

Artigo

Respostas Fisiológicas e Absorção de Metais em Folhas de Azevém Anual (POACEAE) Cultivado com Lodo de Esgoto e Suas Relações com Ácidos Orgânicos

Fonseca, J. G. P.; Oliveira, M. A. L.;* Passos, L. P.; Mittelman, A.; Vaz, F. A. S.; Freitas, J. C. E.; Silva, J. C. J.

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (5), 1079-1096. Data de publicação na Web: 24 de Julho de 2020

<http://rvq.sbg.org.br>

Physiological Responses and Absorption of Metals in Italian Ryegrass (POACEAE) Leaves Cultivated with Sewage Sludge and Its Relationships with Organic Acids

Abstract: In this work, the physiological responses and leaf uptake of Cu, Cr, Fe, Pb and Zn were evaluated during the initial growth of Italian ryegrass with addition of urban sewage sludge (LE) and its relationship with the foliar levels of organic acids (OA) obtained by a simple extraction method, using only water as solvent and with less extraction time. The minimum and maximum contents (mg kg^{-1}) found in Italian ryegrass leaves after 14 days in contact with the sludge (Cu: 12.6-21.2; Cr: 26.9-130; Fe: 395.9-6171 and Zn: 138-1190) indicated the bioaccumulation potential of the species. Only Pb concentration was below the limit of detection (LD) and quantification (LQ). Citric acid ($1,966 \text{ mg g}^{-1}$) and malic acid ($0,957 \text{ mg g}^{-1}$) were successfully quantified, along with positively identified peaks of aspartic acid, indicating that those OA might be related to the nutritional behavior of the species, particularly in the regulation of the uptake of elements harmful to metabolism. Based on the stability constants of malic acid for the formation of organo-metallic complexes (Kest: 3.40 for Cu, 2.75 for Pb and 2.00 for Zn), in addition to interaction studies of carboxyl groups with metal ions, especially the citrate group, it can be suggested that the exudation of citric, malic and aspartic acids promotes uptake and retention of metals, thus facilitating the adaptation of the species in anthropic systems. It is concluded that Italian ryegrass responds positively to the application of LE, however accumulating metals at levels potentially harmful.

Keywords: Biofertilizer; potentially toxic elements; Lolium multiflorum; organic acids; sewage sludge.

Resumo

Neste trabalho foi avaliado as respostas fisiológicas e a absorção foliar de Cu, Cr, Fe, Pb e Zn durante o cultivo inicial do azevém anual com adição de lodo de esgoto (LE) e suas relações com os teores foliares de ácidos orgânicos de baixo massa molecular (AO), obtidos por um método de extração simples, utilizando apenas água como solvente e com menor tempo de extração. Os teores mínimo e máximo (mg kg^{-1}) encontrados em folhas de azevém anual após 14 dias em contato com o lodo (Cu: 12,6-21,2; Cr: 26,9-130; Fe: 395,9-6171 e Zn: 138-1190) indicaram o potencial de bioacumulação da espécie. Apenas a concentração de Pb ficou abaixo do limite de detecção (LD) e quantificação (LQ). Foram quantificados os ácido cítrico ($1,966 \text{ mg g}^{-1}$) e málico ($0,957 \text{ mg g}^{-1}$) nas folhas e identificados picos de ácido aspártico, indicando que os mesmos podem estar relacionados ao comportamento nutricional da espécie, particularmente na promoção ou inibição da absorção de elementos ao metabolismo. Com base nas constantes de estabilidade do ácido málico para a formação de complexos organo-metálicos (Kest: 3,40 para o Cu; 2,75 para o Pb e 2,00 para o Zn), além de estudos de interação de grupos carboxilados com íons metálicos, em especial o grupo citrato, pode-se sugerir que a exsudação dos ácidos cítrico, málico e aspártico promove a absorção e retenção de metais e facilita a adaptação da espécie em sistemas antropizados.

Palavras-chave: Biofertilizante; elementos potencialmente tóxicos; Lolium multiflorum; ácidos orgânicos; lodo de esgoto.

* Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, CEP 36036-330, Juiz de Fora-MG, Brasil.

 marcone.oliveira@ufjf.edu.br
DOI: [10.21577/1984-6835.20200088](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200088)

Respostas Fisiológicas e Absorção de Metais em Folhas de Azevém Anual (POACEAE) Cultivado com Lodo de Esgoto e Suas Relações com Ácidos Orgânicos

Jemima Gonçalves Pinto da Fonseca,^a Marcone Augusto Leal de Oliveira,^{a,*} Leônidas Paixão Passos,^b Andréa Mittelman,^b Fernando Antonio Simas Vaz,^c Jobe Condé Evangelista Freitas,^d Júlio César José da Silva^{a,e}

^a Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Química, CEP 36036-330, Juiz de Fora-MG, Brasil.

^b Embrapa Gado de Leite, CEP 36038-330, Juiz de Fora-MG, Brasil.

^c Universidade Federal Fluminense, Departamento de Química Analítica, CEP 24020-141, Niterói-RJ, Brasil.

^d Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia, CEP 37200-000, Lavras-MG, Brasil.

^e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia, INCT- Acqua, CEP 31270-901, Belo Horizonte-MG, Brasil.

*marcone.oliveira@uff.edu.br

Recebido em 22 de Outubro de 2019. Aceito para publicação em 25 de Maio de 2020.

1. Introdução

2. Parte Experimental

2.1. Coleta e amostragem do LE

2.2. Instrumentação

2.3. Reagentes e soluções

2.4. Procedimento

2.5. Controle de qualidade analítico

3. Resultados e Discussão

3.1. Diagnose foliar

3.2. Análises fisiológicas

3.3. Validação analítica

3.4. Absorção dos nutrientes e elementos potencialmente tóxicos em folhas de azevém anual

3.5. Determinação dos AO em folhas de azevém anual

4. Conclusões

1. Introdução

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo semissólido produzido em estações de tratamento de esgoto (ETE's), o qual contém primariamente compostos orgânicos e inorgânicos além de

minerais e agentes microbiológicos, atributos estes que dependem das características do local de origem.¹⁻² A conscientização ambiental da sociedade nas últimas décadas tem demandado soluções sustentáveis para a destinação desse resíduo, e o uso agrícola do LE tem se destacado no Brasil, incluindo a adubação de pastagens.³⁻⁴

O azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma importante gramínea forrageira de clima temperado usada como alimento na produção leiteira em vários países, em vista de suas características nutricionais favoráveis, tais como, digestibilidade e palatabilidade, além de elevados níveis proteicos e minerais.⁵⁻⁶ No Brasil, o cultivo dessa forrageira está em franca expansão, a partir do crescimento da produção leiteira no sul do país, estimulada pela profissionalização da mão-de-obra familiar e condições de clima e solo, dentre outros fatores.⁷ Nesse contexto, alternativas que promovam a produção sustentável, tal como o uso do LE, começam a ter maior apelo na comunidade produtiva, especialmente nos segmentos em que a adoção de tecnologias preponderantes em labor, porém pouco intensivas em capital, pode determinar ganhos de produtividade e redução do risco econômico.⁸

Evidências demonstram que a complexação de metais com compostos orgânicos favorece a absorção de nutrientes, metais e elementos tóxicos pelas plantas.⁹ Os ácidos orgânicos de baixa massa molecular (AO) presentes no solo e nos organismos vivos têm relevante participação nesses processos, por sua capacidade em interagir com a fase sólida do solo e ocupar sítios de adsorção de nutrientes.¹⁰ Em condições de toxidez por metais, os AO têm sua difusão pelas membranas das raízes inibida ou paralizada, processo este que bloqueia a absorção de elementos-traço. Pode ocorrer também exclusão ou bloqueio desses elementos via liberação intensa de AO nas radículas.¹¹ Dessa forma, tanto quando aplicados artificialmente ou provenientes da exsudação pelas raízes, os AO atenuam a fitotoxidez de vários elementos, tais como Al, Ba e Sr, Cr, Cu, Mn e Zn.^{12,13} Em folhas de gramíneas tropicais cultivadas na presença de LE, os teores dos ácidos acético, láctico e oxálico aumentam em proporção ao incremento nas concentrações de Cd, Cu, Ni e Zn, evidenciando seu papel promotor na absorção desses elementos.¹¹

De acordo com a literatura, extrações de ácidos orgânicos de folhas, raízes, sementes e frutos, são realizadas, em geral, através de mistura de solventes seguidas de agitação. Experimentos reportam a adição de 50 mL de água destilada em 50 g de amostra, seguida de agitação no escuro e adição de acetato de etila para extração e posterior determinação por (cromatografia líquida de alta eficiência) CLAE¹⁴.

Outros utilizaram 1 g de amostra com 30 mL de água deionizada, com 3 re-extrações seguidas por ultrassom por 30 min em temperatura ambiente, para a extração de AO em amostras de frutas.¹⁵ Na literatura é descrito a validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos para detecção de AO em águas residuais de fécula de mandioca ácida utilizando a própria fermentação natural da mandioca para a solubilização dos ácidos durante um período de 32 dias.¹⁶ A solução aquosa foi sucessivamente extraída com hexano com nova secagem e análise posterior por cromatografia de camada delgada (CCD).¹⁶ Outros determinaram AO em exsudatos radiculares de amostras de azevém anual embebendo as raízes em cloreto de cálcio, em seguida passando a solução em uma resina de troca aniônica, extraindo com HCl 1 mol L⁻¹, condensando em evaporador rotativo e finalmente diluindo o exsudado em 5 mL de água deionizada para análise por cromatografia a gas (CG).¹⁷ Verifica-se, portanto, que os métodos em uso têm relativa complexidade, demandando reagentes e um tempo maior de extração, fatores estes que limitam a obtenção rápida de resultados e produtos.

A presença dos AO no azevém anual ainda não foi avaliada e nem o LE foi estudado quanto à suas interações fisiológicas e nutricionais e relações com os AO, quando usado como substrato de cultivo para essa espécie. Dessa forma, a caracterização das relações iônicas dos AO com a absorção de metais pelo azevém anual cultivado na presença de LE assume relevância para viabilizar o uso dessa forrageira em sistemas produtivos com aproveitamento desse resíduo em processos agrícolas. Considerando os aspectos discutidos acima, o presente trabalho teve o objetivo avaliar as respostas fisiológicas e a absorção de Cu, Cr, Fe, Pb e Zn pelas folhas durante o crescimento inicial do azevém anual em cultivo com adição de LE, e verificar suas relações com os teores de AO tendo por base um novo método de extração simples e rápida.

2. Parte Experimental

2.1. Coleta e amostragem do LE

As amostras de LE foram coletadas na cidade de Juiz de Fora, MG, localizada na Zona da Mata a 43°20'40" de longitude oeste e 21°41'20" de latitude sul no sudeste do Brasil¹⁸, na Estação

de Tratamento de Esgoto (ETE) Companhia de Saneamento Municipal–Juiz de Fora (CESAMA/JF), unidade Barreira do Triunfo. Ela emprega a técnica de digestão aeróbica para o tratamento do LE utilizando sistema de lodo ativado. Possui capacidade atual de vazão nominal de 10 L s^{-1} podendo ser ampliada até 4 vezes e vazão tratada de 5 L s^{-1} com 90 % de eficiência no tratamento. Seu corpo receptor é o rio Paraibuna e atende o bairro Barreira do Triunfo e adjacências além de empresas do pólo industrial de JF.¹⁹

Para os experimentos laboratoriais, foram coletados 2 kg de LE fresco para cada mês de estudo, sendo acondicionado em frascos de polietileno previamente descontaminados em solução de HNO_3 10 % v/v durante 24 h. Foi utilizada a amostragem sistemática, pela qual a pilha foi dividida em partes iguais e incrementos foram retirados a fim de garantir o máximo possível de homogeneidade do material. No preparo de amostra, foi empregada a técnica de pilha alongada, dividindo-se a amostra em quatro setores iguais e retirando-se alternadamente os quartos opostos (1 e 4 ou 2 e 3) até se obter a quantidade desejada.²⁰

No laboratório as amostras foram estocadas em geladeira a 4°C até o momento da utilização como biofertilizante.

2.2. Instrumentação

As plântulas foram cultivadas em câmara de crescimento Biotronette Mark III, LAB-LINE Instruments, aplicando $25 \pm 4^\circ \text{C}$ de temperatura, $200 \mu\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ de irradiância, 14 h de fotoperíodo e $65 \pm 5\%$ U.R. As determinações feitas na colheita incluíram a área foliar, com medidor LI-COR 3000A, o teor de clorofila, com medidor SPAD 502, Minolta, as medidas das massas fresca e seca da parte aérea, com balança de precisão AU-220,

Shimadzu, a contagem manual do número de folhas e o comprimento da parte aérea, com régua de precisão de 1 mm.

Para as determinações de Cu, Cr, Fe, Pb, e Zn nas amostras de LE utilizou-se um espectrômetro de absorção atômica com chama (FAAS), modelo Thermo Scientific, Solar Série M5, com corretor de fundo Deutério (D_2) e amostrador automático no modo forno (Thermo Scientific, modelo GF 95). Para este trabalho foi empregado somente o modo chama, utilizando o gás acetileno (C_2H_2) e o óxido nitroso (N_2O), ambos com 99,7 % de pureza, além de ar comprimido. As condições de atomização estão descritas na Tabela 1 abaixo.

Para otimização da vazão do gás acetileno (C_2H_2), da altura e do posicionamento do queimador, soluções padrões de referência para cada analito foram preparadas nas faixas especificadas pelo manual do equipamento e utilizadas para observar a variação do sinal, de maneira a obter um máximo de absorbância. O tempo de cada medida foi de 4 s, sendo todas realizadas em triplicata ($n=3$). Lâmpadas de cátodo oco monoelementares foram utilizadas, operando a 75 % da corrente indicada, com exceção do Zn que operou a 50 % da potência. Para minimizar erros devido ao sinal de fundo, foi utilizado o corretor de fundo de Deutério (D_2), durante as determinações de todos os metais, exceto para o Cr (357,8 nm), já que este corretor é eficiente para comprimentos de onda de até no máximo 350 nm.²¹⁻²²

Os experimentos envolvendo a análise de separação dos AO em amostras de folhas de azevém anual foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar de zona (ECZ - HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, EUA) equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD) ajustado em 230 nm, com um dispositivo de controle de temperatura e software (HP ChemStation, rev A.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais otimizados para FAAS

Analitos	^a λ (nm)	^b Fenda (nm)	^c I (mA)	^d h (mm)	Chama	^e Q (Lmin^{-1})
Cr	357,8	0,5	6	8	$\text{N}_2\text{O}/\text{C}_2\text{H}_2$	3,9
Cu	324,7	0,5	4	7	$\text{Ar}/\text{C}_2\text{H}_2$	1,2
Fe	248,8	0,2	6	7	$\text{Ar}/\text{C}_2\text{H}_2$	1,2
Pb	217	0,5	4	7	$\text{Ar}/\text{C}_2\text{H}_2$	1,1
Zn	213,9	0,2	5	7	$\text{Ar}/\text{C}_2\text{H}_2$	1,2

^aComprimento de onda; ^bAbertura da fenda espectral; ^cCorrente da lâmpada de cátodo oco; ^dAltura do queimador; ^eVazão do gás de nebulização.

06.01) para controle do equipamento e aquisição de dados. Amostras e padrões foram injetados hidrodinamicamente por pressão positiva (25 mbar por 2 s) e o sistema eletroforético foi operado sob tensão de polaridade negativa. Para todas as análises, foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA) 48,5 cm (comprimento efetivo de 40 cm) x diâmetro interno de 75 µm x diâmetro externo de 375 µm. Parâmetros como temperatura (25 °C), voltagem (-20kV, 300µA e 6,0 W), comprimento de onda (230 nm), pH do eletrólito (3,45) e concentração dos constituintes Tris (16 mmol L⁻¹), CTAB 90,8 mmol L⁻¹, Ácido Ftálico (19 mmol L⁻¹), foram otimizados a partir de injeções de mix de padrões a 1 mmol L⁻¹ objetivando a obtenção de picos separados e linhas bases com boas resoluções.

2.3. Reagentes e soluções

As soluções padrão intermediárias de Cu, Cr, Fe, Pb e Zn foram preparadas a partir de padrões monoelementares de 1000 mg L⁻¹ em HNO₃ 2% v/v (MERCK). As faixas de concentrações para as curvas analíticas foram: Cu, Cr e Pb (0,1 – 4 mg L⁻¹), Fe e Zn (0,5 – 8 mg L⁻¹). Nas determinações dos AO por eletroforese capilar de zona (ECZ), foram empregados padrões de hidróxido de sódio, tris, ácido acético, aspártico, cítrico, fórmico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico, tartárico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e as soluções preparadas com água ultrapura com resistividade de 18,2 MΩ.cm e teor de carbono inorgânico total inferior a 2 µg L⁻¹ (Elga PURELAB Option-Q, Marlow, UK). Para a digestão das folhas de azevém anual utilizaram-se os reagentes HNO₃ 30 % (MERCK MILLIPORE) e HClO₄ 70 % (ANIDROL).

2.4. Procedimento

O substrato de crescimento foi obtido por compostagem de restos culturais vegetais, apresentando, como média de três amostragens, a seguinte composição química: 34,3; 16,8; 22,0; 31,4; 5,7; 0,32; 29,3 e 698 g kg⁻¹ de N, P, K, Ca, Mg, Zn, Na e CO, respectivamente, e pH 6,5. Foi escolhido um solo de compostagem visando proporcionar um substrato com textura, aeração e pH (entre 5,5 e 6,5) adequados para o crescimento das

plantas. Dessa forma, preveniram-se problemas de compactação, os quais tendem a inibir o pleno desenvolvimento das raízes, e de absorção deficiente de nutrientes, a qual se verifica fora da faixa de pH utilizada.²⁴ Plântulas de azevém anual cv. BRS Ponteio foram adquiridas e selecionadas quanto à uniformidade, a partir da sementeira e crescimento por 25 dias, tempo necessário para a germinação e maturação da espécie, em SOC com fornecimento hídrico contínuo via sistema de capilaridade utilizando água deionizada. Ao final deste período, houve a seleção de 10 espécimes por recipiente (parcelas) para o monitoramento e de cada parcela foram analisados os valores iniciais de indicadores fisiológicos, antes de serem submetidos ao tratamento experimental com o LE.²⁴

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, utilizando-se 2 tratamentos, a adição de LE puro no solo e o grupo controle (Br), em triplicatas, contendo 10 espécimes por parcela, sendo repetido 4 vezes, nos meses de março, abril, maio e junho de 2017.

Para o grupo controle (Br) foi utilizada somente a água deionizada e o solo. A água foi repostada semanalmente no volume de 100 mL e no 14º dia foram realizadas avaliações dos mesmos indicadores fisiológicos analisados no início do experimento em cada parcela. No mesmo dia houve a colheita do experimento e a pesagem do material vegetal obtido. A parte aérea colhida foi pesada para a determinação do peso fresco. Após a pesagem, as amostras foram acondicionadas em envelopes previamente identificados e secadas em estufa ventilada a 45 ° até atingirem peso constante. Os materiais foram novamente pesados para a determinação da matéria seca.²³⁻²⁴ Os resultados das análises fisiológicas foram submetidos a um tratamento estatístico utilizando o teste *t* pareado em um nível de confiança de 95%. As análises foram feitas no programa MS Excel 2013 Professional Plus.

Para a determinação dos teores de elementos químicos Cu, Cr, Fe e Zn nas folhas de azevém anual, as amostras secas foram maceradas em gral e pistilo e pesou-se 0,2 g para a digestão nitro-perclórica na proporção de 2:1, em bloco digestor (Modelo: AC-4025, Marca ACBLABOR) a 250 °C.²⁵ Os autores optaram pelo bloco digestor em virtude da alta frequência analítica e por ser um equipamento normalmente presente em laboratórios que trabalham com amostras agrônômicas.

No entanto, para a determinação de Pb nas folhas empregou-se uma digestão assistida por micro-ondas (MW, *Speedwave Four*, Berghof), nas condições abaixo (Tabela 2), ao invés do bloco digestor. Esse método foi empregado em virtude da baixa recuperação (menor que 70 %) obtida tanto para amostras quanto para o branco fortificado em ambos os níveis, utilizando a técnica inicial (sistema aberto - bloco digestor), indicando que a metodologia era inadequada para a determinação do analito no material vegetal. Uma das vantagens da digestão úmida em sistemas fechados, como é o caso do MW, é a diminuição da perda do analito por volatilização ou projeção, o que foi comprovado pelo aumento da taxa de recuperação utilizando essa técnica em dois níveis (83-90 %). Segundo a literatura, decomposição de amostras em sistemas fechados são recomendados para a determinação dos analitos As, Pb, Cd, Se e Hg, que formam facilmente compostos voláteis.²⁶

Nas análises por ECZ, utilizou-se a metodologia preconizada por Vaz *et al.*, (2012), pré-condicionando o capilar com solução de NaOH a 1,0 mol L⁻¹ por

30 min. Para cada nova condição experimental testada, o capilar foi pré-tratado com NaOH 1,0 mol L⁻¹ (5 min), H₂O (5 min) e BGE (30 min). Entre as corridas, o capilar foi lavado com BGE fresco (2 min). Para o extrato das plantas foi desenvolvido um método de extração simples e rápido para injeção no equipamento e determinação simultânea dos AO (Figura 1). O método proposto constituiu na pesagem de 1 g de amostras de folhas frescas e maceração com auxílio de nitrogênio líquido em almofariz de porcelana com pistilo. As amostras tratadas foram transferidas para um erlenmeyer com 10 mL de água deionizada, e em seguida autoclavadas por 15 min a 120 °C e pressão de 0,6 kg cm⁻³. Após o resfriamento, as amostras foram filtradas com filtro de papel qualitativo e armazenadas em frascos âmbar para análise.

2.5. Controle de qualidade analítico

A linearidade das curvas de calibração externas para as determinações espectrométricas (FAAS) foi calculada através do coeficiente de determinação

Tabela 2. Programa de aquecimento para determinação de Pb em amostras de folhas de azevém anual

Etapa	^a T (°C)	^b P (bar)	^c Ta (min)	Tempo (min)	Potência
1	150	30	10	5	50
2	190	35	5	15	80
3	50	25	1	10	0

^aTemperatura; ^bPressão; ^cTemperatura da Rampa de Aquecimento

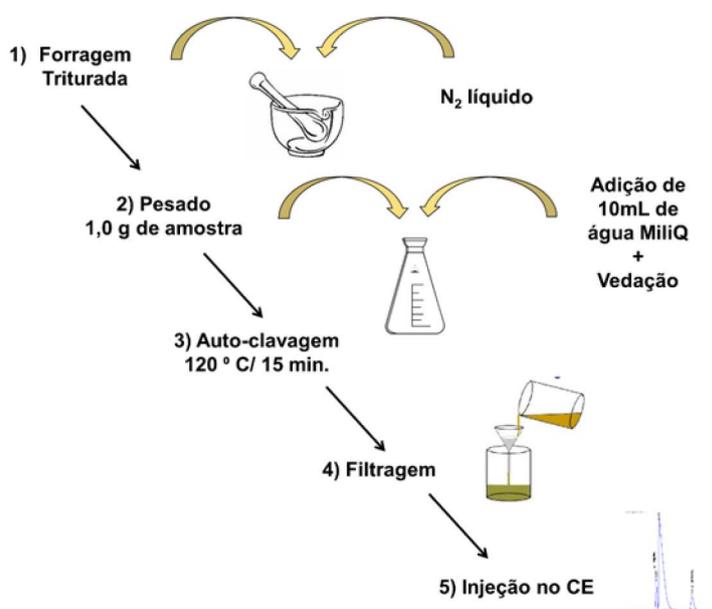


Figura 1. Método para a extração de AO em folhas de azevém anual

(r^2), utilizando o método dos mínimos quadrados ordinário. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) instrumentais nas análises foram calculados utilizando a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear no lugar do desvio padrão do branco e dividindo-se o resultado pelo coeficiente angular da curva analítica. Para calcular os valores de LD e LQ do método proposto, utilizou-se um fator de correção considerando a massa de LE utilizada no método e o volume final da amostra digerida, considerando também as diluições envolvidas. A precisão foi avaliada através da estimativa do coeficiente de variação (CV), realizado em ensaios independentes (replicatas autênticas). Testes de adição e recuperação de analitos foram feitos, em dois níveis de concentração, para avaliar a exatidão do método. A detectabilidade ou sensibilidade para a técnica FAAS nas condições avaliadas foi verificada através do cálculo da concentração característica (c_0). Os valores foram calculados pela divisão do valor 0,0044 pelo coeficiente angular da curva analítica.²⁷

Nas análises por ECZ, a fim de verificar a existência de efeitos de matriz, comparou-se os coeficientes angulares das curvas de adição de padrão com as curvas de calibração externa através do teste t de *Student*. A quantificação dos AO foi feita através do cálculo da concentração em função do fator de resposta (Fr), utilizando primeiramente o ácido oxálico para os testes iniciais como padrão interno (PI) e posteriormente o ácido tártrico como PI nos cálculos. Para o cálculo do Fr, curvas de calibração externa nas concentrações de 0,02, 0,05, 0,10, 0,50, 1,0, 2,5 e 4,0 mmol L⁻¹ foram analisadas aleatoriamente em triplicatas autênticas. As curvas de calibração para a determinação dos AO foram submetidos à análise de variância (programa Statistical Analysis System, versão 9.2, SAS Institute, 2008).²⁸ Os pressupostos de normalidade foram avaliados, através do teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Cochran.²⁷

3. Resultados e Discussão

3.1. Diagnose foliar

A diagnose foliar indicou que todos os espécimes utilizados nos diferentes tratamentos desenvolveram-se de forma regular, sem

mudança de coloração, com bom crescimento, durante o período do experimento. Essa análise preliminar é de altíssima relevância uma vez que a “folha” reflete o melhor estado nutricional da planta. As plântulas não apresentaram sinais de clorose e/ou necrose nas folhas. A não existência de efeitos visuais toxicológicos é um indício que as concentrações das substâncias inorgânicas extraídas do LE, durante o período de estudo, não afetaram o vigor foliar nos indivíduos avaliados.²⁹

3.2. Análises fisiológicas

O tratamento utilizando o LE como fertilizante no solo apresentou os maiores valores para todas as variáveis analisadas (Tabela 3). Os resultados para os testes T demonstraram diferenças significativas entre as médias do grupo controle (Br) e o solo misturado com LE puro, demonstrando que a adição de LE aumenta o desenvolvimento do azevém anual nos estágios iniciais de crescimento. No entanto, mesmo que a espécie vegetal não apresente sinais de toxidez de determinado elemento, esta pode estar contaminada e acabar servindo de alimento para algum animal e intoxicá-lo, caracterizando a biomagnificação.³⁰ Sabe-se, inclusive, que alguns elementos traço são benéficos para a nutrição de muitas plantas em níveis baixos, tornando-se tóxicos em quantidades elevadas. Estes elementos podem ser absorvidos aos poucos do solo por vegetais e serem acumulados em grandes quantidades em seus tecidos, sem causar-lhes danos. Tais indivíduos são apropriados para o uso em fitorremediação.³⁰⁻³¹

3.3. Validação analítica

Os coeficientes de determinação obtidos para as curvas de calibração externa variaram de 0,9968 – 0,9993 indicando boa linearidade do método. Os valores de CV para todas as amostras analisadas foram menores que 10 %, indicando uma precisão apropriada. Os ensaios de recuperação variaram de 82 a 102 %. Esses resultados estão dentro do recomendado pela literatura para seus respectivos níveis de concentração, indicando exatidão do método.²⁷ Os LD's e LQ's instrumentais e do método ficaram abaixo dos valores preconizados pela legislação brasileira CONAMA 420/09³² que estabelece critérios e valores orientadores da qualidade do

Tabela 3. Médias dos indicadores fisiológicos entre 0 e 14 dias após a aplicação de tratamentos com LE e soluções nutritivas convencionais no azevém anual em câmaras de crescimento. $t_{tab} = 4,30$; $n=3$

ªIF	Tratamentos		ªt _{cal}
	ªBr (Controle)	LE (Puro)	
Clorofila (SPAD)	39,37	71,85	-8,45
Parte Aérea (cm)	25,33	27,50	-0,34
Área Foliar (cm ²)	40,81	68,06	-4,57
Rel AF/CPA	1,58	2,433	-1,88
Número de Folhas	46,67	72,67	-2,34
Peso Verde (g)	1,218	2,704	-3,47
Peso Fresco (g)	0,1328	0,2047	-2,73

ªIndicadores Fisiológicos, ¢Branco, ¢Valor de t calculado a um nível de confiança de 95%

solo, destinado a fins agrícolas, quanto à presença de contaminantes bem como diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas e da instrução normativa nº 39/2018 do MAPA³³, que estabelece regras e tolerância dos fertilizantes minerais destinados à agricultura. Tais valores indicaram que o método utilizado é adequado para a detecção e quantificação destes elementos em amostras de azevém anual. Os analitos Cr e Pb não são considerados nutrientes e sua regulamentação se baseia na resolução CONAMA 375/06 (Tabela 4).³⁴

3.4. Absorção dos nutrientes e elementos potencialmente tóxicos em folhas de azevém anual

O pH do solo utilizado no sistema foi avaliado após o 14º dia de inserção do LE *in natura* e foi obtido um valor de 6,4, indicando que não houve alteração significativa no pH do meio. Valores elevados de Ca foram encontrados nas análises de varredura do LE.³⁵ Em processos de calagem do solo, compostos iônicos de Ca atuam como

corretores de pH em solos ácidos. Logo, um LE com um alto teor deste composto pode auxiliar no processo de correção do pH.⁴

Segundo a caracterização inorgânica realizada no LE, foram encontradas altas concentrações de Fe e Zn no biossólido, além de concentrações significativas de Cu e de metais potencialmente tóxicos como Cr e Pb.³⁵ O excesso de Fe altera a absorção de outros nutrientes pela planta, como Ca, Mg, K, P, e outros íons As e Cd, ao formar uma placa na rizosfera, causando efeitos de toxidez indiretos.³⁶⁻³⁸ Em solos com baixa presença de O₂ (como nos alagados, por exemplo) há a redução de Fe³⁺ para Fe²⁺, forma esta que é mais facilmente absorvida por vegetais, o que favorece a toxidez por este elemento.³⁷ Os sintomas citados em outros estudos incluem manchas amareladas em folhas de soja, amarelecimento de folhas de pitangueira, diminuição do comprimento radicular em trigo, redução no crescimento da raiz em aroeira, manchas marrons a aparecimento de necroses nas folhas de batata doce, além de diminuições do crescimento e outros.³⁷⁻⁴¹

Tabela 4. Limites de detecção (LDI) e quantificação (LQI) instrumentais, limites de detecção (LDM) e quantificação (LQM) do método e valores máximos permitidos (VMP) pelas legislações nacionais

Analitos	ªLDI	ªLQI	ªLDM	ªLQM	ªVMP		
					CONAMA 420/09	MAPA 4.954/04	CONAMA 375/06
Cu	1,1.10 ⁻²	3,4.10 ⁻²	1,4	4,5	60	2000	1500
Cr	1,3.10 ⁻²	2,3.10 ⁻²	0,8	2,7	75	*	1000
Fe	2,2.10 ⁻²	6,2.10 ⁻²	2,6	8,7	*	2000	*
Pb	1,2.10 ⁻²	5,3.10 ⁻²	1,9	6,6	72	*	300
Zn	3,3.10 ⁻²	9,2.10 ⁻²	3,6	12	300	3000	2800

ªmg L⁻¹; ¢mg Kg⁻¹; *Valores não especificados

O Zn é um dos micronutrientes menos abundantes nos solos brasileiros, sendo mais comum encontrarmos problemas causados pela sua deficiência do que por seu excesso. Entretanto, em altas concentrações no solo ele pode causar retardos ao crescimento foliar e radicular. Além disso, a presença elevada de Zn leva ao aparecimento de cloroses nas folhas, de forma semelhante àquelas causadas pela deficiência de Fe, tratando-se, portanto, de uma deficiência induzida deste último.⁴²⁻⁴⁴ Nenhum desses sintomas foram detectados no azevém anual.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados para a determinação de Cu, Cr, Fe, Pb e Zn em amostras de folha de azevém anual cultivadas com LE por 14 dias. Os resultados demonstraram disparidade das concentrações obtidas dos metais avaliados durante os 4 meses de estudo. Segundo a literatura³⁵, Juiz de Fora possui duas sazonalidades bem distintas, uma mais chuvosa e quente (que compreende os meses de março e abril) e outra mais seca e com temperaturas baixas (iniciando no mês de maio) que afetam a concentração de alguns nutrientes. Essas diferenças na qualidade do LE poderiam afetar a distribuição de nutrientes e metais potencialmente tóxicos na espécie, com reflexo na translocação para a parte aérea. No entanto, os resultados obtidos não indicaram qualquer tendência que pudesse relacionar com a concentração absorvida pela gramínea, demonstrando que essas disparidades podem estar relacionadas apenas à natureza fisiológica da espécie.

A concentração de Cr, ultrapassou a exigida pelo CONAMA (75 mg kg⁻¹) com teores significativos nas folhas de azevém em todos os experimentos, com destaque para o branco amostral que apresentou uma concentração significativamente maior que os experimentos utilizando LE. Em áreas próximas a atividades com fins agropecuários e de silviculturas o Cr pode ser liberado na decomposição de agroquímicos e fertilizantes, contendo anidrido crômico, ácido crômico, óxido crômico e trióxido de cromo utilizados no plantio de grãos, principais fontes antrópicas de contaminação, o que explicaria a presença do metal em um solo de compostagem. Teores de Cr podem estar associados à sua utilização como agente ativo das tintas, que são utilizadas na preservação da madeira, empregado na construção de cercas, galpões e nas casas.⁴³⁻⁴⁵ No Brasil são raras as informações sobre os teores de Cr em rochas e nos solos, tendo a maior parte em forma não disponível, visto encontrar-se presente em compostos insolúveis de óxidos combinados com Fe e Al ou fortemente ligado às argilas.⁴⁶⁻⁴⁷ Não foi possível avaliar de qual fonte o Cr foi absorvido pela planta e translocado para as folhas, em virtude da presença tanto no LE quanto no solo de compostagem, mas foi possível observar que nos estágios iniciais de desenvolvimento, a espécie acumula o metal na parte aérea podendo ocasionar efeitos tóxicos para a dieta de ruminantes, embora a planta não tenha sofrido de imediato os efeitos de toxidez pela bioacumulação. Estudos reportam a presença de Cr em resíduos de indústria de couro, que emprega Cr III para obtenção do couro *wet blue*, como fonte de nitrogênio para a forrageira Capim

Tabela 5. Teores de analitos presentes em amostras de folhas de azevém anual. média ± desvio padrão; concentração em mg kg⁻¹, n = 3

Amostras (Ano)	Analitos				
	Cu	Cr	Fe	Pb	Zn
03 (2017)	13,4 ± 1,0	66,2 ± 6,8	559 ± 51	<LD	1,00.10 ³ ± 202
04 (2017)	20,4 ± 0,1	44,8 ± 2,2	6,17.10 ³ ± 506	<LD	1,19.10 ³ ± 174
05 (2017)	12,6 ± 1,0	103 ± 17	421 ± 54	<LD	138 ± 17
06 (2017)	21,2 ± 1,4	26,9 ± 3,5	396 ± 21	<LD	297 ± 14
Parâmetros					
^a BA	18,4 ± 0,3	130 ± 66	399 ± 50	<LD	145 ± 7
^b EM	5 - 20	-	50 - 250	-	20 - 120
^c FEP	Ativador no metabolismo vegetal	Ativador vegetal -	Componente das enzimas	Ativador vegetal -	Ativador enzimático

^aBranco Amostral; ^bExigências Nutricionais (apenas solo como substrato e água em sistema PGR); ^cFunções do elemento na planta (faixa de concentração ótima na matéria seca em mg L⁻¹. Fonte: FAQUIN, 2005

Elefante. A presença do metal foi monitorada em folhas e raízes de capim elefante, e os resultados indicaram teores mais elevados na parte radicular do que na parte aérea e os maiores valores não alcançaram a faixa considerada como excessiva ou tóxica na espécie.⁴⁸ Este exemplo demonstra que a absorção, acumulação de metais e resposta fisiológica das plantas varia de uma espécie para a outra. Os dados obtidos para o Cr no azevém anual é altamente relevante. Em virtude dessa espécie ser uma forrageira, com a área foliar destinada à alimentação de gado leiteiro no Sudeste e Sul do Brasil, não conseguir bloquear os níveis de Cr no sistema radicular, mas translocar quantidades significativas para a parte aérea, compromete a utilização de um LE com o teor desse metal tóxico, mesmo em níveis abaixo do especificado pelas legislações ambientais, como fertilizante para essa gramínea. Ao mesmo tempo, viabiliza a utilização da mesma em processos fitorremediativos.

O Fe no mês de abril apresentou um valor atípico de todos os outros (6171 mg kg^{-1}) excedendo a instrução normativa do MAPA que estabelece o valor máximo de 2000 mg kg^{-1} em base seca. Este valor discrepante pode ser proveniente de alguma mudança nas características do solo de compostagem ou mesmo de alguma fonte de contaminação. Estudos sugerem que o ferro total presente em altas concentrações nas plantas está inativo, provavelmente na forma Fe^{3+} ou precipitado pelo fósforo. A fitoferritina (FeO.OH)₈. ($\text{FeO.OPO}_3\text{H}_2$) é uma forma de reserva de Fe no estroma de plastídeos nas células das plantas.^{37,42} Embora essa premissa seja verdadeira, estudos apontam espécies que bioacumulam este metal especialmente no sistema radicular, como as espécies *Caesalpinia echinata*, duas gramíneas, *Dichorisandra sp* e *Paspalum sp*. capazes de absorver concentrações elevadas e a espécie *Homolepis aturensis* (H.B.K.) Chase que absorveu uma quantidade de Fe 20 vezes acima dos limites considerados normais nas três partes da planta.⁴³ O Fe também é considerado um micronutriente essencial e está presente em altas concentrações nos solos brasileiros. Sua disponibilidade é maior em pH mais baixo, podendo chegar a ser absorvido pelas raízes nas formas Fe^{2+} , Fe^{3+} e na forma complexada. Sua eficiência de absorção está na capacidade da espécie em reduzir sua forma para 2^+ , o que pode ser feito através da liberação de substâncias redutoras ou abaixamento do pH.^{37,46}

O Zn, nos meses de março e abril ultrapassou

o limite máximo proposto pela CONAMA 420 (300 mg kg^{-1}) mas não excedeu a concentração máxima exigido pelo MAPA (3000 mg kg^{-1}), embora tenha ultrapassado as exigências nutricionais das plantas em todos os meses analisados (Tabela 7). O potencial de fitoextração e bioacumulação de Zn em diferentes partes da planta tem sido descrito para várias espécies vegetais.⁴² Estudos comprovaram a bioacumulação de Zn por milho e concluíram que a espécie transloca o Zn absorvido para a parte aérea, mas, em condições de maior suprimento, as partes inferiores atuam como órgãos de reserva. Estima-se que 30-60 % do Zn no solo esteja retido ao Fe_2O_3 , e esta retenção aumenta com a elevação do pH, reduzindo sua disponibilidade para as plantas, o que pode explicar o Br amostral possuir uma concentração menor em relação a maioria.⁴⁹

Para o Cu, os valores encontrados nas folhas estão na faixa do permitido para fertilizantes e solo contaminados, no entanto, considerando que a concentração tóxica de Cu em plantas e na dieta de animais é de 20 mg kg^{-1} , nos meses de março e junho a concentração ultrapassou o valor máximo, embora não tenha havido evidências de toxidez na espécie.^{47,52} Do ponto de vista nutricional, o Cu é considerado micronutriente essencial, e a forma iônica mais comum no solo é Cu^{2+} , sendo adsorvido pela fração mineral e posteriormente complexado pela matéria orgânica.^{31,46} Pesquisas constataram que plantas nativas (*Bidens pilosa* e *Plantago lanceolata*) de áreas contaminadas com resíduos de mineração de cobre tem um potencial de bioacumulação para o metal, sendo eficientes para a biorremediação de sítios contaminados com cobre, tais como solos de vinicultura. Além dessas, outras espécies, como a *Senna multijuga* acumulou preferencialmente Cu na parte radicular e *Shizolobium amazonicum* acumulou preferencialmente Cu na parte aérea.^{43,50} Estas plantas demonstram elevado potencial de crescimento com alta tolerância a áreas contaminadas com cobre, atuando como culturas de cobertura contra o impacto direto da chuva na superfície do solo, reduzindo a contaminação dos ambientes adjacentes.

Apenas o Pb ficou abaixo do limite de detecção da técnica (Tabela 04), tanto para as doze amostras, quanto para o branco amostral, indicando que não ocorreu o acúmulo do elemento tóxico na parte aérea durante o período de estudo, podendo ocorrer apenas em experimentos prolongados.

Estudos mediram a biocumulação de Pb em amostras de azevém perene aplicando lama estabilizada, LE proveniente de digestão aeróbica e de secagem térmica e observou um acúmulo de 0,5 - 20 mg kg⁻¹ nas folhas, referente apenas ao LE proveniente da secagem térmica, constatando que embora a planta tenha acumulado o metal nesta concentração, não houve evidência de toxidez.¹³ Embora o Pb seja considerado um dos maiores poluentes do meio agrícola, sua mobilidade no solo é baixa. Na forma iônica, o Pb⁺², concentra-se mais especificamente na superfície e apenas nas formas orgânicas como o Pb-tetraetilo, trietilo e dietilo, são extremamente móveis e chegam rapidamente às raízes das plantas.⁴⁶ Neste estudo não foi possível ter massa suficiente para avaliação dos metais nas raízes. Portanto, um outro fator que deve ser levado em conta é uma possível retenção do metal na parte radicular da espécie, uma vez que a absorção e transporte de elementos depende de vários fatores como temperatura, aeração do solo, pH, velocidade de absorção e mecanismos de defesa da própria espécie.²⁹ Foi avaliado a tolerância, absorção e distribuição de Pb em plantas de vetiver [*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash], jureminha [*Desmanthus virgatus* (L.) Willd] e algaroba [*Prosopis juliflora* (SW) DC], nativas da região Nordeste do país e constataram que os maiores acúmulos nas três espécies estudadas foram encontrados nas raízes, em comparação com os da parte aérea. Segundo este estudo, a fixação de elementos potencialmente tóxicos nas raízes e a baixa absorção traduzida pelos

teores encontrados na aérea, são considerados mecanismos para escape à toxidez por esses elementos.^{43,51} O pH é outro aspecto relevante na absorção pela competição entre o íon H⁺ e os outros cátions e do íon OH⁻ com os outros ânions. Solos ácidos favorecem a absorção do Pb, por isso a calagem serve como contrapartida para a diminuição da disponibilidade do metal para a planta. Como o solo de compostagem apresenta um pH próximo ao neutro, este fator pode ter influenciado na não absorção do metal pela espécie em estudo.⁴⁶

3.5. Determinação dos AO em folhas de azevém anual

O método utilizado¹² permitiu a separação simultânea de 10 ácidos, de acordo com a Figura 1. Todos os picos apresentaram resolução acima de 1,5, considerado o valor recomendado para uma boa separação na técnica de Eletroforese Capilar (EC).

Após a otimização dos parâmetros instrumentais, injetou-se a amostra no ECZ nas seguintes especificações: pura (100 %), 50 % (v/v) e 25 % (v/v). O eletroferograma da amostra pura (100 %) não apresentou boa resolução, no entanto, as amostras diluídas apresentaram um perfil melhor, com picos bem definidos e separados (Figura 3).

Com base no perfil dos 2 eletroferogramas acima, a amostra com concentração de 25 % foi escolhida para ser utilizada nas análises por

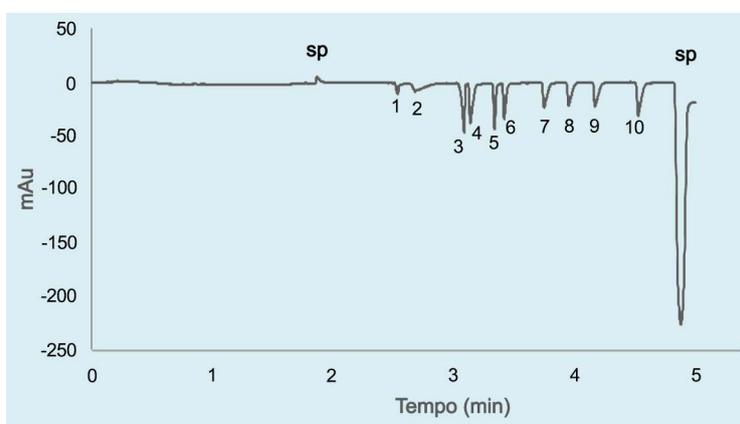


Figura 2. Eletroferograma de mistura de padrões de 10 AOBMM. Separação simultânea de 10 AO. Condições otimizadas: pH 3,45; tampão tris/ácido ftálico: 16 mmol L⁻¹; 19 mmol L⁻¹; CTAB: 0,8 mmol.L⁻¹; voltagem: -20 kV; temperatura: 25 °C; comprimento de onda: 230 nm; padrões dos ácidos (1 mmol L⁻¹ cada): oxálico (1), pirúvico (2), tartárico (3), cítrico (4), fórmico (5), málico (6), láctico (7), succínico (8), aspártico (9) e acético (10); Sp: pico do sistema

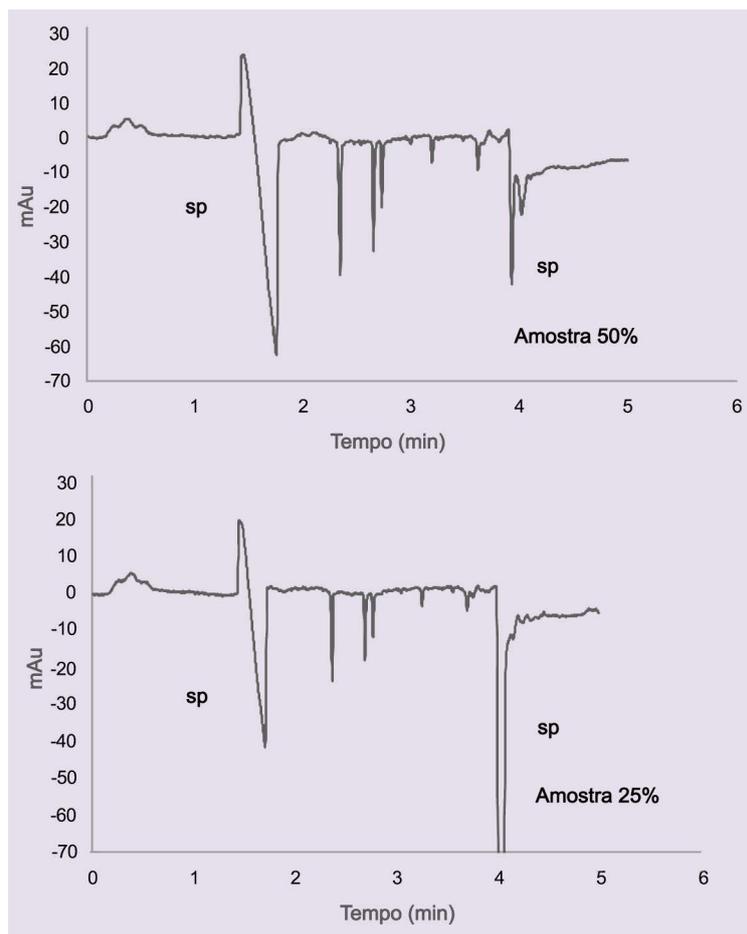


Figura 3. Eletroferograma das amostras nas concentrações de 25 % e 50 %. Sp: pico do sistema. Condições otimizadas: pH 3,45; tampão tris/ácido ftálico: 16 mmol L⁻¹;19 mmol L⁻¹; CTAB: 0,8 mmol.L⁻¹; voltagem: -20 kV; temperatura: 25 °C; comprimento de onda: 230 nm

apresentar uma linha base mais uniforme. Nas primeiras injeções, o ácido oxálico (Ox) foi utilizado como padrão interno (PI) na concentração de 1,0 mmol L⁻¹. No entanto, com o passar das análises verificou-se que ele reagia com a sílica no interior do capilar, sendo posteriormente substituído pelo ácido tartárico (T) para minimizar os erros instrumentais. Para a identificação dos AO, a amostra foi injetada pela primeira vez com o Ox (Figura 3A). Em seguida, a amostra foi fortificada com a adição de volumes fixos de alguns padrões de AO (tartárico - T, cítrico - C, málico - M e aspártico-A) a 1 mmol L⁻¹ (Figura 3B). Os resultados indicaram a presença dos ácidos cítrico, málico e aspártico (Figura 4), mas não a de ácido tartárico, demonstrando que o pico localizado aos 2,5 min não foi identificado como nenhum dos ácidos orgânicos estudados.

Após a identificação dos AO nas folhas de azevém anual, o método de extração proposto e

o método de determinação dos ácidos C e M por ECZ foram validados.

Os testes de Shapiro-Wilk e Cochran realizados em todas as curvas de calibração externa apresentaram uma distribuição normal e homocedástica dos dados. Na análise de variância (ANOVA) foram obtidos valores de F menores que o F crítico para a falta de ajuste, sugerindo que o modelo proposto é adequado para a análise. Para a significância da regressão, os valores obtidos de F calculado foram >> que F tabelado, indicando boa significância para o modelo utilizado. A linearidade do método foi avaliada pelo coeficiente de determinação (r^2) com valores aceitáveis que variaram entre 0,9960 – 0,9972 (Tabela 6).

A precisão do método ao ser avaliada, em termos de desvio padrão relativo (RSD; n = 3), resultou em valores abaixo de 2 %. Os limites de detecção (LD) (AC: 0,103 mmol L⁻¹; AM: 0,090 mmol L⁻¹) e

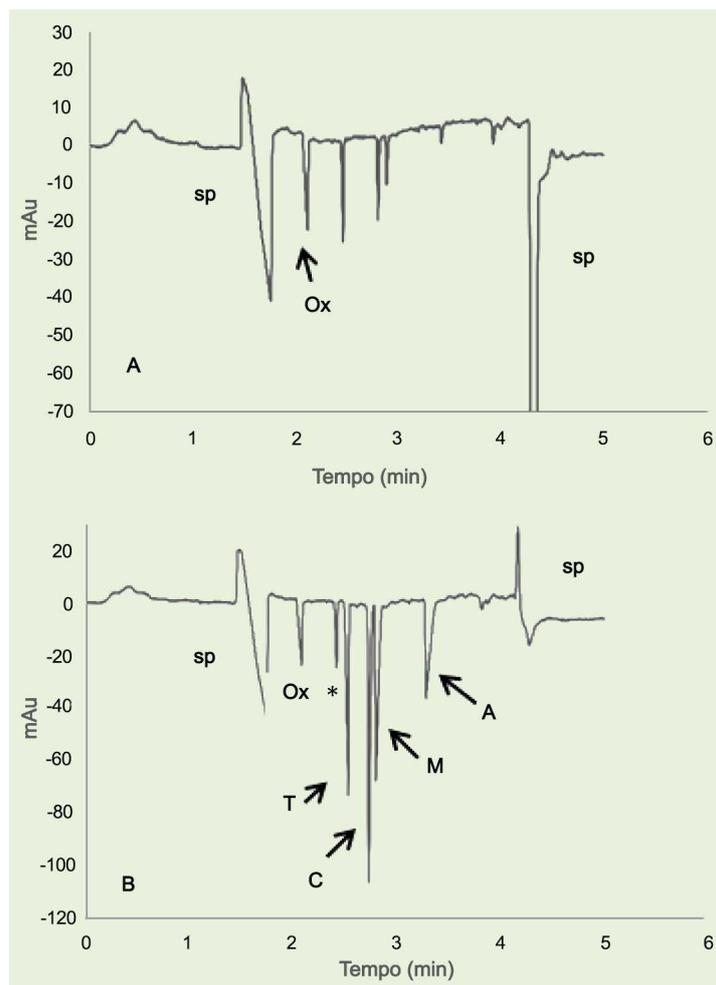


Figura 4. Eletroferograma A: amostra com Ox como PI inicial. Eletroferograma B: amostra com adição de volumes fixos dos ácidos T, C, M e A na concentração de 1 mmol L⁻¹. Os ácidos M, C e A foram identificados em folhas de azevém anual. *Pico desconhecido

Tabela 6. Parâmetros das curvas de calibração dos ácidos orgânicos de baixa massa molecular (AOBMM) para eletroforese capilar (EC). Valores (desvio padrão)

AOBMM	Parâmetros da curva analítica							
	^a m	^b a	^c R ²	^d R ² _{máx}	^e F _r	^f F _{faj}	^g F _{sig}	^h F _{tab}
Cítrico	0,8998 (0,0102)	0,0651 (0,0358)	0,9963	0,9963	0,8998	2,74	3552,5	3,71
Málico	0,9797 (0,0079)	0,0379 (0,0275)	0,9973	0,9974	0,9797	2,18	5040,51	3,71

^aCoefficiente angular da curva; ^bIntercepto; ^cCoefficiente de determinação; ^dCoefficiente de determinação máximo; ^eFator de resposta; ^fF falta de ajuste; ^gF Significância; ^hF tabelado

de quantificação (LQ) (AC: 0,317 mmol L⁻¹; AM: 0,284 mmol L⁻¹) foram determinados com base nos parâmetros das curvas analíticas. A quantificação dos AO foi determinada pelo cálculo da concentração em função do fator de resposta (F_r), utilizando o ácido tartárico como padrão interno, com valores de 0,514 ± 0,04 mmol L⁻¹ para o AC e 0,335 ± 0,11 mmol L⁻¹ para o AM. O teor de AOBMM expresso em mg g⁻¹

de amostra pesada foi de 1,966 ± 0,05 mg g⁻¹ para o AC e 0,957 ± 0,03 mg g⁻¹ para o AM.

Observou-se que a concentração dos ácidos está maior que os limites de detecção e quantificação do método, indicando a aplicabilidade da técnica de ECZ separação, identificação e quantificação de AO por ECZ. Os ensaios de adição e recuperação apresentaram valores de 97,8 e 105 % para o

AC e entre 95 e 102 % para o AM, indicando que não houve interferência de matriz nesses ácidos orgânicos. O método proposto apresentou linearidade, precisão e exatidão adequadas para a quantificação dos ácidos presentes nas folhas da forrageira em estudo.

Neste estudo, o método de extração proposto, utilizando apenas água deionizada e 15 min de autoclavagem, mostrou-se eficaz para a determinação de AO em folhas de azevém anual, contribuindo para a redução do uso de reagentes e tempo de extração em análises laboratoriais. A presença dos AO, bem como seu teor em folhas estão associados ao metabolismo da planta, podendo ser indicativos de maturidade de uma espécie ou de déficit ou excesso de um determinado nutriente.⁵²⁻⁵⁴ Uma variedade de trabalhos tem demonstrado que muitas espécies exsudam AO para aumentar a absorção de elementos tóxicos, tais como Cd e Cr, com papel importante na fitorremediação de solos contaminados.⁵³⁻⁵⁵ Em todas essas abordagens destacam-se os ácidos aspártico, cítrico, málico e oxálico. Por último, alguns AO, como os ácidos aspártico, málico e tartárico têm papel crucial no valor nutritivo de algumas espécies.⁵⁶⁻⁵⁸

No caso dos metais, o nível de complexação entre o AO é dependente da estrutura do ácido envolvido, do pH da rizosfera, da concentração do metal no sistema, além de outros fatores.¹⁰ Este nível de complexação pode ser avaliado teoricamente pela constante de estabilidade da reação com cada um dos metais, conforme Tabela 7, que demonstra alguns valores das constantes de AO com metais presentes no solo.⁵⁹

Alguns cátions metálicos podem interagir com o ácido cítrico em maior ou menor grau. Esta interação pode tornar viável a absorção dos

elementos e translocação para diferentes partes das plantas, tanto como forma de nutrição, proteção ou como característica da espécie possivelmente bioacumulativa. A presença do ácido cítrico como agente fortemente redutor auxilia na absorção do Fe. Segundo a literatura, o Fe³⁺ complexa com o ácido cítrico gerando moléculas de citrato de ferro (sal solúvel). Tais reações podem explicar a alta concentração de Fe nas folhas de azevém mesmo em um pH próximo ao neutro. O citrato age como agente quelante biológico para absorção de metais no sistema solo-planta, podendo agir como facilitador no transporte de íons divalentes como Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺.^{11,60}

A identificação de três AO, a saber, cítrico, málico e aspártico em folhas de azevém anual pode ser uma possível explicação da espécie ser capaz de acumular em sua estrutura teores mais elevados de metais do que as exigências nutricionais e inclusive de elementos tóxicos, como o Cr.⁵⁵⁻⁵⁷ Em termos de Kest, o Pb teoricamente deveria ter sido absorvido em maior quantidade pela planta, ao invés do Cr, que forma complexos estáveis apenas com o ácido acético e oxálico, que não foram identificados na espécie, conforme Tabela 10. Alguns autores citam a competição iônica em termos de absorção radicular e posterior translocação do metal na planta. É sugerido que o raio iônico (RI) efetivo do metal seja um parâmetro fundamental nessa competição, o que pode explicar a absorção do Cr cujo RI é menor nas duas formas (Cr³⁺ = 0,064; Cr⁶⁺ = 0,03-0,04) do que o Pb (Pb²⁺ = 0,132; Pb⁴⁺ = 0,084), o que explicaria a “preferência” da espécie, em uma mesma faixa de pH, de absorver um elemento em detrimento do outro.⁶¹

A condução do estudo em folhas de azevém anual revela-se meritória, visto que as mesmas

Tabela 7. Constantes de estabilidade de complexos formados por AOBMM e elementos potencialmente tóxicos*

AOBMM	Constante de estabilidade (log K _{est})				
	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn
Acético	1,93	1,25	2,22	2,68	1,57
Lático	1,70	-	3,02	2,78	2,22
Málico	2,40	-	3,40	2,75	2,00
Oxálico	3,89	3,85	6,23	4,91	4,87
Succínico	2,72	-	3,28	5,64	2,52
Tartárico	-	-	2,90	2,60	3,82

*Razão estequiométrica de 1:1:0 para metal, ligante e próton. Fonte: Martell (1992)

possuem elevado teor nutritivo, popularizando o uso da espécie na alimentação do gado, com nítida expansão no Brasil.⁶² Assim, as informações obtidas sobre os teores de AO da espécie são relevantes de imediato, tanto do ponto de vista químico, biológico quanto zootécnico. Ademais, contrastando com as funções bem definidas nas plantas C_4 , a relevância dos níveis abundantes de AO nas folhas das plantas C_3 e seus padrões de metabolismo continuam pouco compreendidos e estudados, notadamente pela ausência de associação desses processos com os eventos verificados na rizosfera.^{52,63}

4. Conclusões

Os dados encontrados demonstraram que o azevém anual possui um potencial de bioacumulação dos metais Zn, Cu, Fe e Cr, e que embora a espécie absorva altas concentrações dos metais, tais teores não afetam o desenvolvimento nos estágios iniciais. Embora não tenha sido possível determinar a concentração de Pb, faz-se necessário estudos a longo prazo para verificar se a taxa de absorção do analito sofre modificações ao longo do desenvolvimento da planta.

O método proposto de extração dos AO nas folhas demonstrou-se simples, rápido, uma vez que o preparo da amostra leva menor tempo (15 min de extração) em comparação com outros métodos que fazem sucessivas extrações e derivatizações (levando horas ou dias), além do menor consumo de reagentes, sendo eficaz na inserção de práticas laboratoriais para a determinação e quantificação de AO em amostras vegetais.

Não foi possível avaliar concentrações de metais e AO no sistema radicular e suas interações em virtude de baixa massa obtida.

A determinação de AO em espécies vegetais torna-se imprescindível no estudo de absorção de metais, principalmente em espécies bioacumulativas como o azevém anual. O estudo descrito no presente trabalho passa a disponibilizar uma ferramenta eficaz para futuras investigações visando elucidar a relação entre os níveis foliares de AOs em um dado estágio metabólico que pode ser especificado, e as reações às mudanças no ambiente externo verificadas ao nível de sistema radicular. Os desdobramentos positivos são ainda mais promissores para o estudo de plantas C_3 , em face da ausência de informações referentes a essa categoria.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Rede Mineira de Química (RQMG), Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao senhor Sebastião C. Evaristo pelo auxílio na condução dos experimentos. J.G.P.F gostaria de agradecer a CAPES pela bolsa de doutorado. M.A.L.O agradece ao CNPq pela bolsa de pesquisa.

Referências Bibliográficas

- ¹ Ignatowicz, K. The impact of sewage sludge treatment on the content of selected heavy metals and their fractions. *Environmental Research* **2017**, *156*, 19. [[CrossRef](#)]
- ² Guidi Nissim, W.; Cincinelli, A.; Martellini, T.; Alvisi L.; Palm E.; Mancuso S.; Azarello E. Phytoremediation of sewage sludge contaminated by trace elements and organic compounds. *Environmental Research* **2018**, *164*, 356. [[CrossRef](#)]
- ³ Li, W.W.; Qing Yu, H.; Rittmann. Chemistry: Reuse watter pollutants. *Nature* **2015**, *528*, 29. [[Link](#)]
- ⁴ Bonini, C. S. B.; Alves, C. M.; Montanari, R. Lodo de esgoto e adubação mineral em área degradada em recuperação utilizando lodo de esgoto a adubação mineral. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* **2015**, *19*, 388. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Wang, S.; Li, H.; Lin, C. Physiological, biochemical and growth responses of Italian ryegrass to butachlor exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2013**, *106*, 21. [[CrossRef](#)]
- ⁶ Hannaway, D.; S, Fransen.; J, Cropper.; M, Teel.; M, Chaney.; T, Griggs.; R, Halse.; J, Hart.; P, Cheeke.; D, Hansen.; R, Klinger.; W, Lane. Annual Ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.). *Oregon State University Catalog*, PNW **1999**, *1*, 501. [[Link](#)]
- ⁷ Ramos, A. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade do Estado de Santa Catarina, Brasil, 2017. [[Link](#)]
- ⁸ Sharma, B.; Sarkar, A.; Singh, P.; Singh, R.P. Agricultural utilization of biosolids: A review on potential effects on soil and plant grown. *Waste Management* **2017**, *64*, 117. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Pires, A.M.M.; Marchi, G.; Mattiazzo, M.E.; Guilherme, L.R.G. Organic acids in the rhizosphere and phytoavailability of sewage sludge-borne trace elements. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2007**, *42*, 917. [[Link](#)]

- ¹⁰ Pires, A.M.M., Matiazzo, M.E., Berton, R. S. Ácidos orgânicos como extratores de metais pesados fitodisponíveis em solos tratados com lodo de esgoto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **2004**, *39*, 671. [CrossRef]
- ¹¹ Osmolovskaya, N.; Dung, V.V.; Kuchaeva, L. The role of organic acids in heavy metal tolerance in plants. *Plant Science* **2018**, *63*, 9. [CrossRef]
- ¹² Vaz, F. A. S.; Passos, L.; Silva, P. A.; Heller, M. Otimização de Método por Eletroforese Capilar de zona para análise de ácidos orgânicos alifáticos em extrato de *Brachiaria brizantha*. *Phytochemical Analysis* **2012**, *23*, 569. [CrossRef]
- ¹³ Healy, M. G.; Ryan, P. C.; Fenton, O.; Peyton, D. Bioaccumulation of metals in ryegrass (*Lolium perenne* L.) following the application of lime stabilised, thermally dried and anaerobically digested sewage sludge. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2016**, *130*, 303. [CrossRef]
- ¹⁴ Silva, F. A. M.; Nogueira, F. D.; Ribeiro, L. L.; Godinho, A.; Guimarães, P. T. G. Exsudação de ácidos orgânicos em rizosfera de plantas daninhas. *Planta Daninha* **2001**, *19*, 193. [CrossRef]
- ¹⁵ Wang, L.; Fu, H.; Wang, W.; Wang, Y. Analysis of Reducing Sugars, Organic Acids and Minerals in 15 Cultivars of Jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) Fruits in China. *Journal of Food Composition and Analysis* **2018**, *73*, 10. [CrossRef]
- ¹⁶ Aquino, A.C.S.; Azevedo, M.S.; Ribeiro, D.H.; Costa, A.C.; Amante, E.R. Validation of HPLC and CE methods for determination of organic acids in sour cassava starch wastewater. *Food Chemistry* **2015**, *172*, 725. [CrossRef]
- ¹⁷ Wang, S.; Li, H.; Lin, C. Physiological, biochemical and growth responses of Italian ryegrass to butachlor exposure. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **2013**, *106*, 21. [CrossRef]
- ¹⁸ Mimura, A. M. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Juiz de Fora, Brasil, 2017. [Link]
- ¹⁹ Portal PJF. Prefeitura de Juiz de Fora. Disponível em: <https://pjf.mg.gov.br/cidade/caracteristicas_gerais.php>. Acesso em: 1 novembro 2018.
- ²⁰ Góes, M.A.; Luz, A.B.; Possa, M.V. Em *tratamento de Minérios.*, eds.; Luz, A.B.; Sampaio, J.A.; França, S.C., Cetem: Rio de Janeiro, **2010**, cap.2.
- ²¹ Hoening, M.; Kersabiec, A.M. Sample preparation steps for analyses for atomic spectroscopy methods: present status. *Spectrochimica Acta*, **2016**, *51*, 1297. [CrossRef]
- ²² Oliveira, M. R.; Antunes, A. C. N.; Vieira, M. A.; Medina, A. L. Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. *Microchemical Journal*, **2016**, *124*, 402. [CrossRef]
- ²³ Donagema, G. K.; Campos, D. V. B. de; Calderano, S. B.; Teixeira, W. G.; Viana, J. H. M.; *Manual de métodos de análise de solo*, 2a ed., Embrapa Solos: Rio de Janeiro, 2011.
- ²⁴ Passos, L. P.; Köpp, M. M.; Lédo, F. J. S. Performance of tetraploid alfalfa genotypes as exposed to aluminum toxicity. *Agricultural Sciences* **2012**, *3*, 230. [Link]
- ²⁵ Gonçalves Jr, A. C.; Yoshihara, M. M.; Carvalho, R. A.; Strey, L.; Moraes, A. J. Teores de nutrientes e metais pesados em plantas de estragão submetidas a diferentes fertilizações. *Revista Ciência Agrônômica* **2015**, *46*, 233. [CrossRef]
- ²⁶ Tyutyunnik, O. A.; Getsina, M. L.; Toropchenova, E. S.; Kubrakova, I. V. Microwave Preparation of Natural Samples to the Determination of Mercury and Other Toxic Elements by Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* **2013**, *68*, 377. [CrossRef]
- ²⁷ Lourdes A. M. F. O.; Mimura, A. M. S.; Souza, R. A.; Silva, J. C. J. Ultrasound-assisted Extraction of Cr, K, Na, Pb and Zn in NPK Fertilizers and Determination by FAAS and FAES. *Atomic Spectroscopy* **2016**, *37*, 120. [Link]
- ²⁸ Castro, R. J. C.; Sobrinho, F.; Gama, M. S da.; Barra, P. C.; Antoniassi, R.; Oliveira, M. A. Analysis of the main conjugated linoleic acid (CLA) precursors (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in *Brachiaria ruziziensis* by capillary zone electrophoresis. *Open Chemistry* **2013**, *11*, 1286. [CrossRef]
- ²⁹ Malavolta, E.; *Manual de nutrição mineral de plantas*, 1a ed, Agronômica Ceres: São Paulo, 2006.
- ³⁰ Vasconcellos, M. C.; Pagliuso, D.; Sotomaior, V. S. Fitorremediação: Uma proposta de descontaminação do solo. *Estudos de Biologia* **2012**, *34*, 261. [CrossRef]
- ³¹ Zaefarian, F.; Rezvani, M.; Rejali, F.; Ardakani, M. R.; Noormohammadi, G. Effect of Heavy Metals and Arbuscular Mycorrhizal Fungal on Growth and Nutrients (N, P, K, Zn, Cu and Fe) Accumulation of Alfalfa (*Medicago sativa* L.). *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science* **2011**, *11*, 346. [Link]
- ³² Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 420, 2009. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 12 maio 2018.
- ³³ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Decreto 4954, 2004. Disponível em: <<https://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2004/decreto-4954-14-janeiro-2004-497758-norma-pe.html>>. Acesso em: 23 junho 2018.

- ³⁴ Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução 375, 2006. Disponível em: < <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>>. Acesso em: 10 fevereiro 2014.]
- ³⁵ Fonseca, J. G. P.; Eiterer, L. P.; Otênio, M. H.; Passos, L. P.; Silva, J. C. J. Influência de parâmetros meteorológicos na concentração de metais pesados e agentes etiológicos em amostras de lodo de esgoto como ferramenta para seu uso na agricultura. *Periódico Tchê Química* **2020**, *17*, 147. [[Link](#)]
- ³⁶ Zhang, X.; Zhang, F.; Mao, D. Effect of iron plaque outside roots on nutrient uptake by rice (*Oryza sativa* L.): Phosphorus uptake. *Plant and Soil* **1999**, *209*, 187. [[Crossref](#)]
- ³⁷ Adamski, J. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Pelotas, Brasil, 2011. [[Link](#)]
- ³⁸ Santos, T. C.; Oliveira, M. S.; Alexandre, J. R.; Souza, S. B.; Eutrópio, F. J.; Ramos, A. C. Crescimento inicial de aroeira (*Schinusterebinthifolius* Raddi) e tomate transgênico AVP1OX (*Solanum lycopersicum* L.) sob diferentes níveis de ferro. *Natureza online* **2011**, *9*, 152. [[Link](#)]
- ³⁹ Jucoski, G. O.; Cambraia, J.; Ribeiro, C.; Oliveira, J. A. Excesso de ferro sobre o crescimento e a composição mineral em *Eugenia uniflora* L. *Revista Ciência Agronômica* **2016**, *47*, 720. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁰ Liu, H.-J.; Zhang, J.-L.; Zhang, F.-S. Role of iron plaque in Cd uptake by and translocation within rice (*Oryza sativa* L.) seedlings grown in solution culture. *Environmental and Experimental Botany* **2007**, *59*, 314. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Bataglia, O. C.; Mascarenhas, H. A. A. Toxicidade de ferro em soja. *Bragantia* **1981**, *40*, 199. [[CrossRef](#)]
- ⁴² Alexandre, J. R.; Oliveira, M. L. F.; Santos, T. C.; Canton, G. C.; Conceição, J. M.; Eutrópio, F. J.; Cruz, Z. M. A.; Dobbss, L. B.; Ramos, A. C. Zinco e Ferro: de micronutrientes a contaminantes do solo. *Natureza on line* **2012**, *10*. [[Link](#)]
- ⁴³ Mota, F. A. C.; Santana, G. P. Plantas e metais potencialmente tóxicos—estudos de fitorremediação no Brasil. *Scientia Amazonica* **2016**, *5*, 22. [[Link](#)]
- ⁴⁴ Moraes, P. P. F.; Horn, A. Teores dos metais pesados Cr, Cd e Zn em perfis de solos de veredas da bacia do Rio do Formoso, município de Buritizeiro, Minas Gerais. *Geonomos* **2010**, *18*, 78. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁵ Nava, I. A.; Junior, A. C. G.; Nacke, H.; Guerini, V. L.; Schwantes, D. Disponibilidade dos metais pesados tóxicos cádmio, chumbo e cromo no solo e tecido foliar da soja adubada com diferentes fontes de NPK+ZN. *Ciência Agrotécnica* **2011**, *35*, 884. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁶ Faquin, V.; *Nutrição Mineral de Plantas*, 1a ed, UFL: Lavras, 2005.
- ⁴⁷ Magro, C. D.; Deon, M. C.; Thomé, A.; Piccin, J. S.; Colla, L. M. Bioissorção passiva de Cromo (VI) através da microalga *Spirulina platensis*. *Química Nova* **2013**, *36*, 1139. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁸ Oliveira, D. Q. L.; Carvalho, K. T. G.; Bastos, A. R. R.; Oliveira, L. C. A.; Marques, J. J. G. S.; Nascimento, R. S. M. P. Utilização de resíduos da indústria de couro como fonte nitrogenada para o Capim-Elefante. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2008**, *32*, 417. [[CrossRef](#)]
- ⁴⁹ Gutierrez, A. M.; Silva, C. G. M.; Rezende, A. V.; Simão, E. P.; Martins, D. C.; Guimarães, E. P. O.; *Resumo do XXXI Congresso Nacional do Milho e Sorgo*, Bento Gonçalves, Brasil, 2016.
- ⁵⁰ Andrezza, R.; Camargo, F.A.O.; *Resumo do VII*, Porto Alegre, Brasil, 2011. [[Link](#)]
- ⁵¹ Alves, J. C.; Souza, P. A.; Porto, M. L.; Arruda, J. A.; Júnior, U. A. T.; Silva, G. B.; Araujo, R. C.; Santos, D. Absorção e distribuição de chumbo em plantas de vetiver, jureminha e algaroba. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **2008**, *32*, 1329. [[Link](#)]
- ⁵² Finkemmeier, I.; Konig, A.C.; Heard, W.; Nunes-Nesi, A.; Pham, P. A.; Leister, D.; Fernie, A. R.; Sweetlove, L. J. Transcriptomic analysis of the role of carboxylic acids in metabolite signaling in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **2013**, *162*, 239. [[CrossRef](#)]
- ⁵³ Dresler, S.; Hanaka, A.; Bednarek, W.; Maksymiec, W. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. *Acta Physiologiae Plantarum* **2014**, *36*, 1565. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁴ Chen, Z. C.; Liao, H. Organic acid anions: an effective defensive weapon for plants against aluminum toxicity and phosphorus deficiency in acidic soils. *Journal of Genetics and Genomics* **2016**, *43*, 631. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁵ Niu, Z. X.; Li, X. D.; Sun, L. N.; Sun, T. H. Changes of three organic acids in the process of Cd and Pb phytoextraction by *Helianthus annuus* L. *Plant, Soil and Environment* **2012**, *58*, 487. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁶ Azevedo, R. A.; Lancien, M.; Lea, P. J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. *Amino Acids* **2006**, *30*, 143. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁷ Centeno, D. C.; Osorio, S.; Nunes-Nesi, A.; Bertolo, A. L. F.; Carneiro, R. T.; Araújo, W. L.; Steinhauser, M. C.; Michalska, J.; Rohrmann, J.; Geigenberger, P.; Oliver, S. N.; Stitt, M.; Carrari, F.; Rose, J. K. C.; Fernie, A. R. Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *The Plant Cell* **2011**, *23*, 162. [[CrossRef](#)]

⁵⁸ DeBolt, S.; Cook, D. R.; Ford, C. M. L-Tartaric acid synthesis from vitamin C in higher plants. *Proceedings of the national Academy of Sciences USA* **2006**, *103*, 5608. [[CrossRef](#)]

⁵⁹ Martell, A., Motekaitis, R.J.; *Determination and use of stability constants*, Wiley – VCH: New York, 1992.

⁶⁰ Cheng, S.; Lin, Q.; Wang, Y.; Luo, H.; Huang, Z. The removal of Cu, Ni, and Zn in industrial soil by washing with EDTA-organic acids. *Arabian Journal of Chemistry* **2020**, *13*, 5160. [[CrossRef](#)]

⁶¹ Smithells, C. J.; *Metals Reference Book*, 5a ed., Butterworth-Heinemann: Oxônia, 1976. [[Link](#)]

⁶² Mittelman, A.; Montardo, D. P.; Castro, C. M.; Nunes, C. D. M.; Buchweitz, E. D.; Corrêa, B. O. Caracterização agronômica de populações locais de azevém na região sul do Brasil. *Ciência Rural* **2010**, *40*, 2527. [[Link](#)]

⁶³ Ruffner, H. P. Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review – part B. *Vitis* **1982**, *21*, 346. [[Link](#)]