

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
AGROECOSSISTEMAS**

Lucas Benedet

**BIODISPONIBILIDADE DE COBRE E ZINCO E ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE MILHO
(*Zea mays* L.) EM SOLO ADUBADO COM DEJETOS SUÍNOS**

Florianópolis

2014

Lucas Benedet

**BIODISPONIBILIDADE DE COBRE E ZINCO E ALTERAÇÕES
BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS EM PLANTAS DE MILHO
(*Zea mays* L.) EM SOLO ADUBADO COM DEJETOS SUÍNOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Agroecossistemas.

Orientador: Prof. Dr. Jucinei José Comin

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Brunetto

FLORIANÓPOLIS

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC

Benedet, Lucas

Biodisponibilidade de cobre e zinco e alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de milho (*Zea mays* L.) em solo adubado com dejetos suínos / Lucas Benedet ; orientador, Jucinei José Comin ; coorientador, Gustavo Brunetto. - Florianópolis, SC, 2014.
128 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas.

Inclui referências

1. Agroecossistemas. 2. elementos-traço. 3. sistema antioxidante. 4. minirizobox. 5. apoplasto. I. Comin, Jucinei José. II. Brunetto, Gustavo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas. IV. Título.

“Biodisponibilidade de cobre e zinco e alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de milho (*Zea mays* L.) em solo adubado com dejetos suínos”

Por

Lucas Benedet

Dissertação julgada adequada, em 27 de fevereiro de 2014, e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Agroecossistemas. Área de Concentração Agroecologia, no Programa de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Centro de Ciências Agrárias/UFSC.



Prof. Dr. Ademir Antônio Cazella (Coordenador do Programa)

Banca Examinadora:



Dr. Jucinei José Comin (Presidente/Orientador)



Dr. Paulo Emilio Loyato (Titular/PGA-UFSC)



Dr.ª Rosete Pescador (Externo/FIT-UFSC)



Dr. Cláudio Roberto Fonseca Souza Soares (Externo/PGA-UFSC)

Candidato ao título:


Eng. Agr. Lucas Benedet

Florianópolis, fevereiro de 2014.

À minha família, em especial aos meus pais, Jaci e Maria Inês Benedet

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado a grande honra e sorte de nascer na família a qual pertenço, por encaminhar grandes pessoas ao meu caminho e fazer delas verdadeiros amigos e por toda saúde e segurança dada a mim e às pessoas importantes de minha vida;

Aos meus pais, Jaci e Maria Inês, por estarem sempre comigo, nos bons e maus momentos e por dedicarem suas vidas na minha educação e na minha felicidade. O homem ao qual me tornei é reflexo desse amor, e se muitas vezes recebi elogios pela minha postura, grande parte se deve a eles;

Ao meu irmão Rafael por ser sempre um grande modelo a me espelhar, o meu maior amigo e companheiro;

A minha família por serem as pessoas que mais prezo e que tento orgulhar e honrar (talvez a única coisa desfavorável no mestrado tenha sido ficar distante dessas pessoas tão importantes para mim);

Ao Jociel e Montagna, grandes amigos obtidos durante a graduação, e que com certeza continuarão por toda a vida;

Ao Pedro e Volnei, por uma amizade de mais de 10 anos, e que com certeza durará ainda mais;

Ao Eduardo, Julio, Mitsuo, Caio, Fernando André, Vilmar, F. De Luca, Georg, por essa grande amizade formada e que resultou em grandes momentos, divertidos e inesquecíveis;

A galera do laboratório de solos (Paula, Rafael, Vítor, Elaine, Bruno, Elano, Marcel, Cleiton, Laís, José Henrique, Camila, Mateus, Talita, Barbara, Alex, Rodolfo, Alejandro) pela parceria durante todos esses anos e por toda grande ajuda prestada nos trabalhos a campo e laboratório;

Ao pessoal do laboratório de solos da Universidade de Santa Maria (UFSM), em especial Lessandro, Paulo, Janaína e Miotto, por toda a ajuda, atenção e dedicação;

Ao Vilmar pela grande amizade e companheirismo, alguém para se contar tanto nos bons quanto nos maus momentos;

A todos os colegas de mestrado pela amizade, companheirismo e incentivo;

A todos os professores que contribuíram na minha formação escolar, acadêmica e profissional, assim como de cidadão;

A prof(a). Rosete pela disponibilidade, ajuda e atenção prestada durante esses anos, e que contribuiu em muito na realização deste trabalho;

Ao prof. Brunetto pelo incentivo e toda a colaboração para a elaboração da dissertação e na minha formação,

Ao prof. Jucinei por toda a ajuda, atenção, orientação e conselhos. Além de um orientador, é um grande amigo;

A Capes pelas Bolsas REUNI e CAPES-DS as quais me mantive vinculado durante a realização da pós-graduação.

A todos o meu muito obrigado!

“Desculpem-me, mas eu não quero ser um Imperador, esse não é o meu objetivo. Eu não pretendo governar ou conquistar ninguém. Gostaria de ajudar a todos, se possível, judeus, não-judeus, negros, brancos. Todos nós queremos ajudar-nos uns aos outros, os seres humanos são assim. Todos nós queremos viver pela felicidade dos outros, não pela miséria alheia. Não queremos odiar e desprezar o outro. Neste mundo há espaço para todos e a terra é rica e pode prover para todos. O nosso modo de vida pode ser livre e belo. Mas nós estamos perdidos no caminho.

A ganância envenenou a alma dos homens, e barricou o mundo com ódio; ela colocou-nos no caminho da miséria e do derramamento de sangue.

Nós desenvolvemos a velocidade, mas sentimos-nos enclausurados: As máquinas que produzem abundância têm-nos deixado na penúria. O aumento dos nossos conhecimentos tornou-nos cépticos; a nossa inteligência, empedernidos e cruéis.

Pensamos em demasia e sentimos bem pouco:

Mais do que máquinas, precisamos de humanidade;

Mais do que inteligência, precisamos de afeição e doçura.

Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido.

O avião e o rádio aproximaram-nos. A própria natureza destas invenções clama pela bondade do homem, um apelo à fraternidade universal, à união de todos nós...

...No décimo sétimo capítulo de São Lucas está escrito:

“O reino de Deus está dentro do homem”

Não um homem, nem um grupo de homens, mas em todos os homens; em você, o povo.

Vós, o povo tem o poder, o poder de criar máquinas, o poder de criar felicidade. Vós, o povo tem o poder de tornar a vida livre e bela, para fazer desta vida uma aventura maravilhosa. Então, em nome da democracia, vamos usar esse poder, vamos todos unir-nos. Lutemos por um mundo novo, um mundo bom que vai dar aos homens a oportunidade de trabalhar, que lhe dará o futuro, longevidade e segurança. É pela promessa de tais coisas que desalmados têm subido ao poder, mas eles mentem. Eles não cumprem as suas promessas, eles nunca o farão. Os ditadores libertam-se, porém escravizam o povo. Agora vamos lutar para cumprir essa promessa. Lutemos agora para libertar o mundo, para acabar com as barreiras nacionais, dar fim à ganância, ao ódio e à intolerância. Lutemos por um mundo de razão,

um mundo onde a ciência e o progresso conduzam à felicidade de todos os homens.

Soldados! Em nome da democracia, vamos todos unir-nos!”

Trecho do discurso de Charles Chaplin em: “O Grande Ditador”

RESUMO

A aplicação sucessiva de dejetos suínos além de incrementar os teores de nutrientes no solo, P, K, Ca e Mg, principalmente, pode aumentar os teores de cobre (Cu) e zinco (Zn). Esses elementos-traço, quando adicionados em excesso, tendem a se distribuir em formas mais lábeis, potencializando sua mobilidade e biodisponibilidade. O Cu e Zn, apesar de serem essenciais ao crescimento das plantas, podem ser tóxicos quando em concentrações elevadas. Entretanto, as plantas apresentam diversos sistemas de defesa; a exsudação de compostos orgânicos e a imobilização de elementos-traço pelas raízes são exemplos de mecanismos de defesa desenvolvidos por espécies tolerantes. O objetivo do trabalho foi avaliar, em um solo com elevados teores de elementos-traço, a biodisponibilidade de Cu e Zn no solo rizosférico e não rizosférico e seus efeitos na fisiologia de plantas de milho, bem como os mecanismos de defesa dessa espécie vegetal na presença desses metais. O trabalho foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis (SC). Foram utilizadas para este estudo amostras de solo Argissolo Vermelho Amarelo obtidas de um experimento em uma propriedade particular situada no município de Braço do Norte (SC). A área experimental foi submetida a adubações de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como dejetos líquidos de suíno (DL) e adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como cama sobreposta (CS) de 2002 a 2012. O presente trabalho foi dividido em dois estudos. No primeiro, foi realizado o cultivo de milho, em dois cultivos, por um período de 25 dias após a emergência (DAE) das plantas utilizando-se amostras indeformadas de solo na camada de 0-20 cm de profundidade. No segundo estudo, foi realizado o cultivo de milho até os 20 DAE em minirizobox, utilizando amostras deformadas de solo. Ambos os estudos foram delineados em blocos casualizados com 5 tratamentos e 5 repetições. No primeiro estudo foram avaliadas variáveis enzimáticas ligadas ao estresse oxidativo na parte aérea das plantas de milho, no caso a atividade das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX), o conteúdo de clorofila a, b e total, carotenóides totais, e proteínas e carboidratos solúveis totais, além dos teores disponíveis de Cu e Zn no solo (EDTA e CaCl₂). No segundo estudo foram avaliados os atributos químicos e disponibilidade de Cu e Zn no solo rizosférico e não-rizosférico e o acúmulo desses metais no

apoplasto e simplastos das raízes de milho. A utilização de dejetos de suínos e cama sobreposta promoveu o incremento dos teores disponíveis de Cu e Zn (EDTA e CaCl_2) no solo. Contudo, apenas foi observado o aumento da concentração de Zn no tecido das plantas de milho. Adicionalmente, a produção de biomassa não foi afetada pela aplicação dos diferentes dejetos de suínos (DL e CS). Entretanto, foram observadas pequenas alterações na densidade estomática, nos parâmetros fotoquímicos (clorofila a, b e total e carotenóides totais) e no sistema enzimático antioxidante (catalase e APX), principalmente nas folhas de milho cultivado nos tratamentos que foram adubados com $180 \text{ kg de N ha}^{-1}$ na forma de DL e de CS. A concentração de Cu nas raízes, tanto na apoplasto como no simplasto, foi incrementada com aplicação de dejetos líquido de suíno e cama sobreposta com o tratamento equivalente a 180 kg N ha^{-1} . Com relação ao Zn, as adubações de dejetos líquido de suínos e cama sobreposta com o equivalente a 180 kg N ha^{-1} aumentaram sua concentração nas raízes, promovendo maior acúmulo na região do apoplasto. Apesar da aplicação de dejetos ter promovido poucos efeitos sobre as plantas, a manutenção das aplicações sucessivas de dejetos suínos, sem critérios técnicos, ao longo do tempo poderá incrementar os teores destes elementos no solo e no tecido, aumentando os efeitos dos agentes oxidantes observados no presente trabalho.

Termos de indexação: elementos-traço, sistema antioxidante, minirizobox, apoplasto.

ABSTRACT

The successive application of manure as well as increase the levels of nutrients in the soil, P, K, Ca and Mg, especially, can increase the levels of copper (Cu) and zinc (Zn). These trace elements, when added in excess, tend to spread in more labile forms, increasing their mobility and bioavailability. The Cu and Zn, while being essential to plant growth, can be toxic at high concentrations. However, plants have many defense systems; the exudation of organic compounds and immobilization of trace elements by the roots are examples of defensive mechanisms developed by tolerant species. The aim of this study was to evaluate, in a soil with high levels of trace elements, the bioavailability of Cu and Zn in rhizosphere and non- rhizosphere soil and their effects on the physiology of corn plants, as well as the defense mechanisms of this plant species in presence of these metals. The work was conducted in the greenhouse of the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology (MIP) of the Institute of Biology (CCB) of the Federal University of Santa Catarina (UFSC). Samples of the Typic Hapludalf soil were used from an experiment at a pig farm in the municipality of Braço do Norte (SC). The experimental area was subjected to fertilization with 90 and 180 kg N ha⁻¹ as pig slurry (DL) and fertilizers of 90 and 180 kg N ha⁻¹ as deep litter (CS) during the years 2002-2012. This work was divided into two studies. At first, the cultivation of maize was carried out in two cultivation, for a period of 25 days after plant emergence (DAE) using undisturbed soil samples in the 0 - 20 cm depth. In the second study maize cultivation was done up to 20 DAE in minirhizobox using disturbed soil samples. Both studies, a randomized block experimental with five treatments and five replications were used. The first study was assessed enzymatic parameters related to oxidative stress in shoots of maize plants, in case the catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) activities, the content of chlorophyll a, b and total and total carotenoids, and total soluble protein and carbohydrates. Additionally, available contents of Cu and Zn (EDTA and CaCl₂) were assessed. In the second study, the chemical attributes and availability Cu and Zn in rhizosphere and bulk soil and metal accumulation in apoplast and simplast maize root were evaluated. The use of pig slurry and deep litter promoted the increase of available contents of Cu and Zn (EDTA and CaCl₂) in soil. However, was only observed increase concentration of Zn in the tissue of maize plants.

Additionally, biomass production was not affected by application of different pig manure (DL and CS). Nevertheless, minor changes were observed in stomatal density, photochemical parameters (chlorophyll a, b and total and carotenoids) and enzymatic antioxidant system (CAT and APX), especially in leaves of maize grown in soils that have been fertilized with 180 kg N ha^{-1} in the form of DL and CS. The concentration of Cu in roots in both the apoplast and symplast was enhanced by application of pig slurry and deep litter with the equivalent of 180 kg N ha^{-1} . With respect to Zn, the fertilization of pig slurry and deep litter with 180 kg N ha^{-1} increased their concentration in the roots, promoting greater accumulation in the apoplast region. Although the application of manure have promoted little effect on the plants, the maintenance of successive applications of pig manure, without technical criteria, over time can increase the values of these elements in soil and tissue, strengthening the effects of oxidizing agents observed in this work.

Keywords: trace elements, antioxidant system, minirhizobox, apoplast.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Matéria seca (a) e número de estômatos em folhas (b) de *Zea mays* cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivadas em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias (\pm desvio padrão) seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, $p < 0,05$)..... 53
- Fig. 2. Carboidratos (a) e proteínas solúveis totais (b) em folhas de *Zea mays* cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias (\pm desvio padrão) seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, $p < 0,05$). 56
- Fig. 3. Atividade da catalase (a) e ascorbato peroxidase (b) em folhas de *Zea mays* cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias (\pm desvio padrão) seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, $p < 0,05$). 58
- Fig. 4. Massa fresca (a) e matéria seca (b) na parte aérea e raiz de plantas de milho cultivadas em minirizobox aos 20 dias após a emergência (DAE). As plantas foram cultivadas em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos em uma mesma parte da planta (Teste Tukey, $p < 0,05$). 83
- Fig. 5. Concentração de Cu (a) e Zn (b) no apoplasto e simplasto em plantas de milho cultivadas em minirizobox aos 20 dias após a emergência (DAE). As plantas foram cultivadas em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não indicam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo compartimento radicular. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não indicam diferenças significativas entre os mesmos tratamentos em diferentes compartimentos radiculares (Teste Tukey, $p < 0,05$). 85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atributos químicos do solo aos 25 dias após a emergência (DAE) de sementes de milho <i>Zea mays</i> cultivar DKB 240, depois de submetido à aplicação de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS) para suprir 90 e 180 kg de N ha ⁻¹	50
Tabela 2. Concentração de nutrientes em folhas de milho <i>Zea mays</i> cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).	51
Tabela 3. Clorofila a, b, a/b e total e carotenóides totais em folhas de milho <i>Zea mays</i> cultivar DKB 240 aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).	54
Tabela 4. Atributos químicos do solo rizosférico e não-rizosférico aos 20 dias após a emergência (DAE) do milho, depois de submetido à aplicação de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS) para suprir 90 e 180 kg de N ha ⁻¹	77
Tabela 5. Teores de Cu extraídos por EDTA e CaCl ₂ , ao final do cultivo do milho (20 DAE), em solo rizosférico e não rizosférico com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).	79
Tabela 6. Teores de Zn extraídos por EDTA e CaCl ₂ , ao final do cultivo do milho (20 DAE), em solo rizosférico e não rizosférico com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).	80
Tabela 7. Concentração de nutrientes na parte aérea de plantas de milho cultivadas em minirizobox aos 20 (DAE). As plantas foram cultivadas em solo submetido à aplicação de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS) para suprir 90 e 180 kg de N ha ⁻¹	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA – α -aminolevulínico
APX – Ascorbato peroxidase;
AsA – Ácido ascórbico;
CAT – Catalase;
CCB – Centro de Ciências Biológicas;
Cfa – Clima temperado húmido com verão quente;
Chl – Clorofila;
COD – Carbono orgânico dissolvido;
COT – Carbono orgânico total;
CS – Cama sobreposta;
CTC – Capacidade de troca de cátions;
DAE – Dias após a emergência;
DL – Dejeito líquido de suíno;
DMSO – Dimetilsulfóxido;
DTT – Ditioneitol;
EAA – Espectrofotômetro de absorção atômica;
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético;
EROs – Espécies reativas de oxigênio;
GSH/GSSH – Glutathiona (forma reduzida e oxidada);
MIP – Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia;
MO – Matéria orgânica;
PSI – Fotossistema I;
PSII – Fotossistema II;
PVC – Policloreto de vinila;
PVP – Polivinilpirrolidona;
RPM – Rotação por minuto;
SC – Santa Catarina;
SOD – Superóxido dismutase;
SPD – Sistema de plantio direto;
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina.

ESTRATÉGIA DE ESTUDO

Procurando testar as hipóteses e alcançar os objetivos propostos na dissertação, o presente trabalho foi dividido em dois estudos, que serão apresentados na sequência.

Os solos utilizados nos estudos são oriundos de um experimento com aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suíno e cama sobreposta, localizado em uma propriedade particular de Braço do Norte (SC). O experimento apresenta mais de 10 anos de aplicação de dejetos, sendo conduzido entre os anos de 2002 e 2012. No primeiro estudo foram coletadas amostras indeformadas de solo e cultivadas plantas de milho. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados no Artigo I:

- ARTIGO I - “RESPOSTA FOTOQUÍMICA E SISTEMA ENZIMÁTICO ANTIOXIDANTE EM PLANTAS DE MILHO CULTIVADAS EM SOLO COM ACÚMULO DE CU E ZN APÓS 10 ANOS DE APLICAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNOS”

O segundo estudo foi realizado a partir de amostras deformadas de solo, sendo realizado o cultivo de milho em minirizobox. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados no Artigo II:

- ARTIGO II - “ACÚMULO DE Cu E Zn NA RIZOSFERA E EM RAÍZES DE MILHO (*Zea mays*) EM SOLO ADUBADO COM DEJETO SUÍNO”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	27
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
2.1. Contaminação e dinâmica de cobre e zinco em solos com aplicação de dejetos suínos	29
2.2. Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas ocasionadas por Cu e Zn	31
2.3. Rizosfera e sua ação sobre a cinética de elementos-traço	34
2.4. Acúmulo de elementos-traço nas raízes	36
3. HIPÓTESES	38
4. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo geral	39
3.2. Objetivos específicos	39
5. ARTIGO I – RESPOSTA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE MILHO (<i>Zea mays</i> L.) CULTIVADAS EM SOLO COM ACÚMULO DE Cu E Zn APÓS 10 ANOS DE APLICAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNO	40
1. Introdução	40
2. Material e Métodos	42
3. Resultados e discussão	48
5.4. Conclusão	57
5.5. Referências Bibliográficas	58
6. ARTIGO II – ACÚMULO DE Cu E Zn NA RIZOSFERA E EM RAÍZES DE MILHO (<i>Zea mays</i>) EM SOLO ADUBADO COM DEJETO SUÍNO	68
6.1. Introdução	68
6.2. Material e Métodos	70
6.3. Resultados e Discussão	75
6.4. Conclusão	86
6.5. Referências Bibliográficas	87
7. DISCUSSÃO GERAL	93
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
9. ANEXOS.....	117

1. INTRODUÇÃO GERAL

As unidades suinícolas nos Estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul se caracterizam por apresentar um elevado plantel de animais produzidos em pequenas áreas. O sistema de produção é intensivo, gerando grandes quantidades de dejetos anualmente (**Ceretta et al., 2010**). Nessas propriedades é comum o emprego desses dejetos como adubo em áreas de cultivo de grãos e pastagem, o que permite a ciclagem dos nutrientes dentro da unidade de produção (**Basso et al., 2012**). Contudo, ao contrário dos fertilizantes químicos, os dejetos suínos apresentam uma composição variável e desbalanceada de nutrientes em relação ao requerido pelas culturas. Além disso, em virtude dos tamanhos reduzidos das propriedades suinícolas, aplicações sucessivas são realizadas nas mesmas áreas de cultivo (**Ceretta et al., 2010**), e com isso, as quantidades de nutrientes adicionadas aos solos podem superar a capacidade de absorção pelas plantas e de adsorção pelo solo, promovendo o acúmulo desses elementos.

Um grande problema de aplicações contínuas de dejetos em uma mesma área está relacionado à presença de elementos-traço, como cobre e zinco. Esses elementos-traço estão naturalmente presentes no solo, adsorvidos principalmente às frações orgânicas e inorgânicas do solo, através de ligações com alto grau de energia e, conseqüentemente, indisponíveis às plantas. Contudo, as aplicações sucessivas de dejetos suíno tendem a aumentar os teores de Cu e Zn em formas mais lábeis, potencializando seus efeitos tóxicos sobre as plantas e contaminação de solos e águas (**Giroto et al., 2010a**).

Desta forma, estudos sobre as formas e espécies de Cu e Zn presentes nos solos contaminados por elementos-traço tornam-se importantes, já que a biodisponibilidade e a mobilidade desses elementos químicos são dependentes da capacidade do solo em adsorvê-los (determinada principalmente pelo teor e qualidade da matéria orgânica e tipo de argilominerais), da sua concentração na solução, do tipo de associação com outras espécies iônicas solúveis, da condição geoquímica da solução e da força iônica (**Giroto et al., 2010a**). Por isso, a toxicidade de elementos-traço não pode ser atribuída unicamente à concentração total presente na solução, já que estes podem estar ligados ou não a vários ligantes orgânicos e inorgânicos, alterando sua biodisponibilidade e mobilidade no perfil do solo (**Sodré et al., 2004**).

A presença das raízes também pode modificar o comportamento dos metais pesados no solo (**Michaud et al., 2007**). A liberação de exsudados pode modificar as condições geoquímicas da rizosfera através

da alteração de pH e, conseqüentemente, a quantidade de sítios de ligação no solo (**Chaignon et al., 2009**). Do mesmo modo, a presença de compostos orgânicos de baixo peso molecular na região da rizosfera, liberados pelas raízes, estimula a complexação de metais na solução dos solos, aumentando a concentração de espécies menos biodisponíveis às plantas (**Hinsinger et al., 2006**). Desta forma, estudos que mostram os efeitos da rizosfera sobre a distribuição das formas e espécies de metais pesados no solo são importantes para melhor compreensão do potencial tóxico e contaminante desses elementos-traços.

As frações solução do solo e trocável são consideradas as mais móveis e disponíveis às plantas, representando seu potencial contaminante e tóxico. Adicionalmente, a utilização de extratores como agentes quelantes (EDTA e EDDS) ou sais (CaCl_2 , MgCl_2) são amplamente usados para determinar a disponibilidade de elementos-traço (**Cao et al., 2008; Wang et al., 2009**).

O Cu e o Zn apesar de serem essenciais ao desenvolvimento da planta, atuando como cofatores enzimáticos e participando em diversas atividades catalíticas, quando presentes em altas concentrações podem ser tóxicos (**Yruela, 2005; Hänsch & Mendel, 2009**). Esses elementos-traço em concentrações tóxicas podem causar redução dos pigmentos fotoquímicos, inibição fotossintética, modificar os conteúdos de proteínas e carboidratos solúveis, alterar a função e a densidade estomática e promover a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (**Panou-Filotheou et al., 2001; Bibi & Hussain, 2005; Zhang et al., 2008; Jain et al., 2010**). Para evitar ou reduzir os efeitos da toxidez no tecido vegetal, as plantas apresentam um complexo sistema de defesa (**Apel & Hirt, 2004**). A presença de enzimas como a catalase e ascorbato peroxidase são essenciais à defesa da planta, controlando a concentração de EROs, principalmente quando da ocorrência de agentes estressantes (**Kumar et al., 2008a;b**). Da mesma forma, alterações nas atividades enzimáticas podem indicar a presença de concentrações elevadas de elementos-traço em níveis fitotóxicos.

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a biodisponibilidade de cobre e zinco e alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de milho (*Zea mays* L.) em solo adubado com dejetos suínos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contaminação e dinâmica de cobre e zinco em solos com aplicação de dejetos suínos

O sistema de integração lavoura e pecuária é um modelo viável, que prevê como uma de suas estratégias a reciclagem de resíduos (**Basso et al., 2005; Assmann et al., 2007**). Nesse sentido, a utilização de dejetos de suínos para a produção de grãos e pastagens se confere como alternativa aos fertilizantes químicos e ao direcionamento desse resíduo (**Dortzbach et al., 2012**).

Os dejetos de suínos vêm sendo utilizados como adubo em virtude de serem um ricos em nutrientes em formas prontamente disponíveis às culturas agrícolas (**Giroto, 2007**). De acordo com Perdomo et al. (2001), Mattias et al. (2003) e Assmann et al. (2007) os dejetos suínos apresentam em sua composição elevados teores de nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), além de micronutrientes como zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn). Entretanto, a composição desses nutrientes nos dejetos é variável em função do tipo de alimentação oferecida e da idade dos animais, do manejo da água empregado nas instalações e do armazenamento dos dejetos (**Basso, 2003**). Como resultado, os dejetos possuem nutrientes em proporções desbalanceadas às demandas das plantas ou às recomendações de adubação (**CQFS-RS/SC, 2004**).

A incorporação de nutrientes no solo em quantidades superiores aos extraídos pelas culturas, através de adubações em excesso ou contínuas, provoca o acúmulo desses elementos no solo (**Giroto et al., 2010a**). Da mesma maneira, em áreas onde as aplicações de dejetos de suínos se estendem ao longo anos, pode se esperar alterações dos atributos físicos (**Barilli, 2005**) e químicos dos solos (**Couto et al., 2010**) e teores de alguns nutrientes acima da capacidade de adsorção do solo (**Giroto et al., 2010b**). Nessas situações, podem ocorrer perdas de nutrientes por escoamento superficial e/ou por percolação, potencializando a contaminação de águas superficiais e/ou subsuperficiais (**Ceretta et al., 2010**).

Outro grande problema é o acúmulo e contaminação por elementos-traço em solos e águas em função das sucessivas aplicações de dejetos de suínos (**Basso et al., 2012; Gräber et al., 2005**). A presença de altos teores de Cu e Zn nos dejetos é consequência da adição de quantidades excessivas desses elementos nas rações dos

suínos além dos requerimentos fisiológicos desses animais (**Smanhotto et al., 2010**). De maneira geral, são adicionadas às rações dos suínos 250 mg kg⁻¹ de Cu na forma de sulfato de cobre (**Ribeiro et al., 2008**) e até 100 mg kg⁻¹ de Zn na forma de óxido ou sulfato de zinco (**Gaudré & Quiniou, 2009**). O emprego desses elementos nas formulações das rações se deve às funções que apresentam no metabolismo suíno (**Muniz et al., 2010**). O sulfato de cobre (CuSO₄) é empregado na suinocultura como promotor de crescimento, enquanto o óxido de zinco (ZnO) atua como produto preventivo e curativo da diarreia (**Ribeiro et al., 2008; Lima et al., 2009**).

Os elementos-traço, como Cu e Zn, apesar de serem encontrados naturalmente no solo e essenciais ao crescimento das plantas, podem ser tóxicos quando em concentrações elevadas (**Mattias et al., 2003**). Assim, as aplicações sucessivas de dejetos suínos com quantidades elevadas desses elementos apresentam alto potencial de contaminação ambiental (**Tiecher et al., 2013**).

Os elementos-traço, em condições naturais do solo, se encontram principalmente adsorvidos às frações orgânica, inorgânica e residual, através de ligações com alto grau de energia, sendo poucos disponíveis a absorção das plantas (**Giroto et al., 2010b**). Contudo, adições sucessivas de dejetos tendem a aumentar a presença de Cu e Zn em formas mais lábeis, como solúveis e trocáveis, potencializando seus efeitos tóxicos às plantas e organismos e sua movimentação no perfil do solo (**Basso et al., 2012**).

O Cu e Zn quando adicionados aos solos via dejetos suínos se distribuem nas formas preexistentes no solo, entretanto com menor energia de adsorção ou em precipitados com maior solubilidade (**Tiecher et al., 2013**). Em trabalho desenvolvido por estes autores, após 17 aplicações com diferentes doses de dejetos líquidos de suínos (0, 20, 40 e 80 m³ ha⁻¹), foi observado que o Cu e o Zn são acumulados no solo principalmente em formas biodisponíveis, nos quais os maiores teores encontrados de Cu foram na forma orgânica e mineral do solo, e os de Zn, na forma mineral. No mesmo estudo, os autores encontraram incrementos de teores de Cu e Zn até as camadas de 12 e 10 cm, respectivamente.

A capacidade dos solos em adsorver Cu e Zn é dependente da natureza do material de origem do solo, do teor e composição da fração argila, do conteúdo de matéria orgânica (MO) e das condições físico-químicas dos solos (**Oliveira & Costa, 2004; Cotta et al., 2006**). Entretanto, o teor total desses elementos-traço no solo é um limitado indicador de sua disponibilidade, haja vista as diferentes espécies e

formas reativas que esses elementos podem se apresentar no solo (**Mela et al., 2008; March et al., 2009**).

De caráter analítico, vários são os procedimentos laboratoriais que determinam a disponibilidade e mobilidade dos elementos-traço no solo (**Nachtigall et al., 2009**). Os mais usados são as extrações com produtos químicos realizados de forma isolada ou sequencialmente (**Chaignon et al., 2003; Girotto et al., 2010b**). Assim, estudos que determinam as diferentes formas desses elementos são de grande relevância para avaliar as formas em que os elementos-traço são aplicados e armazenados nos solos, refletindo em seu potencial de toxidez (**Nyamangara, 1998; Mossop & Davidson, 2003; Girotto et al., 2010b**).

2.2. Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas ocasionadas por Cu e Zn

Os elementos-traço, também considerado micronutrientes, como o Cu e Zn, embora requeridos em pequenas quantidades, são essenciais para o desenvolvimento das plantas (**Luchese et al., 2004**). O Cu está relacionado a muitos processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas, devido à sua capacidade de apresentar múltiplos estados de oxidação *in vivo*, estando em condições fisiológicas na forma de Cu^{2+} e Cu^+ (**Yruela, 2005**). O Cu é um cofator de várias enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), citocromo oxidase, amino oxidase, lacases, plastocianinas e polifenol oxidase, também atuando, em nível molecular, na sinalização da transcrição, na fosforilação oxidativa e na mobilização de ferro (Fe) (**Yruela, 2005; Silva et al., 2011**). Esse elemento também está envolvido no fornecimento de resistência estrutural às plantas através de lignificação (**Moore, 1998**).

Com relação ao Zn, este metal é absorvido na forma de Zn^{2+} na solução dos solos (**Stephan et al., 2008**), apresentando variadas funções nos organismos vegetais, participando na estrutura de proteínas e garantindo o seu dobramento adequado e na atividade catalítica de enzimas (p.e. anidrase carbônica), além de estar presente em moléculas de DNA/RNA (**Broadley et al., 2007**).

Entretanto, o acúmulo de Cu e Zn no solo, principalmente em formas solúveis e biodisponíveis na solução do solo, apresenta alto potencial de toxidez às plantas e contaminação do ambiente (**Girotto et al., 2010b**). Esses elementos-traço, quando absorvidos em excesso, podem causar redução de biomassa, sintomas de clorose e afetar o

desenvolvimento das raízes (Yadav et al., 2010). O acúmulo de Cu na parte aérea das plantas causa alterações na fotossíntese, através de distúrbios no transporte de elétrons, redução no número de cloroplastos e danos à estrutura da membrana dos tilacóides (Sandmann & Böger, 1980; Ciscato et al., 1997). O Cu também pode causar alterações no metabolismo do N, reduzindo a atividade de enzimas de assimilação desse nutriente, especialmente nas raízes, e os níveis de nitrogênio total, nitrato e aminoácidos livres (Llorens et al., 2000). Além de seu potencial tóxico, esse elemento-traço também pode causar deficiência de outros nutrientes na planta. Tal efeito é atribuído à interferência no mecanismo de absorção desses elementos, quando em competição com íons de Cu (Mantovani, 2009).

Com relação ao Zn, em altas concentrações este provoca um crescimento atrofiado das plantas, sintomas de clorose pela redução da síntese de clorofila e degradação dos cloroplastos e interferências na absorção de nutrientes como o fósforo (P), magnésio (Mg) e manganês (Mn) (Broadley et al., 2007).

A presença de Cu e Zn em excesso causa estresse oxidativo na planta devido à formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Yruela, 2005). De acordo com Girotto (2010), em condições normais, o sistema de defesa antioxidante promove uma proteção adequada contra as EROs, mas em condições de estresse a produção de EROs pode superar os mecanismos celulares antioxidantes, promovendo o estresse oxidativo.

As espécies reativas de oxigênio se distribuem em diferentes formas, com diferentes graus de reatividade. As principais formas de EROs são o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}) (Wang & Jiao, 2000; Schopfer et al., 2001). Contudo os radicais *singlete* de oxigênio (1O_2), hidroperóxido (HO_2^{\cdot}) e alcóxilo (RO^{\cdot}) também são citados (Triantaphylidès et al., 2008; Delmondès et al., 2013). Apel & Hirt (2004) consideram que apesar de algumas EROs atuarem como importantes moléculas de sinalização de estresse, que alteram a expressão gênica e modulam a atividade de proteínas de defesa, todas essas espécies podem ser extremamente prejudiciais para os organismos quando em concentrações elevadas. Os efeitos causados pelo estresse oxidativo são amplamente discutidos na literatura, correlacionando a atividade das EROs à oxidação de vários componentes celulares, como proteínas, lipídios, carboidratos, pigmentos fotossintéticos e ácidos nucléicos, muitas vezes provocando alterações na estrutura celular,

mutagênese e até a destruição celular (Mittler, 2002; Pinto et al., 2003; Halliwell, 2006; Halliwell & Whiteman, 2004).

Os mecanismos que promovem a formação de EROs nas plantas são variados, sendo um dos mais frequentes a perda de elétrons para o O_2 nas cadeias transportadoras de elétrons, que ocorre tanto nos cloroplastos como nas mitocôndrias (Schopfer et al., 2001; Apel & Hirt, 2004). O Cu em excesso é responsável pela inibição do transporte de elétrons, reduzindo o fotossistema I (PSI) e oxidando o fotossistema II (PSII). A redução do PSI permite a transferência de elétrons para o O_2 , formando o anion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que rapidamente é convertido à H_2O_2 através da enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio é menos reativo que o $O_2^{\cdot-}$, mas devido à presença de metais como o Cu^{2+} , o H_2O_2 pode ser convertido a OH^{\cdot} pela reação de Fenton. Essa espécie de oxigênio é uma das mais reativas dentre as EROs, sendo a sua formação o principal mecanismo de toxicidade do Cu nas plantas (Sandmann & Böger, 1980; Mittler, 2002; Pinto et al., 2003; Halliwell, 2006; Halliwell & Whiteman, 2004). A fotorrespiração nos peroxissomos via glicolato-oxidase é outra fonte de EROs no tecido vegetal, mais precisamente de H_2O_2 , (Van Breusegem et al., 2001). Baptista (2009) ainda ressalta a ação das peroxidases e oxidases associadas à parede celular como fontes de EROs.

Em virtude dos efeitos negativos das EROs sobre os componentes celulares, os organismos desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes para removê-las ou torná-las menos reativas (Hall, 2002; Apel & Hirt, 2004; Khatun et al., 2008; Sharma et al., 2012). Entre os principais mecanismos se destacam as enzimas catalíticas de alto peso molecular, que incluem: a superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) (Mittler, 2002), assim como moléculas de baixo peso molecular solúveis em água como ácido ascórbico (AsA) e compostos orgânicos contendo grupos sulfidril (SH), denominados tióis (Ti) (Bulbovas et al., 2005).

As enzimas superóxido dismutase (SOD) catalisam o $O_2^{\cdot-}$, através de uma reação redox, convertendo o radical superóxido a um H_2O_2 e um O_2 (Sandmann & Böger, 1980; Halliwell, 2006). A SOD presente na matriz mitocondrial apresenta como cofator o manganês (MnSOD), enquanto que no espaço mitocondrial intermembranar e no resto da célula o Cu e o Zn exercem essa função (CuZnSOD), além da presença do ferro (FeSOD) nos cloroplastos (Halliwell, 2006)

A ascorbato peroxidase (APX) é encontrada em cloroplastos e no citosol (Hu et al., 2005; Miyake et al., 2006). É uma enzima muito importante do sistema de defesa antioxidante, reduzindo o H_2O_2 (em

baixas concentrações na célula) em água usando ascorbato como doador de elétrons, formando dehidroascorbato. Este é reciclado a ascorbato usando a GSH como doadora de elétrons e a glutathiona oxidada (GSSG) é convertida pela enzima glutathiona redutase (**Shi et al., 2006**).

A catalase (CAT) é responsável pela formação de água e oxigênio molecular a partir de H_2O_2 . Está presente principalmente nos peroxissomos/glioxissomos (DAT et al., 2000), mas pode ser encontrada em menor quantidade na mitocôndria, no cloroplasto e no retículo endoplasmático (**Rossato, 2010**). A CAT está envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em concentrações altas, pois apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 (**Mittler, 2002**).

Desta forma, como ressaltado por Girotto (2010), o balanço entre as atividades da SOD, CAT e APX apresenta grande importância para determinar o estado estável do radical $O_2^{\bullet-}$ e do H_2O_2 nas células, já que a SOD seria o primeiro mecanismo de defesa a atuar, convertendo o $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 e, na sequência, a APX e a CAT atuam na catalisação do H_2O_2 .

Os organismos, além do sistema de defesa antioxidante enzimático, também apresentam defesas não enzimáticas, atuando de forma conjunta e efetiva contra os efeitos danosos das EROs. O ácido ascórbico e os grupos tióis não protéicos são componentes desse sistema, juntamente com os carotenóides (**Rossato, 2010**). Desta forma, a determinação de alterações no sistema antioxidante enzimático e não enzimático, como resultado do excesso de elementos-traço no organismo vegetal, pode oferecer evidências precoces dos efeitos deletérios de contaminantes sobre parâmetros fisiológicos e morfológicos da planta (**Caregnato, 2009**).

2.3. Rizosfera e sua ação sobre a cinética de elementos-traço

O Cu e Zn, apesar de desempenharem um papel importante em muitos processos fisiológicos nas plantas, podem ser tóxicos quando presentes em elevada concentração (**Santos et al., 2006**). Contudo, muitas plantas desenvolveram mecanismos de tolerância aos elementos-traço, permanecendo íntegras mesmo em solos com elevados teores (**Ernst et al., 2000**).

A capacidade das plantas apresentarem tolerância à presença de elementos-traço está relacionada ao seu material genético, que determina o tipo de “estratégia” a ser utilizado. Dentre alguns mecanismos de defesa empregados pelas plantas, o controle da absorção

e a acumulação de elementos-traço e a liberação de exsudatos são amplamente comentados na literatura (**Santos et al., 2006**). Ao mesmo tempo, a participação da atividade microbiológica sobre a diminuição de biodisponibilidade de metais pesados, como Cu e Zn, também merece destaque (**Lambers et al., 2009**).

Os efeitos da atividade das raízes alteram as propriedades físico-químicas do solo, assim como a atividade biológica (**Neumann et al., 2009**). Essa região de influência das raízes recebe o nome rizosfera, e se estende da superfície da raiz até uma distância de 3 mm (**Su & Zhu et al., 2008**). Entretanto, conforme citado pelos mesmos autores, muitos pesquisadores delimitam essa área até os 5 mm.

As mudanças das condições químicas entre a região da rizosfera do restante do solo podem ser explicadas pela ocorrência de vários fatores como a absorção de água e nutrientes, mudanças de pH na rizosfera e a exsudação de compostos orgânicos, assim como da atividade microbiológica (**Braccini et al., 2000**).

A liberação de íons H^+ ou OH^- na solução do solo pelas raízes está relacionada ao balanço de absorção entre cátions e ânions. Assim, a maior absorção de ânions (NO_3^-) do que cátions (K^+ , NH_4^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) induz à liberação de mais íons OH^- à solução, aumentando o valor de pH (**Braccini et al., 2000; Hinsinger et al., 2003; Zonta et al., 2006**), e, conseqüentemente, diminui a mobilidade de alguns elementos-traço.

Entretanto, são os compostos orgânicos que nos últimos anos vêm recebendo especial atenção em pesquisas de nutrição de plantas (**Zhou et al., 2011**). Neste grupo, os ácidos orgânicos (ex. malato, citrato e oxalato) apresentam grande importância como mecanismo de defesa de plantas à presença de altos teores de elementos-traço, assim como no aumento da absorção de nutrientes e quelação de metais livres no citosol (**Ryan et al., 2001, Santos et al., 2006**).

A liberação de ácidos orgânicos na solução do solo na região da rizosfera influi diretamente e indiretamente sobre a dinâmica dos elementos-traço no solo, como o Cu (**Ryan et al., 2001; Lambers et al., 2009**). Essa reação se explica pela alta afinidade que esse elemento apresenta por grupos funcionais presentes nos compostos orgânicos, o que provoca a sua complexação na solução do solo (**Catanni et al., 2006**). Assim, a exsudação de ácidos orgânicos altera a distribuição das espécies de elementos-traço na solução, reduzindo sua mobilidade e biodisponibilidade.

Desta forma, estudos que abordem os efeitos biológicos e químicos da rizosfera são necessários para avaliar a mobilidade das

formas e espécies de elementos-traço no solo na interface solo-planta (Cieslinski et al., 1998).

2.4. Acúmulo de elementos-traço nas raízes

O aumento da concentração de elementos-traço na parte aérea pode desencadear os efeitos de toxidez na planta, a partir da produção de espécies reativas de oxigênio e da peroxidação lípica (Gaetke & Chow, 2003; Zhang et al., 2010). Para prevenir esses efeitos, algumas plantas desenvolveram estratégias para limitar a translocação de metais para a parte aérea, acumulando-os nas raízes (Brunner et al., 2008). A adsorção de metais no apoplasto, ligação por agentes quelantes e acúmulo no vacúolos são exemplos de mecanismos de defesa responsáveis por acumular elementos-traço nas raízes (Hall, 2002).

A absorção e transporte de metais, dentre os quais Cu e Zn, nas raízes pode ser realizada através da via apoplástica e simplástica (Zhao et al., 2010). Na primeira via, o Cu e Zn são transportados por difusão através da parede celular e espaço intercelular (Stephan, 2002). O apoplasto é um espaço descontínuo, sendo interrompido pela endoderme, a camada de célula mais interna do cortex, através das estrias de Casparian (Krishnamurthy et al., 2009). Este compartimento radicular é rico em grupos carboxílicos (COO-) e sulfidrílicos (SH-), principalmente, presentes na parede celular e compostos orgânicos, capazes de adsorver íons (Boominathan & Doran, 2002; Herbertte et al., 2006). Esta região é fortemente influenciada pelo pH, o qual determina a carga resultante nestes grupamentos (JIN et al., 2007). A promoção de cargas negativas em função do aumento de pH nesta região permite a ligação de cátions metálicos nesses sítios e, conseqüentemente, seu acúmulo (Wang et al., 2007). A via apoplástica também é considerada uma via não-seletiva, sendo a principal responsável pela absorção de elementos-traço quando os mesmo estão presentes em elevados teores na solução do solo (Stephan, 2002). Zhao et al. (2010) avaliando o efeito de agentes quelantes, como EDTA, EDDS e IDSA, no aumento da disponibilidade de elementos-traço, observaram maior acúmulo de metais no apoplasto. Entretanto, os mesmos autores também observaram uma maior translocação para a parte aérea, o que foi atribuído a forte ligação entre o metal e o quelante, que não permitiu a adsorção de parte dos metais nos grupos funcionais presentes na parede celular. Também tem sido relatado o efeito negativo que pode ocorrer pela ligação do metal com os grupos funcionais da

membrana plasmática (**Benavides et al., 2005**). A saída do Ca^{2+} ligado à membrana e a adsorção de Cu, por exemplo, pode promover alterações na conformação da membrana, afetando sua permeabilidade (**Brunner et al., 2008**). Também é associado o atrofiamento de raízes em solos contaminados como consequência da ligação dos metais na membrana (**Alves et al., 2004; Seregin et al., 2004**).

Na via simplástica, a entrada de nutrientes é realizada de maneira seletiva, através da membrana plasmática (**Zhao et al., 2010**). Os íons metálicos quando presentes no citoplasma são transportados através dos plasmodesmas até alcançarem o córtex (**Stephan, 2002**). Contudo, no citosol os metais podem formar quelatos com ligantes de alta afinidade, reduzindo sua mobilidade (**Palmgren et al., 2008**). A quelatização de metais é um mecanismo de defesa da planta para a redução e tolerância a presença de elementos-traço (**Milner & Kochian, 2008; Yadav, 2010**). Os ligantes que apresentam destaque são os ácidos orgânicos e aminoácidos e duas classes de peptídeos, as fitoquelatinas e metalotioneínas (**Hall, 2002**). Adicionalmente, os elementos-traço presentes no citosol das células das raízes podem ser transferidos ao vacúolo, sendo então acumulados (**Brunner et al., 2008**).

Assim, a presença de um grande número de grupamentos na região da raiz, tanto no simplasto como no apoplasto, são mecanismos importantes para redução da mobilidade dos elementos-traço e o aumento de tolerância nas plantas.

3. HIPÓTESES

As aplicações sucessivas de dejetos suíno promovem o acúmulo de Cu e Zn nos solos e o aumento dos teores biodisponíveis. O acréscimo da concentração desses metais na parte aérea promove alterações no sistema antioxidante da planta como uma resposta ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio nas células vegetais.

As plantas são capazes de alterar a biodisponibilidade de metais pesados no solo no nível da rizosfera, além de promover seu acúmulo nas raízes evitando sua translocação para a parte aérea, prevenindo efeitos de fitotoxidez.

4. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a biodisponibilidade de cobre e zinco no solo rizosférico e não-rizosférico e alterações bioquímicas e fisiológicas em plantas de milho em solo contaminado por metais pesados.

3.2. Objetivos específicos

- a) determinar a disponibilidade de cobre e zinco no solo após cultivo de milho;
- b) avaliar alterações no sistema antioxidante enzimático em folhas de milho;
- c) analisar as alterações químicas do solo na região da rizosfera;
- d) avaliar a acumulação de Cu e Zn em plantas de milho;

5. ARTIGO I – RESPOSTA DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES EM PLANTAS DE MILHO (*Zea mays* L.) CULTIVADAS EM SOLO COM ACÚMULO DE Cu E Zn APÓS 10 ANOS DE APLICAÇÃO DE DEJETOS DE SUÍNO

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a resposta de enzimas antioxidantes em plantas de milho cultivadas em solo com acúmulo de Cu e Zn após 10 anos de aplicações de dejetos suíno. Para tanto, foi cultivado milho em amostras indeformadas de solo coletadas de um experimento a campo que recebeu a adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ na forma de dejetos líquidos de suíno e adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ de cama sobreposta. As aplicações de dejetos, independente da forma, promoveram aumentos na produção de matéria seca das plantas de milho. Contudo, foi observada uma diminuição da densidade estomática das folhas de milho cultivado em solo adubado com o tratamento CS 180; os conteúdos de clorofila a, b e total e carotenóides apresentaram redução nas plantas cultivadas no solo do tratamento CS 90; enquanto os teores de proteína e carboidratos solúveis totais não foram influenciados pelas adubações. As atividades das enzimas CAT e APX foram mais elevadas nas plantas cultivadas no solo do tratamento DL 180 em comparação ao CS 180. Os resultados do presente estudo indicam que as aplicações de dejetos promoveram alterações no sistema antioxidante das plantas de milho.

Termos de indexação: metais pesados; toxidez; catalase; ascorbato peroxidase.

1. Introdução

A aplicação sucessiva de dejetos de suíno em áreas sob sistema de plantio direto vem promovendo o acúmulo de nutrientes no solo, como N, P, K, Ca e Mg (Berwanger et al., 2008; Gatiboni et al., 2008; Ceretta et al., 2010; Scherer et al., 2010; Guardini et al., 2012). Da mesma forma, a utilização de dejetos líquidos de suíno, obtidos a partir da limpeza dos dejetos com elevados volumes de água em baias com o piso ripado e seu posterior armazenamento em lagoas de decantação ou esterqueiras (Hadlich & Scheibe, 2007), e de cama sobreposta, oriunda da criação de suínos em leitos cobertos por material de alta relação C/N, como maravalha ou palha de culturas agrícolas (Konzen et al., 2003; Morrison et al., 2003; Morrison et al., 2007), tem provocado o

acúmulo de elementos-traço como o Cu e Zn no solo (**Giroto et al., 2010; Tiecher et al., 2013**).

O Cu e o Zn são essenciais para o desenvolvimento das plantas por estarem envolvidos em diversas reações bioquímicas e metabólicas (**Yruela, 2005; Alloway, 2009; Palmer & Guerinot, 2009; Lehmann et al., 2014**), mas quando presentes em elevadas concentrações no solo e acumulados no tecido vegetal podem apresentar efeitos deletérios ao crescimento e sobrevivência das plantas (**Brun et al., 2003; Alkorta et al., 2004; Sagardoy et al., 2008; Chaves et al., 2011**).

A presença de zonas cloróticas, necroses e inibição do crescimento das raízes e das plantas são sintomas característicos da toxidez por Cu (**Yruela, 2005; Lin et al., 2008; Feigl et al., 2013**). Em elevadas concentrações este elemento se liga aos grupos sulfídricos das proteínas e inibe as suas funções, interfere na biossíntese do maquinário fotossintético através da alteração do pigmento e da composição de proteínas das membranas fotossintéticas, além de diminuir o conteúdo de clorofila e alterar a estrutura de cloroplastos e a composição das membranas tilacóides (**Yruela, 2005; Tanyolac et al., 2007; Sanches-Pardo et al., 2014**). Os ciclos redox entre os dois estados oxidativos do cobre (Cu^+ e Cu^{2+}) catalisam a formação de diferentes espécies reativas de oxigênio (EROs) (**Feigl et al., 2013; Giroto et al., 2013; Sanches-Pardo et al., 2014**).

O Zn, mesmo não participando de reações redox (**Marschner et al., 2012**), em elevadas concentrações pode afetar a integridade e a permeabilidade das membranas e causar estresse oxidativo pela formação de EROs e peroxidação lipídica (**Michael & Krishnaswamy, 2011**). Alguns dos mecanismos que envolvem a inibição da fotossíntese por toxidez de Zn estão associados à diminuição da atividade da Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco), provavelmente causada pela competição do metal com o Mg, inibição da atividade do fotossistema II (PSII) pela substituição do Mn nas membranas tilacóides e, no caso da beterraba açucareira, pela diminuição de CO_2 na Rubisco como resultado da redução da condutância deste gás nos estômatos e no mesófilo (**Marschner et al., 2012**). Adicionalmente, a inibição na síntese de clorofila também está relacionada ao acúmulo de Zn, ao interferir no metabolismo do Fe^{2+} no PSII (**Cherif et al., 2010; Samreen et al., 2013**).

As plantas, de maneira geral, apresentam um eficiente e complexo sistema de defesa antioxidante à produção de EROs, através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (**Rizhsky et al., 2002; Tanyolac et al., 2007; Li et al., 2012**). A redução da concentração de

EROs a partir de mecanismos não enzimáticos é realizada por componentes de baixo peso molecular como ascorbato, glutathione, flavonóides e carotenóides, enquanto para as enzimas se destacam superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) (Cólle et al., 2003; Yadav, 2010; Song et al., 2011; D'Souza & Devara, 2012). A atividade da APX e da catalase é essencial nas plantas para a desintoxicação por H₂O₂ (Noctor et al., 2002). A CAT catalisa a degradação de duas moléculas de peróxido em água e oxigênio, enquanto a APX utiliza redutores para convertê-lo em água (Noctor et al., 2000; Qiu et al., 2008; Ozdener & Aydin, 2010). Contudo, quando do desbalanço entre a concentração de EROs na célula vegetal e a capacidade de defesa do sistema antioxidante, a planta estará sujeita a danos por estresse oxidativo (Giroto et al., 2013).

O trabalho objetivou avaliar a resposta de enzimas antioxidantes, com ênfase às enzimas catalase e ascorbato peroxidase, em plantas de milho cultivadas em solo com acúmulo de Cu e Zn após 10 anos de aplicações de dejetos líquidos de suíno e cama sobreposta.

2. Material e Métodos

2.1. Solo

Amostras indeformadas de um solo classificado como Argissolo Vermelho Amarelo (Typic Hapludalf soil - Soil Survey Staff, 2006) foram coletadas de um experimento que vem sendo conduzido desde dezembro de 2002 em uma propriedade suinícola no município de Braço do Norte, sul do estado de Santa Catarina (SC), na região sul do Brasil (Latitude 28°14'20.7"; Longitude 49°13'55.5"; altitude de 300m acima do nível do mar). Antes da instalação do experimento o solo apresentava as seguintes propriedades na camada de 0-10 cm: argila 330 g kg⁻¹; matéria orgânica 33 g kg⁻¹; pH em água de 5,1; Índice SMP 5,5; P disponível 19 mg dm⁻³; K trocável 130 mg dm⁻³ (ambos extraídos por Mehlich⁻¹); Al, Ca e Mg trocáveis 0,8, 3,0 e 0,8 cmol_c kg⁻¹ (extraídos por KCl 1 mol L⁻¹). O clima na região, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger, é subtropical úmido (Cfa), com temperatura média anual de 18,7 °C e precipitação média de 1.471 mm.

O experimento a campo iniciou em Dezembro de 2002 sobre uma pastagem naturalizada com predomínio de *Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Eryngium ciliatum* e *Stylosanthes montevidensis*, com histórico de aplicações esporádicas de dejetos líquidos de suíno sobre

a superfície do solo. Antes de iniciar o experimento foram aplicados 6 Mg ha⁻¹ de calcário (poder relativo de neutralização total = 87,5%) sobre a superfície do solo, sem incorporação, para elevar o pH para 6,0 (CFS-RS/SC, Comissão de Fertilidade do Solo – 1994). Em janeiro de 2003, a pastagem foi dessecada com herbicida e os tratamentos foram aplicados pela primeira vez. O experimento consistiu de blocos casualizados com cinco tratamentos e três repetições. Cada parcela possuía dimensões de 4,5 m por 6,0 m (27 m²). Os cinco tratamentos aplicados anualmente de 2003 a 2011 foram: testemunha (T) sem adubação; adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como dejetos líquidos de suíno (DL90 e DL180) e adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como cama sobreposta (CS90 e CS180) (Comissão de Fertilidade do Solo (CFS-RS/SC, 1994) e a Comissão de Química e Fertilidade do Solo (CQFS-RS/SC, 2004). As culturas milho (*Zea mays*) seguida por aveia preta (*Avena strigosa*) foram cultivadas em sucessão em cada ano em sistema plantio direto (SPD). Do ano de 2003 a 2011, os tratamentos DL (DL90 e DL180) foram aplicados na superfície do solo em quatro períodos equivalentes: 15, 51 e 95 dias após a semeadura do milho e 15 dias após semeadura da aveia-preta. No total, 36 aplicações foram realizadas de 2003 a 2011. Os tratamentos CS (CS90 e CS180) foram aplicados de 2003 a 2011 na superfície do solo, uma vez ao ano, 15 dias antes da semeadura do milho. Houve um total de oito aplicações de CS entre 2003 e 2011. DL e CS foram os únicos nutrientes adicionados no experimento no período de 2003 e 2011. O milho foi semeado em linha no mês de novembro, com uma densidade de 50.000 plantas por hectare e aveia foi semeada em cada ano a lanço em maio com 120 kg de sementes por hectare.

Em setembro de 2012 foram coletadas amostras indeformadas de solo, na camada de 0–0,20 m de profundidade, nos tratamentos T, DL90, DL180, CS90 e CS180. Para esta coleta utilizou-se um amostrador que introduziu tubos de PVC de 0,20 m de diâmetro e 0,20 m de altura no solo, coletando-se um volume aproximado de 0,0063 m³. Foram coletadas cinco amostras indeformadas oriundas das três parcelas de cada tratamento. Estas amostras foram recolhidas de tal maneira que as camadas de solo foram preservadas, simulando o cultivo em SPD. Após a coleta, as amostras foram conservadas para o cultivo de milho em casa de vegetação.

2.2. Experimento em casa de vegetação

Em outubro de 2013 iniciou-se o cultivo de milho em dois cultivos distintos em casa de vegetação. Foram semeadas a uma

profundidade de aproximadamente 0,03 m oito sementes de milho do cultivar DKB 240, pré germinadas em laboratório, em cada amostra indeformada de solo, deixando-se seis após o raleio. As plantas, em todos os tratamentos, foram adubadas com nitrato de amônio apenas aos sete dias após a emergência (DAE), momento no qual se aplicou o equivalente a 30 kg ha⁻¹ de N diluído em água sobre o solo. A adubação com P e K foi realizada apenas no solo do tratamento testemunha com o equivalente a 20 kg ha⁻¹ de P na forma de superfosfato triplo e 10 kg ha⁻¹ de K na forma de cloreto de K, aos sete DAE. Os demais tratamentos não foram adubados com P e K em função dos altos valores encontrados no solo. Cada cultivo de milho foi realizado durante 25 dias após a emergência.

A temperatura média no interior da casa de vegetação durante a condução do experimento foi de 24,6 °C e a umidade relativa do ar foi de 43,1%. Durante a vigência do experimento a umidade do solo foi mantida a 80% da capacidade de campo, através da adição de água no solo.

Aos 15 e 25 DAE a parte aérea de três plantas foi cortada rente à superfície do solo e pesada em balança de precisão para determinação da massa fresca. Em seguida, aproximadamente cinco gramas de massa fresca foram separadas e congeladas em N líquido e reservadas em freezer -80°C para análises de carboidratos e proteínas solúveis e totais e atividade das enzimas catalase e ascorbato peroxidase. Com 100 mg de massa fresca foi realizada a análise do conteúdo de clorofila (*a*, *b* e total), carotenóides e densidade estomática. Para determinação de matéria seca, aproximadamente 10 g de massa fresca foram acondicionadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa com circulação de ar forçado a 60 °C até atingir peso constante. Em seguida, a matéria seca foi pesada em balança de precisão, moída e reservada para a análise do teor total de nutrientes no tecido.

Após a coleta das plantas aos 25 DAE, amostras de solo foram coletadas na profundidade de 0–0,10 m nas amostras indeformadas com auxílio de um trado calador. As amostras de solo foram secas em estufa com circulação de ar forçado a 40 °C, moídas em gral e reservadas para a análise de pH, matéria orgânica, Ca, Mg e K trocáveis, P disponível e teores disponíveis de Cu e Zn (EDTA e CaCl₂).

2.3. Análise do solo

O solo reservado foi submetido à análise de pH em água, na proporção 1:1 (**Tedesco et al., 1995**). O teor de carbono orgânico total

do solo foi determinado de acordo com **Embrapa (1999)**; o teor de P disponível e K^+ trocável foram extraídos usando a solução de Mehlich 1 (HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ + H_2SO_4 $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$) em uma relação solo/solução 1:10; o P disponível foi determinado em espectrofotômetro e o K^+ trocável em fotômetro de chama (**Tedesco et al., 1995**); o Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} foram extraídos usando solução de KCl 1 mol L^{-1} ; o Al^{3+} foi determinado por titulação com ácido-base, com uma solução de $NaOH$ $0,0125 \text{ mol L}^{-1}$; e os teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA) (**Tedesco et al., 1995**).

Os teores de Cu e Zn extraídos por EDTA foram obtidos de acordo a metodologia proposta por **Chaignon et al. (2009)**. Para tanto, foram pesados 1,5g de solo e adicionados em tubos de polipropileno do tipo Falcon (15 ml). Em seguida foram adicionados 10 mL de solução extratora (Na_2 -EDTA $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, com pH ajustado para 6,0), e agitado por uma hora em agitador end-over-end. Por fim, a solução foi centrifugada por 15min a 3200 rpm e passada em papel filtro. A fração extraída por $CaCl_2$ foi obtida de acordo com **Novozamsky et al. (1993)**. Foi pesado um grama de solo e adicionado em tubos de polipropileno do tipo Falcon (15 mL). Em seguida, foram adicionados 10 mL de solução extratora ($CaCl_2$ $0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e a suspensão foi agitada por duas horas. Ao final, as amostras foram centrifugadas por 15min a 3200 rpm e passadas em papel filtro. Os teores de Cu e Zn extraídos foram determinados em EEA.

2.3. Análises no tecido

2.3.1. Análises químicas nas folhas

Para a análise do total de N, P, K, Ca e Mg nas folhas foi pesado 0,200 g de matéria seca moída e adicionado em tubos de digestão de 100 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de H_2O_2 , 2 mL de H_2SO_4 e 0,7g da mistura de digestão (100 g de Na_2SO_4 + 10 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ + 1 g de selênio em pó) e os tubos foram aquecidos em bloco digestor a $170^\circ C$ por 20 min e, em seguida, a $360^\circ C$ por uma hora. Ao final, o volume dos extratos foi corrigido para 50 mL (**Tedesco et al., 1995**). A determinação do N foi realizada através da adição de 10 mL do extrato em tubos de digestão de 100 mL e destilação com 5 ml de $NaOH$ 10M em um destilador de arraste a vapor. O destilado (35 a 40 mL) foi recuperado em um erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL de indicador ácido bórico. Posteriormente, essa solução coletada foi titulada com H_2SO_4 a $0,025 \text{ mol L}^{-1}$. O P nos extratos foi determinado a partir de

leitura em espectrofotômetro de acordo com **Murphy & Riley (1977)**. O K foi determinado em fotômetro de chama. Os valores de Ca e Mg foram obtidos a partir de leitura em EAA após adição de Sr 0,3% (**Tedesco et al., 1995**).

O conteúdo de Fe, Cu e Zn nas folhas foi determinado a partir de digestão nitroperclórica (**Tedesco et al., 1995**). Foi pesado 0,5 g de matéria seca e adicionado em tubos de digestão de 100 mL. Em seguida foram adicionados 6 mL de ácido nítrico (HNO₃) concentrado nos tubos. Os mesmos foram colocados em bloco digestor e aquecidos a 120°C até restar apenas 1 mL do extrato. Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido perclórico (HClO₄) e os tubos foram aquecidos a 180°C por 2 horas. Após o resfriamento, o volume dos extratos foi ajustado para 25 mL com auxílio de balão volumétrico. Os teores de Cu, Zn e Fe foram determinados em EAA.

2.3.2. Clorofila e carotenóides totais

Foram pesados 100 mg de segmentos de massa fresca de folhas de milho e colocados em tubos de ensaio (12 mm x 120 mm) contendo 7 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Os tubos foram envolvidos em filme PVC e incubados em banho-maria por duas horas a 65 °C no escuro. Em seguida, a solução extraída foi adicionada em proveta e seu volume ajustado para 10 mL. Os valores de absorbância dos carotenóides totais e de clorofila *a* e *b* foram obtidos por meio de espectrofotometria, considerando-se a densidade ótica medida a 480 nm, 649 nm e 665 nm, respectivamente (**Hiscox & Israelstam, 1979**). Para determinação dos teores de clorofila *a* e *b* e de carotenóides totais foram utilizadas as equações propostas por **Wellburn (1994)**:

$$\text{Clorofila A} = [12,19 \times (A665) - 3,45 \times (A649)];$$

$$\text{Clorofila B} = [21,99 \times (A649) - 5,32 \times (A665)];$$

$$\text{Clorofila total} = \text{Chl } a + \text{Chl } b;$$

$$\text{Carotenóides totais}$$

$$= [1.000 \times (A480) - 2,14 \times (\text{Chl } a) - 70,16 \times (\text{Chl } b)] \div 220.$$

Após, os conteúdos dos pigmentos foram expressos em $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

2.3.3. Densidade de estômatos

A densidade de estômatos foi determinada a partir da massa fresca das folhas proveniente da análise de clorofila e carotenóides. Os segmentos foliares sem clorofila foram fixados sobre lâminas

microscópicas, sendo as análises da determinação do número de estômatos por mm² e da densidade estomática realizada em microscópio ótico, com objetiva 100x e área de 0,17 mm².

2.3.4. Carboidratos solúveis totais

A determinação do teor de carboidratos totais foi realizada de acordo com o método fenol-sulfúrico (**Dubois et al., 1956**). Para a extração foi macerado 1,0 g de massa fresca das folhas em cadinho de porcelana com N líquido (-196 °C). Em seguida o extrato foi adicionado em tubo falcon de 15 mL e foram adicionados 2,5 mL de etanol (80%). Os tubos foram colocados em banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 3000 rpm por 10 min. e o sobrenadante filtrado com microfibras de vidro em proveta. Esse procedimento foi repetido por três vezes. Ao final, o volume do extrato foi ajustado para 10 mL com etanol (80%). Deste volume, foram retirados 50 µL e adicionados 500 µL de água destilada, 0,5 mL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado (96%). A absorbância da solução foi medida em espectrofotômetro DB-20 Dynamica a 490 nm. O teor de carboidratos solúveis totais foi determinado com base em uma curva padrão obtida a partir de glicose (10, 20, 40, 60, 80 e 100 µg de glicose mL⁻¹).

2.3.5. Extração de enzimas antioxidantes e proteínas solúveis totais

Aproximadamente 500 mg de massa fresca de folhas de milho congelados foram macerados com 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,5), contendo 1mmol L⁻¹ de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 3 mmol L⁻¹ de ditioneitol (DTT) e 2% (p/v) de polivinilpirrolidona (PVP) (**Azevedo et al., 1998** com modificações). O homogeneizado foi centrifugado a 4000 rpm por 30 min a 4 °C e o sobrenadante foi armazenado em microtubos de 2 mL e guardado em ultrafreezer -80 °C. A partir desse extrato foram quantificadas as proteínas solúveis totais e as atividades das enzimas catalase e ascorbato peroxidase. A concentração de proteínas solúveis totais foi determinada de acordo com a metodologia descrita por **Bradford (1976)**, utilizando soro bovino e tendo a albumina como proteína padrão.

2.3.5.1. Atividades enzimáticas

A atividade da enzima catalase (CAT) foi determinada por espectrofotômetro monitorando o desaparecimento do H_2O_2 , durante 2 minutos, medindo a diminuição na absorbância em 240 nm, a 25 °C, em uma mistura de reação contendo 15 mmol L^{-1} de H_2O_2 em um tampão fosfato de sódio (100 mmol L^{-1} , em pH 7,5) e 30 μL do extrato, com um volume final de 2 mL conforme descrito por **Gomes-Junior et al. (2007)**.

A atividade da enzima Ascorbato Peroxidase (APX) foi determinada de acordo com **Nakano & Asada (1981)**. A mistura de reação consistiu de um volume total de 2 mL de tampão fosfato de sódio (50 mmol L^{-1} , em pH 7,0) contendo 0,1 mmol L^{-1} de EDTA, 0,5 mmol L^{-1} de ácido ascórbico, 0,1 mmol L^{-1} de H_2O_2 e 100 μL do extrato. O H_2O_2 dependente da oxidação de ascorbato foi determinado por uma diminuição do valor de absorbância em 290 nm (durante 2 minutos, a 30 °C), usando o coeficiente de extinção molar 2,8 mmol $\text{L}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

2.4. Análises estatísticas

Os valores de Cu e Zn no solo e no tecido, matéria seca, densidade estomática, teores de clorofilas e carotenóides e atividades das enzimas antioxidantes foram submetidos à análise de variância ANOVA. A hipótese de normalidade dos resultados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, por meio do programa computacional ASSISTAT. Quando os resultados foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

3. Resultados e discussão

3.1. Características do solo e teores totais de N, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu e Zn em folhas de milho

O solo submetido à aplicação do tratamento CS 180 apresentou os maiores teores de carbono orgânico total (COT), P, K, Ca e Mg em comparação aos demais tratamentos (Tabela 1). Em adição, o maior valor do pH também foi obtido nesse tratamento, assim como nos tratamentos DL 90 e CS 90. O valor de pH obtido no tratamento DL 180 não diferiu da testemunha. Resultado semelhante foi encontrado em trabalho conduzido por **Shen & Shen (2001)**, que utilizaram dejetos suíno na forma sólida para a adubação da cultura de feijão verde e observaram alterações nos atributos da solução do solo, com aumento

dos teores de K, P e Mg. Este resultado pode ser explicado em função dos elevados teores de nutrientes presentes na cama sobreposta (Sommer, 2001; Higarashi et al., 2008; Guardini et al., 2012). Além disso, a alta relação C/N e teor de lignina da cama, em função da mistura das fezes com a maravalha, promovem uma lenta decomposição do material orgânico (Shen & Shen, 2001). Giacomini et al. (2008) observaram uma mineralização da cama sobreposta equivalente a 23% do C aplicado ao solo, evidenciando uma baixa taxa de decomposição e liberação mais lenta de nutrientes ao solo, o que pode promover uma melhor ciclagem dos nutrientes nas camadas superficiais. Adicionalmente, a permanência mais prolongada da cama na superfície no solo pela utilização do sistema plantio direto também contribui para que grande parte dos nutrientes aplicados se mantenha nas camadas mais superficiais.

Os maiores teores de Cu extraídos por EDTA ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) foram obtidos nos solos submetidos à aplicação do tratamento CS 180 (Tabela 1). O tratamento DL 180 não exibiu diferenças com os tratamentos CS 90 e DL 90, mas foi superior à testemunha. Resultado semelhante foi observado com os teores de Zn extraídos por EDTA, onde o tratamento CS 180 apresentou o maior teor, seguido dos tratamentos CS 90 e DL 180. Estes diferiram da testemunha. Com relação aos teores de Cu extraídos por CaCl_2 ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$), o solo do tratamento CS 180 apresentou os maiores teores em comparação aos demais tratamentos. Os tratamentos DL 180 e CS 90 diferiram da testemunha. Os maiores teores de Zn foram obtidos no solo do tratamento DL180, que foi seguido por CS 90. Os tratamentos CS 180 e DL 90 não diferiram da testemunha. Esses resultados foram similares aos encontrados por Xu et al. (2013), que observaram aumento gradativo nos teores disponíveis de Cu e Zn no solo ao longo de 10 anos de aplicação de dejetos suínos. Esses mesmos autores ainda observaram que as doses mais elevadas de dejetos ($500 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ ano}^{-1}$) apresentaram os maiores incrementos de Cu e Zn disponíveis. Quando o Cu e Zn são adicionados aos solos, são adsorvidos primeiramente pelos sítios mais ávidos e de maior energia de ligação, porém, em seguida, esses elementos-traço remanescentes são distribuídos em frações onde são retidos por ligações de menor energia e, consequentemente, de maior mobilidade e disponibilidade (Tiecher et al., 2013), o que explica o aumento dos teores disponíveis de Cu e Zn no solo.

Tabela 1. Atributos químicos do solo aos 25 dias após a emergência (DAE) de sementes de milho *Zea mays* cultivar DKB 240, depois de submetido à aplicação de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS) para suprir 90 e 180 kg de N ha⁻¹.

	T	DL90	DL180	CS90	CS180
Carbono Orgânico Total, g kg ⁻¹	24,7 b ⁽¹⁾	28,1 b	31,9 b	30,8 b	42,4 a
pH em água	5,5 b	6,0 a	5,9 ab	6,0 a	6,3 a
Al trocável, cmol _c dm ⁻³	_ ns	_ ns	_ ns	_ ns	_ ns
Ca trocável, cmol _c dm ⁻³	6,74 c	7,27 c	7,47 bc	10,11 b	13,04 a
Mg trocável, cmol _c dm ⁻³	1,00 c	3,10 b	3,47 b	2,98 b	4,83 a
P disponível, mg dm ⁻³	19,7 d	201,8 c	542,4 b	267,1 c	776,0 a
K trocável, mg dm ⁻³	58,4 c	98,7 c	99,4 c	361,4 b	594,0 a
CTC _{pH 7,0} , cmol _c dm ⁻³	12,51 c	13,67 bc	14,60 bc	16,69 b	22,19 a
CTC _{efetiva} , cmol _c dm ⁻³	7,89 c	10,62 bc	11,20 bc	14,01 b	19,39 a
Saturação por bases (%)	62,78 c	77,68 b	76,43 b	83,81 a	87,26 a
Cu EDTA, mg kg ⁻¹	2,43 d	11,57 cd	27,21 b	18,54 bc	52,42 a
Zn EDTA, mg kg ⁻¹	4,65 c	32,81 bc	68,52 b	72,60 b	147,01 a
Cu CaCl ₂ , mg kg ⁻¹	0,12 d	0,18 cd	0,25 b	0,21 bc	0,42 a
Zn CaCl ₂ , mg kg ⁻¹	1,68 c	2,62 bc	10,36 a	3,82 b	2,0 bc

⁽¹⁾ Médias (± desvio padrão) seguidas pela mesma letra na linha não são diferentes significativamente (Teste Tukey, p<0,05).

Adicionalmente, a diferença entre os teores de Cu e Zn extraídos por EDTA em relação aos extraídos por CaCl₂ decorrem principalmente das características destes extratores. O CaCl₂ é um sal neutro que promove a substituição entre o Ca e o metal nos complexos de troca, utilizado para determinar os teores biodisponíveis de micronutrientes catiônicos no solo (**Gupta & Sinha 2007**). Considerando que elementos-traço estão principalmente localizados nas superfícies dos minerais e podem ser deslocados por outros íons, a extração ocorre pela saturação do solo pelo sal, o que promove a dessorção desses elementos, além da complexação com o ânion Cl⁻ (**Menzies et al., 2007**). Os agentes quelantes, como o EDTA, formam complexos estáveis com uma alta variedade de metais (**Barona et al., 2001**), sendo utilizados na biorremediação de solos contaminados (**Thayalakumaran et al., 2003; Meers et al., 2005**), o que explica os maiores teores obtidos com este extrator.

A aplicação de dejetos suíno promoveu principalmente o aumento da concentração de P e K nas folhas de milho aos 15 e 25 DAE, em comparação à testemunha (Tabela 2). Aos 15 DAE a concentração de Cu no tecido foi maior nos tratamentos CS 180 e DL 180 que diferiram de CS 90 e DL 90, mas sem apresentar diferenças em relação à T. Aos 25 dias não foram verificadas diferenças entre tratamentos, à exceção do tratamento CS 90 que apresentou uma concentração de Cu nos tecidos inferior àquela do tratamento T. Em relação ao Zn, aos 15 DAE verificaram-se as maiores concentrações nas folhas das plantas cultivadas nos tratamentos DL 180 e CS 180, mas somente DL 180 diferiu dos tratamentos CS 90, DL 90 e T. Aos 25 DAE as maiores concentrações de Zn foram encontradas nos tratamentos DL 180 e CS 90, mas as diferenças de concentrações foram entre DL 180 em relação aos tratamentos CS 180, DL 90 e T. Os dados sugerem que o Cu está sendo pouco acumulado nas folhas de milho apesar do aumento dos seus teores no solo devido às aplicações com dejetos suíno, o mesmo não ocorrendo com o Zn. Este resultado pode ser explicado devido à competição na absorção e pelos sítios de ligação presentes na parede celular entre esses elementos como descrito por Fulani et al. (2005). Estes autores observaram uma diminuição gradativa na concentração de Mg, Cu e Fe em 24 cultivares comerciais de milho quando cultivadas em doses crescentes de Zn, o que apóia os resultados do presente estudo.

3.2. Produção de biomassa, densidade estomática e conteúdo de clorofila, carotenóides, proteínas e carboidratos solúveis totais.

A maior produção de matéria seca foi observada nas plantas de milho cultivadas no solo dos tratamentos DL 90, DL180, CS 90 e CS 180 em comparação à testemunha, tanto aos 15 como aos 25 DAE (Fig. 1a). Verifica-se que as aplicações de maiores doses de N, tanto na forma de dejetos líquidos como em cama sobreposta, não promoveram incrementos na produção de biomassa das plantas.

Tabela 2. Concentração de nutrientes em folhas de milho *Zea mays* cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).

Dias após a emergência (DAE)		N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	
		-----g kg ⁻¹ -----					-----mg kg ⁻¹ -----			
		---					--			
15	T	23,6 a ⁽¹⁾	6,2 b	22,7 c	6,3 a	6,3 a	117,4 b	9,3 ab	64,4 b	
	DL90	20,8 ab	6,3 b	38,3 b	4,5 bc	5,8 a	89,6 b	7,5 b	61,5 b	
	DL180	23,4 a	7,7 a	35,8 b	4,9 ab	7,8 a	194,1 a	10,9 a	93,3 a	
	CS90	19,4 b	6,7 ab	50,6 a	3,1 c	2,2 b	96,6 b	7,9 b	77,1 b	
	CS180	20,5 b	6,7 ab	53,2 a	3,0 c	2,0 b	128,6 b	10,8 a	80,0 ab	
25	T	20,2 a	4,1 c	21,5 c	5,0 a	5,5 a	123,1 b	8,8 a	42,8 b	
	DL90	23,6 a	5,2 b	34,3 b	3,9 bc	4,7 a	186,5 a	7,5 ab	49,5 b	
	DL180	21,3 a	6,3 a	34,4 b	4,1 ab	5,4 a	118,1 b	8,0 ab	66,4 a	
	CS90	20,5 a	5,8 ab	46,0 a	3,0 cd	2,6 b	106,0 b	7,2 b	55,5 ab	
	CS180	22,3 a	5,7 ab	45,8 a	2,6 c	2,0 b	91,8 b	7,6 ab	44,6 b	

⁽¹⁾ Médias (\pm desvio padrão) seguidas pela mesma letra em cada coluna não são diferentes significativamente na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, $p < 0.05$).

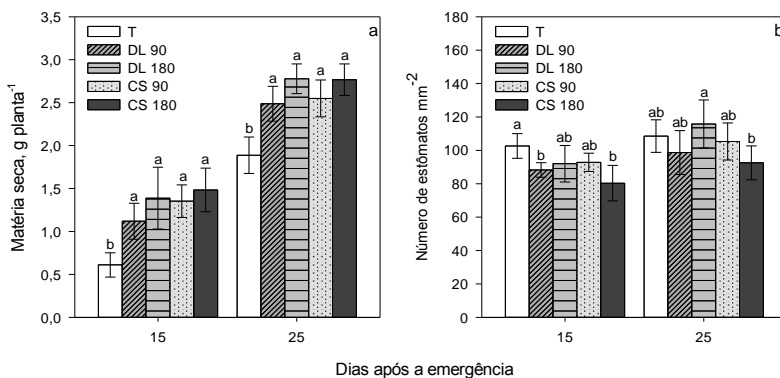


Fig. 1. Matéria seca (a) e número de estômatos em folhas (b) de *Zea mays* cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivadas em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias (\pm desvio padrão) seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, $p < 0,05$).

A maior densidade estomática foi observada nas folhas do milho cultivado no solo sem adubação (T) (Fig. 1b), resultado que foi superior ao das plantas cultivadas nos tratamentos DL 90 e CS 180, aos 15 DAE. Aos 25 DAE, as folhas de milho cultivado no solo do tratamento DL 180 apresentaram a maior densidade estomática, porém diferenciando apenas do tratamento CS 180. A diminuição da densidade estomática no tratamento CS 180 pode ser atribuída a uma resposta adaptativa das plantas para diminuir a absorção de água e, conseqüentemente, nutrientes, com destaque aos elementos-traço, através da falta de gradiente de pressão (Di Baccio et al., 2009). Outra explicação pode ser o desbalanço entre K^+/Ca^{2+} nas células guarda ou alteração na concentração de ácido abscísico, que controla o movimento dos estômatos (Vaillant et al., 2005). Contudo, ao observar a produção de matéria seca das plantas cultivadas no solo adubado com CS 180, nota-se que esta variável não foi influenciada pelo menor número de estômatos, tanto aos 15 quanto aos 25 DAE. Em relação ao aumento na densidade estomática nas folhas de milho cultivado no solo adubado com DL 180, o resultado pode indicar uma resposta a um agente estressante, como metal pesado. A presença de uma maior densidade estomática e nas folhas promove uma maior assimilação de CO_2 e,

consequentemente, uma maior produção de fotoassimilados, o que permite a síntese das moléculas orgânicas necessárias ao crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como de compostos envolvidos nos mecanismos de desintoxicação, como fitoquelatinas, taninos e compostos fenólicos (Roitto et al., 2005; Azmat et al., 2009; Shi & Caia, 2009).

Tabela 3. Clorofila a, b, a/b e total e carotenóides totais em folhas de milho *Zea mays* cultivar DKB 240 aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).

Pigmentos Fotossintéticos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Tratamentos				
	T	DL 90	DL 180	CS 90	CS 180
	15 dias				
Clorofila a	16,188 a ⁽¹⁾	14,633 a	15,761 a	14,086 a	14,258 a
Clorofila b	3,980 a	3,411 ab	3,542 ab	3,036 b	3,198 b
Clorofila a/b	4,083 b	4,299 ab	4,466 ab	4,634 a	4,465 ab
Clorofila total	20,168 a	18,045 ab	18,786 ab	17,122 b	17,456 ab
Carotenóides totais	2,868 a	2,673 a	2,862 a	2,517 a	2,632 a
	25 dias				
Clorofila a	17,613 a	15,537 a	16,407 a	11,160 b	15,888 a
Clorofila b	4,672 a	3,969 a	3,926 a	2,606 b	4,075 a
Clorofila a/b	3,786 c	3,914 bc	4,179 ab	4,274 a	3,924 bc
Clorofila total	22,284 a	19,745 a	20,333 a	13,766 b	20,284 a
Carotenóides totais	3,443 a	3,146 a	3,205 a	2,232 b	3,341 a

⁽¹⁾ Médias (\pm desvio padrão) seguidas pela mesma letra em cada linha não são diferentes significativamente na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, $p < 0.05$).

Aos 15 DAE, o conteúdo de clorofila *a* e carotenóides totais nas folhas de milho não foram influenciados pelos diferentes tratamentos, não apresentando diferenças com o conteúdo das folhas de milho cultivadas no solo do tratamento testemunha (Tabela 3). Nesta mesma data de avaliação, o conteúdo de clorofila *b* e total foi maior nas folhas de milho do tratamento testemunha, que diferiu do conteúdo de clorofila

b nas folhas dos tratamentos CS 90 e CS 180, e do conteúdo de clorofila total do tratamento CS 90. A relação clorofila *a/b* foi incrementada no tratamento CS 90, sendo o único que apresentou diferenças com a testemunha. Aos 25 DAE a aplicação de 90 kg de N ha⁻¹ na forma de cama sobreposta no solo (CS 90) promoveu uma diminuição nos conteúdos de clorofila (*a*, *b* e total) e carotenóides totais nas folhas de milho em comparação aos demais tratamentos (Tabela 3). O tratamento CS 90 também promoveu incrementos na relação entre clorofila *a/b* em comparação aos tratamentos DL 90, CS 180 e T, não diferindo apenas do tratamento DL 180. A diminuição dos teores de clorofila pode ser atribuída a uma resposta fisiológica da planta à presença de elevados teores de elementos-traço no tecido vegetal (Borghi et al., 2007). Elementos como o Cu e Zn interferem na biossíntese de clorofila através da inibição do ácido α -aminolevulínico (ALA), provocam mudanças na cadeia de transporte de elétrons na etapa fotoquímica da fotossíntese, peroxidação lipídica das membranas tilacóides e podem inibir a atividade da enzima Rubisco pela substituição do Mg²⁺ ou ligação com os grupos SH- (Vinit-Dunand et al., 2002; Couée et al., 2006; Gomes et al., 2011), e, por consequência, pode afetar a produção de fotoassimilados e o desenvolvimento da planta. Adicionalmente, a diminuição no conteúdo de carotenóides nas folhas pode estar relacionada à ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), interferindo em sua biossíntese ou aumentando sua degradação, visto que os mesmos atuam na proteção das clorofilas, eliminando oxigênio singletos (1O₂) (Kholová et al., 2009). Em somatório, o aumento na relação entre clorofila *a/b*, que é um indicador de estresse, nos tratamentos CS 90 e DL 180 aos 25 DAE pode também indicar um maior efeito inibidor sobre a clorofila *b*. Este resultado pode indicar um efeito sobre a eficiência fotoquímica do PS II, como reflexo da ação de metais no tecido ou pela presença de EROs (Öncel et al., 2000; Zengin and Munzuroglu, 2005; Tanyolaç, et al., 2007).

Os teores de proteínas e carboidratos solúveis totais nas folhas de milho aos 15 e 25 DAE não diferiram estatisticamente entre os tratamentos (Figs. 2a, b), indicando que a presença dos elementos-traço nas plantas, provenientes das aplicações de dejetos suíno, não influenciou a biossíntese do maquinário fotossintético e componentes da sua membrana, e, conseqüentemente, a produção de carboidratos (Al-Hakimi & Hamada, 2011). Essa conclusão também tem validade com relação às proteínas, cuja redução está associada à sua ligação com metais, principalmente na presença de grupos tióis, o que promove sua alteração ou inativação, além do dano oxidativo (Letelier et al., 2004;

Qi et al., 2006; Jain et al., 2010), efeito que não ocorreu no presente estudo.

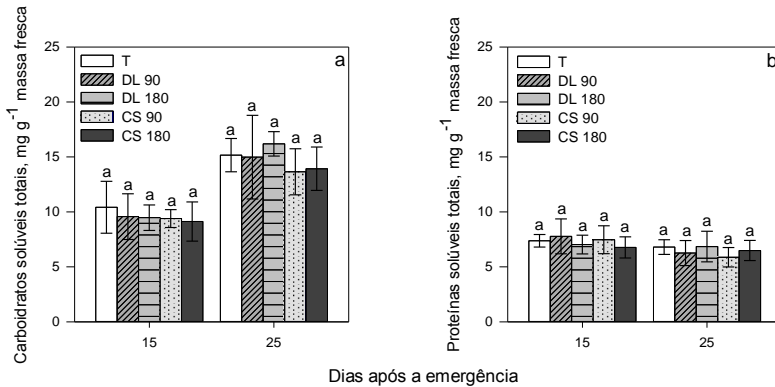


Fig. 2. Carboídratos (a) e proteínas solúveis totais (b) em folhas de *Zea mays* cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquidos suínos (DL) e cama sobreposta (CS). Médias (± desvio padrão) seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, p<0,05).

3.3. Atividade das enzimas catalase e APX

A atividade da enzima catalase (CAT), apresentou poucas variações nas folhas de milho dos tratamentos adubados com dejetos suínos (DL e CS) e do tratamento testemunha, aos 15 e 25 DAE (Fig. 3a). Contudo, em ambas as datas de avaliação, a atividade da CAT foi maior nas folhas de milho cultivadas no solo do tratamento DL 180 em comparação ao tratamento CS 180. Aos 15 DAE, a maior atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) foi observada nas folhas das plantas cultivadas no solo dos tratamentos testemunha, DL 90 e DL 180 (Fig. 3b), mas somente a testemunha diferiu dos tratamentos CS 90 e CS 180. Aos 25 DAE, a atividade da APX das folhas de milho dos tratamentos DL 90 e CS 90 foi superior àquela do tratamento CS 180. A APX é encontrada em cloroplastos e no citosol e reduz o H₂O₂ em água usando ascorbato como doador de elétrons (Hu et al., 2005; Mikaye et al., 2006). A diminuição na atividade da APX mostra o efeito oxidante na

planta, mas também revela a baixa concentração de H_2O_2 no tecido, uma vez que a APX apresenta alta afinidade com esta espécie de EROs (Panchuk et al., 2005). Da mesma forma, a diminuição na atividade da CAT permite inferir um aumento na concentração de H_2O_2 em determinadas organelas na célula. A CAT é encontrada principalmente nos peroxissomos/glioxissomos (Mittler et al., 2004) e está envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em altas concentrações, já que a catalase apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 (Mittler, 2002). A diminuição na atividade das enzimas APX e CAT pode estar relacionada com a concentração de H_2O_2 presente nas células das folhas de milho, visto que a exposição prolongada da CAT à presença de EROs, por exemplo, pode causar a metilação de CpG island II, um promotor desta enzima, reduzindo sua expressão e atividade (Min et al., 2010). Adicionalmente, os resultados obtidos são semelhantes aos encontrados no estudo de Giroto et al (2013), que avaliaram o efeito do acúmulo de Cu e Zn em um solo submetido a mais de oito anos de aplicações sucessivas de diferentes doses de dejetos líquidos suíno (0, 20, 40 e $80m^3 ha^{-1}$) sobre as respostas fisiológicas e o desenvolvimento de plantas de milho. Esses autores observaram que mesmo em doses mais elevadas de dejetos líquidos houve pequenos efeitos sobre as atividades das enzimas CAT e APX, principalmente. Os autores atribuíram esse comportamento tanto à baixa disponibilidade de Cu e Zn no solo como ao complexo sistema de defesa presente na planta, onde outros mecanismos podem atuar para diminuir a atividade das enzimas CAT e APX. A reação de Fenton, catalisada por metais como Fe^{2+} e Cu^+ , e a reação de Haber-Weiss, por exemplo, reduzem a concentração de H_2O_2 , convertendo-o em moléculas como OH^{\bullet} , OH^- e O_2 (Mithöfer et al., 2004), o que também pode ter ocorrido no presente estudo.

5.4. Conclusão

A utilização de dejetos líquidos suíno e cama sobreposta promoveu o incremento dos teores disponíveis de Cu e Zn (EDTA e $CaCl_2$) no solo, mas apenas foi observado o aumento da concentração de Zn no tecido das plantas de milho. No entanto, a produção de matéria seca não foi afetada pela aplicação dos diferentes dejetos suínos (DL e CS). Foram observadas pequenas alterações nos conteúdos de clorofila a, b e total e carotenóides totais e no sistema enzimático antioxidante (catalase e APX), além da densidade estomática, principalmente nas folhas de

milho cultivado nos solos que foram adubados com 180 kg de N ha⁻¹ tanto na forma de dejetos líquidos como de cama sobreposta (DL 180 e CS 180). O aumento dos teores de Cu e Zn no solo e no tecido das plantas de milho provocou alterações nos mecanismos de defesa antioxidante. Assim, a manutenção das aplicações de dejetos suínos, com base no critério do fornecimento de N às culturas, poderá incrementar os valores destes elementos no solo e no tecido, aumentando os efeitos dos agentes oxidantes observados no presente trabalho.

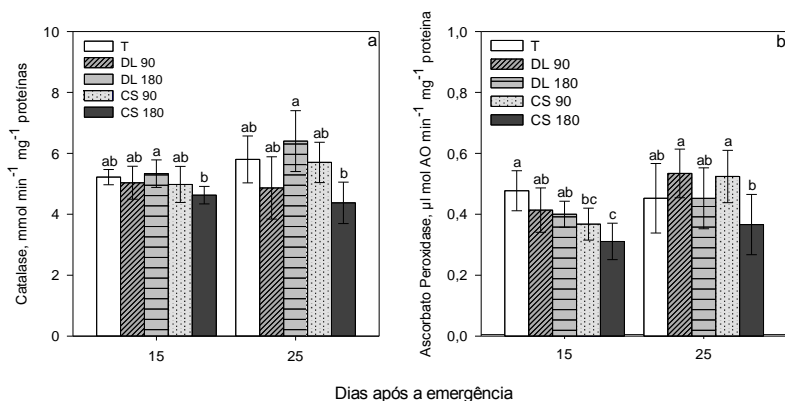


Fig. 3. Atividade da catalase (a) e ascorbato peroxidase (b) em folhas de *Zea mays* cultivar DKB 240, aos 15 e 25 dias após a emergência (DAE), cultivado em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquidos suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias (\pm desvio padrão) seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos na mesma data de amostragem (15 e 25 DAE) (Teste Tukey, $p < 0,05$).

5.5. Referências Bibliográficas

AL-HAKIMI, A. B. M. & HAMADA, A. M. Ascorbic acid, thiamine or salicylic acid induced changes in some physiological parameters in wheat grown under copper stress. **Plant Protect Sci**, v.47, p.92-108, 2011.

- ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J.M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v.3, p.71-90, 2004.
- ALLOWAY, B.J. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. *Environ Geochem Health*. 31:537–548, 2009.
- AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase deficient mutant of barley. **Physiol. Plant**. vol.104, p.280–292. 1998.
- AZMAT, R.; HAIDER, S.; NASREEN, H.; AZIZ, F.; RIAZ, M. A viable alternative mechanism in adapting the Plants to heavy metal environment. **Pak. J. Bot.**, v.41(6), p.2729-2738, 2009.
- BARONA, A.; ARANGUIZ, I.; ELIAS, A. Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination: implications for the effectiveness of further clean-up procedures. **Environmental Pollution**, v.113(1), p.79-85, 2001.
- BERWANGER, A.L.; CERETTA, C.A.; RHEINHEIMER, D.S. Alterações no teor de fósforo no solo com aplicação de dejetos líquidos de suínos. **R. Bras. Ci. Solo**, 32:2525-2532, 2008.
- BORGHI, M.; TOGNETTI, R.; MONTEFORTI, G.; SEBASTIANI, L.. Responses of *Populus × euramericana* (*P. deltoides* × *P. nigra*) clone Adda to increasing copper concentrations. *Environ. Exp. Bot.* v.61, p.66–73. 2007.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; HAMMOND, J.P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytol.** 173, 677–702, 2007.
- BRUN, L.A.; CORFF, J.L.E.; MAILLET, J. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environ Pollut** v.122; p.361–368, 2003.
- CERETTA, C.A.; LORENSINI, F.; BRUNETTO, G.; GIROTTO, E.; GATIBONI, L.C.; LOURENZI, C.R.; TIECHER, T.L.; DE CONTI, L.; TRENTIN, G.; MIOTTO, A. Frações de fósforo no solo após sucessivas

aplicações de dejetos de suínos em plantio direto. **Pesq. Agropec. Bras.**, 45:593-602, 2010.

CHAIGNON, V.; QUESNOIT, M.; HINSINGER, P. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. **Environmental Pollution**. v. 157, p. 3363-3369, 2009.

CHAVES, L. H. G.; ESTRELA, M. A.; DE SOUZA, R. S. Effect on plant growth and heavy metal accumulation by sunflower. **Journal of Phytology**, v.3(12), p.04-09, 2011.

CHERIF, J.; DERBEL, N.; NAKKACH, M.; VON BERGMANN, H.; JERNAL, F.; LAKHDAR, Z. B. Analysis of in vivo chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.101, p.332-339, 2010.

CÓLLEN, J.; PINTO, E.; PEDERSEN, M.; COLEPICOLO, P. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. **Environ. Contam. Toxicol**. v. 45, p.337-342, 2003.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – CFS-RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 3.ed. Passo Fundo, SBCS/NRS, 1994. 223p.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 400, 2004.

COUÉE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; AMRANI, A.E. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.449-459, 2006.

DI BACCIO, D., TOGNETTI, R., MINNOCCI, A., & SEBASTIANI, L. Responses of the *Populus euramericana* clone I-214 to excess zinc: Carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. **Environmental and experimental botany**, v.67(1), p.153-163, 2009.

- D'SOUZA, R. M.; DEVARAJ, V. R. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in hyacinth bean under zinc stress. **African Crop Science Journal**, v. 20, n. 1, p. 17 – 29, 2012.
- DUBOIS, M.K.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, **Anal. Chem.** v.28, p.350, 1956.
- EMBRAPA. Sistema brasileiro de classificação de solos. Brasília: Embrapa-SPI; Rio de Janeiro: Embrapa-CNPq, 1999. 412p.
- FEIGL, G.; KUMAR, D.; LEHOTAI, N.; TUGYI, N.; MOLNÁR, A.; ÖRDÖG, A.; SZEPESI, A.; GEMES, K.; LASKAY, G.; ERDEI, L.; KOLBERT, Z. Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassicajuncea* L. Czern.) and rape seed (*Brassica napus* L.) to copper stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.94, p.179–189, 2013.
- FURLANI, Â. M. C.; FURLANI, P. R.; MEDA, A. R.; DUARTE, A. P. Efficiency of maize cultivars for zinc uptake and use. **Scientia Agricola**, v.62(3), p.264-273, 2005.
- GATIBONI, L.C.; BRUNETTO, G.; KAMINSKI, J.; RHEINHEIMER, D. dos S.; CERETTA, C.A.; BASSO, C.J. Formas de fósforo no solo após sucessivas adições de dejetos líquidos de suínos em pastagem natural. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. vol.32, n.4, pp. 1753-1761, 2008.
- GOMES, M.P.; SÁ, T.C.L.L.; MARQUES, M.; NOGUEIRA, M.O.G.; SILVA, G.H.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M. Efeitos dos rejeitos da indústria de zinco na anatomia e crescimento de plantas jovens de *Salix humboldtiana* Willd. (salgueiro). **Hoehnea**, v.38(1), p.135-142, 2011.
- GOMES-JUNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Funct. Plant Biol.** v.34, p.449–456, 2007.
- GIACOMINI, S. J.; AITA, C.; MIOLA, E. C. C.; RECOUS, S. Carbon mineralization of straw and pig manure with and without incorporation in soil. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, vol.32, p. 2661-2668, 2008.
- GIROTTO, E.; CERETTA, C.A.; BRUNETTO, G.; RHEINHEIMER, D.S.; SILVA, L.S.; LOURENSINI, F.; LOURENZI, C.R.; VIEIRA, R.C.B. & SCHMATZ, R. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo

após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. **R. Bras. Ci. Solo**, 34:955-965, 2010.

GIROTTO, E.; CERETTA, C.A.; ROSSATO, L.V.; FARIAS, J.G.; TIECHER, T.L.; DECONTI, L.; SCHMATZ, R.; BRUNETTO, G.; SCHETINGER, M.R.C.; NICOLOSO, F.T. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol.93, p.145-155, 2013.

GUARDINI, R.; COMIN, J.J.; SCHMITT, D.; TIECHER, T.; BENDER, M.A.; RHEINHEIMER, D.S.; MEZZARI, C.P.; OLIVEIRA, B.S.; GATIBONI, L.C.; BRUNETTO Accumulation of phosphorus fractions in typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep pig litter in a no-tillage system. **Nutr Cycl Agroecosyst**, v.93, p.215-225, 2012.

GUPTA, A. K.; SINHA, S. Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern.(var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 1, p. 144-150, 2007.

HADLICH, G.M.; SCHEIBE, L.F. Dinâmica físico-química de águas superficiais em região de intensa criação: exemplo da Bacia Hidrográfica do rio Coruja-Bonito, município de Braço do Norte, SC. **Geochimica Brasiliensis**, v.21, n.3, p.245-260, 2007.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v.141, p.312-322, 2006.

HIGARASHI, M.M.; COLDEBELLA, A.; OLIVEIRA, P.A.V.; KUNZ, A.; MATTEI, R.M.; SILVA, V.S.; AMARAL, A.L. Concentração de macronutrientes e metais pesados em maravalha de unidade de suínos em cama sobreposta. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.12, n.3, p.311-317, 2008.

HINSINGER, P. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. *In* **Trace Elements in the Rhizosphere**. Eds G R Gobran, W W Wenzel and E Lombi. CRC Press LCC, Boca Raton, FL, 2001, pp. 25-41.

HISCOX, J.D. & ISRAESLTAM, G.F. A method for extraction of chlorophyll from leaf without maceration. **Canadian Journal of Botany** 57:1332-1334, 1979.

- HU, X., JIANG, M., ZHANG, A., & LU, J. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta**, v.223(1), p.57-68, 2005.
- JAIN, R.; SRIVASTAVA, S.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A. K.; CHANDRA, A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta physiologiae plantarum**, v.32(5), p.979-986, 2010.
- KHOLOVÁ, J., SAIRAM, R. K., MEENA, R. C., & SRIVASTAVA, G. C. Response of maize genotypes to salinity stress in relation to osmolytes and metal-ions contents, oxidative stress and antioxidant enzymes activity. **Biologia Plantarum**, v.53(2), p.249-256, 2009.
- KRZESŁOWSKA, M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 1, p. 35-51, 2011.
- KONZEN, E.A. **Aproveitamento de dejetos líquidos de suínos para fertirrigação e fertilização em grandes culturas**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2003a. 11p. (Circular Técnica, 32).
- LETELIER, M. E.; LEPE, A. M.; FAÚNDEZ, M.; SALAZAR, J.; MARÍN, R.; ARACENA, P.; SPEISKY, H. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. **Chemico-biological interactions**, v.151(2), p.71-82, 2005.
- LEHMANN, A.; VERESOGLOU, S.D. ; LEIFHEIT, E.F.; RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizal influence on zinc nutrition in crop plants – A meta-analysis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.69. p.123-131. 2014.
- LI, X.; MA, H.; JIA, P.; WANG, J.; JIA, L.; ZHANG, T.; QIAO, K.; WEI, X. Responses of seedling growth and antioxidant activity to excess iron and copper in *Triticum aestivum* L. **Ecotoxicology and environmental safety**, v.86, p.198–203, 2012.
- LIN, Q.; SHEN, K. L.; ZHAO, H.M.; LI, W.H. Growth response of *Zea mays* L. in pyrene-copper co-contaminated soil and the fate of pollutants. **J. Hazard. Mater.**, v.150, p. 515–521, 2008.
- LIU, Y.; CAO, Q.; LUO, F.; CHEN, J. Biosorption of Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ ions from aqueous solutions by pretreated biomass of brown algae. **Journal of Hazardous Materials**, v.163, p.931–938, 2009.

- MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London, Academic Press. 2012, 651p.
- MENZIES, N. W.; DONN, M. J.; KOPITTKE, P. M. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. **Environmental pollution**, v.145(1), p.121-130, 2007.
- MEERS, E.; RUTTENS, A.; HOPGOOD, M. J.; SAMSON, D.; TACK, F. M. G. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Chemosphere**, v.58(8), p.1011-1022, 2005.
- MICHAEL, P. I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 171-177, 2011.
- MIN, J. Y.; LIM, S.; JUNG, G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. **FEBS Letters**, v.584, p.2427-2432, 2010.
- MITHÖFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. **FEBS Lett**, v.566, p.1-5, 2004.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**. v.7, p.405-410. 2002.
- MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., & VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v.9(10), p.490-498, 2004.
- MIYAKE, C., SHINZAKI, Y., NISHIOKA, M., HORIGUCHI, S., & TOMIZAWA, K. I. Photoinactivation of ascorbate peroxidase in isolated tobacco chloroplasts: *Galdieria partita* APX maintains the electron flux through the water-water cycle in transplastomic tobacco plants. **Plant and cell physiology**, v.47(2), p.200-210, 2006.
- MORRISON, R. S.; HEMSWORTH, P. H.; CAMPBELL, R. G.; CRONIN, G. M. The social and feeding behaviour of growing pigs in deep-litter, group housing systems. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v. 82, p.173-188, 2003.
- MORRISON, R. S.; JOHNSTON, L. J. ; HILBRANDS, A. M. The behaviour, welfare, growth performance and meat quality of pigs housed in a deep-litter, large group housing system compared to a conventional confinement system. **Appl. Anim. Behav. Sci.**, v.103, p. 12-24, 2007.

- MURPHY, J. & RILEY, J. P. A Modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Anal Chem Acta**, v.27, p.31–36, 1962.
- NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiol.** v.22, p.867–880, 1981.
- NOVOZAMSKY, I.; LEXMOND, T. M.; HOUBA, V. J. G. A single extraction procedure of soil for evaluation of uptake of some heavy metals by plants. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, vol. 51, p. 1-4, 1993.
- ÖNCEL, I.; KELEŞ, Y.; ÜSTÜN, A. S. Interactive effects of temperature and heavy metal stress on the growth and some biochemical compounds in wheat seedlings. **Environmental Pollution**, v.107(3), p.315-320, 2000.
- PALMER, C. M. & GUERINOT, M. L. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Nature Chem. Biol.** v.5, p.333–340, 2009.
- PANCHUK, I.I., ZENTGRAF, U.; VOLKOV, R.A. Expression of the APX gene family during leaf senescence of Arabidopsis thaliana. **Planta**, v.222, p.926-932, 2005.
- QI, X. M.; LI, P. J.; LIU, W.; XIE, L. J. Multiple biomarkers response in maize (*Zea mays* L.) during exposure to copper. **Journal of Environmental Sciences**, v.18(6), p.1182-1188, 2006.
- RIZHISKY, L.; HALLAK-HERR2, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J. E.; RODERMEL, S.; INZE´, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, vol. 32, p. 329–342, 2002.
- ROITTO, M.; RAUTIO, P.; JULKUNEN-TITTO, R.; KUKKOLA, E.; HUTTUNEN, S. Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in Scot pine (*Pinus sylvestris*L.) seedlings exposed to nickel and copper. **Environ Pollut**, v.137, p.603–609, 2005.
- SAGARDOY, R.; MORALES, F.; LÓPEZ-MILLÁN, A.; ABADIA, A.; ABADIA, J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biol**, v.11, p.339–350, 2008.

SAMREEN, T., SHAH, H. U., ULLAH, S., & JAVID, M. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*Vigna radiata*). **Arabian Journal of Chemistry**., 2013.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. **Journal of plant research**, v. 127, n. 1, p. 119-129, 2014.

SCHERER, E.E.; NESI, C.N.; MASSOTTI, Z. Atributos químicos do solo influenciados por sucessivas aplicações de dejetos suínos em áreas agrícolas de Santa Catarina. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. vol.34, n.4, pp. 1375-1383. 2010.

SCHRAMEL, O.; MICHALKE, B.; KETTRUP, A. Study of the copper distribution in contaminated soils of hop fields by single and sequential extraction procedures. **Sci Total Environ.**, v.263, p.11-22, 2000.

SHEN, Q. P.; SHEN, Z. G. Effects of pig manure and wheat straw on growth of mung bean seedlings grown in aluminium toxicity soil. **Bioresource Technology**, v.76, p.235-240, 2001.

SHI, G.; CAIA, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.112-117, 2009.

SOIL SURVEY STAFF. Keys to soil taxonomy. 10.ed. Washington, USDA-SCS, 2006. 332p.

SOMMER, S. G. Effect of composting on nutrient loss and nitrogen availability of cattle deep litter. **European Journal of Agronomy**, v.14, p.123-133, 2001.

SONG, A.; LI, P.; LI, Z.; FAN, F.; NIKOLIC, M.; LIANG, Y. The alleviation of zinc toxicity by silicon is related to zinc transport and antioxidative reactions in rice. **Plant and soil**, v.344(1-2), p.319-333, 2011.

TANYOLAÇ, D.; EKMEKÇI, Y.; ÜNALAN, S. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. **Chemosphere**, v. 67(1), p.89-98, 2007.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p.

THAYALAKUMARAN, T.; ROBINSON, B. H.; VOGELER, I.; SCOTTER, D. R.; CLOTHIER, B. E.; PERCIVAL, H. J. Plant uptake and leaching of copper during EDTA-enhanced phytoremediation of repacked and undisturbed soil. **Plant and Soil**, v.254(2), p.415-423, 2003.

TIECHER, T.L.; CERETTA, C.A.; COMIN, J.J.; GIROTTO, E.; MIOTTO, A.; MORAES, M.P.; BENEDET, L.; FERREIRA, P.A.A.; LORENZI, C.R.; COUTO, R.R.; BRUNETTO, G. Forms and accumulation of copper and zinc in a sandy typic hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. vol.37, n.3, pp. 812-824. 2013.

VAILLANT, N., MONNET, F., HITMI, A., SALLANON, H., & COUDRET, A. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. **Chemosphere**, v.59(7), p.1005-1013, 2005.

VINIT-DUNAND, F.; EPRON, D.; ALAOU-SOSSÉ, B.; BADOT P. M. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. **Plant Science**, v.163, p.53-58, 2002.

WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.** v.144, p.307-313, 1994.

XU, Y.; YU, W.; MA, Q.; ZHOU, H. Accumulation of copper and zinc in soil and plant within ten-year application of different pig manure rates. **Plant, Soil and Environment**, v.59(11), p.492-499, 2013.

YADAV, S. K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 167-179, 2010.

YRUELA, Inmaculada. Copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.** vol.17, n.1, pp. 145-156. 2005.

ZENGIN, F. K.; MUNZUROGLU, O. Effects of some heavy metals on content of chlorophyll, proline and some antioxidant chemicals in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v.47 (2), p.157-164, 2005.

6. ARTIGO II – ACÚMULO DE Cu E Zn NA RIZOSFERA E EM RAÍZES DE MILHO (*Zea mays*) EM SOLO ADUBADO COM DEJETO SUÍNO

RESUMO

As plantas podem modificar a disponibilidade de Cu e Zn no solo e promover seu acúmulo nas raízes, mantendo adequadas suas concentrações na parte aérea. O trabalho avaliou os teores de Cu e Zn no solo rizosférico e não rizosférico e seu acúmulo em raízes de plantas de milho cultivadas em solo com histórico de aplicação de dejetos suínos. Foi cultivado milho em minirizobox contendo solo coletado de um experimento a campo que recebeu a adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como dejetos líquidos suínos e adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como cama sobreposta. O solo adubado com o tratamento CS 180 apresentou os maiores teores de Cu extraído por EDTA e CaCl₂ e de Zn extraído por EDTA, enquanto o tratamento DL 180 promoveu o maior teor de Zn extraído por CaCl₂. A concentração de Cu e Zn nas raízes foi incrementada com aplicação dos tratamentos DL 180 e CS 180, tanto na apoplasto como no simplasto. As concentrações de Zn foram superiores na região do apoplasto em todos os tratamentos. O acúmulo de Cu e Zn nas raízes é um mecanismo importante para a manutenção das concentrações desses metais em níveis adequados na parte aérea.

Termos de indexação: elementos-traço, biodisponibilidade, apoplasto, simplasto.

6.1. Introdução

O Cu e Zn são elementos-traço presentes naturalmente nos solos, sendo seus teores dependentes do material de origem e dos processos de formação do solo, principalmente (Fadigas et al., 2002). Contudo, ações antrópicas como indústrias e agricultura podem elevar os teores desses elementos, alterando sua labilidade (Corbi et al., 2006).

A disponibilidade dos elementos-traço é determinada pelo pH, potencial redox, força iônica, íons competidores e pelos constituintes do solo (minerais e orgânicos), além do próprio potencial iônico do metal, ou seja, a relação da sua carga e raio iônico (z^2/r) (Amaral Sobrinho et al., 2009; Costa et al., 2012). Komy et al. (2013), ao avaliar a adsorção

de Cu em diferentes minerais e condições geoquímicas (força iônica, pH e presença de ácidos húmicos, por exemplo), observaram uma maior capacidade de adsorção de Cu em hematita e caulinita em maior valor de pH, menor força iônica e na presença de cátions monovalentes (K^+) como eletrólito dominante. Este comportamento é explicado em função da diminuição das cargas positivas presentes nos minerais, menor competição de cátions como Ca^{2+} e K^+ com o Cu^{2+} pelos sítios de adsorção e a maior capacidade do K^+ em se dissociar dos sítios de adsorção, permitindo a sorção do Cu^{2+} , respectivamente. A presença de matéria orgânica no solo também apresenta influência sobre a mobilidade de metais, no caso, principalmente, o Cu (**Tiecher et al., 2013**). **Neaman et al. (2009)** ao avaliarem a mobilidade de Cu em solo contaminado na costa do Chile, observaram diminuição na atividade de íons livre de Cu^{2+} com o aumento da matéria orgânica no solo e pH, devido à elevada afinidade deste metal aos ligantes orgânicos. A presença de ânions, como os fosfatados (PO_4^{3-}), pode também influenciar a disponibilidade dos elementos-traço através da formação de complexos entre o P e íons metálicos nas superfícies dos colóides orgânicos e inorgânicos (**Perez-Novo et al., 2009; 2011**).

Foi evidenciada a influência das raízes sobre a disponibilidade de elementos-traço na região da rizosfera decorrente de mecanismo das plantas para aumentar absorção de micronutrientes, assim como defesa à toxidez (**Chaignon et al., 2009**). A liberação de exsudatos pelas raízes promove alterações de determinados atributos do solo, como pH e concentração de compostos orgânicos dissolvidos (COD), influenciando diretamente a mobilidade desses metais (**Bravin et al., 2012**). Adicionalmente, a presença de COD na rizosfera tem apresentado efeitos contrastantes sobre a disponibilidade de elementos-traço, principalmente Cu, onde em solos contaminados a complexação com COD atua para reduzir a biodisponibilidade deste metal, mas em situações de deficiência desse elemento, esta complexação pode aumentar a mobilidade e favorecer a sua absorção (**Cattani et al., 2006**).

Adicionalmente, as plantas apresentam mecanismos capazes de acumular o Cu e Zn nas raízes, controlando a sua translocação para a parte aérea (**Chaignon et al., 2009**). A absorção destes metais pode ser realizada por meio de duas vias distintas, através do simplasto ou apoplasto (**Redjala et al., 2010; Li et al., 2012**). Recentemente, vários estudos passaram a abordar o papel da raiz, com ênfase à região do apoplasto, como mecanismo de resistência das plantas a solos contaminados, bem como na promoção de plantas biorremediadoras (**Chaignon et al., 2009; Zhao et al., 2010; Vaculík et al., 2012**).

Contudo, são escassos os trabalhos que abordam este assunto em solos submetidos a adubações de dejetos suíno.

O objetivo do trabalho é avaliar os teores de Cu e Zn no solo rizosférico e não rizosférico e seu acúmulo em raízes de plantas de milho cultivadas em solo com histórico de aplicação de dejetos líquido e cama sobreposta de suíno.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Solo

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), em Florianópolis – SC. Amostras de um solo Argissolo Vermelho Amarelo (Typic Hapludalf soil - Soil Survey Staff, 2006) foram coletadas de um experimento conduzido em uma propriedade suinícola no município de Braço do Norte, sul do estado de Santa Catarina (SC), na região sul do Brasil (Latitude 28°14'20.7''; Longitude 49°13'55.5''; altitude de 300m acima do nível do mar). Antes da instalação do experimento o solo apresentava as seguintes propriedades na camada de 0-10 cm: argila 330 g kg⁻¹; matéria orgânica 33 g kg⁻¹; pH em água de 5,1; Índice SMP 5,5; P disponível 19 mg dm⁻³; K trocável 130 mg dm⁻³ (ambos extraídos por Mehlich⁻¹); Al, Ca e Mg trocáveis 0,8, 3,0 e 0,8 cmol_c kg⁻¹ (extraídos por KCl 1 mol L⁻¹). O clima na região, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger, é subtropical úmido (Cfa), com temperatura média anual de 18,7 °C e precipitação média de 1,471 mm.

O experimento iniciou em Dezembro de 2002 sobre uma pastagem naturalizada com predomínio de *Paspalum notatum*, *Paspalum plicatulum*, *Eryngium ciliatum* e *Stylosanthes montevidensis*, com histórico de aplicações esporádicas de dejetos líquido suíno sobre a superfície do solo. Antes de iniciar o experimento 6 Mg ha⁻¹ de calcário foram aplicados (poder relativo de neutralização total = 87,5%) sobre a superfície do solo, sem incorporação, para elevar o pH para 6,0 (CFS-RS/SC, Comissão de Fertilidade do Solo – 1994). Em janeiro de 2003, a pastagem foi dessecada com herbicida. Os tratamentos foram aplicados pela primeira vez em janeiro de 2003. O experimento consistia de blocos casualizados com cinco tratamentos e três repetições. Cada parcela possuía dimensões de 4,5 m por 6,0 m (27 m²). Os cinco tratamentos aplicados anualmente de 2003 a 2011 foram: testemunha (T); adubação

de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como dejetos líquidos suínos (DL90 e DL180) e adubação de 90 e 180 kg N ha⁻¹ como cama sobreposta (CS90 e CS180). Duas culturas foram cultivadas em sucessão em cada ano, milho (*Zea mays*) seguido por aveia-preta (*Avena strigosa*). Do ano de 2003 a 2011, os tratamentos DL (DL90 e DL180) foram aplicados na superfície do solo em quatro períodos equivalentes: 15, 51 e 95 dias após a semeadura do milho, e 15 dias após semeadura da aveia-preta. Um total de 36 aplicações foi realizado de 2003 a 2011. Os tratamentos CS (CS90 e CS180) foram aplicados de 2003 a 2011 na superfície do solo apenas uma vez ao ano aos 15 dias antes da semeadura do milho. Houve um total de oito aplicações de CS entre 2003 e 2011. Noventa kg de N ha⁻¹ ano é o recomendado a ser aplicado de DL e CS para o cultivo de milho em rotação com aveia-preta em cada ano em SPD (Comissão de Fertilidade do Solo, **CFS-RS/SC, 1994**; Comissão de Química e Fertilidade do Solo, **CQFS-RS/SC, 2004**). DL e CS foram os únicos nutrientes adicionados no experimento no período de 2003 e 2011. O milho foi semeado em linha no mês de novembro, com uma densidade de 50.000 plantas por hectare. A aveia-preta foi semeada em cada ano em linha em maio com 90 kg de sementes por hectare.

Em setembro de 2012 foram abertas trincheiras e coletadas amostras de solos, na profundidade de 0-10 cm, nos tratamentos T, DL90, DL180, CS90 e CS180. As amostras de solo foram secas, destorroadas e reservadas para o cultivo de milho em minirizobox.

6.2.2. Experimento em casa de vegetação

Os minirizobox foram construídos previamente, apresentando dimensões externas de 20 cm x 30 cm e 4 cm. As laterais foram constituídas por ripas de madeira, sendo as partes frontais formadas por duas chapas de acrílico (20 x 30 cm). Essas estruturas transparentes permitem observar o comportamento de crescimento das raízes de milho. Além disso, uma das chapas de acrílico era fixada através de parafusos e porcas do tipo borboleta, permitindo assim sua remoção, além do manuseio e a coleta das raízes e do solo para as análises. No interior dos minirizobox foram colocadas chapas de acrílico de maneira a impedir o contato do solo com a madeira. O interior dos minirizobox também foi vedado através do uso de silicone.

As amostras de solo foram previamente umedecidas a 50% da capacidade de campo antes de serem colocadas no interior dos minirizobox. Adicionalmente, durante a montagem dos minirizobox foram realizadas leves compactações do solo de maneira a se aproximar

da densidade natural do solo. Em cada minirizobox foram adicionados aproximadamente 2,5 kg de solo. Durante toda a condução do experimento, os minirizobox foram mantidos sobre bancadas levemente inclinados ($\approx 45^\circ$) e mantidos distantes entre si por 10 cm.

Em janeiro de 2013 se iniciou o cultivo de milho nos minirizobox em casa de vegetação. Foram colocadas duas sementes em cada minirizobox, deixando apenas uma plântula de milho após o desbaste. A semeadura foi realizada a uma profundidade de aproximadamente 3 cm. Em todos os tratamentos, as plantas foram irrigadas com solução de nitrato de amônio, de modo a fornecer 30 kg N ha^{-1} , aos cinco DAE das plantas. Com relação ao P e K, as plantas não receberam nenhuma adubação em virtude dos valores encontrados no solo serem considerados muito altos (CQFS-RS/SC, 2004). O cultivo do milho foi realizado durante 20 dias após a emergência. A temperatura média durante a condução do experimento no interior da casa de vegetação foi de $27,0 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar média de 32,1% e ao longo do experimento a umidade do solo foi mantida a 80% da capacidade de campo, através da adição de água no solo.

O delineamento experimental utilizado consistiu de blocos casualizados com cinco tratamentos e cinco repetições, onde cada caixa de minirizobox representou uma unidade experimental.

6.2.3. Coleta do solo rizosférico e não-rizosférico e de parte aérea e raízes

Aos 20 DAE das plântulas de milho, quando as raízes passaram a ocupar todo o espaço existente no minirizobox, foi realizada a coleta de solo e das plantas para análise. A parte aérea das plantas foi cortada rente à superfície do solo e pesada em balança de precisão para determinação da massa fresca. Em seguida, a parte aérea foi seca em estufa com circulação de ar forçado a 60°C , pesada para determinação da matéria seca, moída e reservada para a análise do teor total de nutrientes no tecido. Para a coleta do solo rizosférico e não-rizosférico foi realizada a abertura dos minirizobox e a retirada das raízes com o solo aderido, de maneira cuidadosa para não provocar o rompimento das mesmas. Em seguida, este material foi colocado sobre uma bandeja plástica para a obtenção do solo não-rizosférico, a partir de sua agitação. Para padronização da metodologia foram realizadas três agitações rápidas e vigorosas para cada amostra retirada dos minirizobox. O solo que permaneceu aderido às raízes foi considerado como rizosférico. Em seguida, as raízes com o solo rizosférico foram colocadas dentro de

outra bandeja, sendo realizada a sua limpeza e a retirada do solo de maneira cuidadosa, com o auxílio de um pincel. As amostras de solo rizosférico e não-rizosférico foram secas ao ar até atingir massa constante, moídas em gral e armazenadas para análise do pH, COT, P disponível, K, Ca, Mg e Al trocável e Cu e Zn extraídos por diferentes extratores (EDTA e CaCl_2).

As raízes após a retirada do solo rizosférico foram lavadas cuidadosamente com água destilada e secas com a utilização de papel-toalha por 10 minutos. Em seguida, foram pesadas e conservadas em freezer -80°C para posterior análise do teor de Cu e Zn no simplasto e apoplasto. Uma parte das raízes foi seca em estufa a 65°C e pesada para quantificação da matéria seca.

6.2.4. Análise do solo rizosférico e não-rizosférico

O pH do solo foi determinado em água, na proporção 1:1 (**Tedesco et al., 1995**); o teor de carbono orgânico total do solo foi determinado de acordo com **Embrapa (1999)**; os teores de fósforo (P) disponível e potássio (K^+) trocável foram extraídos em solução de Mehlich 1 ($\text{HCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1} + \text{H}_2\text{SO}_4 \text{ } 0,0125 \text{ mol L}^{-1}$) em uma relação solo/solução 1:10; os teores de P disponível foram determinados em espectrofotômetro e de K trocável em fotômetro de chama (**Tedesco et al., 1995**), os cátions trocáveis Ca^{2+} , Mg^{2+} e Al^{3+} foram extraídos em solução de $\text{KCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$; o teor de Al^{3+} foi determinado por titulação ácido-base, com uma solução de $\text{NaOH } 0,0125 \text{ mol L}^{-1}$; e os teores de Ca^{2+} e Mg^{2+} foram determinados em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA) (**Tedesco et al., 1995**).

Os teores de Cu e Zn foram obtidos a partir do extrator EDTA em 1,5g de solo, aos quais foram adicionados 10 mL de solução extratora ($\text{Na}_2\text{-EDTA } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, com pH ajustado para 6,0) (**Chaignon et al., 2009**). A solução foi adicionada em tubos de polipropileno do tipo Falcon (15 ml), agitada em agitador end-over-end por 1h. Por fim a solução foi centrifugada por 15min a 3200 RPM e filtrada em papel filtro. A fração extraída por CaCl_2 foi obtida de acordo com **Novozamsky et al. (1993)**. Foi pesado um grama de solo e adicionado em tubos do tipo Falcon (15 mL). Após, foram adicionados 10 ml de solução extratora ($\text{CaCl}_2 \text{ } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$) e agitado por duas horas. Ao final, as amostras foram centrifugadas por 15min a 3200 rpm e filtradas em papel filtro. Os teores de Cu e Zn de todos os extratores foram determinados em EEA.

6.2.5. Análise da planta

6.2.5.1. Análise dos teores de Cu e Zn nas raízes

O Cu e o Zn presentes no apoplasto e no simplasto foram determinados de acordo com a metodologia proposta por **Chaignon & Hinsinger (2003)**. Para determinação dos teores de Cu e Zn no apoplasto, amostras de 0,8 g de raízes foram agitadas por três minutos com 40 mL da solução HCl 0,001 mol L⁻¹ em Snap-cap Logo em seguida foram adicionados 360 µL⁻¹ da solução HCl 1 mol L⁻¹, atingindo assim a concentração de 0,01 mol L⁻¹, e agitado por mais cinco minutos. Imediatamente após o término do período da extração, o extrato foi separado por filtragem em papel filtro e reservado. Em seguida as raízes foram secas em estufa a 65°C, pesadas e submetidas à digestão nitroperclórica (**Embrapa, 1999**) para determinação de Cu e Zn no simplasto. A concentração de Cu e Zn extraído com a solução de HCl (apoplasto) e extratos da digestão nitroperclórica (simplasto) foram determinados em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (EAA).

6.2.5.2. Determinação do teor de nutrientes na parte aérea

Para a análise de N, P, K, Ca e Mg nas folhas foram pesadas 0,200 g de matéria seca moídos e adicionados em tubos de digestão de 100 ml. Em seguida, foi adicionado 1 mL de H₂O₂, 2 mL de H₂SO₄ e 0,7g da mistura de digestão (100 g de Na₂SO₄ + 10 g de CuSO₄.5H₂O + 1 g de selênio em pó) e os tubos foram aquecidos em bloco digestor a 170°C por 20 min e, em seguida, aquecidos por 360°C por uma hora. Ao final, o volume dos extratos foi corrigido para 50 mL (**Tedesco et al., 1995**). A determinação do N foi realizada através da adição de 10 mL do extrato em tubos de digestão de 100 mL e destilação com 5 ml de NaOH 10M em um destilador de arraste a vapor. O destilado (35 a 40 mL) foi recuperado em um erlenmeyer de 125 mL contendo 5 mL de indicador ácido bórico. Posteriormente, essa solução coletada foi titulada com H₂SO₄ a 0,025 mol L⁻¹. O P nos extratos foi determinado a partir de leitura em espectrofotômetro de acordo com **Murphy & Riley (1962)**. O K foi determinado em fotômetro de chama. Os valores de Ca e Mg foram obtidos a partir de leitura em EAA após adição de Sr 0,3% (**Tedesco et al., 1995**).

O conteúdo de Fe, Cu e Zn nas folhas foi determinado a partir de digestão nitroperclórica (**Tedesco et al., 1995**). Foi pesado 0,5 g de matéria seca e adicionado em tubos de digestão de 100 mL. Em seguida

foram adicionados 6 mL de ácido nítrico (HNO_3) concentrado nos tubos. Os mesmos foram colocados em bloco digestor e aquecidos a 120°C até restar apenas 1 mL do extrato. Em seguida, foi adicionado 1 mL de ácido perclórico (HClO_4) e os tubos foram aquecidos a 180°C por 2 horas. Após o resfriamento, o volume dos extratos foi ajustado para 25 mL com auxílio de balão volumétrico. Os teores de Cu, Zn e Fe foram determinados em EAA.

6.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos de Cu e Zn obtidos no solo rizosférico e não-rizosférico e acumulados no apoplasto e simplasto e os valores de matéria fresca e seca da parte aérea e raiz foram submetidos à análise de variância ANOVA. A hipótese de normalidade dos dados foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, por meio do programa computacional ASSISTAT. Quando os dados apresentaram efeitos significativos dos tratamentos, foram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey, tomando como base os níveis de significância maiores que 95 % ($p < 0,05$).

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Teores de nutrientes e de Cu e Zn em solo rizosférico e não-rizosférico

A aplicação de dejetos suínos promoveu significativas alterações nos atributos do solo rizosférico e não-rizosférico (Tabela 4). Em comparação à testemunha, o tratamento CS 180 apresentou os maiores valores de pH, Ca, Mg, P, K, CTC_{pH 7}, CTC efetiva e saturação por bases. Os elevados teores de P e K no solo podem ser explicados pela composição da cama sobreposta, que apresenta e altos teores desses nutrientes, matéria seca e sua relação C/N (Sommer, 2001; Giacomini et al., 2008; Higarashi et al., 2008). Guardini et al. (2012) que avaliaram o acúmulo de diferentes frações de fósforo na mesma área experimental de onde foram obtidas as amostras de solo do presente estudo, determinaram o conteúdo de P e a quantidade de dejetos aplicados, para ambos os tipos de dejetos durante os anos de 2003 até 2010, e verificaram que houve uma adição total de 500 kg ha^{-1} de P a mais no tratamento CS 90 em comparação ao DL 90. Considerando as aplicações realizadas no tratamento CS 180 serem duas vezes mais elevadas que em CS 90, isso pode explicar os teores mais elevados de P no tratamento

CS 180. Esse mesmo comportamento pode ser esperado para o K. Adicionalmente, a baixa mineralização que a cama sobreposta apresenta em função da sua alta relação C/N e teor de lignina, e o histórico de mais de 10 anos de aplicações deste composto orgânico sobre a superfície do solo manejado sob SPD também contribuem para o maior incremento desses nutrientes no solo (**Giacomini & Aita, 2008a;b**).

A comparação dos atributos químicos do solo rizosférico e o não-rizosférico (Tabela 4) permite observar que o tratamento CS 180 apresentou uma diminuição no pH do solo rizosférico em comparação ao solo não-rizosférico e um aumento nos valores de Ca, Mg, CTC (efetiva e em pH7,0) e saturação por bases (V%). A liberação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular e de íons H^+ pelas raízes das plantas são alguns dos mecanismos que as plantas possuem para alterar o pH do solo (**Cattani et al., 2006**). A principal fonte de H^+ na rizosfera está relacionada com a diferença na absorção de cátions e ânions pelas raízes (**Hinsinger et al., 2003**). Estes autores descrevem que o íon H^+ pode ser liberado para compensar o excesso de entrada de cátions no interior das células das raízes, e assim ocorre a diminuição do pH na rizosfera. Na situação oposta, quando há absorção elevada de ânions, pode haver liberação de íons OH^- ou HCO_3^- (resultante da carbonatação do OH^-) ou absorção de H^+ para compensar o excesso de carga negativa no interior da célula. No caso do presente estudo, os elevados teores de cátions e de íons metálicos disponíveis (Tabela 5 e 6) encontrados na rizosfera, além da maior concentração de K na parte aérea (Tabela 7) fortalecem a hipótese da liberação de H^+ pelas raízes. Estes resultados estão de acordo aos observados por **Cattani et al. (2006)** que avaliaram a biodisponibilidade de Cu na rizosfera de plantas de milho a partir de solos oriundos de mata nativa e de um vinhedo na Itália e observaram redução do valor do pH e aumento do valor de carbono orgânico dissolvido para ambos os solos. A mudança de pH foi atribuída ao balanço de absorção entre cátions e ânions.

Tabela 4. Atributos químicos do solo rizosférico e não-rizosférico aos 20 dias após a emergência (DAE) do milho, depois de submetido à aplicação de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS) para suprir 90 e 180 kg de N ha⁻¹.

Atributos	Tratamentos									
	Solo Rizosférico					Solo Não-rizosférico				
	T	DL9 0	DL18 0	CS90	CS18 0	T	DL9 0	DL18 0	CS90	CS18 0
Carbono orgânico, g Kg ⁻¹	25,9 bA ⁽¹⁾	24,5 bA	20,7 cB	26,8 bB	43,4 aA	24,4 cA	24,2 cA	27,6 bcA	30,9 bA	45,6 aA
pH – H ₂ O (1:1)	4,8 bA	6,1 aA	5,7 abA	5,9 aA	6,1 aB	5,1 cA	6,6 aA	5,4 bcA	6,3 abA	6,7 aA
Al, cmol _c dm ⁻³	0,3 ns ⁽²⁾	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns
Ca, cmol _c dm ⁻³	5,8 dA	8,9 bA	6,8 cA	8,9 bA	13,9 aA	5,6 cA	8,2 bB	6,4 cA	8,8 bA	13,4 aB
Mg, cmol _c dm ⁻³	1,2 eA	3,7 bA	2,3 dA	2,6 cA	5,3 aA	1,1 eA	3,7 bA	2,4 dA	2,7 cA	4,9 aB
P disponível, mg dm ⁻³	34,1 dA	212,2 cA	272,6 bA	210,7 cA	732,5 aA	33,8 dA	225,8 bcA	261,9 bA	205,5 cA	748,9 aA
K trocável, mg dm ⁻³	62,5 cA	89,5 cA	86,3 cA	253,1 bA	847,9 aA	65,3 cA	90,5 cA	76,5 cA	282,7 bA	891,1 aA
CTC _{pH 7,0} , cmol _c dm ⁻³	11,8 cA	15,9 bA	13,1 cA	14,9 bA	24,2 aA	11,5 cA	15,2 bA	12,4 cA	14,9 bA	23,4 aB
CTC _{efetiva} , cmol _c dm ⁻³	7,5 dA	12,9 bA	9,7 cA	12,2 bA	21,4 aA	7,3 dA	12,2 bA	9,0 cA	12,2 bA	20,6 aB
Saturação por bases (%)	60,7 dA	80,9 bA	73,9 cA	82,0 bA	88,4 aA	59,9 eA	80,0 cA	72,5 dA	81,9 bA	88,0 aB
Saturação por Al (%)	4,0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns	5,5 ns	0 ns	0 ns	0 ns	0 ns

(1) Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada linha não são diferentes significativamente entre os diferentes tratamentos para o mesmo solo. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada linha não são diferentes significativamente entre os mesmos tratamentos em diferentes solos (Teste Tukey, p<0,05). (2) Não significativo.

A utilização de dejetos líquido e cama sobreposta de suíno promoveu o incremento dos teores de Cu e Zn no solo (Tabela 5 e 6). Os teores de Cu e Zn extraídos por EDTA e CaCl₂ apresentaram diferenças

entre os tratamentos, bem como entre o solo rizosférico e não-rizosférico. O tratamento CS 180, em comparação aos demais tratamentos, proporcionou os maiores teores de Cu e Zn extraídos por EDTA tanto na região da rizosfera como no restante do solo. Os teores de Cu extraídos por EDTA no tratamento CS 180 foram 16 e 21 vezes superiores à testemunha no solo rizosférico e não-rizosférico, respectivamente. Resultado semelhante foi observado com os teores de Zn extraídos por EDTA, onde o tratamento CS 180 promoveu um aumento de 27 vezes aos obtidos na testemunha para os solos rizosférico e não-rizosférico. Apesar de alguns autores considerarem os valores obtidos por EDTA como um indicador da disponibilidade de Cu e Zn no solo e do seu potencial efeito tóxico às plantas (**Chaignon et al., 2003**), no presente estudo os teores obtidos com esse extrator não apresentaram correlação com as concentrações destes elementos-traço na parte aérea da planta (dados não apresentados). Da mesma forma, não foi observada correlação entre os teores de Cu e Zn no solo e nas raízes, resultado que está em desacordo aos obtidos por **Brun et al. (2001)**. Esses autores avaliaram a disponibilidade de Cu para plantas de milho cultivadas em solos de vinhedos contaminados e observaram correlação entre o conteúdo de Cu presente nas raízes e o extraído por EDTA, mas, assim como no presente estudo, eles não observaram correlação para a parte aérea. Os teores de Cu e Zn extraídos por EDTA no presente estudo apresentaram correlação com o conteúdo de C orgânico na rizosfera ($r=0,8993$ e $r=0,9337$, respectivamente) e no solo não rizosférico ($r=0,9611$ e $r=0,9570$, respectivamente). **Chaignon et al. (2003)**, trabalhando com solos de vinhedos contaminados, também observaram correlação positiva entre os teores disponíveis de Cu (Cu-EDTA) com os de matéria orgânica e argumentaram que quanto maior os valores de C orgânico no solo, maior será a adsorção de elementos-traço no solo, principalmente o Cu, e, por consequência, maiores serão os teores potencialmente biodisponíveis, uma vez que a degradação destes compostos orgânicos pode promover a disponibilização e a consequente absorção destes metais. Isso também explica os maiores valores obtidos com o extrator EDTA, principalmente no tratamento CS 180, pois como esse extrator forma quelatos estáveis com o Cu e Zn removendo-os tanto de ligações com óxidos e compostos orgânicos, ele provavelmente retirou maiores teores destes metais ligados ao C orgânico, presente em maior teor neste tratamento (**Paya-Perez et al., 1993**).

Tabela 5. Teores de Cu extraídos por EDTA e CaCl₂, ao final do cultivo do milho (20 DAE), em solo rizosférico e não rizosférico com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).

Solo	Tratamentos				
	T	DL 90	DL 180	CS 90	CS 180
Extrator EDTA					
----- mg kg ⁻¹ -----					
Rizosférico	3,38 dA ⁽¹⁾	10,81 cA	16,86 bA	15,92 bA	55,77 aA
Não-rizosférico	2,40 dB	8,93 cB	14,50 bB	13,92 bB	51,02 aB
Extrator CaCl ₂					
----- mg kg ⁻¹ -----					
Rizosférico	0,11 dA	0,16 cdA	0,28 bA	0,23 bcA	0,58 aA
Não-rizosférico	0,02 cB	0,06 bcB	0,07 bcB	0,16 bA	0,37 aB

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada linha não são diferentes significativamente entre os diferentes tratamentos para o mesmo solo. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna não são diferentes significativamente entre os mesmos tratamentos em diferentes solos (Teste Tukey, p<0,05).

Tabela 6. Teores de Zn extraídos por EDTA e CaCl₂, ao final do cultivo do milho (20 DAE), em solo rizosférico e não rizosférico com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS).

Solo	Tratamentos				
	T	DL 90	DL 180	CS 90	CS 180
Extrator EDTA					
----- mg kg ⁻¹ -----					
Rizosférico	7,08 dA ⁽¹⁾	24,82 cA	37,37 bA	37,06 bA	192,85 aA
Não-rizosférico	6,71 dA	22,27 cB	34,76 bB	36,15 bA	183,92 aA
Extrator CaCl ₂					
----- mg kg ⁻¹ -----					
Rizosférico	2,33 bA	1,54 bA	5,41 aA	2,31 bA	2,24 bA
Não-rizosférico	1,39 bB	1,87 bA	5,85 aA	2,40 bA	2,79 bA

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula em cada linha não são diferentes significativamente entre os diferentes tratamentos para o mesmo solo. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula em cada coluna não são diferentes significativamente entre os mesmos tratamentos em diferentes solos (Teste Tukey, p<0,05).

Os teores de Cu e Zn extraídos por CaCl₂ também foram influenciados pela aplicação de dejetos líquido e cama sobreposta (Tabela 5 e 6), mas os teores obtidos foram muito inferiores àqueles com o extrator EDTA. O solo adubado com o tratamento CS 180 apresentou os maiores teores de Cu em comparação aos demais tratamentos, tanto na rizosfera quanto no solo não rizosférico. Entretanto, o solo do tratamento DL 180 apresentou teores de Zn extraídos por CaCl₂ superiores aos demais tratamentos, sendo o único que diferiu da testemunha. A explicação para os resultados obtidos com o extrator CaCl₂ pode estar relacionada aos teores de C orgânico e pH nos tratamentos CS 180 e DL 180, respectivamente. Como a disponibilidade do Zn está mais dependente dos componentes minerais do solo, como teor e tipo de argila, os teores de Zn na solução do solo são mais sensíveis ao pH (Qiao et al., 2003; Marcato et al., 2009; Heemsbergen et al., 2010). A ocorrência de valor de pH nos tratamentos DL 180 e CS 180 de 5,4 e 6,7, respectivamente, além do valor de CTC de 9,4 e 20,8, respectivamente, permite considerar a maior presença de

cargas positivas no solo, em função do pH (Degen & Kosek, 2000) como uma das razões para o maior teor de Zn disponível no tratamento DL 180. No caso do Cu, este apresenta alta afinidade pelos grupamentos químicos dos compostos orgânicos (Agbenin et al., 2004) e o maior teor de C orgânico no solo do tratamento CS 180 pode ter influenciado a sua disponibilidade, além do próprio pH (Chaignon et al., 2003). Esta conclusão é reforçada ao se analisar a correlação existente entre os teores de Cu extraídos por CaCl₂ e de C orgânico presentes no solo não rizosférico ($r=0,9926$). Contudo, esta correlação não é observada no solo da rizosfera, o que indica que outros efeitos, como a diminuição do pH no tratamento CS 180 pode estar influenciando a disponibilidade de Cu, além de um aumento nos teores de Ca e Mg na rizosfera. O aumento da força iônica na solução do solo e a diminuição do pH poderiam reduzir a influência do C orgânico sobre os teores de Cu-CaCl₂ (Heemsbergen et al., 2010).

Tabela 7. Concentração de nutrientes na parte aérea de plantas de milho cultivadas em minirizobox aos 20 (DAE). As plantas foram cultivadas em solo submetido à aplicação de dejetos líquidos suíno (DL) e cama sobreposta (CS) para suprir 90 e 180 kg de N ha⁻¹.

Tratamentos	Nutrientes							
	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn
	g/kg					mg/kg		
T	32,4 ns	4,5 b ⁽¹⁾	42,4 b	4,4 a	4,1 ab	183,2 a	12,2 a	45,7 b
DL90	26,9 ns	5,4 ab	44,9 b	3,7 b	4,9 a	164,3 ab	9,0 b	40,1 b
DL180	27,3 ns	5,9 a	41,1 b	3,2 bc	4,3 ab	119,6 c	10,4 ab	72,8 a
CS90	27,9 ns	5,5 ab	66,6 a	3,6 b	3,3 bc	152,3 abc	9,6 b	48,6 b
CS180	28,1 ns	5,9 b	66,1 a	2,7 c	3,0 c	124,1 bc	10,8 ab	71,3 a

⁽¹⁾ Médias seguidas pelas mesmas letras em cada coluna não são diferentes significativamente (Teste Tukey, $p<0,05$).

Os teores de Zn extraídos por CaCl₂ na rizosfera apresentaram correlação com os valores de Zn presentes nas raízes, tanto na região do simplasto, do apoplasto e total ($r=0,9069$, $r=0,9429$ e $r=0,9349$, respectivamente). Assim, apesar dos valores encontrados com CaCl₂ não apresentarem correlação com a concentração de Zn na parte aérea, este

extrator mostrou ser um bom indicador da quantidade de Zn que é absorvido do solo pelas raízes, ou seja, dos teores que realmente são biodisponíveis (**Brun et al., 2001**). Estes autores ainda ressaltam que apesar dos valores de determinados elementos-traço nas raízes não estarem efetivamente relacionados com a sua concentração na parte aérea, em virtude do acúmulo de metais na região do apoplasto funcionar como mecanismo de defesa, eles podem ser relevantes e sensíveis indicadores do risco de fitotoxidez. Adicionalmente, o fato do extrator CaCl_2 apresentar apenas correlação com o solo rizosférico e a concentração na raiz, sendo o mesmo não observado com o solo não rizosférico, reforça a hipótese da ação das raízes sobre a disponibilidade de elementos-traço (**Bravin et al., 2012**).

A região da rizosfera também promoveu mudanças nos teores de Cu e Zn extraídos por EDTA. Houve um aumento dos teores de Cu em todos os tratamentos em comparação ao restante do volume de solo (solo não-rizosférico). Resultado semelhante foi observado para os teores de Zn, onde apenas a testemunha e CS 90 não apresentaram incrementos na região da rizosfera. Ao se utilizar o CaCl_2 como extrator não foi possível observar diferenças nos teores de Zn entre o solo rizosférico e não-rizosférico, com exceção da testemunha. Contudo, ao se analisar os teores de Cu na rizosfera, todos os tratamentos apresentaram aumento, com exceção de CS 90 que não apresentou diferenças em relação ao solo não-rizosférico. A explicação para o aumento dos teores disponíveis, principalmente de Cu, pode estar relacionada com a presença de compostos orgânicos dissolvidos na região da rizosfera (COD) (**Römkens et al., 1999**), pois os fitosideróforos, que são liberados pelas raízes por exsudação ou rizodeposição e podem complexar os elementos-traço presentes no solo e na solução do solo, alteram sua mobilidade (**Römkens et al., 1999**). Resultado semelhante foi encontrado por **Cattani et al. (2006)**, que trabalhando com milho em solos contaminados observaram significativos aumentos dos teores de Cu disponível na região da rizosfera e atribuíram esse resultado à presença de COD, que também foi incrementado pela presença das raízes. Os autores ainda salientam o efeito positivo do COD sobre a mobilidade de metais no solo, principalmente os bivalentes, como o Cu.

6.3.2. Produção de massa fresca e seca

A aplicação de dejetos líquidos e cama sobreposta influenciou positivamente o desenvolvimento das plantas de milho (Fig. 4). As

plantas cultivadas em solo adubado com o tratamento CS 180 apresentaram a maior produção de massa fresca da parte aérea em comparação à testemunha, mas não apresentaram diferenças em relação às plantas dos tratamentos DL 90 e CS 90 (Fig. 4a). A produção de massa fresca de raízes foi incrementada apenas no tratamento CS 180 em comparação à testemunha, porém sem apresentar diferenças com os demais tratamentos.

A produção de matéria seca da parte aérea apresentou incrementos em todos os tratamentos com aplicação de dejetos líquidos e cama sobreposta em comparação à testemunha (Fig. 4b). Entretanto, o mesmo resultado não foi observado com a produção de matéria seca da raiz, onde não houve diferenças entre os tratamentos avaliados. O aumento da produção de massa fresca e seca como efeito da adubação de dejetos suínos é amplamente conhecido na literatura mundial (Berenguer et al., 2008; Giacomini & Aita, 2008; Neto & Mello, 2010; Cavanagh et al., 2011; Cela et al., 2011; Biau et al., 2012), o que foi reforçado pelos resultados do presente estudo.

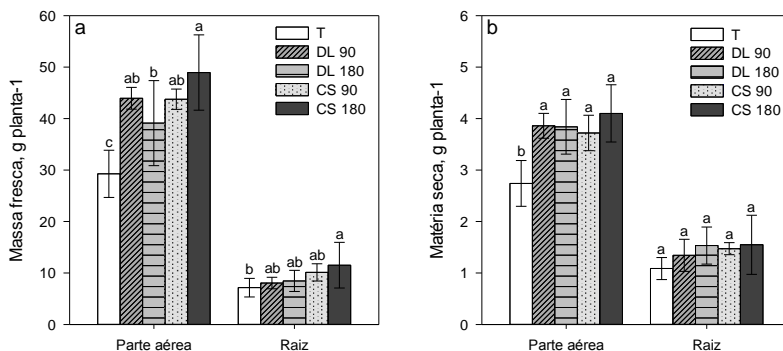


Fig. 4. Massa fresca (a) e matéria seca (b) na parte aérea e raiz de plantas de milho cultivadas em minirizobox aos 20 dias após a emergência (DAE). As plantas foram cultivadas em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquidos suínos (DL) e cama sobreposta (CS). Médias seguidas pela mesma letra não indicam diferenças significativas entre os tratamentos em uma mesma parte da planta (Teste Tukey, $p < 0,05$).

6.3.3. Acúmulo de Cu e Zn nas raízes

A aplicação dos tratamentos DL 180 e CS 180 aumentou a concentração de Cu no apoplasto e simplasto das raízes das plantas de milho em comparação à testemunha (Fig. 2a). Os demais tratamentos, DL90 e CS 90, não apresentaram diferenças em comparação à testemunha. Resultado semelhante foi encontrado para as concentrações de Zn, porém o tratamento DL 180 apresentou o maior teor na região do apoplasto em comparação aos demais tratamentos (Fig. 2b). O tratamento CS 180, apesar de apresentar uma concentração de Zn menor que o DL 180, também foi superior aos demais tratamentos. Em relação à testemunha, DL 90 e CS 90 não apresentaram diferenças. Na região do simplasto, o tratamento DL 180 também apresentou a maior concentração de Zn em relação aos demais tratamentos. A concentração de Zn também foi superior no tratamento CS 180, porém sem apresentar diferença com CS 90. Os demais tratamentos não diferiram em relação à testemunha. O aumento da concentração de Cu e Zn nas raízes, principalmente nos tratamentos CS 180 e DL 180, pode ser decorrente de um mecanismo de tolerância da planta, pela acumulação de metais ou compostos orgânicos tóxicos nas raízes, através de ligações na parede celular e controle da translocação dos mesmos para a parte aérea (Redjala et al., 2010; Zhao et al., 2014). Esta hipótese é fortalecida pela correlação observada entre as concentrações de Zn nas raízes e parte aérea ($r=0,9291$), o que está de acordo com os resultados obtidos por Chaignon et al. (2003), que encontram correlação entre a concentração de Cu nas raízes e parte aérea em plantas de milho cultivadas em solos contaminados. A partir destes resultados, os mesmos autores estabelecem que a concentração do metal na raiz é um excelente indicador para avaliar a sua acumulação na planta, e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade.

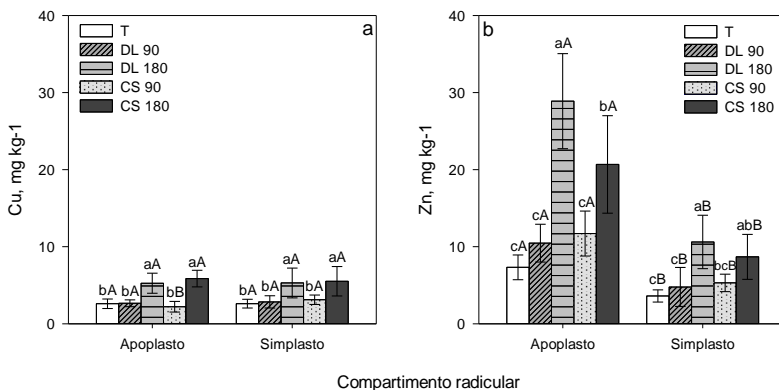


Fig. 5. Concentração de Cu (a) e Zn (b) no apoplasto e simplasto em plantas de milho cultivadas em minirizobox aos 20 dias após a emergência (DAE). As plantas foram cultivadas em solo sem adubação e com a adubação de 90 e 180 kg de N na forma de dejetos líquido suíno (DL) e cama sobreposta (CS). Médias seguidas pela mesma letra minúscula não indicam diferenças significativas entre os tratamentos em um mesmo compartimento radicular. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula não indicam diferenças significativas entre os mesmos tratamentos em diferentes compartimentos radiculares (Teste Tukey, $p < 0,05$).

Ao se comparar as concentrações de Cu entre a região do apoplasto e simplasto, apenas o tratamento CS 90 apresentou diferenças, onde houve um aumento na região do simplasto (Fig. 5a). Com relação ao Zn, em contraste, as concentrações no apoplasto foram superiores às encontradas no simplasto para todos os tratamentos (Fig. 5b). A diferença na concentração de Cu e Zn nas raízes em seus compartimentos, pode ser explicada pelos teores presentes na solução do solo que podem estar influenciando a via de absorção preferencial na raiz (White et al., 2002). Quando os teores na solução do solo são baixos, a via de absorção e transporte até o xilema ocorre principalmente pelo simplasto (Zhao et al., 2010). Neste caso, a entrada dos elementos-traço é seletiva, sendo seu transporte realizado através de ligações com agentes quelantes ou na forma reduzida, atravessando os plasmodesmas até chegar ao córtex (Stephan, 2002). Contudo, quando sua concentração é elevada, o transporte ocorre pela via apoplástica, onde a entrada dos elementos não é seletiva, sendo seu transporte realizado por difusão (Stephan, 2002; White et al., 2002). Esta é uma via

descontínua preenchida por uma solução com sais minerais do solo e compostos orgânicos, como aminoácidos, açúcares, compostos fenólicos e fitosideróforos (Zhao et al., 2010). Este argumento é fortalecido quando são comparados os teores de Cu e Zn obtidos por EDTA e CaCl_2 , onde se percebe que os teores de Zn estão muito mais elevados, o que provavelmente pode estar promovendo maiores concentrações de Zn na solução do solo. Como na via apoplástica a entrada de um determinado íon é controlada principalmente por sua concentração na solução, o aumento dos teores de Zn no solo pode ter favorecido sua absorção (White et al., 2002). Adicionalmente, a maior concentração de Zn no apoplasto em comparação ao simplasto pode estar relacionada com a presença dos diversos sítios de ligação presentes nas paredes celulares, além da presença de compostos orgânicos, principalmente polissacarídeos (ricos em grupos carboxílicos) capazes reterem os elementos-traço nesta região, acumulando-os (Colzi et al., 2012).

Recentemente também foi discutida a importante participação da via apoplástica na translocação de nutrientes para a parte aérea, pois os nutrientes presentes no apoplasto devem entrar na via simplástica para alcançarem o córtex, já que as Estrias de Casparian formam uma barreira para controlar o fluxo desses íons (Geldner, 2013). Contudo, durante a formação das raízes laterais ocorre a ruptura de certos segmentos dessa estrutura, o que permite a passagem de nutrientes ao córtex através da via apoplástica (Stephan, 2002). Tal evento pode ajudar a explicar, juntamente com as concentrações de Zn no simplasto, o aumento da concentração na parte aérea das plantas cultivadas nos tratamentos DL 180 e CS 180 em comparação aos demais tratamentos (Tabela 7).

6.4. Conclusão

1. A aplicação de doses de cama sobreposta com o equivalente a 180 kg N ha^{-1} promoveu o aumento dos teores disponíveis de Cu e Zn extraídos por EDTA 0,05M e de Cu por CaCl_2 0,01M tanto na rizosfera quanto no solo não rizosférico.

2. Os teores de Zn extraídos por CaCl_2 0,01M foram mais pronunciados com a dose de dejetos líquido suíno o equivalente a 180 kg N ha^{-1} , para ambos os solos.

3. A concentração de Cu nas raízes foi incrementada com aplicação de dejetos líquido suíno e cama sobreposta com o equivalente a 180 kg N ha^{-1} , tanto na apoplasto como no simplasto.

4. As adubações de dejetos líquido suíno e cama sobreposta com o equivalente a 180 kg N ha⁻¹ aumentaram a concentração de Zn nas raízes, promovendo maior acúmulo na região do apoplasto.

6.5. Referências Bibliográficas

AGBENIN, J.O. & OLOJO, L.A. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. **Geoderma**, v.119, p. 85–95, 2003.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; BARRA, C.M. & LÃ, O.R. Química dos metais pesados nos solos. In: MELO, V.F.; ALLEONI, L.R.. (Ed.). **Química e Mineralogia do Solo**: Parte II - Aplicações. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009, v. 2, p. 249-312.

BERENGUER, P.; CELA, S.; SANTIVERI, F.; BOIXADERA, J.; LLOVERAS, J. Copper and zinc soil accumulation and plant concentration in irrigated maize fertilized with liquid swine manure. **Agron. J.**, v.100, p. 1056–1061, 2008.

BIAU, A.; SANTIVERI, F.; MIJANGOS, I.; LLOVERAS, J. The impact of organic and mineral fertilizers on soil quality parameters and the productivity of irrigated maize crops in semiarid regions. **European Journal of Soil Biology**, v.53, p.56–61, 2012.

BRAVIN, M.N. ; GARNIER, .C.; LENOBLE, V.; GÉRARD, F.; DUDAL, Y.; HINSINGER, P. Root-induced changes in pH and dissolved organic matter binding capacity affect copper dynamic speciation in the rhizosphere. **Geochim Cosmochim Acta**, v.84, p. 256–268, 2012.

BRUN, L.A.; MAILLET, J.; HINSINGER, P.; PEPIN, M. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. **Environmental Pollution**, v.111, pp. 293–302, 2001.

CATTANI, I.; FRAGOULIS, G.; BOCELLI, R.; CAPRI, E. Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. **Chemosphere**, v.64, p. 1972–1979, 2006.

CAVANAGH, A.; GASSER, M. O.; LABRECQUE, M. Pig slurry as fertilizer on willow plantation. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.4165–4173, 2011.

CELA, S.; SANTIVERI, F.; LLOVERAS, J. Residual effects of pig slurry and mineral nitrogen fertilizer on irrigated wheat. **European Journal of Agronomy**, v.34, p. 257–262, 2011.

CHAIGNON, V.; QUESNOIT, M.; HINSINGER, P. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. **Environmental Pollution**. v. 157, p.3363-3369, 2009.

CHAIGNON, V.; HINSINGER, P. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v.32, p. 824–833, 2003.

CHAIGNON, V.; SANCHEZ-NEIRA, I.; HERRMANN, P.; JAILLARD, B.; HINSINGER, P. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. **Environ. Pollut.**, v.123, p. 229–238, 2003.

COLZI, I.; ARNETOLIA, M.; GALLOA, A.; DOUMETTB, S.; BUBBAB, M. D.; PIGNATTELLI, S.; GABBRIELLIA, R.; GONNELLIA, C. Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. **Environmental and Experimental Botany**, v.78, p.91–98, 2012.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – CFS-RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 3.ed. Passo Fundo, SBRS/NRS, 1994. 223p.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 400, 2004.

CORBI, J. J.; STRIXINO, S. T.; SANTOS, A.do; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Quím. Nova**, v.29(1), p.61-65, 2006.

COSTA, C. N.; MEURER, E. J.; LIMA, C. V. S.; DOS SANTOS, R. C. Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente. In: MEURER, E. J. (Ed.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Evangraf, 2012. p.201-241.

DEGEN, A. & KOSEC, M. Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. **Journal of the European Ceramic Society**. v.20, p. 667–673, 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 1999. 412p.

FADIGAS, F. S.; AMARAL-SOBRINHO, N. M. B. MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C.; FREIXO, A. A. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. **Bragantia** [online], v.61(2), p. 151-159, 2002.

GELDNER, N. Casparian strips. **Current Biology**, v.23, issue,23, p.1025–1026, 2013.

GIACOMINI, S.J.; AITA, C. Deep-Litter and pig slurry as nitrogen sources for corn. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, n.1, p.195-205, 2008.

GIACOMINI, S. J.; AITA, C. Carbon dioxide emission after application of pig slurry and pig deep-litter. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.43, p.107-114, 2008.

GIACOMINI, S. J.; AITA, C.; MIOLA, E. C. C.; RECOUS, S. Mineralização do carbono da palha de aveia e dejetos de suínos aplicados na superfície ou incorporados ao solo. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. v.32, pp. 2661-2668, 2008.

GUARDINI, R.; COMIN, J.J.; SCHMITT, D.; TIECHER, T.; BENDER, M.A.; RHEINHEIMER, D.S.; MEZZARI, C.P.; OLIVEIRA, B.S.; GATIBONI, L.C.; BRUNETTO Accumulation of phosphorus fractions in typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep pig litter in a no-tillage system. **Nutr Cycl Agroecosyst**, v.93, p.215–225, 2012.

HEEMSBERGEN, D. A.; MCLAUGHLIN, M. J.; WHATMUFF, M.; WARNE, M. S. J.; BROOS, K.; BELL, M.; NASH, D.; BARRY, G.; PRITCHARD, D.; PENNEY, N. Bioavailability of zinc and copper in biosolids compared to their soluble salts. **Environmental Pollution**, v.158, p. 1907–1915, 2010.

HIGARASHI, M.M.; COLDEBELLA, A.; OLIVEIRA, P.A.V.; KUNZ, A.; MATTEI, R.M.; SILVA, V.S.; AMARAL, A.L. Concentração de macronutrientes e metais pesados em maravalha de unidade de suínos em cama sobreposta. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.12, n.3, p.311-317, 2008.

HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; JAILLARD, B.; TANG, C. X. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. **Plant and Soil**. v. 248, p. 43–59, 2003.

KOMY, Z. R.; SHAKER, A. M.; HEGGY, S. E. M.; EL-SAYEDB, M. E. A. Kinetic study for copper adsorption onto soil minerals in the absence and presence of humic acid. *Chemosphere*, v.99, p.117–124, 2013.

LI, Q.; GUO, X. Y.; XU, X. H.; ZUO, Y. B.; WEI, D. P.; MA, Y. B. Phytoavailability of copper, zinc and cadmium in sewage sludge-amended calcareous soils. **Pedosphere**, v.22, p.254–262, 2012.

MARCATO, C. E. ; PINELLI, E.; CECCHI, M.; WINTERTON, P.; GUIRESSE, M. Bioavailability of Cu and Zn in raw and anaerobically digested pig slurry. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.72, p. 1538–1544, 2009.

MURPHY, J.; RILEY, J. P. A Modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Anal Chem Acta**, v.27, p.31–36, 1962.

NEAMAN, A.; REYES, L.; TROLARD, F.; BOURRIÉ, G.; SAUVÉ, S. Copper mobility in contaminated soils of the Puchuncaví valley, central Chile. **Geoderma**, v.150, p.359–366, 2009.

NETO, M. N. & MELLO, S. P. Produção de silagens de milho (*Zea mays* L.) com diferentes adubações. **Nucleus**, v. 2, p. 1-10, 2010.

NOVOZAMSKY, I.; LEXMOND, T. M.; HOUBA, V. J. G. A Single Extraction Procedure of Soil for Evaluation of Uptake of Some Heavy Metals by Plants. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, vol. 51, p. 1-4, 1993.

PAYÀ-PÉREZ, A.; SALA, J.; MOUSTY, F. Comparison of ICP-AES and ICP-MS for the analysis of trace elements in soil extracts. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.51, pp. 223–230, 1993.

PÉREZ-NOVO, C.; BERMÚDEZ-COUSO, A.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; ARIAS-ESTÉVEZ, M. The effect of phosphate on the sorption of copper by acid soils. **Geoderma**, v.150, p.166–170, 2009.

PEREZ-NOVO, C., BERMÚDEZ-COUSO, A., LOPEZ-PERIAGO, E., FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D., & ARIAS-ESTEVEZ, M. Zinc

adsorption in acid soils: influence of phosphate. **Geoderma**, v.162(3), p.358-364, 2011.

QIAO, X. L.; LUO, Y. M.; CHRISTIE, P.; WONG, M. H. Chemical speciation and extractability of Zn, Cu and Cd in two contrasting biosolids-amended clay soils. **Chemosphere**, v.50, p.823-929, 2003.

REDJALA, T.; STERCKEMAN, T.; SKIKER, S.; ECHEVARRIA, G. Contribution of apoplast and symplast to short term nickel uptake by maize and *Leptoplax emarginata* roots. **Environmental and Experimental Botany**, v.68, p.99-106, 2010.

RÖMKENS, P.; BOUWMAN, L. A.; BOON, G. T. Effect of plant growth on copper solubility and speciation in soil solution samples. **Environmental Pollution**, v.106, p. 315-321, 1999.

SMITH, V. H.; TILMAN, G. D.; NEKOLA, J. C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, v.100, p.179-196, 1999.

SOIL SURVEY STAFF. Keys to soil taxonomy. 10.ed. Washington, USDA-SCS, 2006. 332p.

SOMMER, S. G. Effect of composting on nutrient loss and nitrogen availability of cattle deep litter. **European Journal of Agronomy**, v.14, p.123-133, 2001.

STEPHAN, U. W. Intra- and intercellular iron trafficking and subcellular compartmentation within roots. **Plant and Soil**, v.241, p.19-25, 2002.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p.

TIECHER, T.L.; CERETTA, C.A.; COMIN, J.J.; GIOTTO, E.; MIOTTO, A.; MORAES, M.P.; BENEDET, L.; FERREIRA, P.A.A.; LORENZI, C.R.; COUTO, R.R.; BRUNETTO, G. Forms and accumulation of copper and zinc in a sandy typic hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. vol.37 (3), pp. 812-824. 2013.

VACULÍK, M., KONLECHNER, C., LANGER, I., ADLASSNIG, W., PUSCHENREITER, M., LUX, A., HAUSER, M. T. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, v.163, 117-126., 2012.

ZHAO, S.; FANG, S.; ZHU, L.; LIU, L.; LIU, Z.; ZHANG, Y. Mutual impacts of wheat (*Triticum aestivum* L.) and earthworms (*Eisenia fetida*) on the bioavailability of perfluoroalkyl substances (PFASs) in soil. **Environmental Pollution**, v.184, p.495–501, 2014.

ZHAO, Z.; XI, M.; JIANG, G.; LIU, X.; BAI, Z.; HUANG, Y. Effects of IDSA, EDDS and EDTA on heavy metals accumulation in hydroponically grown maize (*Zea mays*, L.). **J. Hazard. Mater.**, v.181, p. 455–459, 2010.

WHITE, P. J.; WHITING, S. N.; BAKER, A. J. M.; BROADLEY, M. R. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? **New Phytologist**, v.153, p.201–207, 2002.

7. DISCUSSÃO GERAL

As aplicações de dejetos líquido suíno e cama sobreposta aumentaram os teores de Cu e Zn disponíveis em ambos os estudos, em especial no solo adubado com 180 kg de N ha⁻¹ em forma de cama sobreposta. O Cu e Zn quando em concentrações elevadas, decorrentes de sucessivas aplicações de dejetos tendem a ocupar os sítios mais ávidos com ligações de alta energia, mas também se distribuem em formas mais lábeis, ou seja, de menor energia de ligação e conseqüentemente mais facilmente dessorvidas e disponíveis para as plantas.

Com o aumento dos teores disponíveis desses elementos-traço também se esperava que as plantas apresentassem mecanismos capazes de reduzi-los, como por exemplo, a liberação de exsudatos pelas raízes, mecanismo não avaliado na presente dissertação. No entanto, ao se realizar um comparativo entre os atributos químicos e teores de Cu e Zn presentes no solo rizosférico e não-rizosférico, não se observaram alterações pronunciadas, o que pode indicar pequeno efeito das raízes sobre os atributos do solo, ou até limites do método utilizado para esse fim.

O aumento nos teores disponíveis de Cu e Zn resultaram no acúmulo desses metais nas raízes de plantas de milho, em especial, nos tratamentos DL 180 e CS 180. A concentração de Zn nas raízes foi a que mais apresentou incrementos, principalmente na região do apoplasto. Tal efeito é resultado dos maiores teores disponíveis no solo, das características distintas entre o Cu e Zn e da influência da atividade de um sobre o outro. O Cu é adsorvido principalmente pelos sítios de adsorção presentes na matéria orgânica, já que apresenta alta afinidade com estes grupamentos, enquanto o Zn é principalmente adsorvido pela fração mineral do solo. Entretanto, o Cu e Zn podem competir por determinados sítios de adsorção, situação onde o Cu tende a ter preferência em ocupar estes sítios. Este fato, além do próprio conteúdo de carbono orgânico total (COT) no solo, pode ter favorecido a maior adsorção de Cu, refletindo em menores teores disponíveis em comparação ao Zn, em ambos os estudos. Os maiores teores disponíveis de Zn podem ter favorecido a sua entrada nas raízes através da via apoplástica, já que esta é uma via não seletiva e é influenciada principalmente pela concentração de um determinado elemento na solução do solo. O maior acúmulo de Zn no apoplasto em comparação

ao simplasto fortalece a afirmação anterior, evidenciando a maior ação do apoplasto na acumulação deste metal.

Também foi observado aumento na concentração de Zn na região do simplasto nas plantas de milho cultivadas no solo submetido à adubação de 180 kg de N ha⁻¹ de dejetos líquidos e cama sobreposta. Esta concentração merece especial atenção, já que nesta região da raiz o Zn pode ser mais facilmente translocado para a parte aérea e causar fitotoxidez. Entretanto, a ligação entre o Zn e agentes quelantes e seu transporte ao vacúolo pode promover a sua acumulação nas raízes. Considerando as concentrações de Zn presentes na parte aérea das plantas de milho, em ambos os estudos, pode-se inferir que houve uma maior translocação de Zn às folhas de milho, principalmente no tratamento DL 180. Com relação ao Cu, também foi observado nos tratamentos DL 180 e CS 180 um acúmulo tanto no apoplasto como no simplasto, mas a concentração encontrada foi mais baixa que aquela de Zn. Assim, as alterações nos parâmetros fisiológicos e enzimáticos antioxidantes avaliados no estudo I podem ter sido provocadas principalmente pela maior concentração de Zn na parte aérea, já que a concentração de Cu na planta não foi influenciada pelas adubações.

Em ambos os estudos, a aplicação de dejetos líquidos e cama sobreposta promoveram incrementos de matéria seca de plantas de milho, mesmo com a observação de alterações em determinados parâmetros fisiológicos e enzimáticos das plantas, o que mostra que apesar da presença desses metais estar influenciando alguns mecanismos da planta, não comprometeram o seu desenvolvimento. De maneira geral, todos os tratamentos com aplicação de dejetos líquidos e cama sobreposta influenciaram ao menos um dos parâmetros avaliados (densidade estomática, clorofila e carotenóides, proteínas e carboidratos solúveis totais e atividade das enzimas CAT e APX), mas foram as plantas cultivadas em solo adubado com os tratamentos DL 180 e CS180 que apresentaram as maiores alterações, com destaque para as atividades das enzimas antioxidantes CAT e APX. A presença de alterações mais pronunciadas aos 25 dias de cultivo na atividade da catalase pode indicar um aumento na concentração de H₂O₂ durante o cultivo do milho, pois a enzima atua principalmente quando a concentração de H₂O₂ é alta. No entanto, para confirmar essa suposição, seria necessária a realização de coletas em datas subsequentes aos 25 DAE, permitindo assim o acompanhamento dos teores de H₂O₂ na planta durante todo o seu cultivo. Apesar de não se diferenciarem da testemunha, os tratamentos DL 180 e CS 180 apresentavam diferenças entre si na atividade das enzimas, revelando que a composição dos

dejetos, as relações existentes entre os diferentes nutrientes que compõem esses dejetos e a concentração de nutrientes no tecido vegetal também podem estar relacionadas com as alterações enzimáticas e fisiológicas nas plantas. A avaliação de outros parâmetros do sistema antioxidante da planta poderia promover avanços no estudo. Como o sistema antioxidante é muito complexo, composto por um sistema enzimático e não enzimático, outros mecanismos podem estar atuando na planta, o que teria resultado em leves alterações na atividade da APX e CAT. A análise da enzima superóxido dismutase, ácido ascórbico e os grupos tióis não protéicos, além da estimação da peroxidação lipídica e concentração de H_2O_2 podem fazer o trabalho avançar.

No presente estudo não foi possível obter e analisar os exsudatos das plantas de milho cultivadas nas amostras indeformadas e em minirizobox, o que poderia ajudar na avaliação de um dos mecanismos que as plantas possuem para se defender de condições adversas no solo. Para este determinado fim, metodologias mais refinadas precisam ser adotadas, podendo fornecer dados adicionais e relevantes ao presente estudo. A análise da solução do solo pode ajudar a verificar o efeito das raízes sobre o solo, já que a liberação de exsudatos promove tanto a maior disponibilidade de nutrientes como pode impedir a absorção de outros quando em altas concentrações na solução do solo. A técnica de especiação iônica também permitirá avaliar as relações existentes entre os diferentes nutrientes presentes no solo. A partir da caracterização completa da solução, com as concentrações de íons e das principais moléculas orgânicas podem ser determinadas as diferentes espécies de um elemento químico e a sua atividade na solução do solo através de *softwares* específicos. De posse desses dados será possível determinar o quanto um determinado elemento, nesse caso Cu e/ou Zn, está disponível para ser absorvido pela planta.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBENIN, J.O. & OLOJO, L.A. Competitive adsorption of copper and zinc by a Bt horizon of a savanna Alfisol as affected by pH and selective removal of hydrous oxides and organic matter. **Geoderma**, v.119, p. 85–95, 2003.

AL-HAKIMI, A. B. M. & HAMADA, A. M. Ascorbic acid, thiamine or salicylic acid induced changes in some physiological parameters in wheat grown under copper stress. **Plant Protect Sci**, v.47, p.92-108, 2011.

ALKORTA, I.; HERNÁNDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J.M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I. & GARBISU, C. Recent findings on the phytoremediation of soils contaminated with environmentally toxic heavy metals and metalloids such as zinc, cadmium, lead, and arsenic. **Rev. Environ. Sci. Biotechnol.**, v.3, p.71-90, 2004.

ALLOWAY. B.J. Soil factors associated with zinc deficiency in crops and humans. **Environ Geochem Health**. v.31, p.537–548, 2009.

AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; BARRA, C.M. & LÃ, O.R. Química dos metais pesados nos solos. In: MELO, V.F.; ALLEONI, L.R.. (Ed.). **Química e Mineralogia do Solo: Parte II - Aplicações**. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2009, v. 2, p. 249-312.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 55, p. 373-399, 2004.

ASSMANN, T.S.; ASSMANN, J.M.; CASSOL, L.C.; DIEHL, R.C.; MANTELI, C. & MAGIERO, E.C. Desempenho da mistura forrageira de aveia-preta mais azevém e atributos químicos do solo em função da aplicação de esterco. **R. Bras. Ci. Solo**, v.31; p.1515–1523, 2007.

AZEVEDO, R. A.; ALAS, R. M.; SMITH, R. J.; LEA, P. J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase deficient mutant of barley. **Physiol. Plant**. vol.104, p.280–292. 1998.

AZMAT, R.; HAIDER, S.; NASREEN, H.; AZIZ, F.; RIAZ, M. A viable alternative mechanism in adapting the Plants to heavy metal environment. **Pak. J. Bot.**, v.41(6), p.2729-2738, 2009.

BAPTISTA, S. **Avaliação da resposta ao stress oxidativo induzido por cádmio e cobre em plantas de tabaco transformadas e não transformadas**. 2009. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre. Instituto Superior de Agronomia. Universidade Técnica de Lisboa. Lisboa, 2009.

BARILLI, J. **Atributos de um latossolo vermelho sob aplicação de resíduos de suínos**. 2005. 78f. Programa de Pós-graduação em Agronomia. Tese (Doutorado em Agronomia). Faculdade de Ciências Agronômicas da Unesp, 2005.

BARONA, A.; ARANGUIZ, I.; ELIAS, A. Metal associations in soils before and after EDTA extractive decontamination: implications for the effectiveness of further clean-up procedures. **Environmental Pollution**, v.113(1), p.79-85, 2001.

BASSO, C. J.. **Perdas de nitrogênio e fósforo com aplicação no solo de dejetos líquidos de suínos**. 2003. 125f. Curso de Pós-graduação em Agronomia. T e s e (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Santa Maria 2003.

BASSO, C.J.; CERETTA, C.A.; DURIGON, R. POLETTO, N.; GIROTTO, E. Dejeito líquido de suínos: II - perdas de nitrogênio e fósforo por percolação no solo sob plantio direto. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.35 (6), p.1305-1312, 2005.

BASSO, C.J.; CERETTA, C.A.; FLORES, É.M.deM.; GIROTTO, E. Teores totais de metais pesados no solo após aplicação de dejeito líquido de suínos. **Cienc. Rural** [online], vol.42 (4), p. 653-659, 2012.

BENAVIDES, M. P., GALLEGO, S. M., & TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.17(1), p.21-34, 2005.

BERENGUER, P.; CELA, S.; SANTIVERI, F.; BOIXADERA, J.; LLOVERAS, J. Copper and zinc soil accumulation and plant concentration in irrigated maize fertilized with liquid swine manure. **Agron. J.**, v.100, p. 1056–1061, 2008.

BIAU, A.; SANTIVERI, F.; MIJANGOS, I.; LLOVERAS, J. The impact of organic and mineral fertilizers on soil quality parameters and the productivity of irrigated maize crops in semiarid regions. **European Journal of Soil Biology**, v.53, p.56–61, 2012.

BIBI, M.; HUSSAIN, M. Effect of copper and lead on photosynthesis and plant pigments in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]. **Bulletin**

of environmental contamination and toxicology, v.74(6), p.1126-1133, 2005.

BOOMINATHAN, R.; DORAN, P. M. Cadmium tolerance and antioxidative defenses in hairy roots of the cadmium hyperaccumulator, *Thlaspi caerulescens*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83 (2), p. 158-167, 2003.

BORGHI, M.; TOGNETTI, R.; MONTEFORTI, G.; SEBASTIANI, L.. Responses of *Populus × euramericana* (*P. deltoides* × *P. nigra*) clone Adda to increasing copper concentrations. *Environ. Exp. Bot.* v.61, p.66–73. 2007.

BRACCINI, M. C. L.; MARTINEZ, H. E. P.; BRACCINI, A. L. AND MENDONÇA, S. M. Avaliação do pH da rizosfera de genótipos de café em resposta à toxidez de Al no solo. **Bragantia**, v.59, p.83-88. 2000.

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

BRAVIN, M.N. ; GARNIER, .C.; LENOBLE, V.; GÉRARD, F.; DUDAL, Y.; HINSINGER, P. Root-induced changes in pH and dissolved organic matter binding capacity affect copper dynamic speciation in the rhizosphere. **Geochim Cosmochim Acta**, v.84, p. 256–268, 2012.

BROADLEY, M.R.; WHITE, P.J.; HAMMOND, J.P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytol.**, v.173, p.677–702, 2007.

BRUN, L.A.; CORFF, J.L.E.; MAILLET, J. Effects of elevated soil copper on phenology, growth and reproduction of five ruderal plant species. **Environ Pollut** v.122; p.361–368, 2003.

BRUN, L.A.; MAILLET, J.; HINSINGER, P.; PEPIN, M. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. **Environmental Pollution**, v.111, p. 293–302, 2001.

BRUNNER, I., LUSTER, J., GÜNTHARDT-GOERG, M. S., & FREY, B. Heavy metal accumulation and phytostabilisation potential of tree fine roots in a contaminated soil. **Environmental Pollution**, v.152(3), p.559-568, 2008.

BULBOVAS, P.; RINALDI, M.C.S.; DELITTI, W.B.C.; DOMINGOS, M. Variação Sazonal em antioxidantes em folhas de plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam.(pau- brasil). **Revista brasileira de Botânica**, vol. 28 (4), p.687-696, 2005.

CAO, A.; CAPPAL, G.; CARUCCI, A.; LAI, T. Heavy metal bioavailability and chelate mobilization efficiency in an assisted phytoextraction process. **Environmental Geochemistry and Health**, v.30(2), 115-119, 2008.

CAREGNATO, F. F. **Análise dos parâmetros de estresse oxidativo em espécies vegetais expostas a poluentes ambientais**. 2009. 61f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

CATTANI, I.; FRAGOULIS, G.; BOCCELLI, R.; CAPRI, E. Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. **Chemosphere**, v.64, p. 1972–1979, 2006.

CAVANAGH, A.; GASSER, M. O.; LABRECQUE, M. Pig slurry as fertilizer on willow plantation. **Biomass and Bioenergy**, v.35, p.4165-4173, 2011.

CELA, S.; SANTIVERI, F.; LLOVERAS, J. Residual effects of pig slurry and mineral nitrogen fertilizer on irrigated wheat. **European Journal of Agronomy**, v.34, p. 257–262, 2011.

CERETTA, C.A.; LORENSINI, F.; BRUNETTO, G.; GIROTTO, E.; GATIBONI, L.C.; LOURENZI, C.R.; TIECHER, T.L.; CONTI, L. de; TRENTIN, G.; MIOTTO, A.E. Frações de fósforo no solo após sucessivas aplicações de dejetos de suínos em plantio direto. **Pesq. Agrop. Bras.**, 45, p. 593–602, 2010.

CHAIGNON, V.; HINSINGER, P. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v.32, p. 824–833, 2003.

CHAIGNON, V.; QUESNOIT, M.; HINSINGER, P. Copper availability and bioavailability are controlled by rhizosphere pH in rape grown in an acidic Cu-contaminated soil. **Environ. Pollut.**, v.157: p.3363-3369, 2009.

CHAIGNON, V.; SANCHEZ-NEIRA, I.; HERRMANN, P.; JAILLARD, B.; HINSINGER, P. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. **Environ. Pollut.**, v.123, p. 229–238, 2003.

CHAVES, L. H. G.; ESTRELA, M. A.; DE SOUZA, R. S. Effect on plant growth and heavy metal accumulation by sunflower. **Journal of Phytology**, v.3(12), p.04-09, 2011.

CHERIF, J.; DERBEL, N.; NAKKACH, M.; VON BERGMANN, H.; JERNAL, F.; LAKHDAR, Z. B. Analysis of *in vivo* chlorophyll fluorescence spectra to monitor physiological state of tomato plants growing under zinc stress. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.101, p.332–339, 2010.

CIESLINSKI, G.; VAN REES, K.C.J.; SZMIGIELSKA, A.M.; KRISHNAMURTI, G.S.R.; HUANG, P.M. Low-molecular-weight organic acids in rhizosphere soils of durum wheat and their effect on cadmium bioaccumulation. **Plant Soil** v.203, p.109–17. 1998.

CISCATO, M., R.; VALCKE, K.; VAN LOVEN, H.; CLIJSTER, S.; NAVARI-Izzo, E.: Effects of *in vivo* copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. **Physiol. Plant.** v.100, p.901-908, 1997.

CÓLLEN, J.; PINTO, E.; PEDERSEN, M.; COLEPICOLO, P. Induction of oxidative stress in the red macroalga *Gracilaria tenuistipitata* by pollutant metals. **Environ. Contam. Toxicol.** v. 45, p.337-342, 2003.

COLZI, I.; ARNETOLIA, M.; GALLOA, A.; DOUMETT, S.; BUBBAB, M. D.; PIGNATTELLI, S.; GABBRIELLIA, R.; GONNELLIA, C. Copper tolerance strategies involving the root cell wall pectins in *Silene paradoxa* L. **Environmental and Experimental Botany**, v.78, p.91– 98, 2012.

COMISSÃO DE FERTILIDADE DO SOLO – CFS-RS/SC. **Recomendações de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 3.ed. Passo Fundo, SBRS/NRS, 1994. 223p.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO – CQFS-RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. Porto Alegre, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo/Núcleo Regional Sul, 2004, 400p.

COSTA, C. N.; MEURER, E. J.; LIMA, C. V. S.; DOS SANTOS, R. C. Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente. In: MEURER, E. J. (Ed.). **Fundamentos de química do solo**. Porto Alegre: Evangraf, 2012. p.201-241.

CORBI, J. J.; STRIXINO, S. T.; SANTOS, A.do; DEL GRANDE, M. Diagnóstico ambiental de metais e organoclorados em córregos

adjacentes a áreas de cultivo de cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil). **Quím. Nova**, v.29(1), p.61-65, 2006.

COUÉE, I.; SULMON, C.; GOUESBET, G.; AMRANI, A.E. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v.57, p.449-459, 2006.

COUTO, R.R.; COMIN, J.J.; BEBER, C.L.; URIARTE, J.F.; BRUNETTO, G.; BELLI FILHO, P. Atributos químicos em solos de propriedades suíncolas submetidos a aplicações sucessivas de dejetos de suínos no município de Braço do Norte, Santa Catarina. **Scientia Agraria**, vol. 11 (6), p. 493-497, 2010.

DAT, J.; VANDENABEELE, S.; VRANOVA, E.; Van MONTAGU, M.; INZÉ, D.; Van BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v.57(5), p.779-795, 2000.

DEGEN, A.; KOSEC, M. Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. **Journal of the European Ceramic Society**. v.20, p. 667-673, 2000.

DELMONDES, P. H.; FREIRE, J. M.; SCHAEFER, A. S.; DE AMARA, G. A.; Da SILVA, M. A. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. **Revista Eletrônica Interdisciplinar**, v. 1 (9), p.1-5, 2013.

DI BACCIO, D., TOGNETTI, R., MINNOCCI, A., & SEBASTIANI, L. Responses of the *Populus euramericana* clone I-214 to excess zinc: Carbon assimilation, structural modifications, metal distribution and cellular localization. **Environmental and experimental botany**, v.67(1), p.153-163, 2009.

DORTZBACH, D.; ARAUJO, I.S.; PANDOLFO, C.; VEIGA, M. **Alteração de N, P e K em solos adubados com dejetos líquidos de suínos em áreas de pastagem e milho com histórico de diferentes tempos de aplicação.** Disponível em: http://intranetdoc.epagri.sc.gov.br/producao_tecnico_cientifica/DOC_1252.pdf. Acesso em: 15 jun. 2012.

D'SOUZA, R. M.; DEVARAJ, V. R. Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in hyacinth bean under zinc stress. **African Crop Science Journal**, v. 20 (1), p. 17 – 29, 2012.

DUBOIS, M.K.; GILLES, A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, **Anal. Chem.** v.28, p.350, 1956.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 1999. 412p.

ERNST, W. Evolution of metal hyperaccumulation and phytoremediation hype. **New Phytologist**, v. 146 (3), p. 357-358, 2000.

FADIGAS, F. S.; AMARAL-SOBRINHO, N. M. B. MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C.; FREIXO, A. A. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. **Bragantia** [online], v.61(2), p. 151-159, 2002.

FEIGL, G.; KUMAR, D.; LEHOTAI, N.; TUGYI, N.; MOLNÁR, A.; ÖRDÖG, A.; SZEPESEI, A.; GEMES, K.; LASKAY, G.; ERDEI, L.; KOLBERT, Z. Physiological and morphological responses of the root system of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.) and rape seed (*Brassica napus* L.) to copper stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.94, p.179–189, 2013.

FERNANDES, A.J.S. **Indicadores de stress oxidativo em estirpes de cianobactérias e microalgas**. 2009. 166f. Dissertação (Mestrado em Engenharia do Ambiente). Universidade Técnica de Lisboa, 2009.

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. **Toxicology**, v.189(1), p.147-163, 2003.

GAUDRÉ, D.; QUINIOU, N. What mineral and vitamin levels to recommend in swine diets? **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.190-200, 2009.

GELDNER, N. Casparian strips. **Current Biology**, v.23 (23), p.1025–1026, 2013.

GIACOMINI, S.J.; AITA, C. Deep-Litter and pig slurry as nitrogen sources for corn. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32 (1), p.195-205, 2008.

GIACOMINI, S. J.; AITA, C. Carbon dioxide emission after application of pig slurry and pig deep-litter. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.43, p.107-114, 2008.

GIACOMINI, S. J.; AITA, C.; MIOLA, E. C. C.; RECOUS, S. Carbon mineralization of straw and pig manure with and without incorporation in soil. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**, vol.32, p. 2661-2668, 2008.

GIACOMINI, S. J.; AITA, C.; MIOLA, E. C. C.; RECOUS, S. Mineralização do carbono da palha de aveia e dejetos de suínos aplicados na superfície ou incorporados ao solo. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. v.32, p. 2661-2668, 2008.

GIROTTTO, G. **Cobre e zinco no solo sob uso intensivo de dejetos líquido de suínos**. 2007. 121f. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

GIROTTTO, E. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em plantas cultivadas em solos com acúmulo de cobre e zinco**. 2010. 147f. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

GIROTTTO, E.; CERETTA, C.A.; SANTOS D.R.; BRUNETTO, G.; ANDRADE, J. G.; ZALAMENAIV, J. Formas e perdas de cobre e fósforo em água de escoamento superficial e percolação em solo sob aplicações sucessivas de dejetos líquido de suínos. **Ciência Rural**, v.40 (9), p.1948-1954, 2010a.

GIROTTTO, E.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; SANTOS, D. R.; SILVA, L. S.; LOURENZI, C. R.; LORENSINI, F.; RENAN VIEIRA, C. B.; SCHMATZ, R. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquido de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34 (3), p.955-965. 2010b.

GIROTTTO, E.; CERETTA, C.A.; ROSSATO, L.V.; FARIAS, J.G.; TIECHER, T.L.; DECONTI, L.; SCHMATZ, R.; BRUNETTO, G.; SCHETINGER, M.R.C.; NICOLOSO, F.T. Triggered antioxidant defense mechanism in maize grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to intensive application of pig slurry. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol.93, p.145-155, 2013.

GOMES-JUNIOR, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Funct. Plant Biol**. v.34, p.449-456, 2007.

GOMES, M.P.; SÁ, T.C.L.L.; MARQUES, M.; NOGUEIRA, M.O.G.; SILVA, G.H.; CASTRO, E.M.; SOARES, A.M. Efeitos dos rejeitos da indústria de zinco na anatomia e crescimento de plantas jovens de *Salix humboldtiana* Willd. (salgueiro). **Hoehnea**, v.38(1), p.135-142, 2011.

GRÄBER, I.; HANSEN, J.F.; OLESEN, S.E.; PETERSEN, J.; ØSTERGAARD, H.S. & KROGH, L. Accumulation of copper and zinc in Danish agricultural soils in intensive pig production areas. **Danish J. Geogr.**, v.105, p.15-22, 2005.

GUARDINI, R.; COMIN, J.J.; SCHMITT, D.; TIECHER, T.; BENDER, M.A.; RHEINHEIMER, D.S.; MEZZARI, C.P.; OLIVEIRA, B.S.; GATIBONI, L.C.; BRUNETTO Accumulation of phosphorus fractions in typic Hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep pig litter in a no-tillage system. **Nutr Cycl Agroecosyst**, v.93, p.215–225, 2012.

HALL, J. L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v.53(366), p.1-11, 2002.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol.** v.141, p.312–322, 2006.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and cell culture. How should you do it and what does it mean? **Br. J. Pharmacol.**, v.142, p.231–255, 2004.

HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). **Current opinion in plant biology**, v. 12(3), p. 259-266, 2009.

HEEMSBERGEN, D. A.; MCLAUGHLIN, M. J.; WHATMUFF, M.; Warne, M. S. J.; Broos, K.; Bell, M.; Nash, D.; Barry, G.; Pritchard, D.; Penney, N. Bioavailability of zinc and copper in biosolids compared to their soluble salts. **Environmental Pollution**, v.158, p. 1907–1915, 2010.

HERBETTE, S.; TACONNAT, L.; HUGOUVIEUX, V.; PIETTE, L.; MAGNIETTE, M. L.; CUINE, S.; AUROY, P.; RICHAUD, P.; FORESTIER, C.; BOUGUIGNON, J.; RENOU, J. P.; VAVASSEUR, A.; LEONHARDT, N. Genome-wide transcriptome profiling of the early cadmium response of *Arabidopsis* roots and shoots. **Biochimie**, v.88(11), p. 1751-1765, 2006.

HIGARASHI, M.M.; COLDEBELLA, A.; OLIVEIRA, P.A.V.; KUNZ, A.; MATTEI, R.M.; SILVA, V.S.; AMARAL, A.L. Concentração de macronutrientes e metais pesados em maravalha de unidade de suínos em cama sobreposta. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.12 (3), p.311-317, 2008.

- HINSINGER, P. Bioavailability of trace elements as related to root-induced chemical changes in the rhizosphere. *In* **Trace Elements in the Rhizosphere**. Eds G R Gobran, W W Wenzel and E Lombi. CRC Press LCC, Boca Raton, FL, 2001, pp. 25–41.
- HINSINGER, P., PLASSARD, C., TANG, C., JAILLARD, B. Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: a review. **Plant and soil**, v.248(1-2), p.43-59, 2003.
- HINSINGER, P.; PLASSARD, C.; JAILLARD, B. Rhizosphere: a new frontier for soil biogeochemistry. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 88 (1), p. 210-213, 2006.
- HISCOX, J.D. & ISRAELTAM, G.F. A method for extraction of chlorophyll from leaf without maceration. **Canadian Journal of Botany**, v.57, p.1332-1334, 1979.
- HU, X., JIANG, M., ZHANG, A., & LU, J. Abscisic acid-induced apoplastic H₂O₂ accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. **Planta**, v.223(1), p.57-68, 2005.
- JAIN, R.; SRIVASTAVA, S.; SOLOMON, S.; SHRIVASTAVA, A. K.; CHANDRA, A. Impact of excess zinc on growth parameters, cell division, nutrient accumulation, photosynthetic pigments and oxidative stress of sugarcane (*Saccharum* spp.). **Acta physiologiae plantarum**, v.32(5), p.979-986, 2010.
- JIN, C. W.; YOU, G. Y.; HE, Y. F.; TANG, C.; WU, P.; ZHENG, S. J. Iron deficiency-induced secretion of phenolics facilitates the reutilization of root apoplastic iron in red clover. **Plant Physiology**, v.144(1), p.278-285, 2007.
- KHATUN, S.; ALI, M. B.; HAHN, E. J.; PAEK, K. Y. Copper toxicity in *Withania somnifera*: Growth and antioxidant enzymes responses of *in vitro* grown plants. **Environmental and Experimental Botany**, v.64(3), p.279-285, 2008.
- KHOLOVÁ, J.; SAIRAM, R. K.; MEENA, R. C.; SRIVASTAVA, G. C. Response of maize genotypes to salinity stress in relation to osmolytes and metal-ions contents, oxidative stress and antioxidant enzymes activity. **Biologia Plantarum**, v.53(2), p.249-256, 2009.
- KOMY, Z. R.; SHAKER, A. M.; HEGGY, S. E. M.; EL-SAYEDB, M. E. A. Kinetic study for copper adsorption onto soil minerals in the

absence and presence of humic acid. **Chemosphere**, v.99, p.117–124, 2013.

KRISHNAMURTHY, P., RANATHUNGE, K., FRANKE, R., PRAKASH, H. S., SCHREIBER, L., MATHEW, M. K. The role of root apoplastic transport barriers in salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). **Planta**, v.230(1), p.119-134, 2009.

KRZESŁOWSKA, M. The cell wall in plant cell response to trace metals: polysaccharide remodeling and its role in defense strategy. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33 (1), p. 35-51, 2011.

KUMAR, P.; TEWARI, R. K.; SHARMA, P. N. Cadmium enhances generation of hydrogen peroxide and amplifies activities of catalase, peroxidases and superoxide dismutase in maize. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194 (1), p. 72-80, 2008a.

KUMAR, P.; TEWARI, R. K.; SHARMA, P. N. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by excess supply of iron in maize plants. **Plant cell reports**, v. 27(2), p. 399-409, 2008b.

LAMBERS, H., MOUGEL, C., JAILLARD, B., HINSINGER, P. Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective. **Plant and Soil**, v.321(1-2), p. 83-115, 2009.

LEHMANN, A.; VERESOGLOU, S.D. ; LEIFHEIT, E.F.; RILLIG, M.C. Arbuscular mycorrhizal influence on zinc nutrition in crop plants – A meta-analysis. **Soil Biology & Biochemistry**, v.69. p.123-131. 2014.

LETELIER, M. E.; LEPE, A. M.; FAÚNDEZ, M.; SALAZAR, J.; MARÍN, R.; ARACENA, P.; SPEISKY, H. Possible mechanisms underlying copper-induced damage in biological membranes leading to cellular toxicity. **Chemico-biological interactions**, v.151(2), p.71-82, 2005.

LI, Q.; GUO, X. Y.; XU, X. H.; ZUO, Y. B.; WEI, D. P.; MA, Y. B. Phytoavailability of copper, zinc and cadmium in sewage sludge-amended calcareous soils. **Pedosphere**, v.22, p.254–262, 2012.

LI, X.; MA, H.; JIA, P.; WANG, J.; JIA, L.; ZHANG, T.; QIAO, K.; WEI, X. Responses of seedling growth and antioxidant activity to excess iron and copper in *Triticum aestivum* L. **Ecotoxicology and environmental safety**., v.86, p.198–203, 2012.

LIMA, G. J. M. M.; MORÉS, N.; SANCHES, R. L. As diarreias nutricionais na suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37(1), p.17-30, 2009.

- LIMA, G.J.M.M. Nutrição de suínos: Ferramenta para reduzir a poluição causada pelos dejetos e aumentar a lucratividade do negócio. In: SEGANFREDO, M.A. (Ed.), **Gestão ambiental na suinocultura**. Brasília, DF, EMBRAPA, informações tecnológicas, 2007. 302p.
- LIN, Q.; SHEN, K. L.; ZHAO, H.M.; LI, W.H. Growth response of *Zea mays* L. in pyrene-copper co-contaminated soil and the fate of pollutants. **J. Hazard. Mater.**, v.150, p. 515–521, 2008.
- LIU, Y.; CAO, Q.; LUO, F.; CHEN, J. Biosorption of Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ ions from aqueous solutions by pretreated biomass of brown algae. **Journal of Hazardous Materials**, v.163, p.931–938, 2009.
- LLORENS, N.; AROLA, L.; BLADÉ, C.; MAS, A. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*. **Plant Science**, v.160(1), p.159-163, 2000.
- LUCHESE, A. V.; GONÇALVES JUNIOR, A. C.; LUCHESE, E. B.; BRACCINI, M. C. L. Emergência e absorção de cobre por plantas de milho (*Zea mays*) em resposta ao tratamento de sementes com cobre. **Ciência Rural**, v.34 (6), p.1949-1952, 2004.
- MANTOVANI, A. **Contaminação química de solos contaminados por cobre: formas, sorção e efeito no desenvolvimento de espécies vegetais**. 2009. 166f. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
- MARCATO, C. E. ; PINELLI, E.; CECCHI, M.; WINTERTON, P.; GUIRESSE, M. Bioavailability of Cu and Zn in raw and anaerobically digested pig slurry. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.72, p. 1538–1544, 2009.
- MARCHI, G.; GUILHERME, L. R. G.; SILVA, C. A.; GONÇALVES, V. C. **Elementos-traço e sua relação com qualidade e inocuidade de fertilizantes, corretivos agrícolas e resíduos orgânicos no Brasil**. Embrapa Cerrados, 2009.
- MARSCHNER, P. **Marschner's mineral nutrition of higher plants**. 3 ed. London, Academic Press. 2012, 651p.
- MATTIAS, J.A.; PAVINATO, P.S.; PANDOLFO C.M.; REINSHEIMER, D.S.; FERREIRA, F.P.; STRECK, C.A.; CHIAPINOTTO, J.; BASSO, C.J. Cobre, Zinco e Manganês no solo com Aplicação de dejetos de Suínos. In CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 29, 2003, Ribeirão Preto, **Anais...**, Ribeirão Preto: SBCS. Disponível em:

<http://w3.ufsm.br/ppgcs/congressos/LINKS%20DO%20CBCS%202003/CBCS2003%20EM%20PDF/23.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2012.

MELO, É. E. C. de; NASCIMENTO, C. W. A. do; SANTOS, A. C. Q.; SILVA, A. S. da. Disponibilidade e fracionamento de Cd, Pb, Cu e Zn em função do pH e tempo de incubação com o solo. **Ciênc. agrotec.** v.32 (3), p. 776-784, 2008.

MENZIES, N. W.; DONN, M. J.; KOPITTKE, P. M. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. **Environmental pollution**, v.145(1), p.121-130, 2007.

MEERS, E.; RUTTENS, A.; HOPGOOD, M. J.; SAMSON, D.; TACK, F. M. G. Comparison of EDTA and EDDS as potential soil amendments for enhanced phytoextraction of heavy metals. **Chemosphere**, v.58(8), p.1011-1022, 2005.

MICHAEL, P. I.; KRISHNASWAMY, M. The effect of zinc stress combined with high irradiance stress on membrane damage and antioxidative response in bean seedlings. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 171-177, 2011.

MICHAUD, A. M., BRAVIN, M. N., GALLEGUILLOS, M., & HINSINGER, P. Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cu-contaminated, former vineyard soils. **Plant and Soil**, v.298(1-2), p.99-111, 2007.

MILNER, M. J.; KOCHIAN, L. V. Investigating heavy-metal hyperaccumulation using *Thlaspi caerulescens* as a model system. **Annals of Botany**, v. 102 (1), p. 3-13, 2008.

MIN, J. Y.; LIM, S.; JUNG, G. Downregulation of catalase by reactive oxygen species via hypermethylation of CpG island II on the catalase promoter. **FEBS Letters**, v.584, p.2427-2432, 2010.

MITHÖFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. **FEBS Lett**, v.566, p.1-5, 2004.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.** v.7, p.405-410. 2002.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., & VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v.9(10), p.490-498, 2004.

MIYAKE, C., SHINZAKI, Y., NISHIOKA, M., HORIGUCHI, S., & TOMIZAWA, K. I. Photoinactivation of ascorbate peroxidase in isolated tobacco chloroplasts: *Galdieria partita* APX maintains the electron flux through the water–water cycle in transplastomic tobacco plants. **Plant and cell physiology**, v.47(2), p.200-210, 2006.

MOORE, G. SOIL GUIDE. **A handbook for understanding and managing agricultural soils**. Western Australian Department of Agriculture Bulletin 4343. Sands Print Group, Perth Australia, 381 pp, 1998.

MOSSOP, Katherine F.; DAVIDSON, Christine M. Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. **Analytica Chimica Acta**, v. 478 (1), p. 111-118, 2003.

MUNIZ, M. H. B.; BERTO, D. A.; HAUPTLI, L.; FRACAROLLI, C.; NETO, M. A. T.; TAMASSIA, L. F. M.; WECHSLER, F. S. Fontes orgânicas e inorgânicas de zinco e cobre como melhoradores de desempenho em leitões desmamados. **R. Bras. Zootec.**, v.39 (9), p.1999-2005, 2010.

MURPHY, J. & RILEY, J. P. A Modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. **Anal Chem Acta**, v.27, p.31–36, 1962.

NACHTIGALL, G. R.; NOGUEIROL, R. C.; ALLEONI, L. R. F. Extração seqüencial de Mn e Zn em solos em função do pH e adição de cama-de-frango. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13 (3), p. 240-249, 2009.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplast. **Plant Cell Physiol.** v.22, p.867–880, 1981.

NEAMAN, A.; REYES, L.; TROLARD, F.; BOURRIÉ, G.; SAUVÉ, S. Copper mobility in contaminated soils of the Puchuncaví valley, central Chile. **Geoderma**, v.150, p.359–366, 2009.

NETO, M. N. & MELLO, S. P. Produção de silagens de milho (*Zea mays* l.) com diferentes adubações. **Nucleus**, v. 2, p. 1-10, 2010.

NEUMANN, G., GEORGE, T. S., PLASSARD, C. Strategies and methods for studying the rhizosphere—the plant science toolbox. **Plant and Soil**, v.321(1-2), p.431-456, 2009.

NOVOZAMSKY, I.; LEXMOND, T. M.; HOUBA, V. J. G. A Single Extraction Procedure of Soil for Evaluation of Uptake of Some Heavy Metals by Plants. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, vol. 51, p. 1-4, 1993.

NYAMANGARA, J. Use of sequential extraction to evaluate zinc and copper in a soil amended with sewage sludge and inorganic metal salts. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 69 (2), p.135-141, 1998.

PALMER, C. M. & GUERINOT, M. L. Facing the challenges of Cu, Fe and Zn homeostasis in plants. **Nature Chem. Biol.** v.5, p.333–340, 2009.

PALMGREN, M. G., CLEMENS, S., WILLIAMS, L. E., KRÄMER, U., BORG, S., SCHJØRRING, J. K., & SANDERS, D. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions. **Trends in plant science**, v.13(9), p.464-473, 2008.

PANCHUK, I.I., ZENTGRAF, U.; VOLKOV, R.A. Expression of the APX gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.222, p.926-932, 2005.

PANOU-FILOTHEOU, H.; BOSABALIDIS, A. M.; KARATAGLIS, S. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). **Annals of Botany**, v. 88(2), p. 207-214, 2001.

PAYÀ-PÉREZ, A.; SALA, J.; MOUSTY, F. Comparison of ICP-AES and ICP-MS for the analysis of trace elements in soil extracts. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.51, p. 223–230, 1993.

PERDOMO, C.C.; LIMA, G.J.M.M.D.; NONES, K. Produção de suínos e meio ambiente. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DA SUINOCULTURA, 2001, Gramado. **Anais...** Gramado: s.n., p.17, 2001.

PÉREZ-NOVO, C.; BERMÚDEZ-COUSO, A.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; ARIAS-ESTÉVEZ, M. The effect of phosphate on the sorption of copper by acid soils. **Geoderma**, v.150, p.166–170, 2009.

PEREZ-NOVO, C., BERMÚDEZ-COUSO, A., LOPEZ-PERIAGO, E., FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D., & ARIAS-ESTEVEZ, M. Zinc adsorption in acid soils: influence of phosphate. **Geoderma**, v.162(3), p.358-364, 2011.

- PINTO, E.; SIGUAD-KUTNER, T.; LEITÃO, M. et al. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **J Phycol**, v.39, p.1008–1018, 2003.
- QI, X. M.; LI, P. J.; LIU, W.; XIE, L. J. Multiple biomarkers response in maize (*Zea mays* L.) during exposure to copper. **Journal of Environmental Sciences**, v.18(6), p.1182–1188, 2006.
- QIAO, X. L.; LUO, Y. M.; CHRISTIE, P.; WONG, M. H. Chemical speciation and extractability of Zn, Cu and Cd in two contrasting biosolids-amended clay soils. **Chemosphere**, v.50, p.823–929, 2003.
- REDJALA, T.; STERCKEMAN, T.; SKIKER, S.; ECHEVARRIA, G. Contribution of apoplast and symplast to short term nickel uptake by maize and *Leptoplax emarginata* roots. **Environmental and Experimental Botany**, v.68, p.99–106, 2010.
- RIBEIRO, A. M. L.; PINHEIRO, C. C.; GIANFELICE, M. Nutrientes que afetam a imunidade dos leitões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36(1), p.119–124, 2008.
- RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR2, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J. E.; RODERMEL, S.; INZE, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, vol. 32, p. 329–342, 2002.
- ROITTO, M.; RAUTIO, P.; JULKUNEN-TITTO, R.; KUKKOLA, E.; HUTTUNEN, S. Changes in the concentrations of phenolics and photosynthates in Scot pine (*Pinus sylvestris*L.) seedlings exposed to nickel and copper. **Environ Pollut**, v.137, p.603–609, 2005.
- RÖMKENS, P.; BOUWMAN, L. A.; BOON, G. T. Effect of plant growth on copper solubility and speciation in soil solution samples. **Environmental Pollution**, v.106, p. 315–321, 1999.
- ROSSATO, L.V. **Efeitos bioquímicos e fisiológicos do chumbo em plantas de quitoco (*Pluchea sagittalis*): Possível papel fitorremediador**. 2010. 83f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica), Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- RYAN, P. R., DELHAIZE, E., & JONES, D. L. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. **Annual review of plant biology**, v.52(1), p.527–560, 2001.

SAGARDOY, R.; MORALES, F.; LÓPEZ-MILLÁN, A.; ABADIA, A.; ABADIA, J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. **Plant Biol**, v.11, p.339–350, 2008.

SAMREEN, T.; SHAH, H. U.; ULLAH, S.; JAVID, M. Zinc effect on growth rate, chlorophyll, protein and mineral contents of hydroponically grown mungbeans plant (*Vigna radiata*). **Arabian Journal of Chemistry**, 2013.

SÁNCHEZ-PARDO, B.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M.; ZORNOZA, P. Copper microlocalisation and changes in leaf morphology, chloroplast ultrastructure and antioxidative response in white lupin and soybean grown in copper excess. **Journal of plant research**, v. 127 (1), p. 119-129, 2014.

SANDMANN, G.; BOGER, P. Coppermediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. **Plant Physiol**. v.66, p.797-800 1980.

SANTOS, F.S.; SOBRINHO, N.M.B.A.; MAZUR, N. **Mecanismos de tolerância de plantas a metais pesados**. In. FERNADES, M.S. Nutrição Mineral de Plantas. Viçosa, MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 432p, 2006.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 125 (4), p. 1591-1602, 2001.

SEREGIN, I. V., SHPIGUN, L. K., IVANOV, V. B. Distribution and toxic effects of cadmium and lead on maize roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, v.51(4), 525-533, 2004.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany**, v.12, p.1-26, 2012.

SHEN, Q. P.; SHEN, Z. G. Effects of pig manure and wheat straw on growth of mung bean seedlings grown in aluminium toxicity soil. **Bioresource Technology**, v.76, p.235-240, 2001.

SHI, G.; CAIA, Q. Leaf plasticity in peanut (*Arachis hypogaea* L.) in response to heavy metal stress. **Environmental and Experimental Botany**, v.67, p.112-117, 2009.

SHI, Q.; BAO, Z.; ZHU, Z.; YING, Q.; QIAN, Q. Effects of different treatments of salicylic acid on heat tolerance, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzyme activity in seedlings of *Cucumis sativa* L. **Plant growth regulation**, v.48(2), p.127-135, 2006.

SILVA, R.F.; LUPATINI, M.; ANTONIOLLI, Z.I. LEAL, L.T.; JUNIOR, C.A.M. Comportamento de *Peltophorum dubium* (Spreng.) Taub., *Parapiptadenia rigida* (Benth.) Brenan e *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong cultivadas em solo contaminado com cobre. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 21 (1), p. 103-110, 2011

SILVEIRA, M.L.A. **Extração sequencial e especiação iônica de zinco, cobre e cádmio em latossolos tratados com biossólido**. 2002. 166f. Programa de Pós-graduação em Agronomia. Tese (Doutorado em Agronomia). Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2002.

SMANHOTTO, A.; SOUSA, A.P.S.; SAMPAIO, S.C.; NÓBREGA, L.H.P.; PRIOR, M. Cobre e zinco no material percolado e no solo com a aplicação de água residuária de suinocultura em solo cultivado com soja. **Eng. Agríc., Jaboticabal**, v.30 (2), p.346-357, 2010.

SMITH, V. H.; TILMAN, G. D.; NEKOLA, J. C. Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, v.100, p.179-196, 1999.

SODRÉ, F. F.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GRASSI, MARCO T. Digestão fotoquímica, assistida por microondas, de águas naturais: aplicação em estudos de partição e especiação do cobre. **Química Nova**, v. 27 (5), p. 695-700, 2004.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. 10.ed. Washington, USDA-SCS, 2006. 332p.

SOMMER, S. G. Effect of composting on nutrient loss and nitrogen availability of cattle deep litter. **European Journal of Agronomy**, v.14, p.123-133, 2001.

SONG, A.; LI, P.; LI, Z.; FAN, F.; NIKOLIC, M.; LIANG, Y. The alleviation of zinc toxicity by silicon is related to zinc transport and antioxidative reactions in rice. **Plant and soil**, v.344(1-2), p.319-333, 2011.

STEPHAN, U. W. Intra- and intercellular iron trafficking and subcellular compartmentation within roots. **Plant and Soil**, v.241, p.19-25, 2002.

SU, Y.H.; ZHU, Y.G. Uptake of selected PAHs from contaminated soils by rice seedlings (*Oryza sativa*) and influence of rhizosphere on PAH distribution. **Environmental Pollution**, v. 155 (2), p. 359-365, 2008.

TANYOLAÇ, D.; EKMEKÇI, Y.; ÜNALAN, S. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. **Chemosphere**, v. 67(1), p.89-98, 2007.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: Departamento de Solos, UFRGS, 1995. 174p.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C. & BISSON, M. Sequential extraction procedure for the apeciation of particulate trace metals. **Anal. Chem.**, v.51, p.844–850, 1979.

THAYALAKUMARAN, T.; ROBINSON, B. H.; VOGELER, I.; SCOTTER, D. R.; CLOTHIER, B. E.; PERCIVAL, H. J. Plant uptake and leaching of copper during EDTA-enhanced phytoremediation of repacked and undisturbed soil. **Plant and Soil**, v.254(2), p.415-423, 2003.

TIECHER, T.L.; CERETTA, C.A.; COMIN, J.J.; GIROTTO, E.; MIOTTO, A.; MORAES, M.P.; BENEDET, L.; FERREIRA, P.A.A.; LORENZI, C.R.; COUTO, R.R.; BRUNETTO, G. Forms and accumulation of copper and zinc in a sandy typic hapludalf soil after long-term application of pig slurry and deep litter. **Rev. Bras. Ciênc. Solo**. v.37 (3), p. 812-824. 2013.

TRIANAPHYLIDÈS, C.; KRISCHKE, M.; HOEBERICHTS, F. A.; KSAS, B.; GRESSER, G.; HAVAUX, M.; VAN BREUSEGEM, F.; MUELLER, M. J. Singlet oxygen is the major reactive oxygen species involved in photooxidative damage to plants. **Plant physiology**, v.148(2), p.960-968, 2008.

VAN BREUSEGEM, F.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v.161(3), p.405-414, 2001.

VACULÍK, M., KONLECHNER, C., LANGER, I., ADLASSNIG, W., PUSCHENREITER, M., LUX, A., HAUSER, M. T. Root anatomy and element distribution vary between two *Salix caprea* isolates with different Cd accumulation capacities. **Environmental Pollution**, v.163, p.117-126., 2012.

- VAILLANT, N., MONNET, F., HITMI, A., SALLANON, H., & COUDRET, A. Comparative study of responses in four *Datura* species to a zinc stress. **Chemosphere**, v.59(7), p.1005-1013, 2005.
- VINIT-DUNAND, F.; EPRON, D.; ALAOU-SOSSÉ, B.; BADOT P. M. Effects of copper on growth and on photosynthesis of mature and expanding leaves in cucumber plants. **Plant Science**, v.163, p.53-58, 2002.
- WANG, H., SHAN, X., LIU, T., XIE, Y., WEN, B., ZHANG, S., HAN, F., VAN GENUCHTEN, M. T. Organic acids enhance the uptake of lead by wheat roots. **Planta**, v.225(6), 1483-1494, 2007.
- WANG, S.; JIAO, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48 (11), p. 5677-5684, 2000.
- WANG, S., NAN, Z., LIU, X., LI, Y., QIN, S., & DING, H. Accumulation and bioavailability of copper and nickel in wheat plants grown in contaminated soils from the oasis, northwest China. **Geoderma**, v.152(3), p.290-295, 2009.
- WELLBURN, A.R. The spectral determination of chlorophylls a and b, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **J. Plant Physiol.** v.144, p.307–313, 1994.
- WENG, L., TEMMINGHOFF, E. J., LOFTS, S., TIPPING, E., VAN RIEMSDIJK, W. H. Complexation with dissolved organic matter and solubility control of heavy metals in a sandy soil. **Environmental Science & Technology**, v.36(22), p.4804-4810, 2002.
- WHITE, P. J.; WHITING, S. N.; BAKER, A. J. M.; BROADLEY, M. R. Does zinc move apoplastically to the xylem in roots of *Thlaspi caerulescens*? **New Phytologist**, v.153, p.201–207, 2002.
- XU, Y.; YU, W.; MA, Q.; ZHOU, H. Accumulation of copper and zinc in soil and plant within ten-year application of different pig manure rates. **Plant, Soil and Environment**, v.59(11), p.492-499, 2013.
- YADAV, S. K. Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatin in heavy metal stress tolerance of plants. **South African Journal of Botany**, v. 76 (2), p.167-179, 2010.
- YRUELA, I. Copper in plants. **Braz. J. Plant Physiol.** v.17, p.145–156, 2005.

ZHANG, H.; XIA, Y.; WANG, G.; SHEN, Z. Excess copper induces accumulation of hydrogen peroxide and increases lipid peroxidation and total activity of copper–zinc superoxide dismutase in roots of *Elsholtzia haichowensis*. **Planta**, v.227(2), p.465-475, 2008.

ZHANG, H., ZHANG, F., XIA, Y., WANG, G., & SHEN, Z. Excess copper induces production of hydrogen peroxide in the leaf of *Elsholtzia haichowensis* through apoplastic and symplastic CuZn-superoxide dismutase. **Journal of hazardous materials**, v.178(1), p.834-843, 2010.

ZHAO, S.; FANG, S.; ZHU, L.; LIU, L.; LIU, Z.; ZHANG, Y. Mutual impacts of wheat (*Triticum aestivum* L.) and earthworms (*Eisenia fetida*) on the bioavailability of perfluoroalkyl substances (PFASs) in soil. **Environmental Pollution**, v.184, p.495–501, 2014.

ZHAO, Z., XI, M., JIANG, G., LIU, X., BAI, Z., & HUANG, Y. Effects of IDSA, EDDS and EDTA on heavy metals accumulation in hydroponically grown maize (*Zea mays*, L.). **Journal of hazardous materials**, v.181(1), p.455-459, 2010.

9. ANEXOS

ESTUDO 1.

Tabelas ANOVA para Cu e Zn extraídos por EDTA e CaCl₂ no solo das amostras indeformadas.

Zn EDTA

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	106011,7	1	106011,7	190,1808	0,000000
tratamento	57370,9	4	14342,7	25,7303	0,000001
bloco	1373,9	4	343,5	0,6162	0,657273
Erro	8918,8	16	557,4		

Cu EDTA

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	12581,62	1	12581,62	314,4808	0,000000
tratamento	7276,89	4	1819,22	45,4719	0,000000
bloco	147,96	4	36,99	0,9246	0,474038
Erro	640,12	16	40,01		

Zn CaCl₂

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	419,3649	1	419,3649	346,5195	0,000000
tratamento	258,5233	4	64,6308	53,4042	0,000000
bloco	3,7220	4	0,9305	0,7689	0,560991
Erro	19,3635	16	1,2102		

Cu CaCl₂

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,391338	1	1,391338	1348,863	0,000000
tratamento	0,258649	4	0,064662	62,688	0,000000
bloco	0,004053	4	0,001013	0,982	0,444785
Erro	0,016504	16	0,001031		

Tabelas ANOVA para MS, densidade estomática, clorofila, carotenóides totais, proteínas e carboidratos solúveis totais e atividades das enzimas CAT e APX.

Clorofila a, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5558,543	1	5558,543	3347,485	0,000000
tratamento	21,447	4	5,362	3,229	0,040187
bloco	8,924	4	2,231	1,344	0,296884

Erro	26,568	16	1,661		
------	--------	----	-------	--	--

Clorofila a, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5868,241	1	5868,241	1582,007	0,000000
tratamento	120,569	4	30,142	8,126	0,000892
bloco	2,941	4	0,735	0,198	0,935653
Erro	59,350	16	3,709		

Clorofila b, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	294,8069	1	294,8069	1896,351	0,000000
tratamento	2,6151	4	0,6538	4,205	0,016266
bloco	0,5173	4	0,1293	0,832	0,524391
Erro	2,4874	16	0,1555		

Clorofila b, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	370,4624	1	370,4624	1235,487	0,000000
tratamento	11,4602	4	2,8651	9,555	0,000382
bloco	0,2558	4	0,0640	0,213	0,927221
Erro	4,7976	16	0,2999		

Clorofila total, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	8318,939	1	8318,939	3743,017	0,000000
tratamento	34,411	4	8,603	3,871	0,021958
bloco	20,285	4	5,071	2,282	0,105579
Erro	35,560	16	2,223		

Clorofila total, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	9295,284	1	9295,284	1568,471	0,000000
tratamento	208,797	4	52,199	8,808	0,000588
bloco	2,088	4	0,522	0,088	0,984895
Erro	94,821	16	5,926		

Carotenóides totais, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	183,3469	1	183,3469	2394,166	0,000000

tratamento	0,4877	4	0,1219	1,592	0,224635
bloco	0,5105	4	0,1276	1,666	0,206718
Erro	1,2253	16	0,0766		

Carotenóides totais, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	236,1314	1	236,1314	1373,318	0,000000
tratamento	4,6930	4	1,1732	6,823	0,002103
bloco	0,1095	4	0,0274	0,159	0,955913
Erro	2,7511	16	0,1719		

Nº de estômatos, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	207974,2	1	207974,2	3996,488	0,000000
tratamento	1301,4	4	325,3	6,252	0,003157
bloco	37,6	4	9,4	0,181	0,945086
Erro	832,6	16	52,0		

Nº de estômatos, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	271284,1	1	271284,1	2944,105	0,000000
tratamento	1600,6	4	400,1	4,343	0,014424
bloco	345,7	4	86,4	0,938	0,467140
Erro	1474,3	16	92,1		

Proteínas solúveis totais, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1326,529	1	1326,529	1742,413	0,000000
tratamento	3,047	4	0,762	1,001	0,435922
bloco	3,691	4	0,923	1,212	0,344198
Erro	12,181	16	0,761		

Proteínas solúveis totais, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1041,220	1	1041,220	1455,860	0,000000
tratamento	3,273	4	0,818	1,144	0,371518
bloco	2,271	4	0,568	0,794	0,546272
Erro	11,443	16	0,715		

Carboidratos solúveis totais, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2302,770	1	2302,770	1144,266	0,000000
tratamento	4,763	4	1,191	0,592	0,673573
bloco	6,941	4	1,735	0,862	0,507388
Erro	32,199	16	2,012		

Carboidratos solúveis totais, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5364,237	1	5364,237	2202,472	0,000000
tratamento	30,209	4	7,552	3,101	0,045560
bloco	41,116	4	10,279	4,220	0,016052
Erro	38,969	16	2,436		

Atividade APX, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3,879095	1	3,879095	1857,845	0,000000
tratamento	0,075048	4	0,018762	8,986	0,000530
bloco	0,012723	4	0,003181	1,523	0,242584
Erro	0,033407	16	0,002088		

Atividade APX, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5,425346	1	5,425346	761,7604	0,000000
tratamento	0,091546	4	0,022886	3,2134	0,040801
bloco	0,006859	4	0,001715	0,2408	0,911058
Erro	0,113954	16	0,007122		

Atividade CAT, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	625,1568	1	625,1568	3290,220	0,000000
tratamento	2,4149	4	0,6037	3,177	0,042263
bloco	0,6544	4	0,1636	0,861	0,508113
Erro	3,0401	16	0,1900		

Atividade CAT, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	718,0966	1	718,0966	1101,352	0,000000
tratamento	10,0305	4	2,5076	3,846	0,022460
bloco	2,4262	4	0,6065	0,930	0,471092
Erro	10,4322	16	0,6520		

Matéria seca, 15 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	35,44897	1	35,44897	1127,715	0,000000
tratamento	2,46289	4	0,61572	19,588	0,000005
bloco	0,25948	4	0,06487	2,064	0,133487
Erro	0,50295	16	0,03143		

Matéria seca, 25 DAE

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	155,4400	1	155,4400	7468,931	0,000000
tratamento	2,6317	4	0,6579	31,614	0,000000
bloco	0,1756	4	0,0439	2,110	0,127003
Erro	0,3330	16	0,0208		

ESTUDO 2.

Tabelas ANOVA para Cu e Zn extraídos por EDTA e CaCl₂ no solo rizosférico e não-rizosférico.

Zn EDTA rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	89511,1	1	89511,07	10198,59	0,000000
tratamento	113630,2	4	28407,55	3236,66	0,000000
bloco	23,7	4	5,92	0,67	0,619558
Erro	140,4	16	8,78		

Zn EDTA não-rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	80550,8	1	80550,77	14629,07	0,000000
tratamento	103870,5	4	25967,63	4716,06	0,000000
bloco	23,3	4	5,83	1,06	0,408355
Erro	88,1	16	5,51		

Cu EDTA rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	10556,48	1	10556,48	7590,536	0,000000
tratamento	8323,46	4	2080,86	1496,226	0,000000
bloco	1,48	4	0,37	0,266	0,895435
Erro	22,25	16	1,39		

Cu EDTA não-rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
--	----	------------------	----	---	---

Intercept	8240,169	1	8240,169	7792,740	0,000000
tratamento	7224,420	4	1806,105	1708,036	0,000000
bloco	4,212	4	1,053	0,996	0,438212
Erro	16,919	16	1,057		

Zn CaCl₂ rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	190,9427	1	190,9427	285,4491	0,000000
tratamento	45,7830	4	11,4458	17,1108	0,000012
bloco	2,1458	4	0,5365	0,8020	0,541509
Erro	10,7027	16	0,6689		

Zn CaCl₂ não-rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	204,5510	1	204,5510	316,9934	0,000000
tratamento	61,3206	4	15,3301	23,7572	0,000001
bloco	2,4490	4	0,6123	0,9488	0,461573
Erro	10,3246	16	0,6453		

Cu CaCl₂ rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,855453	1	1,855453	900,2943	0,000000
tratamento	0,664204	4	0,166051	80,5705	0,000000
bloco	0,018279	4	0,004570	2,2174	0,113096
Erro	0,032975	16	0,002061		

Cu CaCl₂ não-rizosférico

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,460209	1	0,460209	129,8367	0,000000
tratamento	0,405719	4	0,101430	28,6159	0,000000
bloco	0,008583	4	0,002146	0,6053	0,664451
Erro	0,056712	16	0,003545		

Tabelas ANOVA para Cu e Zn no simplasto e apoplasto de raízes de milho.

Zn apoplasto

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	6251,828	1	6251,828	447,5853	0,000000
tratamento	1559,321	4	389,830	27,9090	0,000000
bloco	23,086	4	5,771	0,4132	0,796617

Erro	223,486	16	13,968		
------	---------	----	--------	--	--

Zn simplasto

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1089,908	1	1089,908	332,2292	0,000000
tratamento	171,956	4	42,989	13,1040	0,000064
bloco	22,154	4	5,538	1,6882	0,201767
Erro	52,489	16	3,281		

Cu apoplasto

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	346,4810	1	346,4810	607,6281	0,000000
tratamento	58,1140	4	14,5285	25,4788	0,000001
bloco	0,9808	4	0,2452	0,4300	0,784899
Erro	9,1235	16	0,5702		

Cu simplasto

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	376,2630	1	376,2630	290,9757	0,000000
tratamento	39,8293	4	9,9573	7,7003	0,001169
bloco	1,8815	4	0,4704	0,3638	0,830797
Erro	20,6897	16	1,2931		

Tabelas ANOVA comparando o Cu e Zn em solo rizosférico e não-rizosférico extraídos por EDTA e CaCl₂

Testemunha – Zn EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	475,3643	1	475,3643	2099,295	0,000001
tratamento	0,3410	1	0,3410	1,506	0,287038
bloco	1,1207	4	0,2802	1,237	0,420750
Erro	0,9058	4	0,2264		

DL 90 – Zn EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	5542,258	1	5542,258	2861,941	0,000001
tratamento	16,282	1	16,282	8,408	0,044136
bloco	4,884	4	1,221	0,631	0,667039
Erro	7,746	4	1,937		

DL 180 – Zn EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	13008,05	1	13008,05	18827,26	0,000000
tratamento	17,06	1	17,06	24,69	0,007659
bloco	7,15	4	1,79	2,59	0,189785
Erro	2,76	4	0,69		

CS90 – Zn EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	13401,46	1	13401,46	4849,014	0,000000
tratamento	2,06	1	2,06	0,746	0,436522
bloco	29,60	4	7,40	2,677	0,181630
Erro	11,05	4	2,76		

CS 180 – Zn EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	354900,4	1	354900,4	23136,58	0,000000
tratamento	199,3	1	199,3	12,99	0,022671
bloco	148,9	4	37,2	2,43	0,205695
Erro	61,4	4	15,3		

Testemunha – Cu EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	83,50182	1	83,50182	3262,636	0,000001
tratamento	2,44036	1	2,44036	95,351	0,000616
bloco	0,35967	4	0,08992	3,513	0,125520
Erro	0,10237	4	0,02559		

DL 90 – Cu EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	974,8939	1	974,8939	11303,25	0,000000
tratamento	8,8235	1	8,8235	102,30	0,000538
bloco	0,0940	4	0,0235	0,27	0,882038
Erro	0,3450	4	0,0862		

DL 180 – Cu EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2458,313	1	2458,313	10832,00	0,000000
tratamento	13,908	1	13,908	61,28	0,001438
bloco	11,621	4	2,905	12,80	0,014988
Erro	0,908	4	0,227		

CS90 – Cu EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2227,160	1	2227,160	5575,795	0,000000
tratamento	10,000	1	10,000	25,035	0,007472
bloco	4,072	4	1,018	2,548	0,193498
Erro	1,598	4	0,399		

CS 180 – Cu EDTA (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	28509,22	1	28509,22	5796,153	0,000000
tratamento	56,26	1	56,26	11,439	0,027730
bloco	6,09	4	1,52	0,309	0,858842
Erro	19,67	4	4,92		

Testemunha – Zn CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	34,57368	1	34,57368	257,5732	0,000088
tratamento	2,16783	1	2,16783	16,1503	0,015881
bloco	0,68035	4	0,17009	1,2672	0,412031
Erro	0,53691	4	0,13423		

DL 90 - Zn CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	29,17264	1	29,17264	14,49500	0,018985
tratamento	0,27225	1	0,27225	0,13527	0,731662
bloco	9,07676	4	2,26919	1,12749	0,455109
Erro	8,05040	4	2,01260		

DL 180 - Zn CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	316,6313	1	316,6313	2075,250	0,000001
tratamento	0,4840	1	0,4840	3,172	0,149498
bloco	2,1729	4	0,5432	3,560	0,123167
Erro	0,6103	4	0,1526		

CS90 - Zn CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	55,37864	1	55,37864	684,6680	0,000013
tratamento	0,02031	1	0,02031	0,2511	0,642621
bloco	1,09874	4	0,27468	3,3960	0,131697

Erro	0,32354	4	0,08088		
------	---------	---	---------	--	--

CS 180 - Zn CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	63,12656	1	63,12656	173,1630	0,000193
tratamento	0,77006	1	0,77006	2,1124	0,219778
bloco	1,61410	4	0,40353	1,1069	0,461975
Erro	1,45820	4	0,36455		

Testemunha – Cu CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,041227	1	0,041227	381,5056	0,000041
tratamento	0,023485	1	0,023485	217,3230	0,000123
bloco	0,000492	4	0,000123	1,1380	0,451669
Erro	0,000432	4	0,000108		

DL 90 - Cu CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,121771	1	0,121771	160,7957	0,000223
tratamento	0,028644	1	0,028644	37,8235	0,003546
bloco	0,007058	4	0,001764	2,3299	0,216393
Erro	0,003029	4	0,000757		

DL 180 - Cu CaCl₂(rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,307196	1	0,307196	680,5399	0,000013
tratamento	0,107744	1	0,107744	238,6894	0,000102
bloco	0,021810	4	0,005453	12,0793	0,016643
Erro	0,001806	4	0,000451		

CS90 - Cu CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,382085	1	0,382085	84,84372	0,000772
tratamento	0,010758	1	0,010758	2,38895	0,197090
bloco	0,008078	4	0,002019	0,44842	0,771807
Erro	0,018014	4	0,004503		

CS 180 - Cu CaCl₂ (rizosf x não-rizosf)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2,255965	1	2,255965	793,9625	0,000009

tratamento	0,106709	1	0,106709	37,5550	0,003593
bloco	0,044466	4	0,011116	3,9123	0,107451
Erro	0,011366	4	0,002841		

Tabelas ANOVA comparando a concentração de Cu e Zn no apoplasto e simplasto para cada tratamento.

Testemunha – Zn (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	299,3458	1	299,3458	560,6977	0,000019
tratamento	34,5031	1	34,5031	64,6269	0,001300
bloco	6,1971	4	1,5493	2,9019	0,163379
Erro	2,1355	4	0,5339		

DL 90 – Zn (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	581,1394	1	581,1394	812,4711	0,000009
tratamento	80,7696	1	80,7696	112,9213	0,000444
bloco	29,2830	4	7,3208	10,2349	0,022357
Erro	2,8611	4	0,7153		

DL 180 – Zn (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3901,267	1	3901,267	664,3971	0,000013
tratamento	834,094	1	834,094	142,0486	0,000284
bloco	106,112	4	26,528	4,5178	0,086630
Erro	23,488	4	5,872		

CS90 – Zn (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	724,9032	1	724,9032	286,7039	0,000071
tratamento	102,5040	1	102,5040	40,5410	0,003120
bloco	15,1983	4	3,7996	1,5028	0,351367
Erro	10,1136	4	2,5284		

CS 180 – Zn (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	2155,281	1	2155,281	305,4506	0,000063
tratamento	359,205	1	359,205	50,9073	0,002041
bloco	97,603	4	24,401	3,4581	0,128373
Erro	28,224	4	7,056		

Testemunha – Cu (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	67,98404	1	67,98404	3521,107	0,000000
tratamento	0,00015	1	0,00015	0,008	0,933966
bloco	1,72735	4	0,43184	22,366	0,005338
Erro	0,07723	4	0,01931		

DL 90 – Cu (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	75,79697	1	75,79697	644,2667	0,000014
tratamento	0,07766	1	0,07766	0,6601	0,462110
bloco	1,65319	4	0,41330	3,5130	0,125538
Erro	0,47059	4	0,11765		

DL 180 – Cu (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	278,8843	1	278,8843	315,2050	0,000059
tratamento	0,0027	1	0,0027	0,0031	0,958297
bloco	10,5484	4	2,6371	2,9806	0,157626
Erro	3,5391	4	0,8848		

CS90 – Cu (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	71,26230	1	71,26230	1168,441	0,000004
tratamento	2,07480	1	2,07480	34,019	0,004306
bloco	1,96724	4	0,49181	8,064	0,033831
Erro	0,24396	4	0,06099		

CS 180 – Cu (APO/SIM)

	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	324,3075	1	324,3075	531,1158	0,000021
tratamento	0,2969	1	0,2969	0,4862	0,524035
bloco	10,0060	4	2,5015	4,0967	0,100383
Erro	2,4425	4	0,6106		