfatados. *Rev Bras Ciência do Solo* 32:2871–2875. <https://doi.org/10.1590/s0100-06832008000700034>
- Graham JH, Leonard RT, Menge JA (1981) Membrane-Mediated Decrease in Root Exudation Responsible for Phosphorus Inhibition of Vesicular-Arbuscular

- Mycorrhiza Formation. *Plant Physiol* 68:548–552.
<https://doi.org/10.1104/pp.68.3.548>
- Grant CA, Buckley WT, Bailey LD, Selles F (1998) Cadmium accumulation in crops. *Can. J. Plant Sci.* 78:1–17
- Grant CA, Sheppard SC (2008) Fertilizer impacts on cadmium availability in agricultural soils and crops. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 14:210–228
- Gusman GS, Oliveira JA, Farnese FS, Cambraia J (2013) Mineral nutrition and enzymatic adaptation induced by arsenate and arsenite exposure in lettuce plants. *Plant Physiol Biochem* 71:307–314.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.08.006>
- Hall JL (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1–11
- Haque N, Peralta-Videa JR, Duarte-Gardea M, Gardea-Torresdey JL (2009) Differential effect of metals/metalloids on the growth and element uptake of mesquite plants obtained from plants grown at a copper mine tailing and commercial seeds. *Bioresour Technol* 100:6177–6182.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.06.090>
- Harada E, Yamaguchi Y, Koizumi N, Hiroshi S (2002) Cadmium stress induces production of thiol compounds and transcripts for enzymes involved in sulfur assimilation pathways in *Arabidopsis*. *J Plant Physiol* 159:445–448.
<https://doi.org/10.1078/0176-1617-00733>
- Hernández LE, Carpena-Ruiz R, Gárate A (1996) Alterations in the mineral nutrition of pea seedlings exposed to cadmium. *J Plant Nutr* 19:1581–1598.
<https://doi.org/10.1080/01904169609365223>
- Huang B, Kuo S, Bembenek R (2003) Cadmium uptake by lettuce from soil amended with phosphorus and trace element fertilizers. *Water Air Soil Pollut* 147:109–127.
<https://doi.org/10.1023/A:1024558228180>
- Huang B, Kuo S, Bembenek R (2004) Availability of cadmium in some phosphorus fertilizers to field-grown lettuce. *Water Air Soil Pollut* 158:37–51.
<https://doi.org/10.1023/B:WATE.0000044832.04770.41>
- Hussain T, Shukla GS, Chandra S V. (1987) Effects of Cadmium on Superoxide Dismutase and Lipid Peroxidation in Liver and Kidney of Growing Rats: In Vivo and In Vitro Studies. *Pharmacol Toxicol* 60:355–358.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1987.tb01526.x>
- Jiang QY, Zhuo F, Long SH, et al (2016) Can arbuscular mycorrhizal fungi reduce Cd uptake and alleviate Cd toxicity of *Lonicera japonica* grown in Cd-added soils?

Sci Rep 6:. <https://doi.org/10.1038/srep21805>

Joint Expert Committee on Food Additives FAO/ WHO. -JECFA FAO/WHO.

Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food.

WHO Food Additives Series 35, Geneva, WHO, 1996

Joner EJ (2000) The effect of long-term fertilization with organic or inorganic fertilizers on mycorrhiza-mediated phosphorus uptake in subterranean clover. *Biol Fertil Soils* 32:435–440. <https://doi.org/10.1007/s003740000279>

Kanaan SS, Economakis CD (1993) EFFECT OF CLIMATIC CONDITIONS AND TIME OF HARVEST ON GROWTH AND TISSUE NITRATE CONTENT OF LETTUCE IN NUTRIENT FILM CULTURE. *Acta Horti* 75–80. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1993.323.5>

Kapoulas N, Koukounaras A, Ilić ZS (2017) Nutritional quality of lettuce and onion as companion plants from organic and conventional production in north Greece. *Sci Horti* (Amsterdam) 219:310–318. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.03.027>

Katan MB (2009) Nitrate in foods: Harmful or healthy? *Am. J. Clin. Nutr.* 90:11–12

Khan A, Khan S, Khan MA, et al (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 Int* 22:13772–99. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4881-0>

Kobae Y, Ohmori Y, Saito C, et al (2016) Phosphate treatment strongly inhibits new arbuscule development but not the maintenance of arbuscule in mycorrhizal rice roots. *Plant Physiol* 171:566–579. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00127>

Krämer U, Talke IN, Hanikenne M (2007) Transition metal transport. *FEBS Lett.* 581:2263–2272

Lagriffoul A, Mocquot B, Mench M, Vangronsveld J (1998) Cadmium toxicity effects on growth, mineral and chlorophyll contents, and activities of stress related enzymes in young maize plants (*Zea mays* L.)

Loganathan P, Hedley MJ, Gregg PEH, Currie LD (1997) Effect of phosphate fertiliser type on the accumulation and plant availability of cadmium in grassland soils. Kluwer Academic Publishers

Lombi E, Tearall KL, Howarth JR, et al (2002) Influence of iron status on cadmium and zinc uptake by different ecotypes of the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Plant Physiol* 128:1359–1367. <https://doi.org/10.1104/pp.010731>

Lu, Z., Zhang, Z., Su, Y., Liu, C., & Shi, G. (2013). Cultivar variation in morphological response of peanut roots to cadmium stress and its relation to cadmium accumulation. *Ecotoxicology and environmental safety*, 91, 147-155.

- Lugon-Moulin, N., Ryan, L., Donini, P., & Rossi, L. (2006). Cadmium content of phosphate fertilizers used for tobacco production.
- Luo JS, Zhang Z (2019) Proteomic changes in the xylem sap of *Brassica napus* under cadmium stress and functional validation. *BMC Plant Biol* 19:280. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1895-7>
- Luo N, Li X, Chen AY, et al (2017) Does arbuscular mycorrhizal fungus affect cadmium uptake and chemical forms in rice at different growth stages? *Sci Total Environ* 599–600:1564–1572. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.047>
- McCall D, Willumsen J (1998) Effects of nitrate, ammonium and chloride application on the yield and nitrate content of soil-grown lettuce. *J Hortic Sci Biotechnol* 73:698–703. <https://doi.org/10.1080/14620316.1998.11511036>
- McCullough H (1967) The determination of ammonia in whole blood by a direct colorimetric method. *Clin Chim Acta* 17:297–304. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(67\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0009-8981(67)90133-7)
- Meharg AA (2011) Trace Elements in Soils and Plants. 4th edition. By A. Kabata-Pendias. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor & Francis Group (2010), pp. 548, US\$159.95. ISBN 9781420093681. *Exp Agric* 47:739–739. <https://doi.org/10.1017/s0014479711000743>
- Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. – MAPA. Instrução normativa sda nº 27, 05 de junho de 2006 (Alterada pela IN SDA nº 7, de 12/04/2016, republicada em 02/05/2016). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/fertilizantes/legislacoes> Acesso em: outubro 2019
- Minitab 17 Statistical Software (2010). [Computer software]. State College, PA: Minitab, Inc. (www.minitab.com)
- Mobin M, Khan NA (2007) Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *J Plant Physiol* 164:601–610. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.03.003>
- Monteiro MS, Santos C, Soares AMVM, Mann RM (2009) Assessment of biomarkers of cadmium stress in lettuce. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:811–818. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.08.002>
- MOSSE B, PHILLIPS JM (1971) The Influence of Phosphate and Other Nutrients on the Development of Vesicular-arbuscular Mycorrhiza in Culture. *J Gen Microbiol* 69:157–166. <https://doi.org/10.1099/00221287-69-2-157>
- Müller LM, Harrison MJ (2019) Phytohormones, miRNAs, and peptide signals

- integrate plant phosphorus status with arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 50:132–139
- Nazar R, Iqbal N, Masood A, et al (2012) Cadmium Toxicity in Plants and Role of Mineral Nutrients in Its Alleviation. *Am J Plant Sci* 3:1476–1489.
<https://doi.org/10.4236/ajps.2012.310178>
- Nocito FF, Pirovano L, Cocucci M, Sacchi GA (2002) Cadmium-induced sulfate uptake in maize roots. *Plant Physiol* 129:1872–1879.
<https://doi.org/10.1104/pp.002659>
- Nogawa K, Tsuritani I, Kido T, et al (1987) Mechanism for bone disease found in inhabitants environmentally exposed to cadmium: decreased serum 1α , 25-dihydroxyvitamin D level. *Int Arch Occup Environ Health* 59:21–30.
<https://doi.org/10.1007/BF00377675>
- Park HC, Hwang JE, Jiang Y, et al (2019) Functional characterisation of two phytochelatin synthases in rice (*Oryza sativa* cv. Milyang 117) that respond to cadmium stress. *Plant Biol.* <https://doi.org/10.1111/plb.12991>
- Parmar P, Kumari N, Sharma V (2013) Structural and functional alterations in photosynthetic apparatus of plants under cadmium stress. *Bot. Stud.* 54
- Pavlou GC, Ehaliotis CD, Kavvadias VA (2007) Effect of organic and inorganic fertilizers applied during successive crop seasons on growth and nitrate accumulation in lettuce. *Sci Hortic (Amsterdam)* 111:319–325.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2006.11.003>
- Phillips JM, Hayman DS (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158-IN18. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(70)80110-3)
- Pierangeli MAP, Guilherme LRG, Curi N, et al (2005) Effect of pH on cadmium adsorption and desorption in brazilian oxisols. *Rev Bras Cienc do Solo* 29:523.
<https://doi.org/10.1590/S0100-06832005000400005>
- Poorter H, Niklas KJ, Reich PB, et al (2012) Biomass allocation to leaves, stems and roots: Meta-analyses of interspecific variation and environmental control. *New Phytol.* 193:30–50
- Prasad MNV (1995) Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ Exp Bot* 35:525–545. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(95\)00024-0](https://doi.org/10.1016/0098-8472(95)00024-0)
- Qureshi MI, D'Amici GM, Fagioni M, et al (2010) Iron stabilizes thylakoid protein-pigment complexes in Indian mustard during Cd-phytoremediation as revealed by BN-SDS-PAGE and ESI-MS/MS. *J Plant Physiol* 167:761–770.

<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.01.017>

- Raij, B.V.; Andrade, J.C.; Cantarella, H.; Quaggio, J.A. *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.
- Rascio N, Navari-Izzo F (2011) Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Sci.* 180:169–181
- Rauser WE (1999) Structure and function of metal chelators produced by plants: The case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins. *Cell Biochem Biophys* 31:19–48. <https://doi.org/10.1007/BF02738153>
- Raven KP, Loeppert RH (1997) Trace element composition of fertilizers and soil amendments. *J Environ Qual* 26:551–557.
<https://doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600020028x>
- Rezvani M, Zaefarian F (2011) Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in *Aeluropus littoralis*
- Richardson SJ, Hardgrave M (1992) Effect of temperature, carbon dioxide enrichment, nitrogen form and rate of nitrogen fertiliser on the yield and nitrate content of two varieties of glasshouse lettuce. *J Sci Food Agric* 59:345–349.
<https://doi.org/10.1002/jsfa.2740590311>
- Rizzardo, C., Tomasi, N., Monte, R., Varanini, Z., Nocito, F. F., Cesco, S., & Pinton, R. (2012). Cadmium inhibits the induction of high-affinity nitrate uptake in maize (*Zeamays L.*) roots. *Planta*, 236(6), 1701-1712.
- Sanità Di Toppi L, Gabbrielli R (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41:105–130
- Schroeder MS, Janos DP (2005) Plant growth, phosphorus nutrition, and root morphological responses to arbuscular mycorrhizas, phosphorus fertilization, and intraspecific density. *Mycorrhiza* 15:203–216.
<https://doi.org/10.1007/s00572-004-0324-3>
- Shukla, D., Rinehart, C. A., & Sahi, S. V. (2017). Comprehensive study of excess phosphate response reveals ethylene mediated signaling that negatively regulates plant growth and development. *Scientific reports*, 7(1), 3074.
- Smith, Sally E.; READ, David J. *Mycorrhizal symbiosis*. Academic press, 2010.
- Smolders, e., mertens, j., 2013. Cadmium. In: Alloway, B.J. (Ed.) *Heavy Metals in Soils* vol.22. Springer, Netherlands, pp. 283–311.
- Sosa A, Padilla J, Ortiz J, Etchevers JD (2012) Biomass Accumulation and its Relationship with the Demand and Concentration of Nitrogen, Phosphorus, and

- Potassium in Lettuce. *Commun Soil Sci Plant Anal* 43:121–133.
<https://doi.org/10.1080/00103624.2012.634695>
- Tanaka A, Ito H, Tanaka R, et al (1998) Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12719–12723. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12719>
- Tavares, A. T., Vaz, J. C., Haesbaert, F. M., Reyes, I. D. P., Rosa, P. H. L., Ferreira, T. A., & Nascimento, I. R. (2019). ADUBAÇÃO NPK COMO PROMOTOR DE CRESCIMENTO EM ALFACE. *AGRI-ENVIRONMENTAL SCIENCES*, 5.
- Tian, Q., Liu, N., Bai, W., Li, L., Chen, J., Reich, P. B., ... & Cheng, W. (2016). A novel soil manganese mechanism drives plant species loss with increased nitrogen deposition in a temperate steppe. *Ecology*, 97(1), 65-74.
- Trani, P.E. Calagem e adubação para hortaliças sob cultivo protegido. 2007. Artigo em Hypertexto. Disponível em:
http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/cp/index.htm>. Acesso em: 4/11/2019
- Trani P.E., Felipe Villani Purquério L, Job Borges Figueiredo G, Wilson Tivelli S (2014) Calagem e adubação da alface, almeirão, agrião d'água, chicória, coentro, espinafre e rúcula*. 1–16
- Umar S, Iqbal M (2007) Nitrate accumulation in plants, factors affecting the process, and human health implications. A review. *Agron Sustain Dev* 27:45–57.
<https://doi.org/10.1051/agro:2006021>
- Vierheilig H, Garcia-Garrido JM, Wyss U, Piché Y (2000) Systemic suppression of mycorrhizal colonization of barley roots already colonized by AM fungi. *Soil Biol Biochem* 32:589–595. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00155-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00155-8)
- Vitousek PM, Naylor R, Crews T, et al (2009) Nutrient imbalances in agricultural development. *Science* (80-.). 324:1519–1520
- Wei S, Li Y, Zhan J, et al (2012) Tolerant mechanisms of *Rorippa globosa* (Turcz.) Thell. hyperaccumulating Cd explored from root morphology. *Bioresour Technol* 118:455–459. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.049>
- Williams CH, David DJ (1973) The effect of superphosphate on the cadmium content of soils and plants. *Aust J Soil Res* 11:43–56.
<https://doi.org/10.1071/SR9730043>
- World Health Organization - WHO. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants (Sixty-fourth Report of the Joint FAO/ WHO Expert Committee on Food Additives). WHO-TRS 930-JECFA 64/26. World Health Organization, Geneva. 2006.
- Xie M, Chen W, Lai X, et al (2019) Metabolic responses and their correlations with

phytochelatins in *Amaranthus hypochondriacus* under cadmium stress. *Environ Pollut* 252:1791–1800. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.06.103>

Zhang J, Martinoia E, Lee Y (2018) Vacuolar transporters for cadmium and arsenic in plants and their applications in phytoremediation and crop development. *Plant Cell Physiol*. 59:1317–1325

Zorrig W, Khouni A El, Ghnaya T, et al (2013) Lettuce (*Lactuca sativa*): A species with a high capacity for cadmium (Cd) accumulation and growth stimulation in the presence of low Cd concentrations. *J Hortic Sci Biotechnol* 88:783–789. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11513039>

Anexo 1**Declaração de direitos autorais**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem que constam na minha Dissertação de Mestrado, intitulada "AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE FITOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E ALTOS NÍVEIS DE FERTILIZAÇÃO COM NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO", não infringem os dispositivos da Lei nº 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 15 de janeiro de 2020

Assinatura: Ellen Aparecida Nunes

Nome da autora: Ellen Aparecida Nunes

RG nº: 44.382.171-9

Assinatura: Sara Adrián

Nome da orientadora: Sara Adrián López Andrade

RNE nº: V 234072-8



COORDENADORIA DE PÓS GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109. 13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521- 6378. Email:cpgeb@unicamp.br



Anexo 2

Declaração de Bioética e Biossegurança

Em observância ao § 5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15 referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Dissertação de Mestrado intitulada **"AVALIAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE FITOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E ALTOS NÍVEIS DE FERTILIZAÇÃO COM NITROGÊNIO, FÓSFORO E POTÁSSIO"**, desenvolvida no Programa de Pós Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Ellen Aparecida Nunes

Nome da autora: Ellen Aparecida Nunes

RG nº: 44.382.171-9

Assinatura: Sara Adrián

Nome da orientadora: Sara Adrián López Andrade

RNE nº: V 234072-8

Campinas, 15 de janeiro de 2020