

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO**

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM
PLANTAS CULTIVADAS EM SOLOS COM ACÚMULO
DE COBRE E ZINCO**

TESE DE DOUTORADO

Eduardo Giroto

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM
PLANTAS CULTIVADAS EM SOLOS COM ACÚMULO DE
COBRE E ZINCO**

por

Eduardo Girotto

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Processos Químicos e Ciclagem de Elementos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciência do Solo.**

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Ceretta

Santa Maria, RS, Brasil

2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

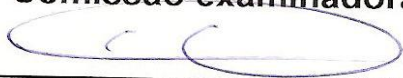
A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM PLANTAS
CULTIVADAS EM SOLOS COM ACÚMULO DE COBRE E ZINCO**

elaborada por
Eduardo Girotto

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciência do Solo

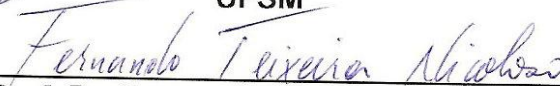
Comissão examinadora:



**Prof. Dr. Carlos Alberto Ceretta
(Presidente/Orientador) – UFSM**



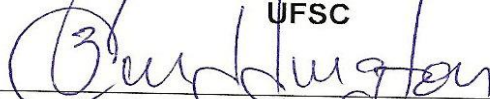
**Prof. Dr. Leandro Souza da Silva
UFSM**



**Prof. Dr. Fernando Teixeira Nicoloso
UFSM**



**Prof. Dr. Gustavo Brunetto
UFSC**



**Pesq. Dr. George Wellington Bastos de Melo
EMBRAPA - CNPUV**

Santa Maria, 26 de novembro de 2010.

DEDICO

Aos meus pais Fernando e Venilde, por terem me apoiado de forma incondicional em minhas escolhas.

OFEREÇO

À minha esposa Roberta com quem tenho dividido minhas apreensões e as minhas alegrias durante os últimos anos. Te amo! Sem você eu não conseguiria ter dado tantos passos importantes em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre guiando meu caminho.

Ao professor Carlos Alberto Ceretta, dizer apenas “obrigado” é realmente muito pouco para expressar toda a gratidão que tenho por você. Agradeço pela oportunidade que me foi confiada, pela amizade, pelos ensinamentos oferecidos e por toda a atenção dispensada. Um exemplo de dedicação, competência e caráter.

Aos meus pais Fernando e Venilde que são exemplos de honestidade e de dedicação a família, que me ensinaram, principalmente, a importância da construção e coerência de meus próprios valores. Obrigado pelo amor, pela compreensão e confiança em mim depositada.

Em especial a minha esposa Roberta pela compreensão, auxílio no desenvolvimento deste trabalho, pelo amor, carinho e incentivo constantes que foram fonte de energia para vencer desafios que pareciam intransponíveis. Te amo!

Ao meu irmão Adroaldo, minha cunhada Eliziane, minha sobrinha Letícia e minha irmã Fernanda pelo apoio e incentivo.

Aos meus sogros, Irineu e Jacinta e minha cunhada Raquel pelo apoio e incentivo.

Ao professor Gustavo Brunetto pela amizade, pelas sugestões, pelos conselhos, pelos constantes incentivos e pela colaboração fundamental na realização deste e outros trabalhos.

Ao professor Fernando Teixeira Nicoloso pela orientação, sabedoria, incentivo e paciência no desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Leandro Souza da Silva pela orientação e pela ajuda, contribuindo para a realização deste trabalho.

Aos doutorandos Alcione Miotto (alemão) e Cledimar Rogério Lourenzi pela ajuda na execução deste trabalho, pela amizade e principalmente pelos conhecimentos compartilhados.

À doutoranda Liana Rossato e a mestrandia Júlia Farias pela amizade, pela paciência e auxílio na execução das avaliações bioquímicas deste trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Gustavo Trentin, pela amizade e ajuda na execução deste trabalho.

Ao mestrando Felipe e aos bolsistas de iniciação científica Tadeu, Lessandro, Mateus, Dênis e Gláucia pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos colegas de pós-graduação pelas conversas e parceria.

Ao Luiz Francisco Finamor sempre bem humorado e disposto a ajudar quando solicitado.

Aos professores do Departamento de Solos Danilo Rheinhermer dos Santos, João Kaminski, Celso Aita, Sandro Giacomini, Rodrigo Jacques, Zaida Antonioli, Ricardo Dalmolin, Fabrício Araújo Pedron, Dalvan J. Reinert, José Miguel Reichert, Thomé Lovato e Flávio Eltz pelas conversas e pelo aprendizado durante o curso.

Aos colegas de laboratório, que além de colegas, demonstraram-se grandes amigos. Agradeço-os pelo convívio e conhecimento compartilhado ao longo desse período.

Ao Tarcísio, antigo secretário, e ao Héverton, atual secretário do curso de Pós-graduação, pela dedicação e pela competência com que realizam seu trabalho.

À Universidade Federal de Santa Maria pelo auxílio estudantil (Casa do estudante, RU), pela oportunidade da graduação, mestrado e do doutorado. Esse título é uma prova da importância, e meu desejo, de que sempre seja pública, gratuita e de qualidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

À Embrapa Uva e Vinho pela estrutura e por ter permitido a coleta de solos em seus vinhedos.

À Vinícola Almadén pela estrutura e por ter permitido a coleta de solo em seus vinhedos comerciais.

A todos os familiares e amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Seria maravilhoso não ter que encontrar dificuldades, no entanto da mesma forma que os exames estimulam os estudos de uma pessoa, sem as dificuldades não pode haver progresso ou desenvolvimento. Não agir pelo bem é o mesmo que corresponder ao mal. Não avançar é o mesmo que retroceder. Fugir perante a luta é o mesmo que abandonar a fé.”

Daisaku Ikeda

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria

ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM PLANTAS CULTIVADAS EM SOLOS COM ACÚMULO DE COBRE E ZINCO

Autor: Eduardo Girotto
Orientador: Carlos Alberto Ceretta
Data: Santa Maria, 26 de novembro de 2010.

A poluição do solo por metais pesados como cobre (Cu) e zinco (Zn) tem merecido atenção especial, porque pode representar riscos à qualidade do ambiente. No Brasil, especialmente, no estado do Rio Grande do Sul, a aplicação de altas doses de dejetos de suínos no solo, como fonte de nutrientes às plantas, e a aplicação continuada de fungicidas à base de Cu em vinhedos são duas atividades que preocupam pelo incremento das quantidades de frações de Cu e Zn no solo, principalmente em camadas superficiais, aumentando a biodisponibilidade destes metais, o que pode causar fitotoxicidade. O presente trabalho teve por objetivos: (a) inferir sobre a possibilidade de fitotoxicidade de Cu e Zn às plantas cultivadas em solos submetidos a aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos e em solos coletados sob vinhedos, com longo histórico com aplicações de fungicidas a base de Cu, da Serra e da Campanha Gaúcha; (b) avaliar a biodisponibilidade do Cu acumulado em solos coletados sob vinhedos da Serra e da Campanha Gaúcha. Para desenvolvimento deste trabalho foram realizados três estudos. No primeiro estudo foi realizado o cultivo de milho em casa de vegetação por um período de 25 dias após emergência das plantas, utilizando-se de amostras de solo deformadas e indeformadas coletadas da camada de 0 - 20 cm de profundidade, onde foram feitas 19 aplicações sucessivas de 0, 20, 40 e 80 m³ ha⁻¹ de dejetos líquidos de suínos, durante sete anos. O segundo estudo foi realizado com solos coletados sob vinhedos da Serra e da Campanha Gaúcha. Em março de 2009 foram coletadas amostras de solo nas camadas de 0 - 20 e de 0 - 5, 5 - 10, 10 - 15, 15 - 20, 20 - 25, 25 - 30, 30 - 40 cm de profundidade, em três vinhedos e mata nativa na Serra Gaúcha e, em dois vinhedos e em campo nativo, na Campanha Gaúcha. Os solos da camada 0 - 20 cm foram secos, moídos e, posteriormente, utilizados para o cultivo com aveia preta em casa de vegetação por um período de 40 dias após a emergência das plantas. Nos dois primeiros estudos foram avaliados parâmetros bioquímicos enzimáticos ligados ao estresse oxidativo na parte aérea das plantas de milho e aveia preta, tais como peroxidação lipídica, concentração de H₂O₂ e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX). Além disso, foram avaliados parâmetros não enzimáticos ligados ao estresse oxidativo na parte aérea das plantas de aveia preta e milho como concentração de ácido ascórbico e de grupos tióis não protéicos. O terceiro estudo foi realizado com solos de vinhedos, onde foi avaliada a biodisponibilidade de Cu nos solos. Foram determinados os teores totais de Cu, teores pseudo-totais (extração pelo método 3050B

da EPA), teores disponíveis (extração com HCl 0,1 mol L⁻¹ e EDTA), além do fracionamento químico do Cu através da extração sequencial. De forma geral, os parâmetros bioquímicos não foram alterados de forma intensa nas plantas de milho, indicando que o acúmulo de Cu e Zn no solo proporcionado pelas 19 aplicações de dejetos líquidos de suínos não causaram impacto negativo sobre as plantas. Por outro lado, os solos Cambissolo Húmico de vinhedos da Serra Gaúcha e os solos Argissolo Vermelho da região da Campanha, com longo histórico de aplicação de fungicidas cúpricos, apresentaram teores de Cu que causaram estresse oxidativo e o sistema antioxidante das plantas de aveia preta não foi suficientemente eficaz para reverter à condição de estresse, indicando que estes solos apresentam teores de cobre tóxicos para as plantas de aveia preta. Em adição, se observou que a concentração de Cu nas raízes da aveia preta pode ser utilizada como indicativo de biodisponibilidade de Cu no solo, mas não é indicador para avaliar fitotoxidez às plantas. Além disso, o cobre adicionado ao solo via aplicação foliar nas videiras acumulou, principalmente, nas camadas superficiais no solo e predominantemente em formas biodisponíveis, especialmente aquelas ligadas à fração mineral do solo.

Palavras-chaves: metais pesados, fitotoxidez, biodisponibilidade, *Vitis* sp, dejetos de suínos.

ABSTRACT

Doctor Science Thesis
Graduate Program in Soil Science
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ALTERATIONS IN PLANTS GROWN IN SOILS WITH ACCUMULATION OF COPPER AND ZINC

Author: Eduardo Girotto
Advisor: Carlos Alberto Ceretta
Date: Santa Maria, 11-26-2010

Soil pollution by heavy metals such as copper (Cu) and zinc (Zn) has deserved special attention as it may represent risks to the quality of the environment. In Brazil particularly in the state of Rio Grande do Sul, the application of high doses of pig slurry in soil as nutrient source to plants and the continued application of copper-based fungicides in vineyards are two activities that are alarming due to the addition of high amounts of Cu and Zn in the soil. For this reason continued application of copper-based fungicides and pig slurry along the years has caused great increment in Cu and Zn contents, mainly in the superficial layers, thus increasing bioavailability of these metals which can cause phytotoxicity to the plants. The objectives of this paper were to infer the possibility of phytotoxicity of Cu and Zn to plants grown in soils submitted to successive applications of pig slurry and in soils collected from vineyards with a long history of copper-based fungicide applications of the Serra Gaúcha and Campanha Gaúcha regions, as well as to evaluate bioavailability of accumulated Cu in soils collected from vineyards of the aforementioned regions. To develop this work was carried out three studies. In first study was grown corn until 25 days after plant emergence in a greenhouse using deformed and undeformed soil samples collected in 0 - 20 cm depth was setup where 19 successive pig slurry applications of 0, 20, 40 and 80 m³ ha⁻¹ were done for the period of seven years. A second study which composes this work was done with soils collected from vineyards of the Serra Gaúcha and Campanha Gaúcha regions. In March 2009, soil samples were collected in soil depths of 0 - 20 and 0 - 5, 5 - 10, 10 - 15, 15 - 20, 20 - 25, 25 - 30, 30 - 40 cm in three vineyards and native forest from the Serra Gaúcha region and in two vineyards and native land of the Campanha Gaúcha region. Soil samples of the 0 - 20 cm depth were dried, grounded and later used for the cultivation of black oat in a greenhouse for period of 40 days after plant emergence the plants. In both studies, enzymatic biochemical parameters linked to oxidative stress in the aerial part of corn and black oat plants such as lipid peroxidation, H₂O₂ concentration, superoxide dismutase enzyme (SOD) activity, catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were evaluated. Further, non-enzymatic parameters linked to oxidative stress in the aerial part of corn and black oat plants such as ascorbic acid and non-protein thiol group concentrations were also evaluated. The third study was conducted with vineyard soils, which assessed the bioavailability of Cu in soils. The total content of Cu, pseudo-total content (extraction using the EPA 3050B method), available

content (extraction with HCl 0.1 mol L⁻¹ and EDTA), as well the chemical fractionation of Cu through sequential extraction were determined. Overall, the biochemical parameters were not intensely altered in the corn plants, thus indicating that the 19 pig slurry applications did not cause excessive accumulation of copper and zinc in soil. On the other hand, Haplumbrept soil from vineyards of the Serra Gaúcha region and the Typic Hapludalf soil from the vineyards of the Campanha Gaúcha region with a long history of cupric fungicide application caused great oxidative stress and the antioxidant system of the black oat plants was not effective enough to reverse the stress condition, indicating that these soils present toxic levels of copper to the black oat plants. Lastly, it was observed that a high concentration of Cu in black oat roots may be an indicator of bioavailability of Cu in soil, but it is not an indicator to evaluate phytotoxicity to the plants. In addition, copper added to the soil via foliar application in grapevines accumulates mainly in the superficial layers of soil predominately in bioavailable forms, especially those linked to the mineral fraction of the soil.

Key Words: heavy metals, phytotoxicity, bioavailability, *Vitis* sp, pig manure.

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Cobre e zinco no dejetos líquido de suínos.....	17
2.2 Alterações causadas no solo devido ao uso de dejetos líquido de suínos.....	19
2.3 Acúmulo de Cu em solos de videiras	21
2.4 Interação entre cobre e o zinco e componentes do solo	22
2.5 Efeitos bioquímicos e fisiológicos do cobre e do zinco.....	24
2.6 Estresse oxidativo	27
2.7 Sistema antioxidante enzimático e não-enzimático das plantas.....	28
3. Hipóteses	31
4. Objetivos	31
5. Estratégia de Estudo	32
6. ARTIGO I - TRIGGERED ANTIOXIDANT DEFENSE MECHANISM IN MAIZE GROWN IN SOIL WITH ACCUMULATION OF Cu AND Zn DUE TO INTENSIVE APPLICATION OF PIG SLURRY	33
6.1 Abstract	33
6.2 Introduction.....	33
6.3 Material and methods.....	35
6.4 Results	41
6.5 Discussion	51
6.6 Conclusion.....	55
6.8 References	56
7. ARTIGO II - ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM AVEIA PRETA CULTIVADA EM SOLOS DE VINHEDOS CONTAMINADOS COM COBRE	61
7.1 Resumo	61
7.2 Abstract	62
7.3 Introdução	63
7.4 Material e Métodos.....	65
7.5 Resultados	73

7.6 Discussão.....	80
7.7 Conclusões.....	86
7.8 Referências	86
8 ARTIGO III - ACÚMULO E BIODISPONIBILIDADE DE COBRE EM SOLOS CULTIVADOS COM VIDEIRA NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL	92
8.1 Resumo.....	92
8.2 Abstract.....	93
8.3 Introdução	94
8.4 Material e Métodos.....	96
8.5 Resultados e Discussão.....	102
8.6 Conclusões.....	116
8.7 Referências	116
9 DISCUSSÃO GERAL	122
10 CONSIDERAÇÕES FINAIS	135
11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os metais pesados, como o cobre (Cu) e o zinco (Zn), estão presentes no ambiente, sendo constituintes naturais de rochas e sedimentos e, por isso, em condições naturais, a principal fonte destes elementos no solo é o material de origem. Entretanto, fontes antropogênicas, como dejetos de animais, biossólidos, fertilizantes e pesticidas, podem contribuir no aumento da concentração de metais no solo. Nos últimos anos, especialmente na década de 1990, a poluição do solo por esses elementos tem merecido atenção especial, porque pode representar riscos à qualidade do ambiente.

Dentre as atividades agropecuárias, a suinocultura se destaca na produção de resíduos. Os dejetos produzidos geralmente são utilizados como fertilizante em áreas agrícolas ou sobre pastagens, sendo estas algumas das principais alternativas para seu descarte. No Brasil, principalmente nos estados de Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), a utilização de dejetos de suínos é feita quase que exclusivamente pela sua acumulação em esterqueira e posterior disposição no solo, utilizando-o como fertilizante em áreas de lavoura. Entretanto, por mais privilegiado que seja seu potencial de uso como fertilizante, são considerados resíduos, que, ao serem dispostos na natureza, tornam-se potenciais poluentes. Isso porque os dejetos de suínos possuem na sua constituição altas concentrações de metais pesados como o Cu e o Zn (MATTIAS et al., 2010). Desta forma, a disposição de dejetos líquidos de suínos sucessivamente ao longo dos anos pode se tornar um problema, por causa do acúmulo excessivo destes elementos no solo, o que pode potencializar a toxidez às plantas e aos organismos do solo.

A viticultura é outra atividade agrícola que preocupa em relação à contaminação do solo com metais, entre eles o Cu. Isso porque diversos agroquímicos a base de Cu, além da calda bordalesa ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$), que é comumente utilizada para controle e prevenção de doenças fúngicas foliares, são utilizados no manejo das mais diversas patologias de videiras no mundo e também no Brasil. No Brasil, o RS possui a maior área cultivada com a videira do país. Nele, a Serra Gaúcha, região Nordeste do estado,

é a mais antiga região vitivinícola e possui a maior área cultivada com a videira. Porém, a partir da década de 1970 e de forma mais intensa na década de 2000, áreas de campo natural da região da Campanha do RS foram incorporadas ao sistema de produção de uvas viníferas. Nessas duas regiões, a videira anualmente é submetida às aplicações sucessivas de fungicidas e, especialmente, caldas à base de Cu, para o controle de doenças fúngicas, uma vez que, em geral, os vinhedos são localizados em áreas com clima úmido. A calda bordalesa, que é uma suspensão coloidal obtida pela mistura de sulfato de cobre, hidróxido de cálcio e água é muito usada para prevenir a incidência de míldio (*Plasmopara viticola*). O seu uso continuado adiciona ao solo grandes quantidades de Cu e outros metais, que, graças a sua alta afinidade com os sítios de ligação do solo, acumulam nas camadas superficiais do solo.

Em solos não contaminados, o Cu e o Zn são encontrados em maior quantidade ligados as frações orgânicas e inorgânicas, respectivamente, sendo retidos por ligações físicas e, principalmente, químicas com altos graus de energia. Conseqüentemente, a quantidade desses elementos-traço biodisponível e, especialmente, a concentração na solução do solo são muito baixas. Os elementos químicos adicionados ao solo pela atividade antrópica distribuem-se nas formas pré-existentes (RHEINHEIMER et al., 2003), mas com menor energia de adsorção ou em precipitados com maior solubilidade. Então, a especiação dos elementos-traço entre a fase sólida e a solução do solo é dependente da quantidade adicionada, da quantidade e tipo de adsorvente (matéria orgânica, minerais silicatados, óxidos de ferro e manganês e grupos fosfatos) e das condições geoquímicas da solução, em especial, da concentração de prótons e da força iônica (McBRIDE, 1994; ALLOWAY, 1995; KABATA-PENDIAS & PENDIAS, 2001).

Os metais pesados Cu e Zn são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas, pelo fato de serem constituintes de muitas enzimas, proteínas e catalisarem o fluxo de elétrons e as reações de oxidação-redução nas células vegetais. Contudo, em altas concentrações na solução do solo, esses elementos podem proporcionar algum tipo de estresse às plantas. Paralelamente e/ou consecutivamente, pode ocorrer manifestação de sintomas visíveis de toxidez, tal como inibição no crescimento das plantas, danos em raízes e cloroses em tecidos (YRUELA, 2005; PAVÍKOVÁ et al., 2007).

Os sintomas de toxidez causados pelo excesso de Cu e Zn são expressos devido a uma gama de interações a nível celular e molecular. O excesso de Cu e Zn pode causar a inibição na atividade enzimática ou alteração na sua estrutura, como também a substituição de elementos essenciais resultando na deficiência de outros nutrientes. Além disso, o excesso de Cu e Zn pode estimular a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o oxigênio singlete (1O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) que são considerados os principais agentes causadores da injúria nos tecidos depois da exposição das plantas aos metais pesados. As EROs possuem potencial para interagir de forma não específica com muitos componentes celulares, desencadeando reações peroxidativas, que causam danos significativos em membranas de macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos fotossintéticos, proteínas e ácidos nucleicos.

Em termos ambientais, uma das preocupações é determinar se áreas de vinhedos com longo período de cultivo e com sucessivas aplicações de dejetos de suínos apresentam teores fitotóxicos de Cu e Zn e quais são os efeitos sobre as plantas. Rotineiramente, a fração de metal que pode ser absorvido pelas plantas é estimada com uso de extratores químicos com diferentes princípios de ação. Contudo, tais extrações químicas dificilmente representam a disponibilidade em termos de fitotoxicidade em solos com diferentes características físico-químicas devido aos vários fatores que influenciam a aquisição ou assimilação de metais pelas plantas e, portanto, podem não estimar de forma satisfatória a biodisponibilidade de metais em solos com diferentes características físico-químicas.

O cultivo de plantas pode ser utilizado como indicativo do acúmulo excessivo e da biodisponibilidade de metais como o Cu e o Zn no solo. Esse tipo de ensaio é comum em trabalhos que avaliam o efeito tóxico de determinado elemento em solução nutritiva, quando se mantém constante a concentração de outros nutrientes. Contudo, ainda são escassos ensaios com plantas cultivadas diretamente no solo com aplicações de dejetos de suínos e com solos oriundos de vinhedos com sucessivas aplicações fungicidas à base de Cu. O cultivo de plantas e avaliação de enzimas relacionadas com a defesa da planta ao excesso de Cu e Zn nestes solos pode indicar o acúmulo excessivo de determinado metal no solo. Além disso, bioensaios podem auxiliar na

proposição de alternativas de remediação dos efeitos tóxicos de Cu e Zn, com base nos efeitos negativos destes metais sobre as plantas.

O presente trabalho teve por objetivos: (a) inferir sobre a possibilidade de fitotoxicidade de Cu e Zn às plantas cultivadas em solos submetidos a aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos e em solos coletados sob vinhedos, com longo histórico com aplicações de fungicidas a base de Cu, da Serra e da Campanha Gaúcha; (b) avaliar a biodisponibilidade do Cu acumulado em solos coletados sob vinhedos da Serra e da Campanha Gaúcha.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cobre e zinco no dejetos líquido de suínos

No Brasil e, principalmente, nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, a utilização dos dejetos de suínos é feita quase que exclusivamente pela sua acumulação em esterqueira com posterior descarte no solo, utilizando-o como fertilizante em áreas de lavoura. Entretanto, por mais privilegiado que seja seu potencial de uso como fertilizante, devem ser considerados como resíduo, ou esgoto poluente que, ao serem dispostos na natureza, sem os cuidados necessários, causam impactos ambientais negativos no solo e às águas superficiais e subsuperficiais (KONZEN, 2005). Devido às restrições topográficas e os altos custos de armazenagem e transporte (SEGANFREDO & GIROTTO, 2004), em muitas propriedades rurais os dejetos são aplicados continuamente nas mesmas áreas, em frequências e quantidades excessivas em relação à capacidade de absorção de nutrientes pelas plantas cultivadas (SEGANFREDO, 2000; BASSO, 2003; BERWANGER, 2006).

Ao contrário dos fertilizantes solúveis que podem ser formulados para condições específicas de cada tipo de solo e cultura, os dejetos apresentam, simultaneamente, nutrientes em quantidades desproporcionais em relação às requeridas pelas plantas (CQFS - RS/SC, 2004). Com isso, as adubações em excesso ou continuadas com

esses dejetos podem ocasionar impactos ambientais indesejáveis, destacando-se os desequilíbrios químicos e biológicos no solo, poluição das águas, perdas de produtividade, da qualidade dos produtos agropecuários e redução da diversidade de plantas e organismos do solo.

A disposição de dejetos líquidos de suínos sucessivamente ao longo dos anos nas mesmas áreas pode causar sérios problemas como contaminação de águas subsuperficiais e espelhos de águas superficiais com nitrato e fósforo (L'HERROUX et al., 1997; BASSO, 2003; CERETTA et al., 2005; BASSO et al., 2005; BERWANGER, 2006). Outro problema é a possibilidade de contaminação do solo e da água devido à alta concentração de metais pesados como Zn e Cu, que os dejetos líquidos de suínos possuem na sua composição (L'HERROUX et al., 1997; HSU & LO, 2000; GRÄBER et al., 2005; GIROTTO et al., 2010; MATTIAS et al., 2010).

A alta concentração de Cu e Zn nos dejetos de suínos tem origem nas rações que são fornecidas aos suínos que, geralmente sofrem suplementação com fontes de Cu e Zn em certo grau às vezes excedendo grandemente o requerimento fisiológico dos suínos (JONDREVILLE et al., 2003). A adição destes metais às rações fornecidas aos suínos se deve as muitas funções que são atribuídas a estes dois elementos no metabolismo dos suínos. Entretanto, as quantidades assimiladas são muito pequenas. Do total adicionado via ração, se estima que 72-80% do total de Cu ingerido é eliminado via dejeções dos suínos (BONAZZI et al., 1994). Para o zinco, a quantidade eliminada via dejetos pode ser ainda maior chegando a 92-96% do ingerido; por isso a preocupação dos técnicos na adição de fontes destes elementos em quantidades muitas vezes excessivas (BONAZZI et al., 1994).

As principais fontes de Cu e Zn fornecidas aos suínos são na forma de carbonato, cloreto, sulfato, óxido e proteinato, sendo a mais econômica a forma de óxido (ANDRIGUETTO, 1981). Nos últimos anos, fontes alternativas de Zn também têm sido propostas para o fornecimento às rações (MATTIAS, 2006), sendo que complexos Zn-metionina tem se mostrado mais eficientes na disponibilização de Zn aos suínos que os tradicionais óxidos e sulfatos (WEDEKIND, 1992).

Assim como as fontes de Cu e Zn podem ser variáveis nas rações, as características químicas dos dejetos também são muito variáveis, dependendo do tipo

de criação e alimentação dos suínos e do manejo dado aos dejetos. Contudo, a presença de Cu e Zn em alta concentração nos dejetos associado às aplicações sucessivas de dejetos causam acúmulos de Cu e Zn no solo, tornando os dejetos uma fonte poluidora com alto potencial de contaminação ambiental.

2.2 Alterações causadas no solo devido ao uso de dejetos líquidos de suínos

Sucessivas aplicações de dejetos líquidos de suínos podem levar a alterações em diversos atributos químicos do solo, como teor de nutrientes (fósforo, potássio, cálcio, magnésio) e matéria orgânica (MO), pH e capacidade de troca de cátions. Contudo, estas alterações são reflexos, principalmente, das características dos dejetos aplicados aos solos, da sucessão de cultura, do sistema de preparo do solo utilizados e principalmente das características físico-química do solo, aos quais os dejetos são adicionados. Em adição, alterações significativas são observadas de forma predominante em ensaios de longa duração, uma vez que os efeitos, em sua maioria, são cumulativos no solo e refletem uma condição natural, onde os produtores utilizam dejetos durante muitos anos nos mesmos locais (Lourenzi, 2010).

Entre os elementos aplicados via dejetos de suínos em grandes quantidades, o fósforo (P) é o principal nutriente que tende a ter elevados incrementos no solo. Em trabalho desenvolvido por Berwanger (2006), se observou que a aplicação acumulada de 460 e 960 m³ ha⁻¹, totalizando a aplicação de 310 e 628 kg de P ha⁻¹ em 4,5 anos, resultou no aumento de 13 mg kg⁻¹ (extraído por Mehlich-1), que era a dose inicial, para 71 e 140 mg kg⁻¹ na camada de 0 a 2,5 cm, respectivamente, significando aumentos de 446 e 976 %. O acúmulo de P no solo está relacionado com a quantidade de P adicionada ao solo através dos dejetos, do tipo de solo, transferências e as exportações das culturas (CERETTA et al., 2003). Assim, os incrementos de P no solo em áreas com aplicação de dejetos são variáveis. Hedley et al. (1982) encontrou incrementos de P em formas inorgânica e orgânica lábil acrescidos do moderadamente lábil de 844 % e 222 %, respectivamente na camada de 0-20 cm de profundidade, em solo com a

aplicação contínua de dejetos de bovinos em cultivos sucessivos de milho por 111 anos. Por sua vez, Ceretta et al. (2003), encontraram incrementos de 3.943 e 6.710 % no P do solo extraído por Mehlich-1 na camada de 0-10 cm de profundidade, aplicando doses acumuladas de 560 e 1120 m³ ha⁻¹ em um período de 48 meses.

Além do incremento na concentração de elementos como P e K no solo, Lourenzi (2010) também observou que aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos aumentaram o pH em água do solo, podendo o incremento atingir a profundidade de 8 cm com 19 aplicações de dejetos realizadas durante sete anos. Além disso, Lourenzi (2010) observou acúmulo de cálcio, magnésio e aumento nos teores de matéria orgânica do solo após 19 aplicações de dejetos líquidos de suínos. Por outro lado, em condições de pastagem, Durigon (2002) observou que o incremento nos teores de C orgânico e N total ocorreu apenas na camada 0 - 2,5 cm, em solo com 28 aplicações de dejetos líquidos de suínos, durante 4 anos. O fato de a aplicação de dejetos não resultar em incrementos nos teores de C orgânico e N total nas camadas mais profundas deve-se, provavelmente, à retirada dos resíduos da vegetação da superfície do solo a cada nova aplicação de dejetos, diminuindo o aporte de material orgânico ao solo.

As aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos no solo também ocasionam acúmulo de Cu e Zn em camadas superficiais do solo, como observado por Giroto et al. (2010), onde foram encontrados acúmulos significativos de Cu até a camada de 12 cm de profundidade e de Zn até a camada de 10 cm de profundidade, com aplicação de 20, 40 e 80 m³ ha⁻¹ de dejetos. O acréscimo nos teores de Cu e Zn é explicado em função das altas concentrações desses metais nos dejetos, que resultaram, após sete anos de aplicação de dejetos na adição de 16,0, 32,0 e 64,0 kg de Cu ha⁻¹ e 19,9, 39,8 e 79,6 kg de Zn ha⁻¹, respectivamente para as doses de 20, 40 e 80 m³ ha⁻¹ de dejetos. Resultados semelhantes foram observados por L'Herroux et al. (1997), que após cinco anos com aplicação de dejetos de suínos na região da Bretanha, no norte da França, encontraram aumentos nos teores de Cu e Zn no solo e movimentação destes no perfil do solo.

As alterações em atributos químicos do solo, como aumento no teor de MO e aumento dos valores de pH, aliados à adição de grandes quantidades de nutrientes como P e compostos orgânicos via dejetos, podem amenizar os efeitos fitotóxicos do acúmulo excessivos de Cu e Zn, em áreas com aplicações excessivas de dejetos de suínos. A

presença do fosfato pode aumentar a adsorção e, conseqüentemente, diminuir a mobilidade e biodisponibilidade de metais como Cu, Cd, Zn e Pb em solos. Na literatura, é relatado que o P é capaz de neutralizar parcial ou totalmente ou, até mesmo, reverter à carga positiva predominante na superfície de óxidos de Fe e de Al, em condições de solos ácidos (PÉREZ-NOVO et al., 2008). Isso porque, um ânion, quando adicionado ao solo antes do metal (M = Cd, Cu, Pb, etc), como, por exemplo, por meio de fertilização fosfatada antes da aplicação de fungicida cúprico, poderá ligar-se aos óxidos (S) de Fe ou Al presentes, alterar a carga líquida superficial de positiva para negativa e promover a formação de complexos envolvendo o grupo funcional de superfície, o fosfato adsorvido e o metal. Prováveis mecanismos para explicar o aumento da retenção e, ou, imobilização dos metais, na presença de P, incluem: (a) formação de fosfatos de metais precipitados (NRIAGU, 1984; CRANNELL et al., 2000); (b) aumento da carga líquida negativa da fase sólida do solo (McBRIDE, 1994).

2.3 Acúmulo de Cu em solos de videiras

O uso de fungicidas a base de Cu é realizado a mais de dois séculos, em tradicionais regiões produtoras de videiras no mundo. Assim, a maioria dos solos cultivados com videiras tende a apresentar contaminação por Cu devido a aplicações sucessivas de fungicidas a base deste elemento, como a calda bordalesa ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$), a fim de prevenir doenças fúngicas, especialmente o míldio (*Plasmopara viticola*). Devido à sua utilização em nível mundial e prolongada, concentrações muito acima das naturais de Cu, em camadas superficiais de solos sob vinhedos, têm sido relatadas em regiões produtoras tradicionais em diversos países (MAGALHÃES et al. 1985, em Portugal; TOSELI et al. 2009, na Itália; KOMÁREK et al. 2008, na República Tcheca; MICHAUD et al. 2007, na França; PIETRZAK e McPHAIL, 2004, na Austrália; FERNÁNDEZ-CALVIÑO et al. 2008, na Espanha; CASALI et al., 2008, no Brasil).

A constatação da presença de concentrações muito acima das naturais de Cu em solos sob vinhedos tem levado diversos pesquisadores a estudar a dinâmica do Cu

em vinhedos de tradicionais regiões vitivinícolas do mundo (BRUN et al., 1998; FERNÁNDEZ-CALVIÑO et al. 2008; KOMÁREK et al. 2008; TOSELI et al. 2009). Nestas, principalmente em países como a França e a Itália, os solos são calcários e apresentam alta fertilidade natural. Entretanto, no Brasil, especialmente na região Sul, estes estudos ainda são escassos e as videiras, em geral, são cultivadas em solos que apresentam baixa a média fertilidade natural e elevada acidez, o que dificulta a comparação e extrapolação dos resultados de outros países para as condições dos solos tradicionalmente utilizados no Brasil para o cultivo de videiras. Além disso, o clima mais úmido na região Sul do Brasil, do que as tradicionais regiões produtoras de videiras na Europa, leva a aplicações muito mais frequentes de fungicidas a base de Cu, para a prevenção de doenças fungicas.

A propagação de altas concentrações de Cu em solos sob vinhedos leva a uma questão ambiental grave devido à sua natureza não-biodegradável e o uso em longo prazo. Para avaliar os riscos ecotoxicológicos que os altos teores de Cu podem gerar, é necessário antes predizer a biodisponibilidade do Cu às plantas. Isso porque o Cu adicionado em solos de vinhedos é mantido principalmente nas camadas superiores do solo, devido à sua baixa mobilidade (KOMÁREK et al. 2008), e a sua acumulação pode afetar negativamente os microrganismos do solo em termos de número, atividade e diversidade (DÍAZ-RAVINA et al. 2007; MIGUÉNS et al., 2007), e, conseqüentemente, podem causar graves problemas agrícolas e ambientais.

2.4 Interação entre cobre e o zinco e componentes do solo

No solo, os metais pesados adicionados, seja através de fontes orgânicas como os dejetos ou minerais como os sulfatos da calda bordalesa, se redistribuem lentamente entre os diferentes componentes da fase sólida (HAN et al., 2001a). A redistribuição dos metais pesados no solo é caracterizada por uma rápida retenção e por reações subseqüentes lentas, sendo esse comportamento dependente da espécie do metal, das propriedades do solo, da quantidade e do tempo de adição do metal (HAN et al., 2001b). Como as reações químicas são temporais, algumas ocorrem em

segundos e outras em dias, enquanto outras reações muito mais lentas ocorrem em escala de tempo de meses e até anos (SPARKS, 1995). Assim, o fator tempo da adição do metal ao solo deve ser considerado na avaliação da toxidez de um determinado metal às plantas. Isso porque o efeito tóxico de uma determinada quantidade de metal adicionada ao solo em uma única aplicação pode ser diferente de quando se faz a adição desta mesma quantidade de metal ao longo dos anos, como acontece em solos sob aplicação de dejetos de suínos ou sob o cultivo de videiras.

O acúmulo de elementos químicos na fase sólida do solo ocorre de diferentes maneiras e com diversos níveis energéticos, os quais estabelecem maior ou menor reversibilidade de suas reações. Essas reações determinam a concentração do elemento que estará disponível na solução do solo aos sistemas biológicos e compreendem, basicamente, as reações de precipitação/dissolução, de adsorção/dessorção e de oxirredução (ALLEONI et al., 2005). As reações de oxirredução podem influenciar a disponibilidade de metais pesados nos solos. Contudo, tanto o Cu como o Zn não são afetados diretamente pelas condições de oxirredução ocorridas na maioria dos solos, embora o Cu^{2+} possa ser reduzido a Cu^+ . Em alguns casos, em situações de oxirredução, esses elementos são afetados indiretamente pelo aumento de pH do solo (ABREU et al., 2007).

A fim de avaliar os danos potenciais relacionados à acumulação de Cu em solos de vinhedos, o teor de Cu total tem sido amplamente estudado (BRUN et al., 1998; FERNÁNDEZ-CALVIÑO et al. 2008; KOMÁREK et al. 2008; TOSELI et al. 2009). No entanto, o conteúdo total de Cu não é um bom indicador de sua biodisponibilidade às plantas. Isso porque elementos metálicos como o Cu são retidos por ligações físicas e, principalmente, químicas com altos graus de energia. Conseqüentemente, a quantidade desses metais pesados biodisponíveis e, especialmente, a concentração na solução do solo são muito baixas. Os elementos químicos adicionados ao solo pela atividade antrópica distribuem-se nas formas pré-existentes (RHEINHEIMER et al., 2003), mas com menor energia de adsorção ou em precipitados com maior solubilidade. Então, a especiação dos metais pesados entre a fase sólida e a solução do solo é dependente da quantidade adicionada, da quantidade e tipo de adsorvente (MO minerais silicatados, óxidos de ferro e manganês e grupos fosfatos) e das condições

geoquímicas da solução, em especial, da concentração de prótons e força iônica (McBRIDE, 1994; ALLOWAY, 1995). Desta forma, a concentração total de metais pesados no solo é um indicador limitado em termos de disponibilidade (TESSIER et al., 1979; FENG et al., 2005; ALVAREZ et al., 2006). Vários são os tipos de procedimentos laboratoriais para estimar a disponibilidade dos metais pesados aos organismos vivos e/ou à mobilidade no perfil do solo. Assim, a distribuição de Cu entre os componentes do solo irá influenciar fortemente a mobilidade e, portanto, a biodisponibilidade de Cu. A avaliação da biodisponibilidade do metal no solo utilizando extrações químicas é uma abordagem convencional utilizada em testes de solo (TESSIER et al., 1979; RIBOLZI et al., 2002).

Os mais usados são as extrações com produtos químicos de forma isolada ou sequencialmente. Os valores de concentração de metais pesados extraídos por qualquer que seja o extrator usado devem ser calibrados com a absorção pelas plantas ou um organismo vivo (biodisponibilidade) ou validados com a transferência dentro do perfil (mobilidade). A calibração com a absorção pelas plantas, embora oneroso, é bastante usado nos sistemas de recomendação de fertilizantes e corretivos. No entanto, a relação entre concentração do metal pesado extraído e a sua toxicidade a um organismo alvo ou a sua mobilidade no perfil do solo é muito mais difícil de estabelecer e, conseqüentemente, escassa na literatura. Mesmo assim, a estimativa das formas de metais biodisponíveis é também usada para estudos de toxidez às plantas e de contaminação de animais ou águas (L'HERROUX et al., 1997; CHOPIN & ALLOWAY, 2007).

2.5 Efeitos bioquímicos e fisiológicos do cobre e do zinco

Os elementos Cu e Zn são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal das plantas. O Cu está envolvido em muitos processos fisiológicos e bioquímicos nas plantas, devido a sua capacidade de apresentar múltiplos estados de oxidação *in vivo*. Sobre condições fisiológicas, o Cu pode existir como Cu^{2+} e Cu^+

(YRUELA, 2005). O Cu pode atuar como elemento estrutural em proteínas regulatórias e participa no metabolismo da parede celular e sinalização hormonal (Raven et al., 1999). Íons de Cu também atuam como cofatores em muitas enzimas tal como Cu/Zn superóxido dismutase (SOD), citocromo oxidase, amino oxidase, plastocianinas e polifenol oxidase (YRUELA, 2005). As propriedades redox conferem ao Cu o caráter de essencialidade e também contribuem para sua inerente toxidez (YRUELA, 2005).

Os sintomas de toxidez do Cu podem variar entre as espécies vegetais. Contudo, geralmente se observa redução no crescimento das raízes em plantas cultivadas em solos com alto teor de formas disponíveis de cobre. Entre os sintomas, em geral são citados ramificações anormais, espessamento, coloração escura e redução do alongamento (MARSHNER, 1995; SHELDON & MENZIES, 2005; KOPPITKE & MENZIES, 2006; PAVÍKOVÁ et al., 2007). Na parte aérea normalmente se observa redução na biomassa e sintomas de clorose (BERNAL et al., 2006). Além disso, o excesso de Cu induz a redução da concentração de Fe na parte aérea, com consequente clorose internerval, como observado por Michaud et al. (2008) em ensaios com o cultivo de trigo. Sintomas semelhantes foram observados por McBride (2001) na cultura do milho. O excesso de Cu na parte aérea das plantas afeta importantes processos, como por exemplo, o transporte elétrons na fotossíntese (YRUELA, 2005). Além disso, o excesso de Cu pode reduzir o conteúdo de clorofila e causar alterações na estrutura dos cloroplastos e na composição das membranas dos tilacóides (PÄTSIKKÄ et al., 1998; QUARTACCI et al., 2000).

Os sintomas de toxidez causados pelo excesso de Cu são expressos devido a uma gama de interações em nível celular e molecular (KABAŁA et al., 2008). A toxidez também pode ser resultado da forte interação do Cu com os grupamentos sulfidrílicos de enzimas e proteínas no apoplasto das células de raiz, causando uma inibição na atividade ou alteração na sua estrutura, como também a substituição de elementos essenciais resultando na deficiência de outros nutrientes (YRUELA, 2005; KABAŁA et al., 2008). Além disso, o excesso de metais pesados pode estimular a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SCHÜTZENDUBEL & Polle, 2002; ARTETXE et al., 2002).

Altas concentrações de Cu também podem causar efeitos sobre o metabolismo do nitrogênio. De acordo com Liorens et al. (2000), altos teores de Cu reduzem drasticamente a atividade das enzimas de fixação e assimilação de nitrogênio (nitrato e nitrito redutases, glutamina sintase e glutamato sintase), principalmente nas raízes, reduzindo os níveis de nitrogênio total, nitrato e aminoácidos livres (especialmente glutamina e glutamato) em toda a planta. Desta forma, o excesso de Cu alteraria principalmente a capacidade de assimilar nitrogênio na forma de nitrato.

O Zn, assim como o Cu, é um elemento essencial às plantas, sendo absorvido na forma de Zn^{2+} da solução do solo. O Zn participa de vários processos metabólicos nas plantas, tais como, ativação enzimática, síntese de proteínas e metabolismo de carboidratos, lipídeos e ácidos nucléicos (BROADLEY et al., 2007). Além disso, o Zn faz parte dos fatores que controlam a multiplicação e diferenciação celular (LIN et al., 2005). Entretanto, altas concentrações de Zn no solo podem causar inibição no crescimento vegetal, danos em raízes, cloroses, e redução na taxa fotossintética e o conteúdo de clorofila nas folhas (LIN et al., 2005, BROADLEY et al., 2007, PAVLÍKOVA et al., 2008). Além disso, altas concentrações de Zn em plantas inibem o aparato fotossintético, e atividade de várias enzimas tais como a Rubisco (Pavlíkova et al., 2008). A redução na taxa fotossintética ocorre devido a inibição do fotossistema II, como observado por Quartacci et al. (2000).

O excesso de metais pesados, entre eles Cu e o Zn, induzem à formação de EROs (MALLICK, 2004), que causam danos em moléculas orgânicas (CHAOUI et al., 1997). Embora, o Zn não apresente reações de oxirredução, sua presença gera estresse oxidativo através de mecanismos ainda não claramente compreendidos (ARTETXE et al., 2002). Altas concentrações de Zn podem causar inibição enzimática (CUYPERS et al., 2001). Entretanto o Zn também pode incrementar significativamente a atividade de outras enzimas, entre as quais são citadas a superóxido dismutase (SOD), peroxidases e catalase (CAT), que seria um mecanismo de defesa contra processos de estresse oxidativo (CUYPERS et al., 2001). Por outro lado, autores como Weckx & Clijsters (1997) reportam que concentrações tóxicas de Zn estimulam a atividade de lipoxigenase e, conseqüentemente, a indução da peroxidação lipídica.

2.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo corresponde a um estado em que há uma elevada produção de EROs, onde os mecanismos celulares pró-oxidativos superam os antioxidantes. Sob condições de “não estresse”, o sistema de defesa antioxidante fornece proteção adequada contra as EROs. Contudo, situações de estresse de origem natural ou antrópica podem provocar o aumento da produção de EROs.

A terminologia EROs inclui as espécies chamadas de radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade (MARRONI, 2002). A geração de EROs, tais como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o oxigênio singlete (1O_2), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH\cdot$) tem demonstrado serem agentes causadores da injúria nos tecidos depois da exposição das plantas aos metais pesados, tal como Cu (YRUELA, 2005) e Zn (MADHAVA RAO and SRESTY, 2000; WANG et al., 2009).

Um dos principais representantes de EROs é o anion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é produzido através de uma redução monoelétrica do oxigênio. Nas células, o $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente convertido à H_2O_2 através de sua dismutação espontânea ou enzimática pela SOD (ALSCHER et al., 2002; FATIMA & AHMAD, 2004). O H_2O_2 é menos reativo que o $O_2^{\cdot-}$, porém na presença de metais como Ferro (Fe^{2+}) ou o Cu^{2+} , ele pode gerar o radical $OH\cdot$ (MITHÖFER et al., 2004). O $OH\cdot$ é provavelmente um dos radicais mais reativos dentre as EROs. A geração do radical $OH\cdot$ é o principal mecanismo de toxicidade do Cu que envolve a reação de Fenton catalisada pela presença do metal, e que se caracteriza pela produção de radicais $OH\cdot$ a partir do $O_2^{\cdot-}$, e H_2O_2 , na presença de íons Cu livres na célula (BRIAT & LEBRUN, 1999).

As EROs possuem potencial para interagir de forma não específica com muitos componentes celulares, desencadeando reações peroxidativas e causando dano significativo às membranas e a outras macromoléculas essenciais, tais como os pigmentos fotossintéticos, as proteínas, os ácidos nucleicos e os lipídios (FOYER et al., 1994) (Figura 1). Com o rompimento das membranas, ocorre a perda de fluidos e do

gradiente osmótico nas células e em organelas, como os cloroplastos, o que pode paralisar o metabolismo (LIN et al., 2005).

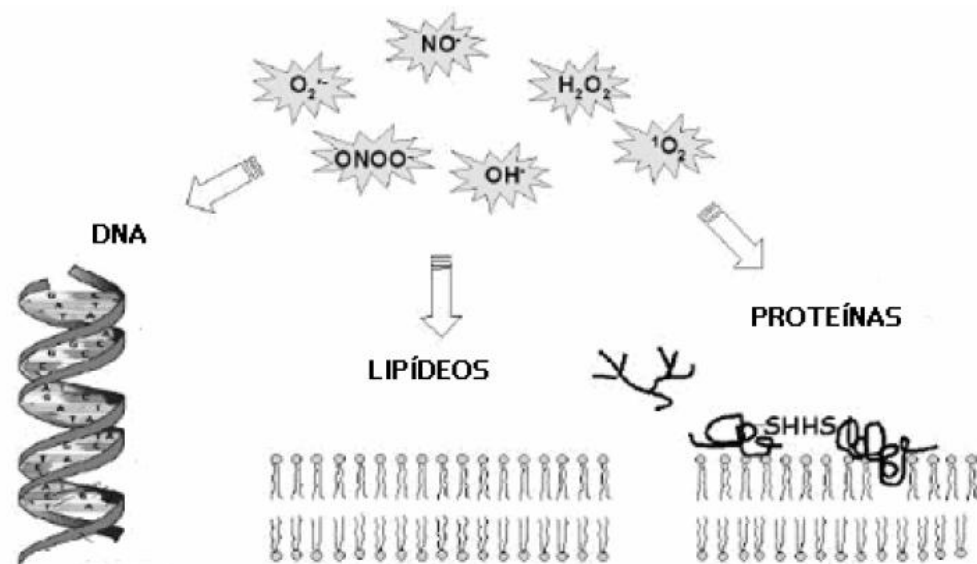


Figura 1. Dano oxidativo às macromoléculas biológicas. (Adaptado de TORRES, 2003).

Além disso, a alta afinidade de ligação de metais como o Cu e o Zn aos compostos contendo enxofre, nitrogênio e grupos funcionais contendo oxigênio, nas moléculas biológicas, podem induzir à inativação e ao dano dessas moléculas (NELSON, 1999; CLEMENS, 2001).

2.7 Sistema antioxidante enzimático e não-enzimático das plantas

As respostas bioquímicas e fisiológicas de plantas superiores às doses tóxicas de metais pesados são complexas e diversas estratégias de defesa têm sido sugeridas. Estas incluem complexação de íons metálicos, reduzido efluxo de metais e a produção

de antioxidantes em resposta a concentrações tóxicas de metais (VAN ASSCHE & CLISTERS, 1990; RADOTIC et al., 2000; SCHÜTZENDÜBEL & POLLE, 2002).

Para o combate dos efeitos negativos iniciado pelas EROs, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa antioxidante incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas envolvidas na defesa de plantas contra as EROs incluem a SOD a CAT, e a ascorbato peroxidase (APX) (DAT et al., 2000; MITTLER, 2002; FATIMA e AHMAD, 2004).

A SOD catalisa a conversão de $O_2^{\cdot-}$, gerado através de diferentes processos do metabolismo celular, tais como o transporte de elétrons na mitocôndria e cloroplastos, à H_2O_2 . O Zn se encontra associado com o Cu na isoenzima superóxido dismutase dependente de Cu e Zn (Cu/Zn SOD). A redução na atividade da SOD ocorre com um aumento simultâneo da acumulação de $O_2^{\cdot-}$. O radical $O_2^{\cdot-}$ é um dos principais oxidantes responsáveis pela peroxidação de lipídios e conseqüente aumento na permeabilidade das membranas (APEL & HIRT, 2004).

A CAT, por sua vez, é encontrada nos peroxissomos/glioxissomos, sendo responsável pela remoção do H_2O_2 gerado em diferentes processos nas plantas. É uma das enzimas chave envolvida na remoção de peróxidos tóxicos nas células quando estes estão em concentrações altas, pois apresenta baixa afinidade pelo H_2O_2 (MITTLER, 2002). A CAT decompõe H_2O_2 em água e oxigênio molecular (MITTLER, 2002). A APX, outra importante enzima do sistema de defesa antioxidante, primariamente localizada em cloroplastos e no citosol, reduz o H_2O_2 (quando em baixas concentrações na célula) até água usando ascorbato como doador de elétrons, resultando na formação de dehidroascorbato. Este é reciclado a ascorbato usando a GSH como doadora de elétrons e a glutatona oxidada (GSSG) é convertida pela enzima glutatona redutase, dependente de NADPH (ASADA & TAKAHASHI, 1987).

O balanço entre as atividades da SOD, CAT e APX é crucial para determinar o estado estável do radical $O_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 nas células, sendo que a SOD agiria como primeira linha de defesa convertendo o $O_2^{\cdot-}$ a H_2O_2 . Por outro, lado APX e a CAT então detoxificam o H_2O_2 .

Além do sistema de defesa antioxidante enzimático, as defesas antioxidantes não-enzimáticas são de fundamental importância às células. Os antioxidantes não

enzimáticos incluem, entre outros, o ácido ascórbico, a glutatona e os carotenóides. O ácido L-ascórbico, encontrado em altas concentrações nos cloroplastos e outros compartimentos, desempenha importante papel na tolerância das plantas ao estresse como um componente do sistema antioxidante (NOCTOR & FOYER, 1998). Está envolvido na regulação da fotossíntese, na expansão celular, no alongamento das raízes e no transporte de elétrons transmembrana (NOCTOR & FOYER, 1998; SMIRNOFF, 2000). Também está associado com a remoção do H_2O_2 via ascorbato peroxidase (SAIRAM et al., 1998), além de reagir com radicais $O_2^{\cdot-}$ e radicais OH^{\cdot} (REDDY et al., 2004).

Os grupos tióis não protéicos, entre estes a glutatona (GSH), são conhecidos por possuírem um papel central nos mecanismos de resposta aos metais pesados em plantas terrestres (RAUSER, 1999). A GSH reduz diretamente a maioria das espécies reativas de oxigênio, enquanto que a enzima glutatona redutase (GR) usa NADPH para reduzir GSSG a GSH (GRANT et al., 1997). Estudos mostram que níveis elevados de GSH celular estão associados à tolerância a metais pesados em plantas (CHEN & GOLDSBROUGH, 1994) e a exposição aos metais pesados leva a uma síntese acelerada de GSH em raízes e em culturas de células (SCHNEIDER & BERMANN, 1995). Além disso, a GSH é precursor das fitoquelatinas que complexam metais pesados em plantas (ROSEN, 2002).

Os carotenóides também possuem um papel importante na proteção do pigmento clorofila sob condições de estresse e são conhecidos por manter as reações fotodinâmicas, protegendo a clorofila da peroxidação lipídica e impedindo o colapso da membrana dos cloroplastos (KNOX & DODGE, 1985).

3. Hipóteses

Aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos e consecutivas aplicações de fungicidas à base de cobre ao longo dos anos aumentam os teores e a biodisponibilidade de cobre e zinco no solo. Isso causa fitotoxidez às plantas identificada através de alterações fisiológicas e bioquímicas, que servem como indicativo do acúmulo excessivo de cobre e zinco nos solos.

Na região da Campanha Gaúcha, onde predominam solos com textura arenosa e com baixos teores de matéria orgânica, existe maior probabilidade de ocorrer toxidez de Cu às plantas de aveia preta cultivada em solos oriundos de vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas a base de Cu, quando comparado aos solos de textura argilosa com médio a alto teor de matéria orgânica dos solos da Serra Gaúcha.

4. Objetivos

Inferir sobre a possibilidade de fitotoxidez de cobre e zinco às plantas cultivadas em solos submetidos a aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos e em solos coletados sob vinhedos, com longo histórico com aplicações de fungicidas à base de cobre, na Serra e na Campanha Gaúcha;

Avaliar a biodisponibilidade do cobre acumulado em solos coletados sob vinhedos da Serra e da Campanha Gaúcha.

5. Estratégia de Estudo

Procurando responder às hipóteses e atender aos objetivos propostos para este trabalho de tese, foi adotada como estratégia a divisão do trabalho de tese em dois estudos, que serão apresentados na sequência.

O primeiro estudo foi realizado com solo oriundo de um experimento com aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos, que era localizado na área experimental do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Durante a condução deste experimento, entre os anos de 2000 e 2008, foram realizadas 19 aplicações de dejetos. Os resultados obtidos neste estudo são apresentados no Artigo I:

- ARTIGO I - “TRIGGERED ANTIOXIDANT DEFENSE MECHANISM IN MAIZE GROWN IN SOIL WITH ACCUMULATION OF Cu AND Zn DUE TO INTENSIVE APPLICATION OF PIG SLURRY”

O segundo estudo foi realizado com solos provenientes de vinhedos localizados nas regiões fisiográficas da Serra e da Campanha Gaúcha do estado do Rio Grande do Sul. Estes vinhedos foram anualmente submetidos à aplicação de fungicidas a base de cobre para o controle de doenças fúngicas.

Os resultados obtidos neste estudo são apresentados nos Artigo II e Artigo III:

- ARTIGO II – “ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM AVEIA PRETA CULTIVADA EM SOLOS DE VINHEDOS CONTAMINADOS COM COBRE”

- ARTIGO III – “ACÚMULO E BIODISPONIBILIDADE DE COBRE EM SOLOS CULTIVADOS COM VIDEIRA NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL”

6. ARTIGO I- TRIGGERED ANTIOXIDANT DEFENSE MECHANISM IN MAIZE GROWN IN SOIL WITH ACCUMULATION OF Cu AND Zn DUE TO INTENSIVE APPLICATION OF PIG SLURRY

6.1 Abstract

Environmental safety of agricultural utilization of pig slurry from intensive farming is attracting great attention once the manures often contain high concentrations of Cu and Zn. The objective of the present study was to evaluate the possible changes in growth parameters and in the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of maize (*Zea mays*) plants grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to 19 applications of pig slurry during 7 years. Plant of maize were grown in undisturbed and disturbed soil samples with applications of 0, 20, 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry. At 15 and 25 days after plant emergence, plant samples were harvested and growth, chemical and biochemical parameters were determined. The results demonstrated that leaf Cu concentration increased with increasing pig slurry levels in both undisturbed and disturbed soils. Conversely, leaf Zn concentration either increased in undisturbed soil or decreased in disturbed soil upon addition of pig slurry. The high accumulation of Cu, mainly in disturbed soil samples, due to the application of 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry increased tissue lipid peroxidation, whereas it decreased SOD activity, and concentration of AsA and NPSH, when compared to the PK treatment. In conclusion, maize plants grown in undisturbed and disturbed soils with high concentrations of Cu and Zn did not present acute toxicity. However, the increased Cu concentration in the tissues suggests that successive application of pig slurry may also cause environmental damage.

Key words: manures, heavy metals, toxicity, oxidative stress, *Zea mays*.

6.2 Introduction

The intensive pig production generates a large volume of pig slurry that is disposed on agricultural land, whatever has now become a major environmental problem in countries with high densities of intensive pig farms, such as France (L'Herroux et al., 1997), the Netherlands (Esselink et al., 1995), Denmark (Bak et al., 1997), USA (Novak et al., 2004) and recently in Southern Brazil, especially in the States of Rio Grande do Sul (RS) and Santa Catarina (SC) (Giroto et al., 2010; Mattias et al., 2010). The application of pig slurry (PS) has recently raised serious environmental concerns due to the presence of Cu(II) and Zn(II) ions used abundantly as pig feed additives, which may reach excessive amounts in PS-amended soils, endangering soil and water quality (Diez et al., 2001; Berenguer et al., 2008). As a result, it is expected over the years, that the excessive accumulation of these metals in soil can produce phytotoxic effects leading to reduced yields of sensitive crops (L'Herroux et al., 1997).

At the cellular level in plants, Cu is a structural and catalytic component of many proteins and enzymes involved in a variety of metabolic pathways (Pilon et al., 2006). Cu participates in many physiological processes because it is able to exist in multiple oxidation states *in vivo* (Yruela, 2005). However, the redox properties that make Cu an essential element also contribute to its inherent toxicity. Redox cycling between Cu^{2+} and Cu^+ catalyzes production of hydroxyl radicals from superoxide and hydrogen peroxide by the reaction known as Fenton reaction and thus enhances the production of reactive oxygen species (ROS) (Elstner et al., 1988; Briat and Lebrun, 1999). Therefore, Cu has the capacity to initiate oxidative damage in plant tissues and then interfere with important cellular processes such membrane permeability, chromatin structure, protein synthesis, enzyme activities, photosynthesis and respiratory processes, causing a strong inhibition of plant growth (Yruela, 2005; Gratão et al., 2005).

On the other hand, Zn is a non redox-metal and is not able to generate ROS directly through Fenton reaction, but can generate oxidative stress by interfering with the antioxidant defense system of plants (Gratão et al., 2005). Zn toxicity can reduce rooting capacity, decrease chlorophyll content and even cause leaf chlorosis (Castiglione et al., 2007), which contributes to the growth inhibition. Furthermore, Zn toxicity may cause negative effects on membrane permeability, electron transport chain

(De Magalhães et al., 2004), and uptake and translocation of nutrients (Jiang and Wang, 2008; Wang et al., 2009). Hence, the excessive uptake of Cu and Zn by plants can cause oxidative stress due to an imbalance between the antioxidant responses and increased ROS production.

Plants possess several potential cellular mechanisms that may be involved in the detoxification of heavy metals. To control the level of ROS and to protect the cells, plants possess low molecular weight antioxidants such as ascorbic acid, glutathione and carotenoids, and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) that scavenge ROS (Gratão et al., 2005). The antioxidant responses have been observed in leaves and roots being Cu and Zn concentration or time-dependent as well as plant species or ecotype dependent (Cuypers et al., 2002).

Many studies have been devoted to the interference of Cu and Zn with a variety of physiological processes. There are many reports concerning the response of the antioxidant systems in plants to metal stress in nutrient solutions (Cuypers et al., 2002; Tewari et al., 2006). However, limited information in this regard is available in respect of maize grown in soil with application of pig slurry over the years, in which occurred the accumulation of Cu and Zn in soil. In view of this, the objective of the present study was to evaluate the possible changes in growth parameters and in the enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems of maize (*Zea mays*) plants grown in soil with accumulation of Cu and Zn due to 19 applications of pig slurry during 7 years.

6.3 Material and methods

Soil and manures

Disturbed and undisturbed top soil samples (0 - 20 cm) were collected from a field experiment located in the Department of Soil Science at Federal University of Santa Maria (UFSM), physiographic region of Central Depression of Rio Grande do Sul (RS) (29°41'11.46"S and 53°43'8.28"W), southern Brazil. The climate is Cfa according to the classification of Köppen, with annual precipitation of 1769 mm and average annual

temperature of 19.2 °C. The soil is classified as a Typic Hapludalf soil (Soil Survey Staff, 1999). The area had been kept under a no tillage system for the eight years prior to the year 2000, when the experiment began. In March 2000 the area was sampled in the layer of 0-10 cm. The results of the analyses were: clay 170 g kg⁻¹, silt 300 g kg⁻¹, sand 530 g kg⁻¹, pH-H₂O 4.7, soil organic matter 16 g dm⁻³, Al 0.8 cmol_c dm⁻³ (extracted by KCl 1 mol L⁻¹), Ca 2.7 cmol_c dm⁻³ (extracted by KCl 1 mol L⁻¹), Mg 1.1 cmol_c dm⁻³ (extracted by KCl 1 mol L⁻¹), P (extracted by Mehlich 1; HCl 0.05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0.0125 mol L⁻¹), 15.0 mg dm⁻³ and 96 mg dm⁻³ of K (extracted by Mehlich 1), Cu and Zn (extracted by HCl 0.1 mol L⁻¹) 1.2 and 1.6 mg kg⁻¹, respectively.

The undisturbed and disturbed soil samples used in the present investigation was collected from the following experiment: the experiment was installed in 2000 to evaluate the response of crops (maize, black bean, black oats, pearl millet, common vetch) cultures to pig slurry rates of 0, 20, 40 and 80 m³ ha⁻¹ in no tillage system. First pig slurry rates of 0, 20, 40 and 80 m³ ha⁻¹ were applied on a total area of 12 m² (4 m x 3 m) in May 2000. After the harvest of grain, in summer crops, or flowering, in winter crops, the plants were desiccated and, under cultural residues, pig slurry was applied for the next crop. The pig slurry was scattered on the soil surface one day before the sowing of each species, without incorporating it into the soil. In seven years (2000 to 2007) a total of 19 pig slurry applications were done. The total amount of Cu applied was 0, 16.5, 33.0 and 66.0 kg ha⁻¹ and of Zn were 0, 20.4, 40.8 and 81.6 kg ha⁻¹, for the rates of 0, 20, 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, respectively. The chemical attributes of these soils are presented in Table 1.

The disturbed soil samples were collected from layer of 0-20 cm depth. After collection the soils were dried, ground and reserved for the cultivation of maize (*Zea mays*). On the other hand, the undisturbed soil samples were collected with PVC tubes of 200 mm diameter and 220 mm deep, which had undertaken the cultivation of maize.

Pot experiment

The soil of the control treatment was separated into two parts. One part (40 kg) was fertilized with N = 45, P = 125, K = 90 mg kg⁻¹ of soil (PK treatment). The nitrogen

fertilization was similar for all treatments in both disturbed (control, PK, 20, 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry) and undisturbed soil sample (0, 20, 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry). Moreover, the application of N was divided into two applications at sowing of the plants (15 mg) and eight days after emergence (30 mg) for both disturbed and undisturbed sample soils. The experimental unit for disturbed soil consisted of a pot, internally lined with plastic bag to prevent loss of nutrients and water drainage, containing 4 kg of dried soil to air (2 mm mesh) and four plants. The grown was carried out in greenhouse which had no automatic control of temperature, but had a held partial control by means of ventilated environment and mist in the warmer days. In addition, the pots were subjected to periodic rotation to avoid the effect of location in the greenhouse. The experimental design was randomized treatments with eight replications. Daily irrigations were done with distilled water for both disturbed and undisturbed soil sample, trying to maintain soil moisture between 60 and 80 % of field capacity through daily measurements by weighing.

The experimental unit for undisturbed soil was composed of a pot approximately 11 kg of soil. The experimental design was randomized treatments with six replications.

At 15 and 25 days after the plant emergence, maize plants of four and three experimental units for each treatment were collected respectively for disturbed and undisturbed soil samples. At harvest, plants were divided into roots, stalk and leaves to determine fresh weight, plant height, senescent leaves, green leaves, and biochemical and chemical analysis.

Soil analysis

At harvest at 25 days after plant emergence, soil samples were also collected for the analysis of pH, water-soluble (solution/soil ratio 2:1) and plant-available Cu and Zn in soil that was extracted by 0.1 mol L⁻¹ of HCl with soil/solution ratio of 1:5 after 30 min shaking by an end-over-end shaker at room temperature (20 °C). At the end of the shaking period 15 h, the supernatant solutions were separated from the soil for measurement of Cu and Zn by AAS. Ca and Mg exchangeable were extracted by 1.0

mol L⁻¹ of KCl in a soil/solution ratio of 1:20 followed a similar procedure performed for the extraction and determination of Cu and Zn.

Soil K and P plant-available were extracted by Mehlich 1 in a soil/solution ratio of 1:10 after 30 min shaking by an end-over-end shaker at room temperature (20 °C). The phosphorus concentration was determined by the Murphy and Riley (1962) method and the K by flame spectrometry (B262 Micronal).

Chemical analysis in shoot

To metal determination (Cu and Zn) in plants, leaves were oven-dried at 65 °C to constant mass. Dried plant tissues (0.1 g) were ground and digested in 3.0 mL of HNO₃ plus 1 mL of HClO₄. The digest of samples was made in an open system utilizing a block digester Velp Scientifica (Milano, Italy), heated at 130 °C, during 4 h. Cu and Zn concentration was estimated by flame atomic absorption spectrometry (Varian SpectrAA- 600, Australia).

Estimation of lipid peroxidation

The level of lipid peroxidation products was estimated following the method El-Moshaty et al. (1993) by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA) as an end product of lipid peroxidation by reaction with thiobarbituric acid (TBA). Shoot of maize plant were homogenized at 4 °C in 20 mL of 0.2 M citrate-phosphate buffer, pH 6.5, containing 0.5 % Triton X-100 at a proportion of 1:20 (w/v). The homogenate was filtered through two layers of paper and centrifuged for 15 min at 20,000 g. One milliliter of the supernatant fraction was added an equal volume of 20 % (w/v) trichloroacetic acid (TCA) containing 0.5 % (w/v) TBA. The mixture was heated at 95 °C for 40 min and then quickly cooled in an ice bath for 15 min. After centrifugation at 10,000 g for 15 min, the absorbance of the supernatant was measured at 532 nm. A correction of non-specific turbidity was made by subtracting the absorbance value taken at 600 nm.

Determination of hydrogen peroxide (H₂O₂)

The H₂O₂ content of maize leaves was determined according to Loreto and Velikova (2001). Approximately 0.1 g of shoot was homogenized at 4 °C in 2 mL of 0.1 % (w/v) TCA. The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 15 min and 0.5 mL of 10 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 and 1 mL of 1 mol KI. The H₂O₂ content of the supernatant was evaluated by comparing its absorbance at 390 nm with a standard calibration curve.

Superoxide dismutase activity

The activity of superoxide dismutase was assayed according to Misra and Fridovich (1972). About 0.2 g of leaves of maize plant were homogenized in 5 mL of 100 mM K-phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.1 mM ethylenediaminetetracetic acid (EDTA), 0.1 % (v/v) Triton X-100 and 2 % polyvinylpyrrolidone (PVP) (w/v). The extract was filtered and centrifuged at 22,000 g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was utilized for assay. The assay mixture consisted of a total volume of 1 mL, containing glycine buffer (pH 10.5), 1 mM epinephrine and enzyme material. Epinephrine was the last component to be added. The adrenochrome formation in the next 4 min was recorded at 480 nm in UV-Vis spectrophotometer. One unit of SOD activity is expressed as the amount of enzyme required to cause 50 % inhibition of epinephrine oxidation in the experimental conditions. This method is based on the ability of SOD to inhibit the autoxidation of epinephrine at an alkaline pH. Since the oxidation of epinephrine leads to the production of a pink adrenochrome, the rate of increase of absorbance at 480 nm, which represents the rate of autoxidation of epinephrine, can be conveniently followed. SOD has been found to inhibit this radical-mediated process.

Catalase activity

Catalase activity were determined from maize leaves homogenized in a solution containing 50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ (pH 7.0), 10 g L⁻¹ PVP, 0.2 mM EDTA and 10 mL L⁻¹ Triton X-100, at a proportion of 1:5 (w/v). The homogenate was centrifuged at 12,000 g

for 20 min at 4 °C. The supernatant was used for determination of catalase activity according to the modified method of Aebi (1984) by monitoring the disappearance of H₂O₂ by measuring the decrease in absorbance at 240 nm in a reaction mixture with a final volume of 2 mL containing 15 mM H₂O₂ in 50 mM KPO₄ buffer (pH 7.0) and 30 mL of the extract.

Ascorbate peroxidase activity

To determine the APX activity, leaves of maize were homogenized in 50 mmol L⁻¹ K-phosphate buffer containing 1 mmol L⁻¹ EDTA and 2% PVP (w/v), pH 7.8, at a proportion of 1:3 (w/v). The homogenate was centrifuged at 13,000 g for 20 min at 4°C, and the supernatant used for enzyme activity according to the modified method of Zhu et al. (2004). The reaction mixture in a total volume of 2 mL consisted of 25 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mmol L⁻¹ EDTA, 0.25 mmol L⁻¹ ascorbate, 1.0 mmol L⁻¹ H₂O₂ and 100 µL extract. The H₂O₂-dependent oxidation of ascorbate was followed by a decrease in absorbance at 290 nm using the molar extinction coefficient 2.8 mM cm⁻¹.

Ascorbic acid and non-protein thiol groups concentration

Shoot of maize plant were homogenized in a solution containing 50 mM Tris–HCl and 10 mL L⁻¹ Triton X-100 (pH 7.5), centrifuged at 6,800 g for 10 min. To the supernatant obtained was added 10 % TCA at proportion 1:1 (v/v) followed by centrifugation (6,800g for 10 min) to remove protein. The supernatant was used to determine ascorbic acid (AsA) and non-protein thiol groups contents (NPSH) contents.

AsA determination was performed as described by Jacques-Silva et al. (2001). An aliquot of the sample (300 mL) was incubated at 37 °C in a medium containing 100 mL TCA 13.3 %, 100 mL deionized water and 75 mL DNPH. After 3 h, 500 mL of 65 % H₂SO₄ was added and samples were read at 520 nm. A standard curve was constructed using L(+) ascorbic acid.

NPSH concentration in shoot maize was measured spectrophotometrically with Ellman's reagent (Ellman, 1959). An aliquot of the sample (400 μL) was added in a medium containing 550 mL 1 M Tris-HCl (pH 7.4). Reaction was read at 412 nm after the addition of 10 mM 5-5-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (0.05 mL). A standard curve using cysteine was used to calculate the content of thiol groups in samples.

Protein determination

In all the enzyme preparations, protein was measured by the Coomassie Blue method according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as standard.

Statistical analysis

The experiments were done as randomized design. The analyses of variance were computed on statistically significant differences determined based on the appropriate F-tests. The results are the means \pm SD of four and three independent replicates of maize plant grown respectively in disturbed and undisturbed soil samples. The mean differences were compared utilizing Tukey multiple range test ($p < 0.05$).

6.4 Results

Soil properties and Cu and Zn concentrations in maize leaves

The application of pig slurry caused significant changes on several attributes of the soil (Table 1). However, the greater differences were observed in relation to Cu, Zn and P concentrations that increased 16, 13 and 37 fold, respectively, upon addition of 80 $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ of pig slurry, when compared to the control. In addition, control treatment showed the lowest availability of P and K.

Table 1. Chemical properties of soil with application of pig slurry (PS) and fertilizer PK used for the cultivation of maize plants.

Properties	Control	PK	20 m ³ of PS ha ⁻¹	40 m ³ of PS ha ⁻¹	80 m ³ of PS ha ⁻¹
pH _{H2O}	4.71 ± 0.12 ^{c*}	4.92 ± 0.12 ^b	4.92 ± 0.12 ^b	5.06 ± 0.10 ^b	5.26 ± 0.12 ^a
OM, g kg ⁻¹	19.78 ± 0.42 ^d	20.27 ± 0.27 ^d	21.98 ± 1.01 ^c	23.60 ± 0.75 ^b	35.07 ± 0.59 ^a
Al, cmol _c kg ⁻¹	0.78 ± 0.08 ^a	0.68 ± 0.04 ^b	0.29 ± 0.04 ^c	0.13 ± 0.02 ^d	0.09 ± 0.03 ^d
CTCef, cmol _c kg ⁻¹	4.01±0.1 ^c	4.26±0.6 ^c	4.24±0.13 ^c	4.80±0.28 ^b	6.03±0.20 ^a
CTC7, cmol _c kg ⁻¹	9.87±1.35 ^b	10.28±1.17 ^{ab}	10.16±0.73 ^{ab}	10.74±0.37 ^{ab}	12.15±0.68 ^a
V, %	32.50±2.87 ^d	35.25±4.24 ^{cd}	38.94±2.50 ^{bc}	43.48±2.00 ^{ab}	49.41±2.19 ^a
Cu, mg kg ⁻¹	1.15 ± 0.14 ^d	1.18 ± 0.10 ^d	5.87 ± 0.18 ^c	9.23 ± 0.64 ^b	18.57 ± 0.64 ^a
Cutot, mg kg ⁻¹	34.33±1.25 ^c	35.20±2.46 ^c	41.50±0.87 ^b	46.03±2.04 ^b	55.87±3.11 ^a
Zn, mg kg ⁻¹	1.67 ± 0.23 ^d	1.73 ± 0.18 ^d	5.61 ± 0.50 ^c	9.70 ± 0.75 ^b	21.66 ± 1.46 ^a
Zntot, mg kg ⁻¹	21.49±2.40 ^c	21.70±1.50 ^c	25.72±1.28 ^b	31.62±2.55 ^b	46.32±3.70 ^a
K, mg kg ⁻¹	26.50 ± 2.98 ^d	75.75 ± 5.89 ^a	46.25 ± 4.20 ^c	51.50 ± 3.16 ^{bc}	53.00 ± 4.60 ^b
P, mg kg ⁻¹	10.14 ± 0.36 ^e	44.11 ± 2.44 ^d	87.21 ± 2.54 ^c	154.24 ± 4.17 ^b	379.38 ± 25.63 ^a
Ca, cmol _c kg ⁻¹	2.25 ± 0.12 ^d	2.48 ± 0.05 ^{cd}	2.59 ± 0.12 ^c	2.94 ± 0.21 ^b	3.72 ± 0.19 ^a
Mg, cmol _c kg ⁻¹	0.86 ± 0.47 ^d	0.92 ± 0.01 ^d	1.24 ± 0.07 ^b	1.60 ± 0.08 ^b	2.13 ± 0.08 ^a

*Data (means ± SD) followed by the same letters in each line are not significantly different (tukey's test, $p < 0.05$).

Leaf Cu concentration in both undisturbed and disturbed soil samples increased with pig slurry treatments (Fig. 1A, B). However, at 25 days after plant emergence, leaf Cu concentration showed no significant alteration at 20 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control. In addition, Cu concentration in plants grown in disturbed soil sample was not affected by PK treatment.

In the plants grown in undisturbed soil, leaf Zn concentration increased with increasing pig slurry levels, and the increase in tissue Zn concentration was steeper at 15 days after plant emergence (Fig. 1C). On the other hand, in the plants grown in disturbed soil samples leaf Zn concentration linearly decreased upon addition of pig slurry treatments (Fig. 1D). For both 15- and 25-day-old plants, leaf Zn concentration decreased upon addition of PK treatment. Moreover, leaf Zn concentration was much higher in plants grown in disturbed than in undisturbed soil samples.

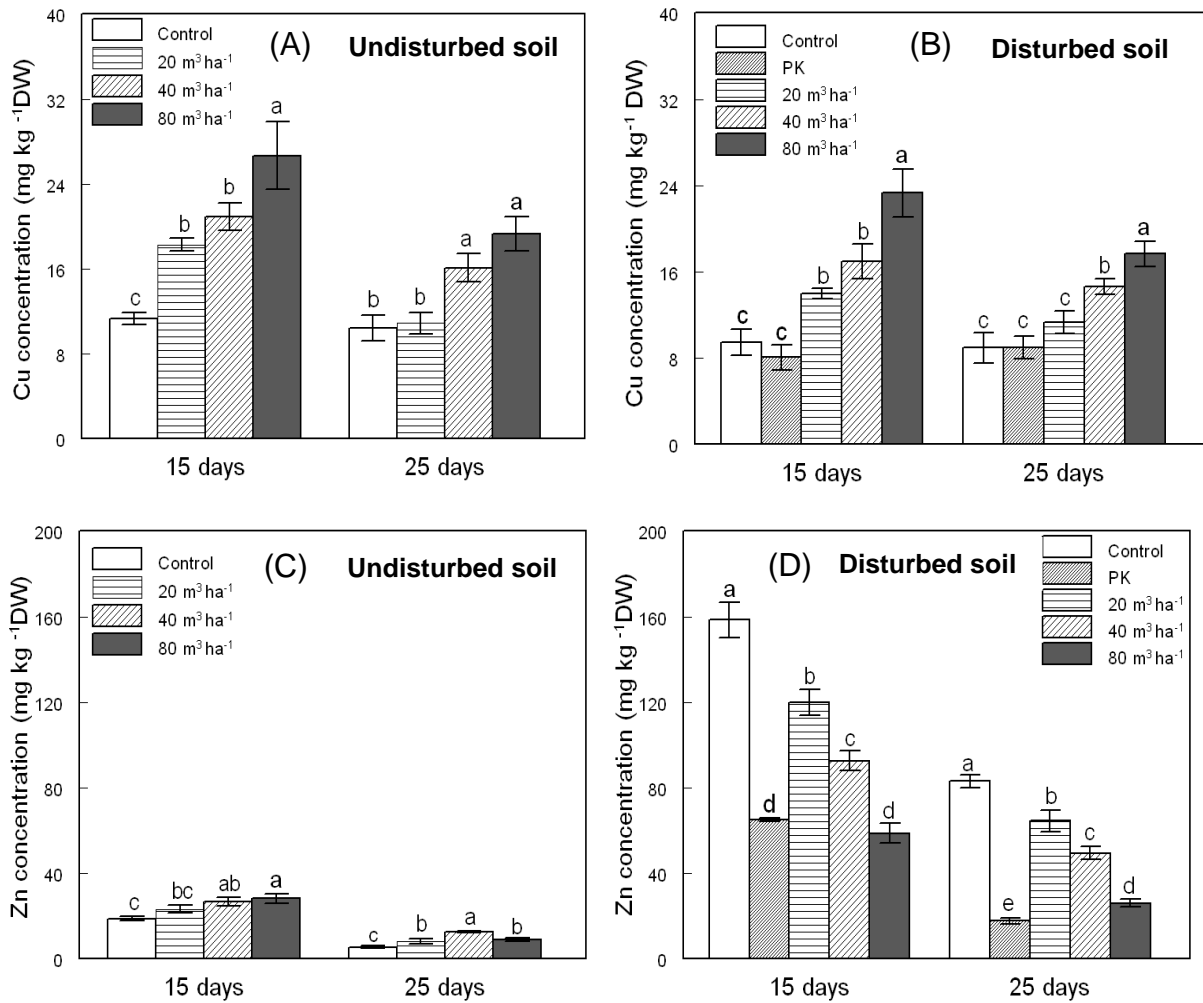


Fig. 1. Cu and Zn concentrations in leaves of maize grown in undisturbed (A and C, respectively) and disturbed (B and D, respectively) soil sample after 15 and 25 days of plants emergence. The grown of maize plants was performed in soil with 19 applications of pig slurry or otherwise with PK fertilization or without any amendment (control treatment). Data are means \pm SD of three different replicates. Different letters indicate significant difference at a particular sampling (one-way ANOVA, tukey test, $p < 0.05$).

Plant growth

Plant height and shoot fresh weight increased upon addition of pig slurry levels in both undisturbed and disturbed soil samples, when compared to the control (Figure 2A and B). However, in both 15- and 25-day-old plants grown in undisturbed soil no difference in plant height and shoot fresh weight was found for pig slurry treatments ranging from 20 to 80 m³ ha⁻¹ (Fig. 2A). Conversely, in disturbed soil, plant height and

shoot fresh weight in 25-day-old plants were greater at 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry than at 20 and 40 m³ ha⁻¹ (Fig. 2B, D). Moreover, PK treatment presented greater plant height than did 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry (Fig. 2B). On the other hand, no difference in shoot fresh weight was found for PK treatment and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry (Fig. 2D). As shown in the figure 2E, in undisturbed soil there was a significant increase in number of green leaves at 20 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry when compared to the control. In addition, no difference in number of senescent leaves was observed for all treatments. In disturbed soil samples, PK treatment presented the highest number of green leaves when compared to all treatments (Figure 2F). Moreover, the number of senescent leaves was either significantly decreased in PK treatment or increased upon addition of 20 and 40 m³ ha⁻¹ of pig slurry levels, when compared to the control.

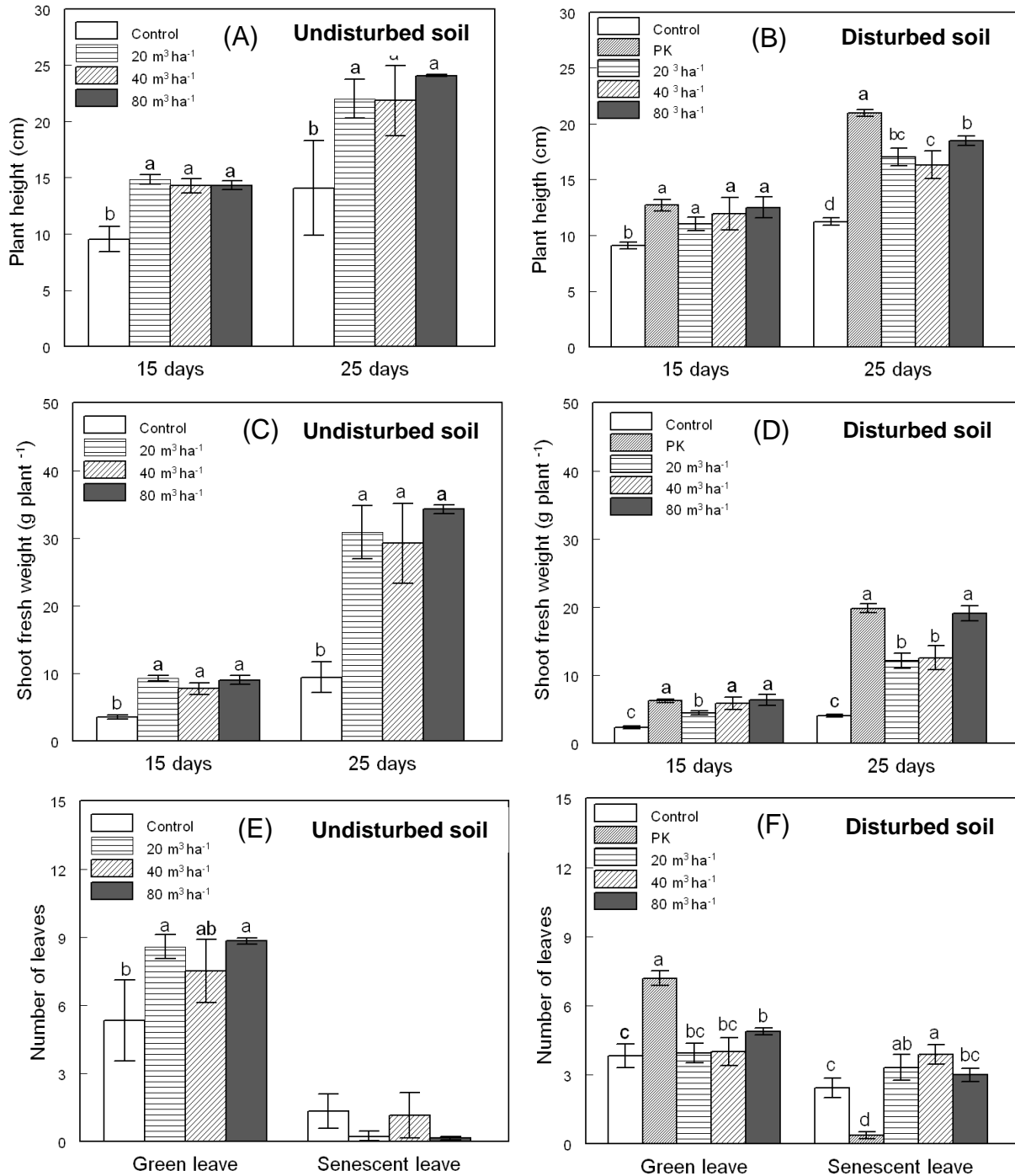


Fig. 2. Height and fresh weight of maize plants grown in undisturbed and disturbed soil samples at 15 and 25 days after emergence plant (A and B, C and D, respectively), and the number of green and dried leaves at 25 days (E and F, respectively). The grown of maize plants was performed in soil with 19 applications of pig slurry or otherwise with PK fertilization or without any amendment (control treatment). Data are means \pm SD of three different replicates. Different letters indicate significant difference at a particular sampling (one-way ANOVA, tukey test, $p < 0.05$).

Lipid peroxidation and H₂O₂ concentration

Lipid peroxidation level was measured in terms of MDA accumulation. As shown in Figure 3A, MDA concentration in leaves of maize grown in undisturbed soil samples at 15 days presented a significant decrease in all pig slurry treatments. However, at 25 days, leaf MDA concentration was only significantly decreased at 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control. In disturbed soil samples at both 15 and 25 days after plant emergence, MDA concentration was lower in all treatments when compared to control treatment (Figure 3B). However, it was observed a significantly increase in leaf MDA concentration in all pig slurry treatments when compared to PK treatment. In addition, the lowest leaf MDA concentration was observed upon addition of PK treatment in both 15- and 25-day-old plant.

As shown in Figure 3C and D, H₂O₂ concentration in leaves of maize grown in both undisturbed and disturbed soil samples was significantly decreased at all pig slurry treatments at 15 days. On the other hand, at 25 days, in undisturbed soil sample a decreased in H₂O₂ concentration was only observed at 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry (Fig. 3C). Moreover, in plants grown in disturbed soil samples H₂O₂ concentration either increase upon addition of NPK, 20 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry treatments or did not change at 40 m³ ha⁻¹ of pig slurry when compared to the control (Fig. 3D).

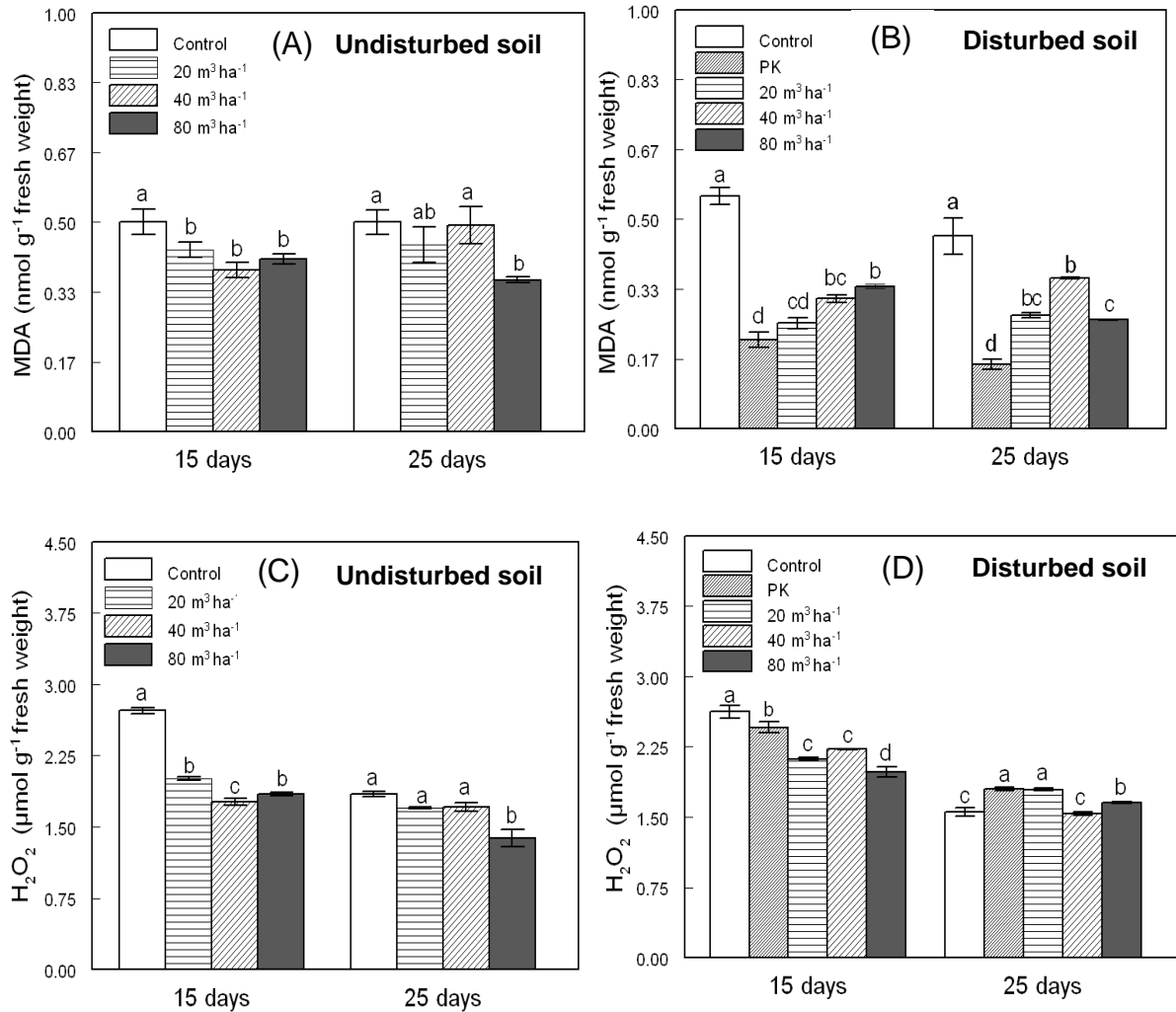


Fig. 3. MDA concentration in leaves of maize plants grown in undisturbed and disturbed soil samples (A and B, respectively) and hydrogen peroxide content grown in undisturbed and disturbed soil samples (C and D, respectively), at 15 and 25 days after plant emergence. The grown of maize plants was performed in soil with 19 applications of pig slurry or otherwise with PK fertilization or without any amendment (control treatment). Data are means \pm SD of three different replicates. Different letters indicate significant difference at a particular sampling (one-way ANOVA, tukey test, $p < 0.05$).

SOD, CAT and APX activities

In both 15- and 25-day-old plants grown in undisturbed soil, leaf SOD activity were lesser upon addition of pig slurry treatments, when compared to the control (Fig. 4A). However, in 25-day-old plants SOD activity decreased with increasing pig slurry levels. On the other hand, in 15-day-old plants grown in disturbed soil samples, SOD

activity was either increased at PK treatment, 20 and 40 m³ ha⁻¹ of pig slurry or decreased at 80 m³ ha⁻¹ pig slurry, when compared to the control (Fig. 4D). Similarly, at 25 days, SOD activity was either increased at PK treatment and 20 m³ ha⁻¹ of pig slurry or decreased at 40 e 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control.

The effects of pig slurry treatments on leaf CAT activity are shown in Fig. 4C and D. In 15- and 25-day-old plants grown in both undisturbed and disturbed soil samples leaf CAT activity was significantly decreased at all pig slurry treatments, when compared to the control. However, no significant difference in CAT activity was observed for pig slurry treatments, and PK treatment. Moreover, plants grown in disturbed soil showed greater leaf CAT activity at the control treatment than did plants grown in undisturbed soil.

The effects of pig slurry treatments on leaf APX activity are shown in Fig. 4E and F. In 15- and 25-day-old plants grown in undisturbed soil, leaf APX activity was decreased at 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control (Figure 4E). In plants grown in disturbed soil, at 15 days, the activity of APX decreased at all pig slurry levels, when compared to the control (Figure 4F). However, in 25-day-old plants, APX activity was either increased at 40 m³ ha⁻¹ of pig slurry or did not change at both 20 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control.

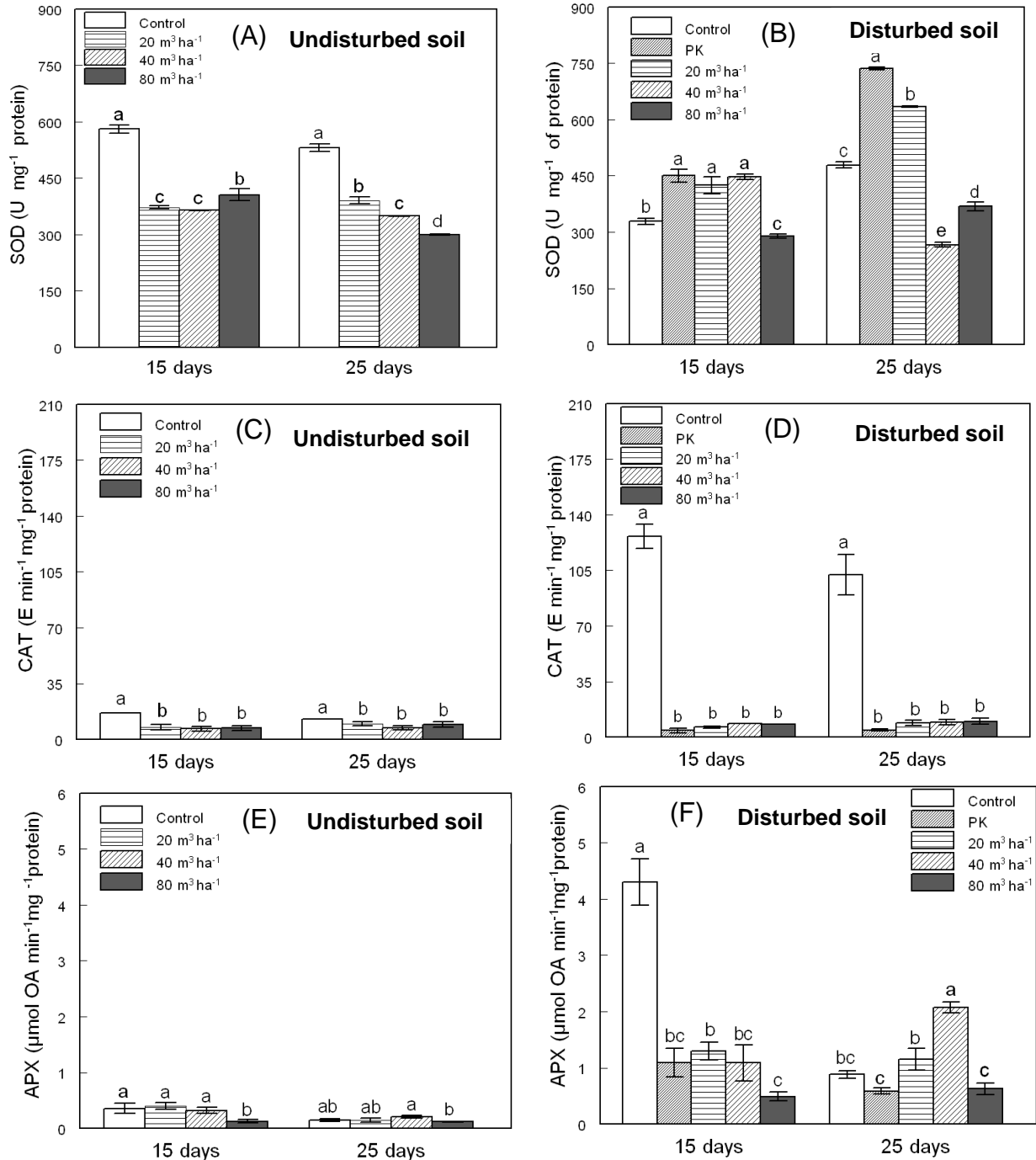


Fig 4. Superoxide dismutase activity in leaves of maize plants grown in undisturbed and disturbed soil samples (A and B, respectively), and catalase activity in undisturbed and disturbed soil samples (C and D, respectively) and ascorbate peroxidases activity in undisturbed and disturbed soil samples (E and F, respectively) at 15 and 25 days after plant emergence. The grown of maize plants was performed in soil with 19 applications of pig slurry or otherwise with PK fertilization or without any amendment (control treatment). Data are means \pm SD of three different replicates. Different letters indicate significant difference at a particular sampling (one-way ANOVA, tukey test, $p < 0.05$).

AsA and NPSH concentration

The pig slurry effects on leaf AsA concentration are shown in Fig. 5A and B. In 15-day-old plants grown in undisturbed soil, leaf AsA concentration either increased at 20 m³ ha⁻¹ of pig slurry or did not change at higher concentrations. However, in 25-day-old plants, leaf AsA concentration was increased at 20 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control. In plants grown in disturbed soil, at 15 days, leaf AsA concentration decreased at 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control (Fig. 5B). On the other hand, in 25-day-old plants, leaf AsA concentration was significantly decreased at 40 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control. However, in 15- and 25-day-old plants leaf AsA concentration was greater at 20 m³ ha⁻¹ than at higher concentrations of pig slurry. The leaf AsA concentration was higher in 25-day-old plants than in 15-day-old plants. Moreover, leaf AsA concentration was either decreased or did not change at PK treatment, respectively at 15 and 25 days after plant emergence.

The effects of pig slurry on leaf NPSH concentration are shown in Fig. 5C and D. In undisturbed soil samples at 15-day-old plants the NPSH concentration was reduced upon addition of 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry (Fig. 5C), whereas in 25-day-old plants it decreased at 20 and 40 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control. In disturbed soil sample, leaf NPSH concentration linearly decreased with increasing pig slurry treatments in 15-day-old plants (Fig. 5D). On the other hand, in 25-day-old plant grown in disturbed soil, leaf NPSH concentration either increased at 20 m³ ha⁻¹ of pig slurry or decreased at 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry, when compared to the control. Moreover, leaf NPSH concentration was higher at PK treatment than at 40 and 80 m³ ha⁻¹ of pig slurry in both 15- and 25-day-old plants. Independently of the soil used, 25-day-old plants showed higher leaf NPSH concentration than did 15-day-old plants.

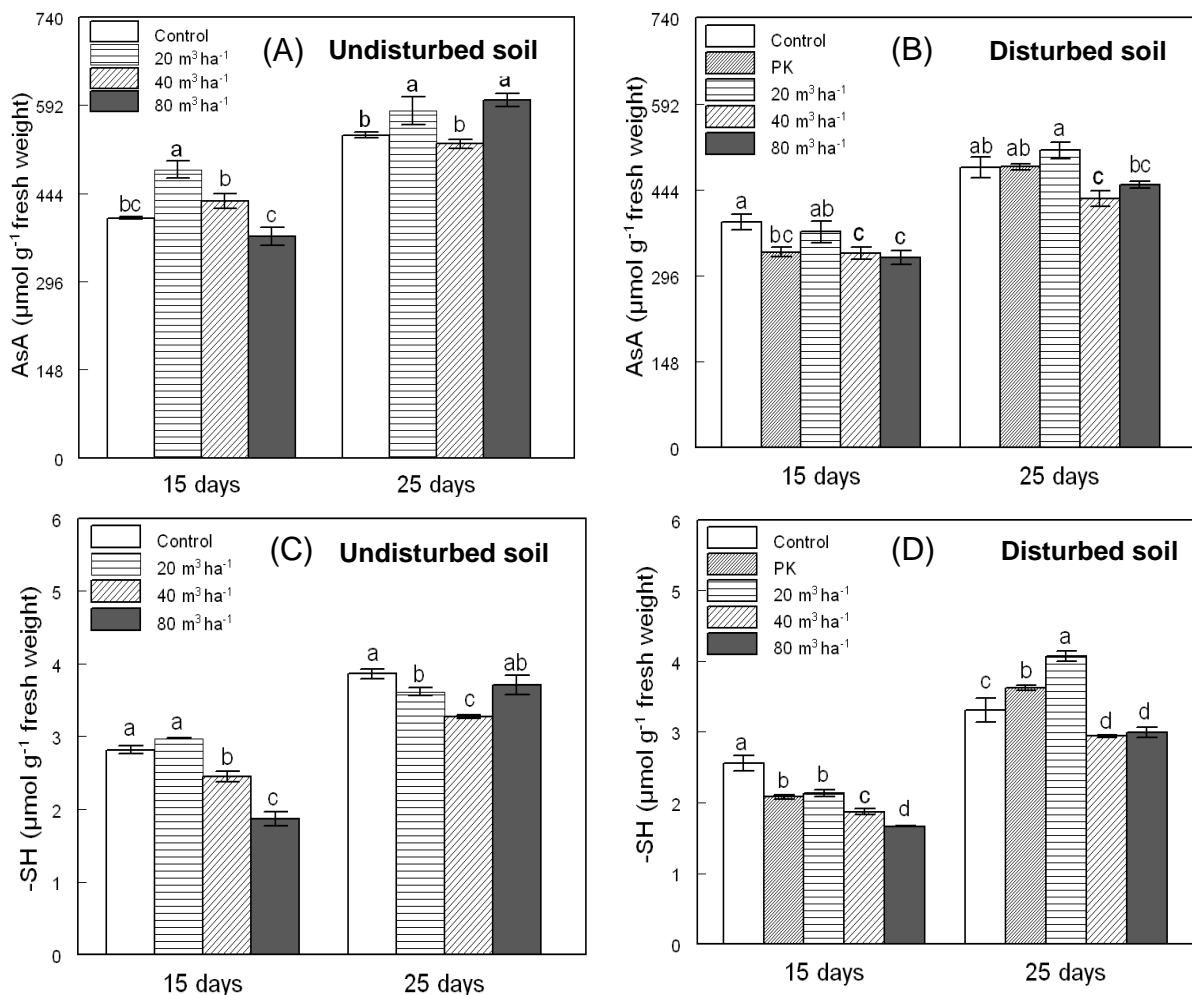


Fig 5. Ascorbic content (AsA) in leaves of maize plants grown in undisturbed and disturbed soil samples (A and B, respectively), and no-protein thiols groups content (NPSH) in undisturbed and disturbed soil samples (C and D, respectively) at 15 and 25 days after plant emergence. The grown of maize plants was performed in soil with 19 applications of pig slurry or otherwise with PK fertilization or without any amendment (control treatment). Data are means \pm SD of three different replicates. Different letters indicate significant difference at a particular sampling (one-way ANOVA, tukey test, $p < 0.05$).

6.5 Discussion

In this study, maize plants were grown in soils where Cu and Zn levels were increased due to 19 applications of pig slurry. The present study shows a strong relation between pig slurry applications and Cu and Zn concentrations in soil (Table 1). In addition, there was an increase in leaf Cu concentration of maize grown in both

undisturbed and disturbed soil samples (Figure 1). Conversely, leaf Zn concentration was observed either increased in plants grown in undisturbed soil sample or decreased in plants grown in disturbed soil upon addition of pig slurry. These data suggest that the availability of Zn in disturbed soil samples was significantly changed due to homogenization of the soil. On the other hand, in no tillage system these elements are mainly retained in upper soil layers due to low mobility of the Cu (Martinez and Peu, 2000) and Zn (Martinez and Peu, 2000) in the soil. Additionally, we may suggest that there was an antagonist interaction between Cu and Zn in disturbed soil samples upon addition of pig slurry.

In relation to growth of maize plants in undisturbed soil samples an increase in height, shoot fresh weight and number of green leaves upon addition pig slurry was observed. These data show a possible positive effect of pig slurry application. Despite the large increase in Cu and Zn in soil, the bioavailability of trace metals in soil solution is greatly dependent on the metal, pH, presence of organic matter and other ions (Sauvé et al. 1997). Actually, increasing the pH, the free cupric ion activity considerably decreases at the expense of organically bound complex species in the soil solution (Sauvé et al. 1997). Thus, the significant increase in the organic matter levels and pH in soil (Table 1) could have reduced the adverse effect of Cu and Zn excess in maize plant. In addition, the interaction between P and Cu, and P and Zn in soil also may decrease toxicity of Cu and of Zn in maize plant. As observed for Cd (Naidu et al., 1994; Bolan et al., 1999) and for Cu (Pérez-Novo et al., 2009) several mechanisms of adsorption could be induced by H_2PO_4^- in soils, including (1) an increase in negative charges; (2) co-sorption of H_2PO_4^- and Cu and Zn as an ion pair; and (3) surface complex formation of Cu and Zn on the P compound. In this study, the data also indicate that the increase of P concentration in soil could decrease the negative effects of Cu and Zn excess in soil.

Interestingly, maize plants grown in disturbed soil samples showed decreased plant height, shoot fresh weight and number of green leaves upon addition pig slurry in relation to PK treatment. These data could be ascribed to the possible negative effects of the increased Cu (Wang et al., 2004) and Zn (Tewari et al., 2008) concentration in the soil as well as in maize plant. Moreover, these alterations occurred concomitantly with

the increase of lipid peroxidation (Fig. 2). These data also suggest that the homogenization of soil (disturbed samples) can change the distribution of mineral nutrients and organic matter in soil, hence creating adverse conditions for the development of maize plants.

Several studies have demonstrated that the imposition of abiotic stresses, including high levels of Cu and Zn in soil, can give rise to excess concentrations of reactive oxygen species (ROS) in plant cells (Prasad et al., 1999; Tanyolac et al., 2007), which are potentially harmful since they initiate the peroxidation and destruction of lipids, nucleic acids and proteins (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006). In the present study, the reduced MDA concentration in leaves of maize grown in both disturbed and undisturbed soil samples suggests a decreased lipid peroxidation in pig slurry treatments. The high MDA concentration in control treatment could be ascribed to high levels of H_2O_2 content showed here. These results are in accordance with Tewari et al. (2004) which showed that low levels of P and K in maize plant increase the MDA concentration. In addition, in control treatment there was a significant increase in APX activity, which is an important H_2O_2 detoxifying enzyme in plants (Gratão et al., 2005).

Nevertheless, in maize leaves grown in disturbed soil samples, at 15 and 25 days after emergence, there was an increase in MDA concentration upon addition of pig slurry treatments, when compared relation to the PK treatment. In agreement with our results, others studies have showed an increased MDA concentration in Cu-exposed plants (Tewari et al., 2006). The increased MDA concentration is mainly a result of increased ROS production that induce severe lipid peroxidation due to removal of hydrogen from unsaturated fatty acids leading to formation of lipid radicals and reactive aldehydes (Mishra et al., 2006). However, in the present study the H_2O_2 concentration was decreased in leaves exposed to pig slurry treatments in undisturbed and disturbed soil samples. In addition, in these treatments there was an increased Cu concentration in leaves. The reduction in the content of the H_2O_2 could be related to the Haber-Weiss reaction, that is characterized by metal (mainly Cu and Fe) catalyzed production of hydroxyl radicals (HO^\bullet) from superoxide ($O_2^{\bullet-}$) and H_2O_2 (Sandman and Böger, 1980; Mithöfer et al., 2004). In fact, H_2O_2 can be reduced to HO^\bullet , highly reactive and thus the levels of H_2O_2 in cells do not reflect its real formation. The lipid peroxidation could be the

result of the ROS interaction (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$) formed as a result of the toxic effect of Cu, but is mainly the HO^{\bullet} the responsible for this damage (Apel & Hirt, 2004).

The protection to these ROS via antioxidant system is complex and highly organized. Superoxide dismutase constitutes the primary line of defense in this system as it dismutates superoxide radicals to H_2O_2 (Fatima and Ahmad 2005; Alscher et al., 2002). Degradation of H_2O_2 to water and oxygen is carried out by catalase in peroxisomes and by ascorbate peroxidase, as a constituent of ascorbate–glutathione cycle (Gratão et al., 2005). In this study there was higher SOD activity in maize grown in undisturbed soil sample of the control treatment, where it was observed low availability of P and K, which reflected in lower production of fresh weight and height of maize plants. ROS generation due to macronutrient deficiencies can be responsible for transcriptional activation of genes responsible for new synthesis of SOD isoforms (Tewari et al., 2004). In addition, in the control there was an increased MDA concentration as an indicative of lipid peroxidation in this treatment and it agrees with the data of CAT activity that presented an increased activity. However, in maize grown in disturbed soil samples there was a reduction in SOD activity upon addition of pig slurry treatments. This decrease in SOD activity could be related to reduced levels of $\text{O}_2^{\bullet-}$ due to Haber-Weiss reaction, as mentioned previously. In addition the reduced levels of H_2O_2 , could also explain the reduced CAT activity in pig slurry treatments.

In both collections of plants (15 and 25 days), either the antioxidant enzymatic activity (SOD and APX activity) or non-enzymatic antioxidant content (AsA and NPSH content) in maize grown in disturbed soil were reduced in the treatment with $80 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ of pig slurry. Interestingly, Zn and Cu are constituent of the isoform of SOD namely Cu/Zn-SOD (Cohu and Pilon 2007). Thus, the increase of these metals showed here could contribute to increased activity of these enzymes, but this not was observed in this study. Therefore, the decrease in SOD and APX activity could be due to the blocking of essential functional groups like $-\text{SH}$ in the enzymes or the displacement of essential metal ions from enzymes, as suggested for other metals (Shah and Dubey, 1995; Schützendübel and Polle, 2002).

In relation to AsA concentration, in undisturbed soil sample at 25 days after emergence, an increase in treatment with application of $80 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ of pig slurry was

observed. This result can indicate the induction of protective mechanisms to detoxifying Cu excess, which seems to be efficient in the protection of membrane lipids, since shoot lipid peroxidation was not observed. AsA is a key antioxidant for elimination of ROS especially H_2O_2 (Noctor and Foyer, 1998). The reaction of AsA with H_2O_2 can occur directly or it can be catalyzed by APX (Chen and Gallie, 2004). On the other hand, a decrease in AsA concentration was observed in maize grown in disturbed soil samples at 25 days in treatment with application of 40 and 80 $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ of pig slurry when compared to the PK treatment. In fact, other studies have demonstrated that ROS are involved in the oxidation of ascorbic acid to dehydroascorbic acid, leading to reduction in the ascorbic acid content of the plant (Singh et al., 2006).

NPSH are known to be affected by the presence of several metals (Xiang and Oliver, 1998). In the present study, a decrease in NPSH concentration was observed at 15 and 25 days in leaves of maize grown in disturbed soil samples upon addition of 40 and 80 $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ of pig slurry. The decrease in NPSH occurred probably due to degradation of existing-SH compounds (Mishra et al., 2006) and would have severely affected the plants tolerance ability. Moreover, subcellular sulfate assimilation is known to take place in chloroplasts (Buchner et al., 2004; Rausch and Wachter, 2005), hence damage to chloroplast ultrastructure and membrane integrity by Cu (Maksymiec, 1997) may affect the status of sulfur metabolism of plants. Reduced activity of SOD is also supposed to contribute towards decline in NPSH.

6.6 Conclusion

The maize plants grown in undisturbed and disturbed soil samples after 19 application of pig slurry containing high Cu and Zn concentrations did not presented acute toxicity. However, the increased Cu concentration in the plant tissues suggests that pig slurry application may also cause an environmental damage. In addition, the increase in MDA concentration and the decrease in SOD activity at 80 $\text{m}^3 \text{ha}^{-1}$ of pig slurry treatment in disturbed soil samples suggest negative effects of Cu accumulation in soil. Besides, the results of this study showed that there were significant differences between the maize plants grown in undisturbed and disturbed soil samples in terms of

antioxidant enzymatic and non-enzymatic responses. Finally, it should be emphasized that the pot experiments with disturbed and undisturbed soil samples were different in relation to the amount of soil in the pot, therefore, further studies under field condition and other should be made.

6.7 Acknowledgements

The authors thank the Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico and Tecnológico (CNPq) for the research fellowships.

6.8 References

- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology* 105, 121-126.
- Apel, K., Hirt, H., 2004. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55, 373-399.
- Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S., 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53, 1331-1341.
- Bak, J., Jensen, J., Larsen, M. M., Pritzl, G. and Scott-Fordsmand, J., 1997. A heavy metal monitoring programme in Denmark. *The Science of the Total Environment* 207, 179-186.
- Briat, J.F., and Lebrun, M., 1999. Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 322, 43–54.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248- 254.
- Berenguer, P., Cela, S., Santiveri, F., Boixadera, J., Lloveras, J., 2008. Copper and Zinc Soil Accumulation and Plant Concentration in Irrigated Maize Fertilized with Liquid Swine Manure. *Agronomy Journal New Articles* 100, 1056-1061.

- Bolan, N. S., Naidu, R., Khan, M. A. R., Tillman, R. W., Syers, J. K., 1999. The effects of anion sorption on sorption and leaching of cadmium. *Australian Journal of Soil Research* 37, 445-460.
- Buchner, P., Takahashi, H., Hawkesford, M.J., 2004. Plant sulphate transporters: coordination of uptake, intracellular and long-distance transport. *Journal of Experimental Botany* 55, 1765-1773.
- Castiglione, S., Franchin, C., Fossati, T., Lingua, G., Torrigiani, P., Biondi, S., 2007. High zinc concentrations reduce rooting capacity and alter metallothionein gene expression in white poplar (*Populus alba* cv. Villafranca). *Chemosphere* 67, 1117-1126.
- Chen, Z., Gallie, D.R., 2004. The ascorbic acid redox state controls guard cell signalling and stomatal movement. *The Plant Cell* 16, 1143-1162.
- Cuyper, A., Vangronsveld, J., Clijsters, H., 2002. Peroxidases in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. Copper and zinc phytotoxicity: A comparison. *Journal of Plant Physiology* 159, 869-876.
- Cohu, C. M., Pilon, M., 2007. Regulation of superoxide dismutase expression by copper availability. *Physiologia Plantarum* 129, 747-755.
- Diez, J. A., De la Torre, A.I., Cartagena, M.C., Carballo, M., Vallejo, A., Munoz, M.J., 2001. Evaluation of the application of pig slurry to an experimental crop using agronomic and ecotoxicological approaches. *Journal of Environmental Quality* 30, 2165-2172.
- De Magalhaes, C.C.P., Cardoso, D., Dos Santos, C.P., Chaloub, R.M., 2004. Physiological and photosynthetic responses of *Synechocystis aquatilis* f. *aquatilis* (Cyanophyceae) to elevated levels of zinc. *Journal of Phycology* 40, 496-504.
- Elstner, E. F., Wagner, G.A., Schutz, W., 1988. Activated oxygen in green plants in relation to stress situations. *Current Topics Plant Biochemistry and Physiology* 7, 159-187.
- Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82, 70-77.
- Esselink, H., Van der Geld, F.M., Jager, L.P., Posthuma-Trumpie, G.A., Zoun P.E.F., Baars, A.J., 1995. Biomonitoring heavy metals using the barn owl (*Tyto alba guttata*):

- sources of variation especially relating to body condition. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28, 471-486.
- Fatima, R.A., Ahmad, M., 2005. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater, *Science of The Total Environment* 346, 256-273.
- Giroto, E., Ceretta, C.A., Brunetto, G., Rheinheimer, D.S., Silva, L.S., Lourenzi, C.R., Lorensini, F., Vieira, R.C.B., Schmatz, R., 2010. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 34, 955-965.
- Gratão, P.L., Polle, A., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2005. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. *Functional Plant Biology* 32, 481-494.
- Sandman, G., Böger, P., 1980. Copper mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. *Journal of Plant Physiology* 66, 797-800.
- Jiang, X., Wang, C., 2008. Zinc distribution and zinc-binding forms in *Phragmites australis* under zinc pollution. *Journal of Plant Physiology* 165, 697-704.
- Loreto, F., Velikova, V., 2001. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Journal of Plant Physiology* 127, 1781-1787.
- Jacques-Silva, M.C., Nogueira, C.W., Broch, L.C., 2001. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacology & Toxicology* 88, 119-125.
- L'Herroux, L., S., LeRoux, P., Martinez, J., 1997. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany France. *Environmental Pollution* 97,119-130.
- Maksymiec, W., 1997. Effect of copper on cellular processes in higher plants. *Photosynthetica* 34, 321-342.
- Marschner, H., 1995. *Mineral Nutrition of Higher Plants*, 2nd edn. Academic Press, London.
- Martinez, J., Peu, P., 2000. Nutrient fluxes from a soil treatment process for pig slurry. *Soil Use Manage* 16, 100-107.

- Mattias, J.L., Ceretta, C.A., Nesi, C.N., Giroto, E., Trentin, E.E., Lourenzi, C.R., Vieira, R.C.B., 2010. Copper, zinc and manganese in soils of two watersheds in Santa Catarina with intensive use of pig slurry. *Revista Brasileira de Ciências dos Solos* 34, 445-454.
- Mishra, S., Srivastava, S., Tripathi, R.D., Govindarajan, R., Kuriakose, S.V., Prasad, M.N.V., 2006. Phytochelatin synthesis and resopsne of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri*. *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 25-37.
- Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry* 244, 6049-6055.
- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W., 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters* 566, 1-5.
- Naidu, R., Bolan, N.S., Kookana, R.S., Tiller, K.G, 1994. Ionic-strength and pH effects on the adsorption of cadmium and the surface charge of soils. *European Journal Soil Sciences* 45, 419-429.
- Novak, J.M., Watts D.W., Stone K.C., 2004. Copper and zinc accumulation, profile distribution, and crop removal in Coastal plain soils receiving long-term, intensive applications of swine manure. *International Journal of the American Society of Agricultural and Biological Engineers* 47, 1513-1522.
- Noctor, G., Foyer, C.H., 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 249-279.
- Rausch, T., Wachter, A., 2005. Sulfur metabolism: a versatile platform for launching defence operations. *Trends in Plant Science* 10, 503-509.
- Sauvé, S., McBride, M., Norvell, W.A., Hendershot, W.H., 1997. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. *Water, Air, and Soil Pollution* 100, 133-149.
- Schützendübel, A., and Polle, A., 2002. Plant responses to abiotic stresses: Heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53, 1351-1365.

- Pérez-Novo, C., Bermúdez-Couso, A., López-Periago, E., Fernández-Calviño, D., Arias-Estévez, M., 2009. The effect of phosphate on the sorption of copper by acid soils. *Geoderma* 150, 166-170.
- Prasad, K.V.S.K., Pardha Saradhi, P., Sharmila, P., 1999. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth and zinc toxicity in *Brassica juncea*. *Environmental and Experimental Botany* 42, 1-10.
- Pilon, M., Abdel-Ghany, S.E., Cohu, C.M., Gogolin, K.A., Ye, H., 2006. Copper cofactor delivery in plant cells. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 256-263.
- Tewari, R.K., Kumar, P., Sharma, P.N., 2008. Morphology and physiology of zincstressed mulberry plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 171, 286-294.
- Tewari, R. K., Kumar, P., Sharma, P.N., 2006. Antioxidant responses to enhanced generation of superoxide anion radical and hydrogen peroxide in the copper-stressed mulberry plants. *Planta* 223, 1145-1153.
- Tewari, R., Kumar, P., Tewari, N., Srivastava, S., Sharma, P., 2004. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses: influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. *Plant Science* 166, 687-694.
- Tanyolaç, D., Ekmekçi, Y., Ünalın, S., 2007. Changes in photochemical and antioxidant enzyme activities in maize (*Zea mays* L.) leaves exposed to excess copper. *Chemosphere* 6, 89–98.
- Verma, S., Dubey, R.S., 2003. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science* 164, 645-655.
- Zhu, Z., Wei, G., Li, J., Qian, Q., Yu, J., 2004. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167, 527-533.
- Wang, C., Zhang, S.H., Wang, P.F., Hou, J., Zhang, W.J., Li, W., Lin, Z.P., 2009. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere* 75, 1468–1476.
- Wong, M. H., Bradshaw, A. D., 1982. A comparison of the toxicity of heavy metals using root elongation of ryegrass *Lolium perenne*. *New Phytologist* 91, 255–261.
- Yruela, I., 2005. Copper in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 171, 145-156.

7. ARTIGO II - ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS EM AVEIA PRETA CULTIVADA EM SOLOS DE VINHEDOS CONTAMINADOS COM COBRE

7.1 Resumo

Os solos cultivados com videiras e com histórico de aplicação de fungicidas cúpricos podem apresentar acúmulo de cobre no solo, que pode ser tóxico devido a indução do estresse oxidativo com a consequente redução do crescimento das plantas, como a aveia preta, que co-habita as linhas e entrelinhas das videiras. O presente trabalho teve como objetivo avaliar parâmetros de crescimento e estresse oxidativo em plantas de aveia preta cultivadas em solos de vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas e acúmulo de cobre no solo. Em março de 2009 foram coletados quatro solos em vinhedos localizados na Região da Serra Gaúcha do RS e três solos de vinhedos na Campanha Gaúcha (RS). O experimento foi conduzido em casa de vegetação nos meses de junho e julho de 2009, onde foi realizado o cultivo da aveia preta, durante 40 dias, nos solos derivados de vinhedos com teores crescentes de Cu e valores similares de pH em água, fósforo disponível e potássio trocável. Aos 15 e aos 40 dias após a emergência das plantas as plantas foram coletadas e o acúmulo de matéria seca de raízes e parte aérea e a concentração de Cu foram determinados. Foram avaliados parâmetros bioquímicos enzimáticos ligados ao estresse oxidativo na parte aérea das plantas, tais como peroxidação lipídica, concentração de H₂O₂ e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX). Além disso, foram avaliados parâmetros não enzimáticos ligados ao estresse oxidativo na parte aérea das plantas de aveia como concentração de ácido ascórbico e de grupos tióis não protéicos. Os solos Cambissolo Húmico de vinhedos da Serra Gaúcha e Argissolo Vermelho da região da Campanha, com longo histórico de aplicação de fungicidas cúpricos apresentam teores de cobre tóxicos devido à drástica redução no crescimento das plantas de aveia preta. Em adição, os solos com maior disponibilidade de Cu causaram grande estresse oxidativo e o sistema antioxidante das plantas de aveia preta não foi suficientemente eficaz para reverter a condição de

estresse. O Cu absorvido pelas plantas foi acumulado predominantemente nas raízes das plantas, sendo pequena a sua translocação para a parte aérea das plantas.

Palavras-chaves: *Vitis* sp, metais pesados, fitotoxidez, estresse oxidativo.

7.2 Abstract

BIOCHEMICAL ALTERATIONS OF BLACK OAT PLANTS GROWN IN COPPER CONTAMINATED VINEYARD SOILS

Soils cultivated with grapevines and with a history of cupric fungicide application may present accumulation of copper in soil which may be toxic, thus decreasing growth and causing oxidative stress in plants such as black oat which coexists along and in between the vineyard rows. The objective of this paper is to evaluate growth and oxidative stress parameters in black oat plants grown in copper contaminated vineyard soils. In March 2009 four soils were collected from vineyards located in the Serra Gaúcha region of the state of Rio Grande do Sul (RS) and three from vineyards in the Campanha Gaúcha (RS) region. The experiment was conducted in a greenhouse during June and July where a black oat cultivation was carried out for the period of 40 days in soils derived from vineyards of the Serra Gaúcha and Campanha Gaúcha regions with increasing levels of copper (Cu) and similar values of pH in water, available phosphorus and exchangeable potassium. The accumulation of dry matter of roots and aerial part and the concentration of Cu were evaluated at 15 and 40 days after plant emergence of the plants. Enzymatic biochemical parameters linked to oxidative stress in the aerial part of the plants such as lipid peroxidation, H_2O_2 concentration, superoxide dismutase enzyme (SOD) activity, catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) were evaluated. Further, non-enzymatic parameters linked to oxidative stress in the aerial part of the black oat plants such as ascorbic acid and non-protein thiol group concentrations were also evaluated. The Haplumbrept soil from vineyards of the Serra Gaúcha region and the Typic Hapludalf soil from the vineyards of the Campanha Gaúcha region with a long history of cupric fungicide application present toxic levels of copper for the black oat

plants. Soils with higher Cu availability caused great oxidative stress and the antioxidant system of the black oat plants was not effective enough to reverse the stress condition. The Cu absorbed by plants was accumulated predominantly in the roots of the plants resulting in low translocation to the aerial part of the plants.

Key words: *Vitis* sp, heavy metals, phytotoxicity, oxidative stress.

7.3 Introdução

O estado do Rio Grande do Sul (RS), região Sul do Brasil, possui a maior área cultivada com a videira do país. Nele, a Serra Gaúcha, região Nordeste do estado é a mais antiga região vitivinícola e possui a maior área cultivada com a videira. Porém, nos últimos anos, áreas de campo natural da região da Campanha do RS, região Sudeste, foram incorporadas ao sistema de produção de uva. Nessas duas regiões a videira anualmente é submetida às aplicações sucessivas de fungicidas e, especialmente, caldas, a base de cobre, para a prevenção e controle de doenças fúngicas foliares, uma vez que, em geral, os vinhedos são localizados em áreas com clima úmido (Brunetto et al., 2007). A calda bordalesa, que é uma suspensão coloidal obtida pela mistura de sulfato de cobre, hidróxido de cálcio e água é muito usada para prevenir a incidência de míldio (*Plasmopara viticola*). O seu uso continuado pode adicionar ao sistema de produção de uvas até 30 kg de Cu ha⁻¹ ano⁻¹, que pode chegar até a superfície do solo por causa da unidirecionabilidade da aplicação na planta, pelo escoamento do Cu das folhas durante precipitações ou ainda, pela queda das folhas senescentes (Nachigall et al., 2007). Com isso, ao longo dos anos se espera o acúmulo de Cu, principalmente, nas camadas superficiais do solo, por causa da sua baixa mobilidade e ao não revolvimento do solo (Pietrzak & McPhail, 2004, Komárek et al., 2008, Mirlean et al., 2009; Banas et al., 2010).

O Cu, embora seja um elemento essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Gaetke & Chow, 2003), quando em altas concentrações no solo, pode ser absorvido em maior quantidade pelas plantas e assim causar diversos efeitos negativos como, por exemplo, redução no crescimento do sistema radicular e

parte aérea (Yruela, 2005). Além disso, o excesso de cobre na planta pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) de forma excessiva, tanto nas raízes como na parte aérea das plantas, o que gera o estresse oxidativo nas plantas (Benavides et al., 2005). Um dos principais representantes de EROs é o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o qual é produzido através de uma redução monoelétrica do oxigênio. Nas células, o $O_2^{\cdot-}$ é rapidamente convertido à peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através de sua dismutação espontânea ou enzimática pela ação da enzima superóxido dismutase (Alscher et al., 2002; Fatima & Ahmad, 2004). O H_2O_2 é menos reativo que o $O_2^{\cdot-}$, porém na presença de metais como Ferro (Fe^{2+}) e/ou o Cu^{2+} , ele pode gerar radicais hidroxil (OH^{\cdot}) (Mithöfer et al., 2004). O OH^{\cdot} é provavelmente um dos radicais mais reativos dentre os EROs. A geração de radical hidroxil é o principal mecanismo de toxicidade do Cu que envolve a reação de Fenton catalisada pela presença do metal, que se caracteriza pela produção de radicais hidroxil a partir de radical superóxido e peróxido de hidrogênio, na presença de íons Cu livres na célula (Briat & Lebrun, 1999).

As EROs possuem potencial para interagir de forma não específica com muitos componentes celulares, causando várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação de lipídios de membranas e aumento na carbonilação de proteínas, o que afeta diretamente diversas moléculas essenciais como pigmentos fotossintéticos, proteínas e ácidos nucleicos (Foyer et al., 1994). Com isso, pode ocorrer a paralisação do metabolismo celular (Lin et al., 2005). As alterações na atividade de vários antioxidantes enzimáticos como as enzimas ascorbato peroxidase (APX), superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e na concentração de antioxidante não-enzimáticos como ácido ascórbico e glutatona em plantas, que são utilizados como indicativo da produção excessiva de EROs (Mittler, 2002; Fatima & Ahmad, 2004). Contudo, o efeito tóxico do Cu na planta, diminuindo a produção de matéria seca e/ou causando alterações bioquímicas e fisiológicas na planta, é variável com a espécie vegetal e dependente das características dos solos, como: os valores de pH em água, da capacidade de troca de cátions (CTC), da quantidade e constituição da matéria orgânica (MO) e do teor e do tipo de argilomineral (Carrillo-Gonzalez et al., 2006; Fernández-Calviño et al., 2008). Acredita-se que a aveia preta (*Avena strigosa*), normalmente cultivada nas linhas e entrelinhas dos vinhedos localizados na região Sul

do Brasil, pode ser usada como indicativo do acúmulo excessivo de Cu no solo. O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar parâmetros de crescimento e estresse oxidativo em plantas de aveia preta cultivadas em solos de vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas e acúmulo de cobre no solo.

7.4 Material e Métodos

Descrição do Experimento

O experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. Para a sua realização, em março de 2009, foram coletados quatro solos em vinhedos localizados na região da Serra Gaúcha do RS e três solos de vinhedos na Campanha Gaúcha, também do RS. Os solos foram coletados na camada de 0-20 cm de profundidade e apresentavam níveis crescentes de Cu e valores similares de pH em água, P disponível e K trocável. Os solos depois da coleta foram secos, moídos e reservados para realização do cultivo de aveia preta (*Avena strigosa Schreb.*).

Na Serra Gaúcha os quatro solos foram coletados em vinhedos localizados na área experimental da Embrapa Uva e Vinho, no município de Bento Gonçalves (RS) e foram classificados como Cambissolo Húmico (Embrapa, 2006). Esses solos apresentavam teores crescentes de Cu: 5,5; 95,7; 270,5 e 328,7 mg kg⁻¹ de Cu, extraído por Na₂-EDTA 0,01 mol L⁻¹/acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹, sendo denominados, respectivamente, Cambi MN (solo coletado sob mata nativa), Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3, sendo a sigla “Vn” referente aos solos coletados sob vinhedos. Para fins de comparações, além do tratamento Cambi MN, utilizou-se como testemunha o tratamento Cambi MN + PK, criado pela correção dos níveis de P e K do solo coletado sob mata nativa (Cambi MN). Nesse tratamento foram adicionados, com base nos resultados da análise de solo e de acordo com a CQFS-RS/SC (2004), respectivamente, 55 e 50 mg de P e K por kg de solo. No solo proveniente da mata, que apresentava pH em água de 4,7, antes da aplicação de P e K foi aplicado Ca(OH)₂ e MgO na proporção molar de 2:1, para elevar o pH até 6,0.

Os três solos coletados na Campanha Gaúcha foram oriundos de vinhedos comerciais, localizados em uma propriedade no município de Santana do Livramento (RS) e foram classificados como Argissolo Vermelho (Embrapa, 2006). Esses solos apresentavam teores de: 2,2; 36,8 e 67,2 mg kg⁻¹ de Cu, extraído por Na₂-EDTA 0,01mol L⁻¹/acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹ e foram denominados, respectivamente, de Argi, Arg Vn1 e Arg Vn2. O solo denominado como Argi foi utilizado como testemunha. Esta área era destinada à produção de mudas de videiras e devido ao seu histórico de não aplicação de fungicidas cúpricos, portanto, os teores de Cu nesse solo foram próximos aos originais do solo. Já os solos Argi Vn1 e Vn2 foram coletados sob vinhedos com teores crescentes de Cu. O tempo de cultivo com a videira em cada solo coletado na região da Serra Gaúcha e Campanha, teor de Cu e as coordenadas geográficas são apresentados na tabela 1.

Em junho e julho de 2009, 4 kg de cada solo seco ao ar, moído e reservado foi acondicionado em vasos com capacidade de 5 kg. Em cada vaso foram semeadas 25 sementes de aveia preta (*Avena strigosa Schreb.*), cultivar “UPF moreninha”. Após a emergência foi realizado o raleio, permanecendo 16 plantas em cada vaso. Ao longo do cultivo o solo foi mantido a 80% da capacidade de campo, determinada com amostra deformada em mesa de tensão (1 mpa). A irrigação foi realizada diariamente com água destilada pela reposição da água evapotranspirada, que foi calculada por pesagem diária dos vasos. Ao longo do cultivo da aveia foi realizada duas aplicações de N, totalizando, 45 mg de N por kg de solo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com oito repetições por tratamento.

Um segundo cultivo de aveia preta foi realizado, nos mesmos solos, nos meses de agosto e setembro de 2009. Contudo, optou-se por não apresentar os resultados obtidos neste segundo cultivo, pois estes foram semelhantes aos observados no cultivo realizado nos meses de junho e julho de 2009.

Tabela 1. Tempo de cultivo com videira, teores de cobre (Cu) disponível nos solos coletados na região da Serra e Campanha Gaúcha e suas respectivas coordenadas geográficas.

Solo	Tempo de cultivo, anos	Teor de CuEDTA, mg kg ⁻¹ de solo	Coordenadas geográficas	
Serra Gaúcha				
Cambi MN⁽¹⁾	00	5,5 ⁽²⁾	29°9'41,61" S	51°32'16,70" W
Cambi MN + PK	00	5,2	29°9'41,61" S	51°32'16,70" W
Cambi Vn1	23	95,7	29°9'43,56" S	51°31'40,54" W
Cambi Vn2	30	270,5	29°9'42,27" S	51°31'44,35" W
Cambi Vn3	33	328,7	29°9'41,69" S	51°31'46,45" W
Campanha Gaúcha				
Argi	0	2,2	30°47'13,87" S	55°22'9,79" W
Argi Vn1	25	36,8	30°47'11,47" S	55°22'11,02" W
Argi Vn2	30	67,2	30°48'28,62" S	55°23'10,31" W

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. ⁽²⁾Extraído por Na₂-EDTA 0,01 mol L⁻¹/acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹.

Colheita das plantas de aveia

A aveia preta foi colhida em duas épocas. A primeira colheita foi realizada aos 15 dias depois da emergência (DAE) e a segunda aos 40 DAE. Contudo, antes das coletas das plantas foi realizada a contagem do número de perfilhos por planta. No momento da coleta, a parte aérea de dezesseis plantas de aveia preta foram cortadas rente à superfície do solo e reservadas. Em seguida, oito plantas foram pesadas e imediatamente refrigeradas em caixas térmicas com gelo e, posteriormente foram armazenadas em freezer com a temperatura -30°C. As oito plantas restantes foram pesadas e acondicionadas em sacos de papel. Em seguida, foram secas em estufa com circulação de ar forçado à 65 °C até atingir massa constante. Após a secagem, as amostras foram pesadas, moídas e preparadas para a análise do tecido vegetal. As raízes presentes em cada vaso foram separadas do solo manualmente logo após a retirada da parte aérea das plantas. O solo foi seco, moído e reservado. Já as raízes foram lavadas com EDTA 0,02 mol L⁻¹ e água destilada, para a retirada dos resíduos de solo. Em seguida, as raízes foram acondicionadas em sacos de papel e secas em

estufa com circulação de ar forçada, até 65 °C durante 48 h. Depois de secas, as raízes foram pesadas, moídas e preparadas para as análises. Na parte aérea foi determinado o acúmulo de matéria seca, número médio de perfilhos por planta, o teor total de Cu e parâmetros bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo.

Análises de solo

O solo reservado foi submetido à análise de distribuição granulométrica dos constituintes dos solos, segundo o método da pipeta (Embrapa, 1997). A determinação de pH foi feita em água, na proporção 1:1, de acordo com metodologia proposta por Tedesco et al. (1995). O teor de matéria orgânica do solo (MO) foi analisado por oxidação úmida, usando dicromato de potássio em meio sulfúrico (0,4 N), sendo a determinação realizada por titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,1 N, segundo a Embrapa (1997).

Os teores pseudo-totais de Cu (Cutot) e Zn (Zntot) nas amostras de solo foram extraídos com o uso de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) + ácido nítrico (HNO₃) + ácido clorídrico (HCl), segundo método nº 3050B (EPA, 1996). Para a determinação da fração considerada disponível de Cu (CuEDTA) e Zn (ZnEDTA) foi utilizada a extração com Na₂-EDTA 0,01 mol L⁻¹/acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹ com pH ajustado para 7,0, segundo Chaignon et al. (2009). Tanto os teores disponíveis quanto os teores totais foram mensurados em espectrofotômetro de absorção atômica, marca GBC mod. 932 AA.

A extração do P disponível e K⁺ trocável foi realizada com a solução de Mehlich 1 (HCl 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹). Os teores de P extraído pela solução Mehlich 1 foram determinados de acordo com Murphy & Riley (1962). A concentração de K⁺ trocável foi determinada por espectroscopia de emissão de chama. Os cátions trocáveis Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ foram extraídos com o uso da solução KCl 1 mol L⁻¹ (Embrapa, 1997). A concentração de Al³⁺ foi determinada por titulação ácido-base, com uma solução de NaOH 0,0125 mol L⁻¹, enquanto a concentração de Ca²⁺ e Mg²⁺ foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (EAA) (Tedesco et al., 1995).

A capacidade de troca de cátions efetiva (CTCef) foi obtida pela soma das bases Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ (SB_{KCl+Mehlich-1}), mais Al³⁺ (SB + Al_{KCl}) (CQFS-RS/SC, 2004).

A capacidade de troca de cátions em pH 7 (CTC7) foi estimada pela soma de bases mais H + Al (SB + H + Al_{SMP}). Os valores de H + Al foram estimados pela equação proposta por Kaminski et al. (2002) e adotada pela CQFSRS/SC (2004) (Equação 1):

$$H + Al = \frac{e^{10,665 - 1,1483 * pH_{SMP}}}{10} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: o teor no solo de H + Al é estimado em cmol_c kg⁻¹ e o Índice SMP é a medida do pH de equilíbrio do solo com a solução SMP (Shoemaker et al., 1961). Já a solução SMP tem uma concentração de 1,78 mol L⁻¹ tamponada em pH 7,5, composta por trietanolamina, paranitrofenol, K₂CrO₄, Ca(CH₃COO)₂ e CaCl₂.2H₂O (Tedesco et al., 1995).

Análises de cobre no tecido

O teor total de Cu na parte aérea e raízes de aveia foi extraído através de digestão ácida, onde: em 0,200 g de tecido seco foi adicionado uma mistura de ácido nítrico (HNO₃) concentrado + ácido perclórico (HClO₄), com o uso de aquecimento. Os teores totais de Cu foram determinados usando espectrofotômetro de absorção atômica marca GBC mod. 932 AA.

Análises bioquímicas

Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimado seguindo o método de El-Moshaty et al. (1993), através da determinação da concentração de malondialdeído (MDA), como produto da peroxidação lipídica pela reação com ácido tiobarbitúrico (TBA). Para isso 0,8 g de matéria fresca da parte aérea das plantas de aveia preta foi homogenizado com 8 mL de 0,2 mol L⁻¹ de tampão fosfato-citrato a pH 6,5, contendo 0,5 % Triton X-

100, em uma proporção de 1:20 (p/v), em uma temperatura de 4 °C. Logo depois, o homogeneizado foi filtrado, em duas camadas de papel filtro e, em seguida, centrifugado por 15 min a 20.000 g em centrífuga refrigerada a 4 °C. Um mililitro da fração do sobrenadante foi adicionado a um volume correspondente a 20% (p/v) TCA, contendo 0,5 % (p/v) de TBA. A mistura foi aquecida a 95 °C por 40 min e então rapidamente resfriada em gelo por 15 min. Em seguida, o extrato foi novamente centrifugado a 10.000 g por 15 min, quando o sobrenadante foi pipetado e lido a absorvância de 532 nm. Uma correção para a turbidez não específica foi feita por subtração do valor de absorvância obtida em 600 nm.

Concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A concentração de H₂O₂ na matéria fresca da parte aérea das plantas de aveia preta foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Loreto e Velikova (2001). Aproximadamente 0,1 g de matéria fresca foi macerada com a adição de 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1 % (p/v) a 4 °C. Logo depois, o homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g por 15 min em centrífuga refrigerada a 4 °C e, em seguida no sobrenadante foi adicionado 0,5 mL de tampão de fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 e 1 mL de KI 1 mol L⁻¹. A concentração de H₂O₂ do sobrenadante foi determinada por comparação a uma curva padrão de calibração à absorvância de 390 nm.

Atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase foi determinada usando o método de Misra e Fridovich (1972). Aproximadamente 0,2 g de matéria fresca da parte aérea das plantas de aveia preta foram homogeneizados com a adição de 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,8), contendo 0,1 mmol L⁻¹ de EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100 e 2 % PVP (p/v). Logo após, o extrato foi filtrado com o uso de papel filtro e, em seguida, o extrato foi centrifugado a 22.000 g por 10 min a 4 °C. A mistura de reação consistiu de um volume final de 1 mL, contendo tampão glicina (pH 10,5), e 17 µL de epinefrina (1 mmol L⁻¹) e material enzimático. A epinefrina foi o último

componente a ser adicionado. A formação do adenocromo nos primeiros 4 min foi determinada a 480 nm em um espectrofotômetro UV-Visível. A unidade de atividade de SOD foi expressa como a quantidade de enzima requerida para causar 50 % de inibição da oxidação da epinefrina nas condições experimentais.

Atividade da enzima catalase

A atividade da enzima catalase foi determinada de acordo com o método modificado por Aeby (1984). Aproximadamente 0,2 g de matéria fresca da parte aérea das plantas de aveia preta foi homogeneizada com a adição de 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,8), contendo 0,1 mmol L⁻¹ de EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100 e 2 % PVP (p/v). O extrato do homogeneizado foi filtrado, usando papel filtro e, em seguida, centrifugado a 12.000 g por 20 min a 4 °C. A atividade da catalase foi obtida pelo desaparecimento do H₂O₂, checada na absorbância de 240 nm em uma mistura de reação com volume final de 2 mL, contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), 15 mM H₂O₂ e 30 µL de extrato da planta.

Atividade da enzima ascorbato peroxidase

Para a determinação da atividade da enzima APX 0,2 g de matéria fresca da parte aérea das plantas de aveia preta foi homogeneizada com a adição de 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mmol L⁻¹ (pH 7,8), contendo 0,1 mmol L⁻¹ de EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100 e 2 % PVP (p/v). Logo após, o extrato foi filtrado com o uso de papel filtro e, em seguida, o extrato foi centrifugado a 22.000 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi usado para determinar a atividade enzimática, de acordo com o método modificado por Zhu et al. (2004). A mistura de reação em um volume total de 2 mL consistiu de 25 mmol L⁻¹ tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 0,1 mmol L⁻¹, EDTA, 0,25 mmol L⁻¹ de ácido ascórbico, 1,0 mmol L⁻¹ de H₂O₂ e 100 µL extrato. O H₂O₂ dependente de ascorbato foi determinado por uma diminuição do valor de absorbância a 290 nm, usando o coeficiente de extinção molar 2,8 mM cm⁻¹.

Concentração de ácido ascórbico e grupos tióis não protéicos

Para a determinação da concentração de ácido ascórbico e grupos tióis não protéicos 1,0 g de matéria fresca da parte aérea das plantas de aveia preta foi homogeneizada com 5 mL de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl e 10 mL L⁻¹ Triton X-100 (pH 7,5). Em seguida, o extrato obtido foi centrifugado a 6.800 g por 10 min. No extrato obtido foi adicionado TCA a 10 % na proporção de 1:1 (v/v) e, logo depois, foi submetido à centrifugação (6.800 g por 10 min), para separação do precipitado protéico. O sobrenadante foi utilizado para determinação do conteúdo de ácido ascórbico (AsA) e o conteúdo de grupos tióis não protéicos (NPSH).

A determinação de AsA foi realizada conforme descrito por Jacques-Silva et al. (2001). Uma alíquota da amostra (300 µL) foi incubada a 37 °C em meio contendo 100 ml TCA 13,3 %, 100 mL de água deionizada e 75 mL DNPH. Após 3 horas foi adicionado 500 mL de H₂SO₄ 65 % e, posteriormente foi realizada a leitura de absorbância a 520 nm. A curva padrão foi construída usando ácido ascórbico L⁽⁺⁾.

A concentração de NPSH na matéria fresca da parte aérea das plantas de aveia preta foi determinada por espectrofotometria, com reagente de Ellman (Ellman, 1959). Em uma alíquota da amostra (400 µL) foi adicionado o meio contendo 550 mL 1 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH 7,4). A reação foi lida em 412 nm após a adição de 10 mM 5-5-dithio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (0,05 mL). Uma curva padrão usando cisteína foi utilizado para calcular o teor de grupos tióis nas amostras.

Concentração de proteína

A concentração de proteína das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976), onde 50 µL do homogeneizado foi adicionado em 2,5 mL de Coomassie Blue. Em seguida, em uma alíquota foi realizada a leitura da absorbância a $\lambda = 595$ nm, utilizando-se, como padrão, curva de albumina sérica bovina.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, e quando significativo, foram submetidos ao teste de comparação de médias de Tukey, tomando por base os níveis de significância maiores que 95 %.

7.5 Resultados

Acúmulo de Cu no solo

Foram observados acúmulos expressivos de Cu no solo Cambissolo Húmico, coletado nos vinhedos localizados na Serra Gaúcha, e no solo Argissolo Vermelho, coletado na Campanha Gaúcha do RS, ambos com histórico de aplicação de fungicidas a base de cobre (Tabela 2). Nos solos argilosos da Serra Gaúcha, com mais de 30 anos de cultivo com a videira (Cambi Vn3), foi encontrado até 60 vezes mais Cu disponível, extraído por $\text{Na}_2\text{-EDTA } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, comparativamente ao solo sem cultivo de videiras (Cambi MN). Por outro lado, nos solos coletados na região da Campanha Gaúcha, os teores de Cu disponível, extraídos por $\text{Na}_2\text{-EDTA } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ em solos com mais de 30 anos de cultivo (Argi Vn2), foram 30 vezes maiores que o teor encontrado no solo sem cultivo de videira (Tabela 2). Além disso, os solos coletados em vinhedos nas duas regiões vitivinícolas apresentaram alta disponibilidade de K trocável e P disponível (CQFS RS/SC, 2004), ambos extraídos por Mehlich 1.

Os teores de Cu pseudo-total (Cutot) nos solos de vinhedos com mais de 30 anos de cultivo foram 16,0 e 6,5 maiores, quando comparado com os solos sem cultivo de videiras, respectivamente para o Cambissolo e Argissolo. Além disso, como se pode observar na tabela 2, os teores de Cu disponível, extraído por $\text{Na}_2\text{-EDTA } 0,01 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ e na forma pseudo-total (Cutot), observados nos solos coletados em vinhedos da Campanha foram, em torno de 6,0 vezes menores nos solos com maiores teores de Cu (Cambi Vn3 e Argi Vn2), comparativamente aos encontrados nos solos da Serra Gaúcha (Tabela 2).

Tabela 2. Atributos químicos e físicos dos solos coletados em vinhedos, na camada de 0 - 20 cm, nas regiões da Serra e da Campanha Gaúcha.

Parâmetros	Cambi	Cambi	Cambi	Cambi	Cambi	Argi	Argi	Argi
	MN	MN+PK	Vn1	Vn2	Vn3		Vn1	Vn2
Areia, g kg ⁻¹	346	346	298	345	320	675	661	705
Silte, g kg ⁻¹	391	391	373	353	370	260	264	205
Argila, g kg ⁻¹	263	263	329	302	310	65	75	90
pH _{H2O}	5,8a [*]	5,8a	5,2c	5,3c	5,3c	5,5b	5,3c	5,2c
MO, g kg ⁻¹	33,9c	34,3bc	27,3d	37,9a	35,9b	11,2e	12,1e	9,2f
Al, cmol _c kg ⁻¹	0,00	0,00	0,05ab	0,02b	0,03b	0,00	0,06a	0,03b
H+Al, cmol _c kg ⁻¹	2,8d	2,6de	4,2ab	4,5a	3,8b	2,3e	3,2c	2,9cd
CTCef, cmol _c kg ⁻¹	8,6a	8,8a	6,0c	8,0b	8,0b	2,4d	2,2d	1,6e
CTC7, cmol _c kg ⁻¹	11,4b	11,5b	10,2c	12,5a	11,8b	4,6e	5,4d	4,4e
V, %	75,4a	76,0a	58,9d	64,4c	67,4b	50,6e	40,2f	34,9g
CuEDTA, mg kg ⁻¹	5,5f	5,2f	95,7c	270,5b	328,7a	2,2g	36,8e	67,2d
Cutot, mg kg ⁻¹	29,8f	29,0f	183,0c	408,3b	490,3a	11,3g	51,6e	73,1d
ZnEDTA, mg kg ⁻¹	2,3f	2,2f	13,8c	18,7b	21,0a	2,5f	7,0e	10,2d
Zntot, mg kg ⁻¹	59,2b	60,6b	81,0a	84,6a	81,8a	8,2c	10,8c	16,4c
P, mg kg ⁻¹	4,8g	18,2f	35,6d	20,0f	27,0e	48,5c	70,7a	65,7b
K, mg kg ⁻¹	110,9c	130,5b	267,0a	90,2c	112,0c	129,5b	101,0bc	73,7c
Ca, cmol _c kg ⁻¹	4,6b	4,7b	3,7c	5,9a	5,6a	1,4d	1,3d	1,0d
Mg, cmol _c kg ⁻¹	3,7a	3,7a	1,6d	1,9c	2,1b	0,6e	0,6e	0,4f

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. *Dados seguidos pelas mesmas letras em cada linha não diferem significativamente (teste de tukey, p <0,05).

Crescimento e concentração de Cu nas plantas

As plantas de aveia preta cultivadas nos solos com maiores teores de CuEDTA (Cambi Vn2, Vn3 e Argi Vn2) apresentaram menor acúmulo de matéria seca da parte aérea aos 15 e aos 40 DAE, quando comparado as plantas cultivadas nos solos sem cultivo de videiras (Cambi MN + PK e Argi) (Tabela 3). Além disso, também se observou redução no acúmulo de matéria seca de raízes nos solos com altas concentrações de CuEDTA no solo, quando as plantas foram coletadas aos 40 DAE (Tabela 3). Entretanto, as plantas cultivadas no solo Cambi MN, que apresentava baixo teor de CuEDTA e baixo teor de P disponível, também apresentaram crescimento reduzido aos

40 DAE, quando comparado ao solo Cambi MN + PK. Também se verificou que as plantas de aveia preta cultivadas nos solos com altos teores de Cu e coletados sob vinhedos das duas regiões (Cambi Vn2 e Vn3 e Argi Vn2), aos 40 DAE, apresentaram ausência de perfilhos, o que se refletiu em menor produção de matéria seca da parte aérea (Tabela 3).

Tabela 3. Acúmulo de matéria seca (MS) de raízes e parte aérea, concentração de Cu nas raízes e parte aérea e número de perfilhos aos 15 e 40 dias após a emergência (DAE), em plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos na Serra e na Campanha Gaúcha.

Solo	Matéria seca, mg planta ⁻¹		Concentração de Cu, mg kg ⁻¹ MS		Número de perfilhos
	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	
15 DAE					
Cambi MN⁽¹⁾	10,0±3,0*	22,0±3,0a	15,2±2,9d	11,7±0,8d	-
Cambi MN + PK	10,0±1,0	23,0±3,0a	11,2±1,6d	14,2±2,1cd	-
Cambi Vn1	9,0±1,0	18,0±1,0bc	104,9±11,2c	11,3±0,6d	-
Cambi Vn2	10,0±1,0	14,0±1,0d	184,9±12,7b	17,2±1,8bc	-
Cambi Vn3	11,0±1,0	13,0±2,0d	169,3±12,2b	28,7±1,7a	-
Argi	10,0±1,0	22,0±2,0a	13,5±2,0d	17,1±2,1bc	-
Argi Vn1	11,0±1,0	16,0±2,0cd	117,2±4,5c	20,3±2,8b	-
Argi Vn2	11,0±9,0	15,0±1,0cd	251,2±12,9a	31,1±2,3a	-
40 DAE					
Cambi MN⁽¹⁾	21,0±1,0d*	55,0±1,0d	19,5±0,1d	16,8±1,3ef	-
Cambi MN + PK	34,0±2,0ab	155,0±4,0a	18,9±1,7d	15,0±1,7ef	2,07±0,5a
Cambi Vn1	26,0±2,0c	99,0±5,0c	230,5±8,7c	38,3±2,2a	0,87±0,2c
Cambi Vn2	25,0±3,0cd	33,0±5,0e	523,3±14,2b	18,0±1,2de	-
Cambi Vn3	23,0±1,0cd	39,0±4,0e	666,5±83,3a	32,3±2,8b	-
Argi	38,0±1,0a	160,0±8,0a	24,2±1,5d	13,7±1,5f	1,60±0,5b
Argi Vn1	37,0±2,0b	117,0±3,0b	223,2±12,4	21,7±1,5d	1,67±0,6ab
Argi Vn2	32,0±1,0b	64,0±2,0d	738,9±26,2a	27,7±1,4c	-

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. Os dados são médias ± DP de quatro repetições. Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa em cada avaliação particular (teste de tukey, p <0,05).

Os teores de Cu na parte aérea e nas raízes das plantas de aveia preta cultivadas nos solos Cambissolo e Argissolo coletados em vinhedos, aos 15 e 40 DAE foram maiores que os encontrados nas plantas cultivadas nos solos testemunhas, Cambi MN + PK e Argi, respectivamente (Tabela 3). A exceção foi observada na parte aérea das plantas cultivadas no solo Cambi Vn1 e coletadas aos 15 DAE, onde não se observou incremento nos teores de Cutot, quando comparado ao solo Cambi MN + PK. Contudo, as concentrações de Cu nas raízes das plantas cultivadas no solo Cambi Vn3 e Argi Vn2, aos 15 DAE foram 6,0 e 8,0 vezes maiores, respectivamente, quando comparado aos teores obtidos na parte aérea das plantas desses mesmos tratamentos. Já aos 40 DAE os teores de Cu nas raízes das plantas cultivadas nos solos Cambi Vn3 e Argi Vn2 foram, respectivamente, 20,0 e 26,0 vezes maiores quando comparado aos teores encontrados na parte aérea das plantas.

Peroxidação lipídica, concentração de H₂O₂, e atividade das enzimas SOD, CAT e APX

A redução no crescimento da parte aérea da aveia preta, bem como os sintomas de clorose internerval, ocorreu concomitantemente com o aumento da peroxidação lipídica (Figura 1). O nível de peroxidação lipídica foi determinado pela concentração MDA, que é um indicativo do aumento de estresse oxidativo na planta. No presente estudo, a maior concentração de MDA na parte aérea das plantas cultivadas em ambos os solos Cambissolo e Argissolo foi observado nas duas coletas, 15 e 40 DAE, nos solos com maiores teores de Cu e no solo derivado da mata nativa (Cambi MN). Além disso, também se observou aumento nos teores de H₂O₂ na parte aérea da aveia, aos 15 e 40 DAE, cultivadas nos solos Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3, quando comparado ao solo Cambi MN + PK (Figura 1). Por outro lado, na parte aérea da aveia cultivada nos solos derivados da Campanha Gaúcha se observou somente incremento nos teores de H₂O₂ aos 40 DAE e no solo Argi Vn2, que apresentava maior teor de CuEDTA, comparativamente ao solo Argi, que não possuía histórico com aplicação de Cu.

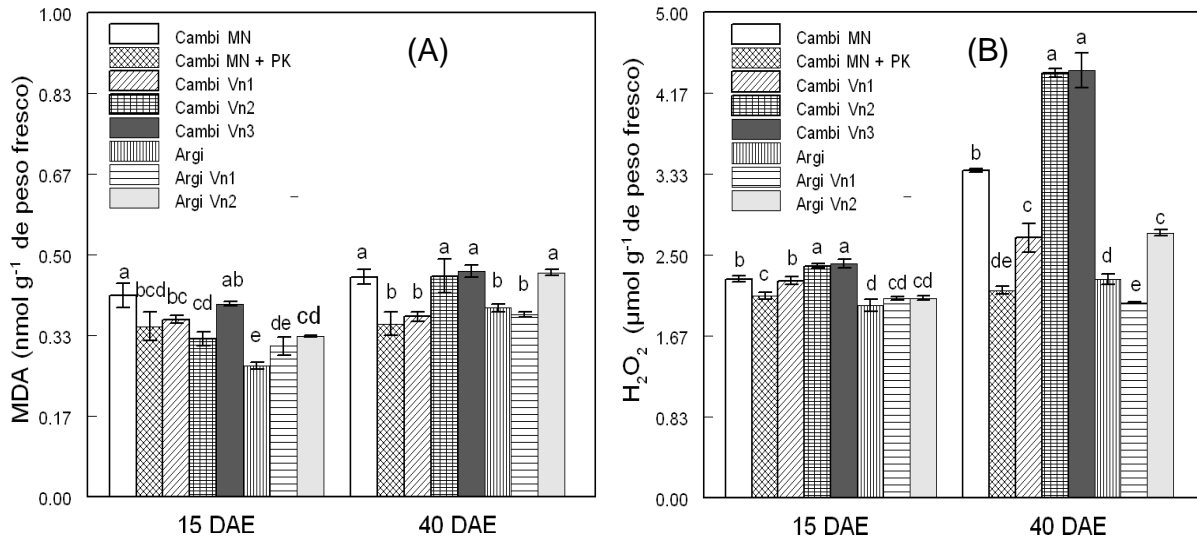


Figura 1. Concentração de malondialdeído (MDA) (A) e teor de peróxido de hidrogênio (B) na parte aérea de plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas cúpricos. Plantas coletas aos 15 e 40 dias após a emergência das plantas (DAE). Os dados são médias ± DP de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa em uma coleta particular (teste de tukey, p <0,05).

A atividade da enzima SOD na parte aérea da aveia preta, aos 15 DAE foi maior quando cultivada nos solos argilosos com maiores teores de CuEDTA, Cambi V2 e Cambi Vn3, quando comparado ao solo Cambi MN + PK (Figura 2A). Entretanto, a atividade desta enzima foi inibida na parte aérea das plantas de aveia preta cultivadas nos solos arenosos com maiores teores de Cu (Argi Vn1 e Argi Vn2). Por outro lado, aos 40 DAE a atividade da enzima SOD na parte aérea das plantas de aveia preta foi inibida nos solos Cambissolo e Argissolo, coletados sob os vinhedos (Cambi Vn1, Cambi Vn2, Cambi Vn3, Argi Vn1 e Argi Vn2), quando comparado aos solos sem adição de Cu, Cambi MN + PK e Argi. Essa inibição foi maior nas plantas cultivadas nos solos que apresentavam maiores teores de CuEDTA, corroborando com o aumento nos teores de MDA e de H₂O₂ (Figura 1).

A atividade da enzima CAT na parte aérea das plantas de aveia coletadas aos 40 DAE aumentou nas plantas cultivadas no solo Cambi MN, Cambi Vn2 e Cambi Vn3, quando comparado ao solo Cambi MN + PK (Figura 2B). Em adição, a atividade da

enzima CAT aumentou na parte aérea das plantas de aveia cultivada no solo Argi Vn2, quando comparado ao solo Argi.

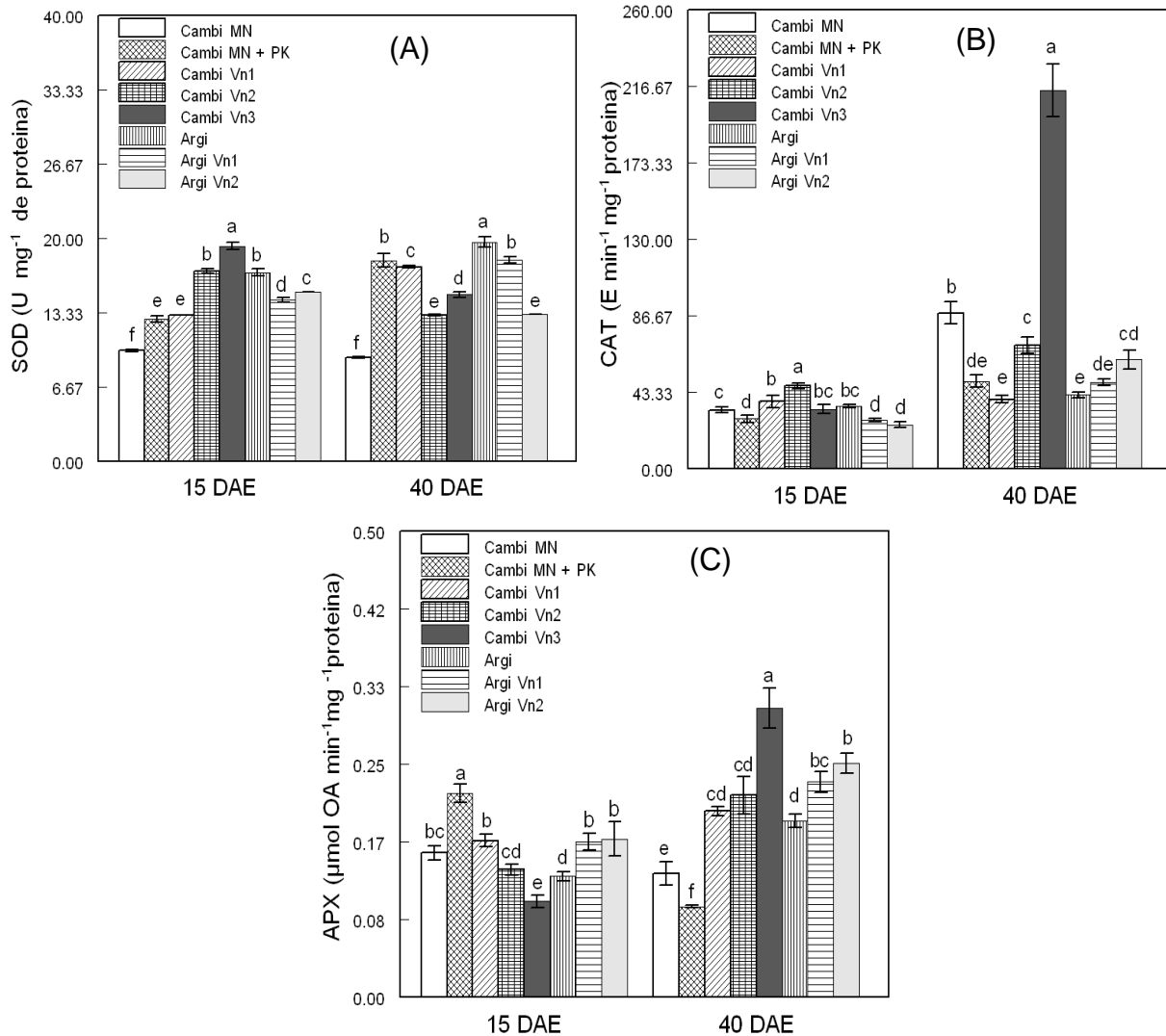


Figura 2. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (A), atividade da enzima catalase (CAT) (B), atividade da enzima ascorbato peroxidase (APX) (C), na parte aérea de plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas cúpricos. Plantas coletas aos 15 e 40 dias após a emergência das plantas (DAE). Os dados são médias \pm DP de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa em uma coleta particular (teste de tukey, $p < 0,05$).

A atividade da enzima APX na parte aérea da aveia preta, aos 15 DAE foi inibida quando as plantas foram cultivadas nos solos Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3,

quando comparado ao solo controle, Cambi MN + PK (Figura 2C). Entretanto, a atividade desta enzima foi maior na parte aérea das plantas cultivadas nos solo Argi Vn1 e Argi Vn2, quando comparado a parte aérea das plantas cultivadas no solo sem adição de Cu (Argi). Por outro lado, a atividade da enzima APX, aos 40 DAE, aumentou na parte aérea das plantas cultivadas nos solos Cambissolo e Argissolo (Cambi Vn, Vn2 e Vn3, Argi Vn1 e Vn2), coletados em vinhedos, respectivamente, quando comparado aos solos Cambi MN + PK e Argi, sem adição de Cu.

A concentração de AsA na parte aérea das plantas de aveia preta coletadas aos 15 DAE aumentou quando foram cultivadas, apenas, no Argissolo com maior teor de CuEDTA (Argi Vn2) (Figura 3A). Por outro lado, a concentração de AsA nas plantas coletadas aos 40 DAE aumentou na parte aérea das plantas cultivadas nos Cambissolos com altos teores de Cu (Cambi Vn2 e Vn3) e nos Argissolos coletados nos vinhedos Argi Vn1 e Vn2, respectivamente, quando comparado aos solos sem adição de Cu (Cambi MN + PK e Argi). Contudo, nos solos Cambissolos, as maiores concentrações de AsA na parte aérea foram encontradas nas plantas cultivadas no solo Cambi MN, sem adição de fertilizantes, onde se tinha baixa disponibilidade de nutrientes, entre eles o P (Tabela 2), e onde se observou baixo crescimento das plantas.

A concentração de grupos tióis não protéicos (concentração de NPSH) aos 40 DAE foi maior na parte aérea das plantas de aveia preta cultivadas nos solos Cambi Vn2 e Cambi Vn3, e nos solos Argi Vn1 e Argi Vn2, respectivamente, quando comparado às plantas cultivadas nos solos com baixa concentração de CuEDTA (Cambi MN + PK e Argi) (Figura 3B), comportamento semelhante ao observado para as concentrações de AsA. Por outro lado, não se observou alteração nas concentrações de AsA e de NPSH na parte aérea das plantas cultivadas no Cambi Vn1, que apresentaram teores intermediários de CuEDTA. Além disso, assim como observado para as concentrações de AsA, a maior concentração de NPSH foi observada na parte aérea das plantas cultivadas no solo Cambi MN.

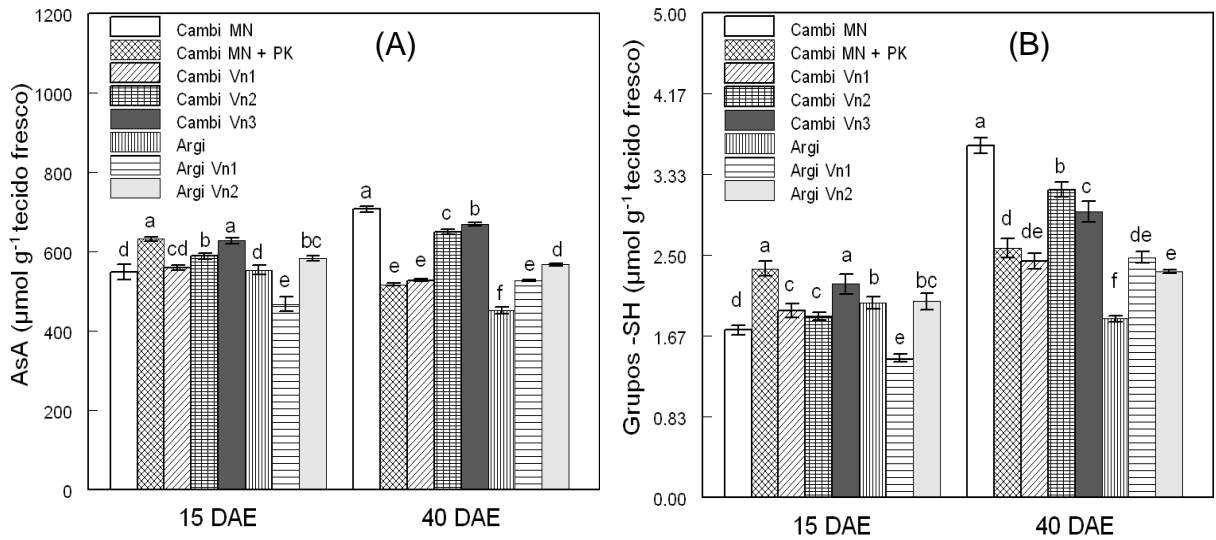


Figura 3. Concentração de ácido ascórbico (AsA) (A), concentração de grupos tióis não protéicos (NPSH) (B), na parte aérea de plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas cúpricos. Plantas coletas aos 15 e 40 dias após a emergência das plantas (DAE). Os dados são médias \pm DP de três repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa em uma coleta particular (teste de tukey, $p < 0,05$).

7.6 Discussão

O incremento expressivo nos teores disponíveis (CuEDTA) e pseudo-totais de Cu (Cutot) nos solos da Serra e Campanha Gaúcha está associado ao uso frequente e em longo prazo de fungicidas a base de Cu, como a calda bordalesa ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$), comumente utilizada na prevenção e controle de doenças fungicas foliares (Brun et al., 2001; Mirlean et al., 2007; Fernández-Calviño et al., 2009; Mirlean et al., 2009; Banas et al., 2010). Os teores de Cutot encontrados nos solos coletados em vinhedos da Serra Gaúcha são elevados, contudo ainda são inferiores aos observados em outros estudos como o de Mirlean et al. (2007), que encontraram teores maiores que $1.200 \text{ mg de Cu total kg}^{-1}$, em um solo de vinhedo da Serra Gaúcha, com 40 anos de cultivo. Além disso, como pode se observar na tabela 2, os teores pseudo-totais de Cu (Cutot) nos solos coletados em vinhedos da Serra Gaúcha (Cambi Vn2 e Vn3), apresentaram valores acima do limiar de referência de qualidade, que seria de 200 mg kg^{-1} para o Cu, estabelecido pelo CONAMA (2009), o que indica o acúmulo excessivo do elemento do solo.

Os teores de CuEDTA e Cutot encontrados nos solos Argissolo Vermelho coletados em vinhedos da Campanha Gaúcha, com maior acúmulo de Cu, foram em torno de 6,0 vezes menores, que os encontrados nos solos Cambissolo Húmico da Serra Gaúcha, com maior acúmulo de Cu (Tabela 2). Esse comportamento pode ser explicado pela composição natural do solo, como se observa no solo Cambi MN, que apresentava teor de 29 mg de Cutot kg⁻¹, enquanto o solo testemunha da Campanha, não oriundo de vinhedo, apresentava teor de 11 mg de Cutot kg⁻¹. Também é importante destacar que os solos Argissolos da Campanha apresentam menores teores de MO e argila, se comparado ao solo Cambissolo Húmico da Serra Gaúcha (Tabela 2) e isso pode ter sido determinante para os menores teores totais de Cu nos solos da Campanha, quando comparado aos solos da Serra Gaúcha. Entretanto, os solos coletados nos vinhedos das duas regiões vitivinícolas apresentaram alta disponibilidade de nutrientes como o P disponível e K trocável (CQFS-RS/SC, 2004), o que é benéfico para o desenvolvimento das plantas. Essa alta disponibilidade de P disponível e K trocável se deve ao histórico de aplicação de fertilizantes fosfatados e potássicos solúveis e/ou orgânicos, muitas vezes acima do exportado pela produção.

As altas concentrações de CuEDTA no solo causaram drástica redução nos parâmetros de crescimento avaliados, como a matéria seca da parte aérea e raízes e o número médio de perfilhos por planta de aveia preta, cultivada nos solos coletados em vinhedos nas duas regiões (Tabela 3). Estes resultados demonstram que apesar do Cu ser um elemento essencial para o crescimento das plantas e ter funções importantes em muitos processos fisiológicos, como a fotossíntese, a respiração, a distribuição de carboidratos, a redução e a fixação do N, e o metabolismo de proteínas (Yruela, 2005), é tóxico para as plantas, quando em altas concentrações no solo (Michaud et al., 2007; Michaud et al., 2008; Bravin et al., 2010).

Convém ressaltar que se verificou grande redução do crescimento das plantas cultivadas em solos Argissolos coletados em vinhedos da Campanha Gaúcha, mesmo que apresentaram valores abaixo do estabelecido como limiar, 200 mg de Cu kg⁻¹ de solo (CONAMA, 2009). Com isso, se pode inferir que o valor estabelecido por essa normativa não é adequada para solos arenosos, como é o caso dos solos Argissolos coletados em vinhedos da região da Campanha Gaúcha. Isso porque o comportamento

dos metais é influenciado por atributos da fase sólida do solo, como tipo de adsorvente (matéria orgânica, minerais silicatados, óxidos de ferro e manganês, e grupos fosfatos) e as condições geoquímicas da solução, em especial, da concentração de prótons e da força iônica (McBride, 1994; Alloway, 1995).

O acúmulo de Cu ocorreu predominantemente nas raízes, não ocorrendo translocação proporcional para a parte aérea das plantas (Tabela 3). Isso evidencia que as plantas de aveia, assim como outras espécies, possuem mecanismos em seu sistema radicular que podem impedir ou reduzir a translocação de parte do excedente de Cu absorvido, como observado em outras espécies (Brun et al., 2001; Chaignon et al., 2003; Chaignon e Hinsinger, 2003; Cornu et al. 2007; Michaud et al., 2007). Este comportamento tem sido descrito como mecanismo de tolerância ao excesso de Cu. Em função disso, a acumulação de metais em raízes, como o cobre, pode minimizar os efeitos adversos dos metais no crescimento da parte aérea (Marschner, 1995). Contudo, se observou neste estudo drástica redução no crescimento, tanto na parte aérea como das raízes das plantas de aveia preta (Tabela 3). Esta redução ocorreu de forma concomitante ao acúmulo excessivo de Cu nas raízes e alterações nos parâmetros bioquímicos avaliados.

O acúmulo de Cu foi semelhante nas raízes e na parte aérea das plantas cultivadas em ambos os solos Cambissolo e Argissolo (Tabela 3). Contudo, os teores pseudo-totais e disponíveis de Cu (CuEDTA) no solo foram em torno de 6 vezes maiores no Cambissolo, naquele que apresentou maior teor de Cu (Cambi Vn3), comparativamente ao solo Argissolo com maior teor de Cu (Argi Vn2). Isso indica que a biodisponibilidade dificilmente será detectada por extração química (McBride 2001; Chaignon et al., 2003) e outros parâmetros devem ser relacionados para se determinar o limiar de toxidez para determinada espécie de planta, em diferentes solos.

Peroxidação lipídica, concentração de H₂O₂, e atividade das enzimas SOD, CAT e APX

Nos solos que apresentavam maiores teores de CuEDTA, também se observou redução no crescimento e sintomas de clorose internerval, sintomas comumente

observados em plantas submetidas à toxidez por Cu o que está associado a diminuição na concentração de clorofila, bem como mudanças na estruturas das membranas dos tilacóides (Basynski et al., 1988). De forma concomitantemente se observou o aumento do nível de peroxidação lipídica (Figura 1A), que foi determinado pela concentração de MDA. O aumento dos níveis de peroxidação lipídica na parte aérea das plantas de aveia preta indica o acúmulo excessivo de Cu no solo. No presente estudo, se observou o aumento do nível de H_2O_2 nas plantas cultivadas nos solos Cambissolos (Cambi Vn1, Vn2 e Vn3), quando coletadas aos 40 DAE, e no solo de mata nativa (Cambi MN). Por outro lado, a peroxidação lipídica na parte aérea das plantas aumentou somente nos solos Cambi Vn2 e Vn3. Nos solos Argissolos, as plantas coletadas aos 40 DAE somente apresentaram aumento do nível de H_2O_2 e de MDA, quando cultivadas no solo Argi Vn2. Esse comportamento indica menor nível de estresse oxidativo na parte aérea das plantas de aveia preta cultivadas no solo Cambi Vn1 e Argi Vn1.

O aumento nos teores de MDA pode ser resultado do aumento nos teores de H_2O_2 na parte aérea das plantas de aveia preta, que ocorreram nas plantas cultivadas nos solos Cambi Vn2 e Vn3 e Argi Vn2, o que indica o acúmulo excessivo de Cu no solo. O H_2O_2 é um oxidante que pode causar dano celular como a carbonilação de proteínas ou até mesmo a morte celular (Bienert et al. 2006). Além disso, o Cu por ser um metal com mais de um estado de oxidação *in vivo* (Cu^+ e Cu^{2+}) pode catalisar a formação de EROs. Os metais como o Ferro (Fe^{2+}) ou o Cu^{2+} podem gerar radicais hidroxil (OH^{\cdot}) (Mithöfer et al., 2004) e esse radical hidroxil é o principal mecanismo de toxicidade do Cu e envolve a reação de Fenton catalisada pela presença do metal, que se caracteriza pela produção de radicais hidroxil, a partir de superóxido e peróxido de hidrogênio, na presença de íons livres de Cu na célula (Briat & Lebrun, 1999). A presença excessiva de EROs induz a severa peroxidação lipídica, por causa da remoção do hidrogênio de ácidos graxos insaturados constituintes de membranas celulares, como relatado por Mishra et al. (2006).

Por outro lado, a alta concentração de MDA e de H_2O_2 , nas plantas cultivadas no solo Cambi MN, pode estar relacionado a baixa disponibilidade de P disponível no solo. Esses resultados estão em conformidade com os obtidos por Tewari et al. (2004), onde níveis baixos de P disponível e de K trocável no solo, ocasionaram o aumento na

concentração de MDA em plantas de milho. Além disso, neste tratamento também se observou aumento na atividade da enzima CAT, quando comparado ao tratamento mata + PK, onde a disponibilidade de P disponível e K trocável eram maiores.

O acúmulo excessivo de Cu no solo também alterou a atividade de antioxidantes enzimáticos como a enzima SOD, na parte aérea das plantas de aveia preta. A SOD é um componente essencial do sistema antioxidante de defesa de estresse nas plantas, catalisando a dismutação do radical superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (Mittler, 2002). Nas plantas coletadas aos 15 DAE, houve o aumento na atividade da enzima SOD nos tratamentos onde os solos apresentavam altos teores de Cu, onde se observou altas concentrações de H_2O_2 . O aumento na atividade da SOD pode ter ocorrido por causa do aumento da concentração de radical superóxido, o que induz à síntese de novas unidades enzimáticas (Verma & Dubey 2003; Fátima e Ahmad 2004). Por outro lado, no presente estudo, o teor de H_2O_2 na parte aérea das plantas foi negativamente relacionado com a atividade da enzima SOD (Figura 3), aos 40 DAE. Esta redução da atividade da enzima SOD na parte aérea das plantas coletadas aos 40 DAE pode ser explicada pelo aumento dos níveis de H_2O_2 . Isso porque o H_2O_2 pode inativar enzimas por oxidação dos grupos tióis (Aebi 1984). Além disso, altas concentrações de Cu em solos podem reduzir a absorção e translocação de Fe e Mn para a parte aérea das plantas (Ait Ali et al., 2002). Assim, estes resultados sugerem que a redução da atividade da enzima SOD na parte aérea das plantas cultivadas em solos com excesso de Cu pode resultar na deficiência de metais essenciais para a ação catalítica dessa enzima. Isso porque a enzima SOD é uma metaloenzima que possui, dependendo da isoforma, na sua composição o Fe, o Cu/Zn ou Mn, nos seus grupos prostéticos. Além disso, a formação de EROs de forma excessiva pode causar uma sobrecarga de substrato para a SOD, levando à sua inibição (Chamseddine et al., 2009), o que foi observado na parte aérea das plantas coletadas aos 40 DAE e cultivadas nos solos coletados em vinhedos.

A atividade da enzima CAT, outro importante antioxidante enzimático responsável pela degradação de H_2O_2 , teve sua atividade aumentada na parte aérea das plantas cultivadas nos solos com maiores teores de CuEDTA, em ambos os solos Cambissolos e Argissolos. Além disso, a atividade da enzima CAT foi relacionada ao

aumento do teor de MDA na parte aérea das plantas, como observado naquelas coletadas aos 40 DAE e cultivadas nos solos com maiores teores de Cu. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos onde a indução da atividade da enzima CAT em folhas de *Arabidopsis thaliana* foi concomitante ao rápido aumento da concentração de H_2O_2 , depois da aplicação de Cu (Maksymiec & Krupa, 2006).

A atividade da enzima APX, assim como observado para enzima CAT, foi aumentada na parte aérea das plantas de aveia preta cultivadas nos solos coletados em vinhedos. Isso sugere que o sistema antioxidante envolvido na conversão de H_2O_2 e O_2 para a água foi induzido por causa do acúmulo excessivo de Cu no solo. A APX é um componente da via glutathiona-ascorbato, que desempenha um papel em limpeza H_2O_2 (Asada, 1992). O H_2O_2 é um sinal sistêmico para a indução da APX (Morita et al., 1999). Além disso, estudos indicam que a exposição de plantas como *Phaseolus vulgaris* a concentrações altas de Cu em solução nutritiva estimula a atividade da enzima APX (Gupta et al., 1999).

Nas plantas o controle dos níveis de EROs também é realizado por antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, glutathiona e tocoferol (Schützendübel et al., 2002). Neste estudo foram determinados os teores de AsA e NPSH, os dois principais componentes nas células vegetais que regulam a concentração de H_2O_2 em alguns compartimentos celulares (Mittler, 2002). Nossos resultados indicaram que o teor de AsA foi aumentado significativamente na parte aérea das plantas de aveia preta cultivadas nos solos com altos teores de Cu e quando cultivadas no solo Cambi MN, que possuía baixa disponibilidade de P. Isso sugere, um aumento na produção de ascorbato reduzido para realizar a limpeza de H_2O_2 , uma reação catalisada pela APX.

Os teores AsA e NPSH aumentaram na parte aérea das plantas coletadas aos 40 DAE e cultivadas nos solos com maiores teores de Cu (CuEDTA). Isso indica que a exposição ao estresse oxidativo aumenta o acúmulo de ácido ascórbico e de NPSH nos tecidos, como resposta da planta à condição de estresse. Além disso, o AsA estaria envolvida na regulação da fotossíntese e na expansão celular (Horemans et al., 2000). Contudo, se observa que os teores de AsA e NPSH não foram alterados na parte aérea das plantas coletadas aos 40 DAE e cultivadas no solo Cambi Vn1, que apresentava $95,7 \text{ mg kg}^{-1}$ de CuEDTA, quando comparado as plantas cultivadas no solo Cambi MN

+ PK. Além disso, as plantas cultivadas nesse solo apresentaram menor redução no acúmulo de matéria seca da parte aérea e das raízes, quando comparado aos solos Cambi Vn2 e Vn3. Esse comportamento indica que esses níveis ainda são toleráveis pelas plantas de aveia preta.

7.7 Conclusões

Os solos Cambissolo Húmico de vinhedos da Serra Gaúcha e Argissolo Vermelho da região da Campanha, com longo histórico de aplicação de fungicidas cúpricos apresentam teores de Cu tóxicos para as plantas de aveia preta. Os solos com maior disponibilidade de Cu causaram estresse oxidativo e o sistema antioxidante das plantas de aveia preta não foi suficientemente eficaz para reverter a condição de estresse. Além disso, o Cu absorvido pelas plantas foi acumulado predominantemente nas raízes das plantas, sendo pequena a sua translocação para a parte aérea das plantas.

7.8 Referências

- AEBI, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105: 121-126, 1984.
- AIT ALI, N.; BERNAL, M. P.; ATER, M. Tolerance and bioaccumulation of copper in *Phragmites australis* and *Zea mays*. *Plant and Soil*, 239:103-111, 2002.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 53, 1331-1341, 2002.
- ALLOWAY, B. J. *Heavy Metals in Soils*. 2nd. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. 368 p.
- ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.*, 85: 235-241, 1992.
- BANAS, D.D.; MARIN, B.; SKRABER, S.; CHOPIN, E. I. B.; ZANELLA, A. Copper mobilization affected by weather conditions in a stormwater detention system receiving runoff waters from vineyard soils (Champagne, France). *Environ. Pollut.*, 158: 476-482, 2010.

- BENAVIDES, M. P.; GALLEGO, S. M.; TOMARO, M. L. Cadmium toxicity in plants. *Braz. J. Plant. Physiol.* 17:21-34, 2005.
- BIENERT, G. P.; SCHJOERRING, J. K.; JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, 1758: 994-1003, 2006.
- BRIAT, J.F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 322, 43-54, 1999.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, 72:248- 254, 1976.
- BRAVIN, M.N.; LE MERRER, B.; DENAIX, L.; SCHNEIDER, A.; HINSINGER, P. Copper uptake kinetics in hydroponically-grown durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) as compared with soil's ability to supply copper. *Plant and Soil*, 331: 91-104, 2010.
- BRUN, L.A.; MAILLET, J.; HINSINGER, P.; PÉPIN, M. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environ. Pollut.*, 111:293-302, 2001.
- CARRILLO-GONZALEZ, R.; SIMUNEK, J.; SAUVÉ, S.; ADRIANO, D. Mechanisms and pathways of trace element mobility in soils. *Adv. Agron.*, 91:111-178, 2006.
- 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.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro e 2009. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620/>. Acessado em 20 janeiro de 2010.
- CHAIGNON, V.; HINSINGER, P. A. Biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, 32:824-33, 2003.
- CHAIGNON, V.; SANCHEZ-NEIRA, I.; HERMANN, P.; JAILLARD, B.; HINSINGER, P. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ. Pollut.*, 123:229-238, 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.*, 157: 3363-3369, 2009.
- CHAMSEDDINE, M.; WIDED, B. A.; GUY, H.; MARIE-EDITH, C.; FATMA, J. Cadmium and copper induction of oxidative stress and antioxidative response in tomato (*Solanum lycopersicon*) leaves. *Plant Growth Regul.*, 57:89-99, 2009.

- CORNU, J.Y.; STAUNTON, S.; HINSINGER, P. Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant and Soil*, 292: 63-77, 2007.
- EL-MOSHATY, F.I.B.; PIKE, S.M.; NOVACKY, A.J.; SEHGAL, O.P. Lipid peroxidation and superoxide production in cowpea (*Vigna unguiculata*) leaves infected with tobacco ringspot virus or southern bean mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 43:109-119, 1993.
- ELLMAN, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys*, 82:70-77, 1959.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa, 2006. 306p.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de métodos de análises de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 212p.
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils, 1996.<[http:// www.epa.gov/sw-846/pdfs/3005A.pdf](http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3005A.pdf)> (20 apr. 2006).
- FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Sci. Total Environ.* 346, 256-273, 2005.
- FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, J.A.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; SIMAL- GÁNDARA, J. Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components. *Geoderma*, 145:91-7, 2008.
- FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; NÓVOA-MUÑOZ, J.C.; DÍAZ-RAVIÑA, M.; ARIAS-ESTÉVEZ, M. Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula). *Geoderma*, 153:119-29, 2009.
- FOYER, C.H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. *Acta Physiol. Plant*, 92:696-717, 1994.
- GUPTA, M.; CUYPERS, A.; VANGRONSVELO, J.; CLIJSTERS, H. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant.*, 106: 262-267, 1999.
- GAETKE, L.M.; CHOW, C.K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189:147-163, 2003.

- JACQUES-SILVA, M.C.; NOGUEIRA, C.W.; BROCH, L.C. Diphenyl diselenide and ascorbic acid changes deposition of selenium and ascorbic acid in liver and brain of mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 88:119-125, 2001.
- LIN, C.; CHANG, H.; HUANG, H. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. *Plant Physiol. Biochem.*, 43: 963-968, 2005.
- HOREMANS, N.; FOYER, C.H.; ASARD, H. Transport and action of ascorbate at the plant plasma membrane. *Trends Plant Sci.*, 5:263-267, 2000.
- LORETO, F.; VELIKOVA, V. Isoprene produced by leaves protects the photosynthetic apparatus against ozone damage, quenches ozone products, and reduces lipid peroxidation of cellular membranes. *Plant Physiol.*, 127:1781- 1787, 2001.
- KAMINSKI, J.; GATIBONI, L.C.; RHEINHEIMER, D.S.; MARTINS, J.R.; SANTOS, E.J.S.; TITSSOT, C.A. Estimativa da acidez potencial em solos e sua implicação no cálculo da necessidade de calagem. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:1107-1113, 2002.
- KOMÁREK, M.; SZÁKOVÁ, J.; ROHOŠKOVÁ, M.; JAVORSKÁ, H.; CHRASTNÝ, V.; BALÍK, J. Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: a case study from the Czech Republic. *Geoderma*, 147:16-22, 2008.
- MAKSYMIEC, W.; KRUPA, Z. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.*, 57:187-194, 2006.
- MARSCHNER, H. Mineral Nutrition of Higher Plants. Academic Press, London, 889, 1995.
- 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 Cucontaminated, former vineyard soils. *Plant and Soil*, 298:99-111, 2007.
- MICHAUD, A.M.; CHAPPELLAZ, C.; HINSINGER, P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). *Plant and Soil*, 310:151-165, 2008.
- MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R.D.; GOVINDARAJAN, R.; KURIAKOSE, S.V.; PRASAD, M.N.V. Phytochelatin synthesis and resopsne of antioxidants during cadmium stress in *Bacopa monnieri* L. *Plant Physiol. Biochem.*, 44:25-37, 2006.
- McBRIDE, M.B. Environmental chemistry of soils. New York, Oxford University Press, 1994. 406p.

- McBRIDE, M.B. Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. J. Environ. Qual., 30:78-84, 2001.
- MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A.; CHIES, J.O. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). Environ. Pollut., 149:10-17, 2007.
- MIRLEAN, N.; BAISCH, P.; MEDEANIC, S. Copper bioavailability and fractionation in coppercontaminated sandy soils in the wet subtropics (southern Brazil). B. Environ. Contam. Tox., 82:373-377, 2009.
- MISRA, H.P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. J. Biol. Chem., 244:6049-6055, 1972.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci., 7:405-410, 2002.
- MITHÖFER, A.; SCHULZE, B.; BOLAND, W. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. FEBS Lett., 566: 1-5, 2004.
- MORITA, S.; KAMINAKA, H.; MASUMURA, T.; TANAKA, K. Induction of rice cytosolic ascorbate peroxidase mRNA by oxidative stress, the involvement of hydrogen peroxide in oxidative stress signalling. Plant Cell Physiol., 40: 417-422, 1999.
- MURPHY, J.; RILEY, J.P. A Modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. Anal. Chem. Acta, 27:31-36, 1962.
- PIETRZAK, U.; MCPHAIL, D.C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. Geoderma, 122:151-66, 2004.
- SCHUTZENDUBEL, A.; NIKOLOVA, P.; RUDOLF, C.; POLLE, A. Cadmium and H₂O₂-induced oxidative stress in *Populus x canescens* roots. Plant Physiol. Biochem., 40:577-584, 2002.
- SHOEMAKER, H.E.; McLEAN, E.O.; PRATT, P.F. Buffer methods for determining the lime requirement of soils with appreciable amounts of extractable aluminum. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 25: 274-277, 1961.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A, BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. Análises de solo, planta e outros materiais. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.
- TEWARI, R.; KUMAR, P.; TEWARI, N.; SRIVASTAVA, S.; SHARMA, P. Macronutrient deficiencies and differential antioxidant responses: influence on the activity and expression of superoxide dismutase in maize. Plant Sci., 166: 687-694, 2004.

VERMA, S.; DUBEY, R.S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.*, 164: 645-655, 2003.

YRUELA I. Copper in plants. *Braz. J. Plant Physiol.*, 17:145-146, 2005.

ZHU, Z.; WEI, G.; LI, J.; QIAN, Q.; YU, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Sci.*, 167, 527-533, 2004.

8 ARTIGO III - ACÚMULO E BIODISPONIBILIDADE DE COBRE EM SOLOS CULTIVADOS COM VIDEIRA NO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

8.1 Resumo

Os solos cultivados com videiras e com histórico de aplicações sucessivas de fungicidas cúpricos, em geral, apresentam acúmulo de cobre (Cu). Contudo, solos com diferentes atributos físico-químicos podem apresentar distinta biodisponibilidade do Cu acumulado. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o acúmulo e a biodisponibilidade de Cu em solos derivados de vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas à base de Cu e teores crescentes de Cu. Em março de 2009 foram coletadas amostras de solo nas camadas de 0 - 20 e de 0 - 5, 5 - 10, 10 - 15, 15 - 20, 20 - 25, 25 - 30, 30 - 40 cm de profundidade, em três vinhedos e mata nativa na Serra Gaúcha e, em dois vinhedos e em campo nativo, na Campanha Gaúcha. Os solos da camada 0 - 20 cm foram secos moídos e, posteriormente, acondicionados em vasos e submetidos ao cultivo com aveia preta em casa de vegetação. Aos 40 dias após a emergência as plantas foram coletadas, separadas em parte aérea e raízes, secas, determinado o acúmulo de matéria seca, moída e submetida a análise do teor total de Cu. Após a coleta das plantas, o solo foi seco moído e submetido a análise dos teores totais de Cu e pseudo-totais (extração pelo método 3050B da EPA), teores disponíveis (extração com HCl 0,1 mol L⁻¹ e EDTA), além do fracionamento químico do Cu através da atração sequencial. A aplicação de fungicidas cúpricos em videiras aumentou o teor de cobre extraído por HCl 0,1 mol L⁻¹ no perfil do solo, inclusive até a camada de 30 - 40 cm de profundidade. Em adição, o cobre adicionado ao solo via aplicação foliar nas videiras acumula no solo predominantemente em formas biodisponíveis, especialmente aquelas ligadas a fração mineral do solo. A concentração de Cu nas raízes pode ser utilizada como indicativo de biodisponibilidade de Cu no solo, mas não é indicador para avaliar fitotoxidez às plantas. Além disso, se observou que o cobre acumulado nos solos

Argissolos da Campanha do Rio Grande do Sul apresentam maior biodisponibilidade, quando comparado ao cobre acumulado nos Cambissolos da Serra Gaúcha.

Palavras-chaves: metais pesados, fracionamento químico, contaminação ambiental, *Vitis* sp.

8.2 Abstract

ACCUMULATION AND BIOAVAILABILITY OF COPPER IN SOILS CULTIVATED WITH GRAPEVINES IN RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

Soils cultivated with grapevines and with a history of cupric fungicide application present great accumulation of copper. However, soils with different physicochemical attributes may present differences in terms of bioavailability of accumulated copper (Cu). The objective of this paper was to evaluate Cu accumulation and bioavailability in soils derived from vineyards with a history of application of copper-based fungicides. In March 2009, soil samples were collected in soils depths of 0 - 20 and 0 - 5, 5 - 10, 10 - 15, 15 - 20, 20 - 25, 25 - 30, 30 - 40 cm in three vineyards and native forest from the Serra Gaúcha region and in two vineyards and native land of the Campanha Gaúcha region. Soil samples of the 0 - 20 cm depth were dried, grounded and later used for the cultivation of black oat in a greenhouse. On the 40 days after plant emergence the plants were collected, separated in aerial part and root, dried, dry matter accumulation was determined, grounded and submitted to analysis of the total content of Cu. In the soil samples taken from the vases, after the collection of the plants, total content of Cu, pseudo-total content (extraction by EPA 3050B method), available content (extraction with HCl 0.1 mol L⁻¹ and EDTA), as well the chemical fractionation of Cu through sequential extraction were determined. The application of cupric fungicide in vines increased copper extracted by HCl 0.1 mol L⁻¹ in the soil profile, including up to the 30 - 40 cm depth. In addition, copper added to the soil via foliar application in grapevine accumulates in soil predominately in bioavailable forms, especially those linked to the mineral fraction of the soil. Cu concentration in roots may be used as an indicator of

bioavailability of Cu in soil, but it is not an indicator to evaluate phytotoxicity to the plants. In addition, accumulated copper in Typic Hapludalf soil of the Campanha Gaúcha region of Rio Grande do Sul presented higher bioavailability when compared to copper accumulated in Haplumbrept soil of the Serra Gaúcha region.

Key words: heavy metals, fractionation chemistry, environmental contamination, *Vitis* sp.

8.3 Introdução

As aplicações repetidas de fungicidas à base de Cu, como a calda bordalesa ($\text{Ca(OH)}_2 + \text{CuSO}_4$), em videiras para a prevenção e controle de doenças fúngicas foliares, causam o acúmulo de Cu nas camadas superficiais de solos. Devido a sua utilização a nível mundial e prolongada, concentrações elevadas de Cu na forma total ($>200 \text{ mg kg}^{-1}$) têm sido relatadas em solos de regiões produtoras tradicionais em diversos países (Brun et al., 2001, na França; Pietrzak e McPhail, 2004, na Austrália; Fernández-Calviño et al. 2008, na Espanha; Toselli et al. 2009, na Itália). Contudo, o teor de Cu em solos de vinhedos pode ser bastante variável em função da frequência de aplicação de fungicidas, à base de Cu e das características físico-químicas dos solos. No Brasil, em vinhedos da Serra Gaúcha, localizada no estado do Rio Grande do Sul, foram relatadas concentrações superiores a 3.000 mg kg^{-1} de Cu na forma total (Mirlean et al., 2007). Estes teores de Cu indicam o uso intensivo de fungicidas à base de Cu, o que se deve ao clima mais úmido, quando comparado a regiões produtoras tradicionais da Europa com clima mais seco.

No Rio Grande do Sul existem, aproximadamente, 31.000 mil hectares cultivados com videiras (Mello, 2005), maior área cultivada com videira do país. A maior parte dos vinhedos se concentra na Serra Gaúcha, onde predominam solos com textura média ou argilosa, e com médio a alto teor de matéria orgânica (Brunetto et al., 2007). Entretanto, com a ampliação de fronteiras agrícolas, áreas de campo natural da Campanha Gaúcha foram incorporadas, a partir da década 1970, e de forma mais intensiva na década de 2000, ao sistema de produção de uvas viníferas. Nesta região, a videira passou a ser

cultivada em solos com textura arenosa ($<100 \text{ mg kg}^{-1}$ de argila) e com baixo teor de matéria orgânica ($<15 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo) e, conseqüentemente, com baixo poder tamponante. Assim, se espera que o Cu acumulado nos solos, por causa dos distintos atributos químicos e físicos, da Serra Gaúcha e Campanha do RS, possam apresentar distinta biodisponibilidade e toxicidade para as videiras e plantas que co-habitam os vinhedos, como a aveia preta, no período de inverno/primavera. Isso porque a biodisponibilidade, a toxicidade e a mobilidade do Cu no solo são influenciados pela sua cinética de distribuição entre a solução e a fase sólida do solo e pela variação na quantidade dos componentes da fase sólida (Han et al., 2001).

Vários são os tipos de procedimentos laboratoriais utilizados para estimar a disponibilidade dos metais como Cu às plantas e/ou à sua mobilidade no perfil do solo. Os mais usados são as extrações com produtos químicos de forma isolada ou sequencialmente. Através das extrações sequenciais, os extratores químicos removem os metais pesados das formas mais lábeis até as mais estáveis (Tessier et al., 1979; Lima et al., 2001). É possível separar a quantidade total de metal presente nos solos ou sedimentos, em frações biodisponíveis (solúvel em água e trocável), potencialmente biodisponíveis (ligadas a óxidos, carbonatos e matéria orgânica) e residual ou não disponível (estrutura dos minerais) (Tessier et al., 1979; Sodré et al., 2001).

Os trabalhos com a utiliza o de extra es de Cu com solu es químicas de forma isolada ou sequencialmente em solos de vinhedos no Brasil são recentes (Nachtigall et al., 2007; Mirlean et al., 2007; Casali et al., 2008; Nogueirol et al., 2010) e indicam, ao longo dos anos, incremento dos teores de Cu em fra es consideradas biodisponíveis, nas camadas superficiais de solos cultivados com videiras. Contudo, os valores de concentra o de Cu extraídos por diferentes extratores devem ser calibrado com a absor o do elemento pelas plantas ou um organismo vivo (biodisponibilidade) ou validados com a transferência dentro do perfil (mobilidade). Isso porque as plantas podem alterar a mobilidade e biodisponibilidade do Cu na rizosfera, através da modifica o dos valores de pH (Chaignon et al., 2003; Chaignon et al., 2009) ou pela libera o de compostos solúveis orgânicos que podem complexar o Cu (Chaignon & Hinsinger, 2003, Cattani et al., 2006).

A calibração com a absorção pelas plantas, embora oneroso, é bastante usado nos sistemas de recomendação de fertilizantes e corretivos. Contudo, a relação entre concentração do Cu extraído e a sua toxicidade a um organismo alvo ou a sua mobilidade no perfil do solo é muito mais difícil de estabelecer e, conseqüentemente, escassa na literatura relacionada a solos com cultivo de videiras no estado do Rio Grande do Sul. Assim, o cultivo de plantas como a aveia preta (*Avena strigosa*), normalmente cultivadas nas linhas e entrelinhas dos vinhedos localizados na Região Sul do Brasil, pode ser usada como indicativo do acúmulo excessivo e auxiliar na determinação da biodisponibilidade de Cu no solo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o acúmulo e a biodisponibilidade de Cu em solos derivados de vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas à base de Cu e teores crescentes de Cu.

8.4 Material e Métodos

Coleta de solo e descrição do experimento

Em março de 2009 foram coletadas amostras de sete solos com níveis crescentes de Cu e valores similares de pH em água, P disponível e K trocável, nas camadas de 0 - 20 e de 0 - 5, 5 - 10, 10 - 15, 15 - 20, 20 - 25, 25 - 30 e 30 - 40 cm de profundidade. No município de Bento Gonçalves (RS), região da Serra Gaúcha, na área experimental da Embrapa Uva e Vinho foram coletadas três amostras de solos sob vinhedos e uma amostra de solo sob mata nativa (solo controle). No município de Santana do Livramento, Região da Campanha Gaúcha do RS e em vinhedos comerciais foram coletados dois solos sob vinhedos e um solo em uma área destinada à produção de mudas, que não recebia aplicação de fungicidas à base de Cu. Logo depois da coleta, os solos foram secos, moídos e reservados. Na Serra Gaúcha os quatro solos foram classificados como Cambissolo Húmico (Embrapa, 2006). Esses solos apresentavam, na camada de 0 - 20 cm de profundidade, teores crescentes de Cu: 5,5; 95,7; 270,5 e 328,7 mg kg⁻¹ de Cu, extraído por Na₂-EDTA 0,01 mol L⁻¹/acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹, sendo denominados, respectivamente, Cambi MN (solo coletado sob mata nativa), Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3, sendo a sigla "Vn" referente aos solos coletados sob vinhedos. Para fins de comparações, além do tratamento

Cambi MN, utilizou-se como testemunha o tratamento Cambi MN + PK, criado pela correção dos níveis de P e K do solo coletado sob mata nativa (Cambi MN). Nesse tratamento foram adicionados, com base nos resultados da análise de solo e de acordo com a CQFS-RS/SC (2004), respectivamente, 75 e 70 mg de P e K por kg de solo. No solo proveniente da mata, que apresentava pH em água de 4,7, antes da aplicação de P e K foi aplicado Ca(OH)_2 e MgO na proporção molar de 2:1, para elevar o pH até 6,0.

Os três solos coletados na Campanha Gaúcha foram classificados como Argissolo Vermelho (Embrapa, 2006). Esses solos apresentavam teores de: 2,2; 36,8 e 67,2 mg kg^{-1} de Cu, extraído por $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ 0,01 mol L^{-1} /acetato de amônio 1,0 mol L^{-1} e foram denominados, respectivamente, de Argi, Arg Vn1 e Arg Vn2. O solo denominado como Argi foi utilizado como testemunha, devido ao seu histórico de não aplicação de fungicidas cúpricos e, por isso, os teores de Cu nesse solo foram próximos aos originais. Esta área era destinada à produção de mudas de videiras. Já os solos Argi Vn1 e Argi Vn2 foram coletados sob vinhedos com teores crescentes de Cu. O tempo de cultivo com a videira em cada solo coletado na região da Serra Gaúcha e Campanha, o teor de Cu e os atributos físico-químicos da camada de 0 - 20 cm de profundidade são apresentados na tabela 2.

Em junho e julho de 2009, na casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, RS, 4 kg de cada solo seco ao ar foi acondicionado em vasos com capacidade de 5 kg. Em cada vaso foram semeadas 25 sementes de aveia preta (*Avena strigosa* Schreb.), cultivar “UPF moreninha”. Após a emergência foi realizado o raleio, permanecendo 16 plantas em cada vaso. Ao longo do cultivo o solo foi mantido a 80% da capacidade de campo, determinada com amostra deformada em mesa de tensão (1 mpa). A irrigação foi realizada diariamente pela reposição da água evapotranspirada, que foi calculada por pesagem diária dos vasos. Ao longo do cultivo da aveia foram realizadas duas aplicações de N, totalizando, 45 mg de N por kg de solo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com quatro repetições por tratamento.

Colheita das plantas de aveia e análise do teor de cobre no tecido

As plantas de aveia preta foram coletadas em duas épocas, a primeira coleta foi realizada aos 15 dias após a emergência (DAE) e a segunda aos 40 DAE, como descrito no Artigo II. Contudo, para a realização deste estudo foram utilizados os resultados apresentados no Artigo II, referentes ao acúmulo de matéria seca de raízes e parte e concentração de Cu, nestes tecidos, aos 40 dias após a emergência das plantas de aveia preta. Isso porque as extrações simples e sequencial de Cu foram realizada somente após a coleta das plantas aos 40 DAE. No momento da coleta, a parte aérea das dezesseis plantas de aveia preta foram cortadas rente a superfície do solo e reservadas. Em seguida, as raízes presentes em cada vaso foram separadas do solo manualmente, lavadas com água destilada para retirada do solo aderido às raízes e, logo após, lavadas novamente com EDTA 0,02 mol L⁻¹ e, por fim, com água destilada para a retirada do excesso de EDTA. Em seguida, a parte aérea e raízes foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa com circulação de ar forçada, até 65 °C até atingir massa constante. Posteriormente, a parte aérea e as raízes foram pesadas, moídas e preparadas para a análise do teor total de Cu no tecido, extraído pela digestão ácida, onde: em 0,2 g de tecido seco foi adicionado uma mistura de ácido nítrico (HNO₃) concentrado + ácido perclórico (HClO₄), com o uso de aquecimento. Os teores totais de Cu foram determinados usando espectrofotômetro de absorção atômica marca GBC mod. 932 AA.

Coleta e análise de solo

Após a coleta da parte aérea e raízes foi realizada a homogeneização do solo em cada vaso e coletado 0,250 kg de solo de cada vaso. Em seguida, o solo foi seco, moído e submetido à análise de distribuição granulométrica dos constituintes dos solos, segundo o método da pipeta (Embrapa, 1997). A determinação de pH foi realizada em água, na proporção 1:1, de acordo com a metodologia proposta por Tedesco et al. (1995). O teor de matéria orgânica do solo (MO) foi analisado por oxidação úmida, usando dicromato de potássio em meio sulfúrico (0,4 N), sendo a determinação realizada por titulação com sulfato ferroso amoniacal 0,1 N, segundo a Embrapa (1997). A extração do P disponível e K trocável foi realizada com a solução de Mehlich 1 (HCl

0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹). Os teores de P foram extraídos pela solução Mehlich 1 e determinados de acordo com Murphy & Riley (1962). A concentração de K⁺ trocável foi determinada por espectroscopia de emissão de chama. Os cátions trocáveis Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ foram extraídos com o uso da solução KCl 1 mol L⁻¹ (Embrapa, 1997). A concentração de Al³⁺ foi determinada por titulação ácido-base, com uma solução de NaOH 0,0125 mol L⁻¹, enquanto a concentração de Ca²⁺ e Mg²⁺ foi determinada por espectroscopia de absorção atômica (EAA) (Tedesco et al., 1995).

A capacidade de troca de cátions efetiva (CTCef) foi obtida pela soma das bases Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ (SB_{KCl+Mehlich-1}), mais Al³⁺ (SB + Al_{KCl}) (CQFS-RS/SC, 2004). A capacidade de troca de cátions em pH 7 (CTC7) foi estimada pela soma de bases mais H + Al (SB + H + Al_{SMP}). Os valores de H + Al foram estimados pela equação proposta por Kaminski et al. (2002) e adotada pela CQFSRS/SC (2004) (Equação 1):

$$H + Al = \frac{e^{10,665 - 1,1483 * pH_{SMP}}}{10} \quad \text{Equação 1}$$

Onde: o teor no solo de H + Al é estimado em cmol_c kg⁻¹ e o Índice SMP é a medida do pH de equilíbrio do solo com a solução SMP (Shoemaker et al., 1961). Já a solução SMP tem uma concentração de 1,78 mol L⁻¹ tamponada em pH 7,5, composta por trietanolamina, paranitrofenol, K₂CrO₄, Ca(CH₃COO)₂ e CaCl₂.2H₂O (Tedesco et al., 1995).

Para a determinação dos teores totais de Cu (CuTot) 0,5 g do de solo seco foi submetido à digestão com a mistura de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) + ácido fluorídrico (HF) concentrado + ácido perclórico (HClO₄), com aquecimento (Tessier et al., 1979). Os teores pseudo-totais de Cu (CuEPA) nas amostras de solo foram extraídos com o uso de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) + ácido nítrico (HNO₃) + ácido clorídrico (HCl), segundo método nº 3050B (EPA, 1996). Este extrator não determina a quantidade dos metais na matriz dos minerais, mas determina a fração dos elementos considerados ambientalmente biodisponíveis ou também denominado como teores pseudo-totais, sendo utilizado como método padrão pela normativa do CONOMA (2009).

Para a determinação da fração considerada disponível de Cu foram utilizados dois extratores. A extração com $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ $0,01\text{mol L}^{-1}$ /acetato de amônio $1,0\text{ mol L}^{-1}$ com pH ajustado para 7,0 (CuEDTA), segundo Chaignon et al., (2009). O outro extrator utilizado foi o HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ (CuHCl), que é adotada pela Comissão de Química e Fertilidade do Solo dos Estados do RS e SC (CQFS-RS/SC, 2004), como sendo disponível às plantas. Tanto os teores disponíveis quanto os teores totais foram mensurados em espectrofotômetro de absorção atômica, marca GBC mod. 932 AA.

O fracionamento químico de Cu no solo seguiu a metodologia proposta por Tessier et al. (1979). Usaram-se apenas as amostras de solo das camadas de 0 - 20 cm de profundidade dos quatro solos coletados na Serra Gaúcha (Cambi MN, Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3), mais o solo Cambi MN + PK e dos três solos coletados na Campanha Gaúcha (Argi, Argi Vn1 e Argi Vn2). As amostras, em triplicata de 1,0 g de solo seco foram transferidos para tubos de polipropileno de 50 mL e realizadas extrações sequenciais, brevemente descritas a seguir: fração solúvel (CuSol), extraída com água deionizada (8 mL); fração trocável (CuTroc), extraída com cloreto de magnésio (MgCl_2) $1,0\text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0 (8 mL); ligados a fração mineral (CuMin), extraída com cloridrato de hidroxilamina (NH_2OHHCl) $0,04\text{ mol L}^{-1}$ em ácido acético 25 % (v/v) a pH 2,0 (20 mL) (CuMin); ligados a fração orgânica (CuOrg), extraídos com ácido nítrico (HNO_3) $0,02\text{ mol L}^{-1}$ (3mL) + peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 30 % (8 mL) + acetato de amônio (NH_4OAc) em HNO_3 20% (v/v) (5 mL). O sobrenadante foi separado por centrifugação a 1500 g durante uma hora e uma alíquota foi reservada para a determinação do teor de Cu. Entre cada extração, as amostras foram agitadas com água deionizada, centrifugadas e o sobrenadante descartado. No final da extração sequencial, o resíduo remanescente foi seco em estufa a $105\text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas e, em seguida, 0,5 g do resíduo seco foi submetido à digestão com ácido fluorídrico (HF) concentrado + ácido perclórico (HClO_4), para determinação da fração residual de Cu. Na condução dos trabalhos, toda a vidraria utilizada foi submetida à limpeza com HNO_3 10%, sendo mantida neste ácido por um período de, no mínimo, 24 horas e após este período foi realizada uma lavagem tripla com água deionizada.

Para a determinação dos teores de Cu solúveis (CuSol40DAE) na solução do solo foi realizada a extração da solução do solo ao final do período de cultivo das

plantas (aos 40 DAE), com o uso do método da centrifugação. Neste método são utilizados cilindros de PVC rígido com 2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura, fechados em uma das extremidades com uma placa de acrílico perfurada, recoberta com papel de filtro analítico. O solo foi colocado nos cilindros a com umidade equivalente a 80 % da capacidade de campo. A extração foi realizada colocando-se os cilindros em tubos de centrífuga, apoiados em um anel de 1 cm de PVC, com o mesmo diâmetro dos cilindros, com centrifugação a 1500 g, por 15 minutos, para extração da solução do solo. As amostras de solução do solo foram filtradas em membrana de 0,45 μm , para posterior determinação dos teores solúveis de Cu (CuSol40DAE).

Análise estatística

Os resultados qualitativos foram submetidos à análise de variância e, quando os efeitos foram significativos foram submetidas ao teste de comparação de médias Tukey, tomando por base os níveis de significância maiores que 95%. Posteriormente, os dados foram agrupados por solo para aplicação da análise de componentes principais (ACP). Os solos constituíram os indivíduos, cujas variáveis foram representadas pelo valor médio. Dessa maneira, foi organizada uma matriz de dados $X_{(n \times p)}$ de ordem 8x13, com os solos (n=8) dispostos nas linhas e as variáveis (p=13) dispostas nas colunas. Os dados da matriz $X_{(8 \times 13)}$ foram autoescalados, isto é, normalizados (escores z), de modo que cada variável ficasse com média igual a zero e variância igual à unidade. O auto escalonamento dos dados se justifica pelo fato de que as variáveis apresentam escalas diferentes (unidades de medida) e, portanto, diferem em ordem de grandeza, o que causaria influência demasiada de algumas poucas variáveis no modelo da ACP (Sena, et al. 2002). Sobre a matriz dos dados escalonados $Z(8 \times 13)$ foi efetuada a ACP, considerando a matéria seca de raízes (MS Raízes), matéria seca da parte aérea (MS PA), concentração total de Cu nas raízes (Cu Raízes) e concentração total de Cu na parte aérea (Cu PA) como variáveis ativas (variáveis usadas para calcular os autovetores e os escores de cada solo). As medidas de concentração de Cu no solo por diferentes métodos (CuTot, CuEPA, CuEDTA, CuHCl, CuSol40DAE, CuSol, CuTroc, CuMin e CuOrg) foram consideradas como variáveis suplementares (variáveis

projetadas no plano da ACP para auxiliar na interpretação dos eixos (CP1 ou CP2), na relação entre indivíduos (solos) e desses com as componentes e com as variáveis ativas). Em adição, foi realizada à análise de Correlação de Pearson entre os teores de Cu nas raízes e parte aérea e o acúmulo de matéria seca de raízes e parte aérea e as medidas de concentração de Cu no solo por diferentes métodos (CuTot, CuEPA, CuEDTA, CuHCl, CuSol40DAE, CuSol, CuTroc, CuMin e CuOrg).

8.5 Resultados e Discussão

Atributos dos solos

Os solos Cambissolos coletados na região da Serra Gaúcha apresentaram maiores teores de argila e MO, comparativamente aos solos Argissolos derivados da Campanha Gaúcha. Os teores de argila, dos solos Cambissolos, variaram de 263 a 329 g kg⁻¹ e de MO variando de 33,9 a 37,3 g kg⁻¹ de solo (Tabela 1). Por outro lado, os solos Argissolos coletados na região da Campanha Gaúcha apresentaram teores de argila que oscilaram de 65 a 90 g kg⁻¹ e de MO variando de 9,2 a 11,2 g kg⁻¹ de solo (Tabela 1). Como consequência, os solos Cambissolos possuíram maiores valores de CTC7 e teores totais de CuTot mais elevados, quando comparado aos solos Argissolos, mesmo nos solos coletado sob mata nativa (Cambi MN) (Tabela 1 e 2). Convém ressaltar que os valores de pH do solo, a CTC, a textura do solo, o teor de óxidos e de MO afetam a disponibilidade de Cu no solo (Gupta e Aton, 1993; Brun et al., 2001).

Tabela 1. Tempo de cultivo com videira e atributos químicos e físicos de solos coletados em vinhedos nas regiões da Serra e da Campanha Gaúcha, na camada de 0 - 20 cm, após terem sido utilizados para o cultivo da aveia preta em casa de vegetação.

Parâmetros	Cambi	Cambi	Cambi	Cambi	Cambi	Argi	Argi	Argi
	MN ⁽¹⁾	MN+PK	Vn1	Vn2	Vn3		Vn1	Vn2
Anos de cultivo	0	0	23	30	33	0	25	30
Areia, g kg ⁻¹	346	346	298	345	320	675	661	705
Silte, g kg ⁻¹	391	391	373	353	370	260	264	205
Argila, g kg ⁻¹	263	263	329	302	310	65	75	90
Fe DCB, mg kg ⁻¹	1354	1350	1391	1369	1372	101	104	152
Fe oxalato, mg kg ⁻¹	102	101	101	110	114	15	16	12
pH _{H2O}	5,8a*	5,8a	5,2c	5,3c	5,3c	5,5b	5,3c	5,2c
MO, g kg ⁻¹	33,9b	34,3b	27,3c	37,3a	35,9a	11,2d	12,1d	9,2e
Al, cmol _c kg ⁻¹	0,00	0,00	0,05ab	0,02b	0,03b	0,00	0,06a	0,03b
H+Al, cmol _c kg ⁻¹	2,81d	2,64de	4,19ab	4,46a	3,84b	2,27e	3,25c	2,88cd
CTCef, cmol _c kg ⁻¹	8,63a	8,84a	6,01c	8,05b	7,99b	2,37d	2,24d	1,57e
CTC7, cmol _c kg ⁻¹	11,45b	11,48b	10,20c	12,51a	11,81b	4,59e	5,45d	4,43e
V, %	75,42a	76,00a	58,91d	64,37c	67,45b	50,65e	40,24f	34,93g
P, mg kg ⁻¹	4,8g	18,2f	35,6d	20,0f	27,0e	48,5c	70,7a	65,7b
K, mg kg ⁻¹	110,9c	130,5b	267,0a	90,2c	112,0c	129,5b	101,0bc	73,7c
Ca, cmol _c kg ⁻¹	4,60b	4,72b	3,67c	5,90a	5,60a	1,36d	1,27d	1,02d
Mg, cmol _c kg ⁻¹	3,74a	3,74a	1,57d	1,92c	2,08b	0,57e	0,63e	0,36f

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. *Dados seguidos pelas mesmas letras em cada linha não diferem significativamente (teste de Tukey, p <0,05).

Entretanto, os solos coletados nos vinhedos das duas regiões vitivinícolas apresentaram alta disponibilidade de nutrientes como o P disponível e K trocável (CQFS-RS/SC, 2004). Essa alta disponibilidade de P disponível e K trocável se deve ao histórico de aplicação de fertilizantes fosfatados e potássicos solúveis e/ou orgânicos, muitas vezes acima do que seria recomendado.

Os solos coletados sob vinhedos Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3 e Argi Vn1, Argi Vn2, em função das sucessivas aplicações de fungicidas à base de Cu, apresentaram incremento nos teores de CuHCl até a camada de 30 - 40 cm de profundidade, respectivamente, quando comparados aos solos controle Cambi MN e Argi (Tabela 2). Este aumento dos teores de CuHCl no solo nas camadas mais

profundas indica a saturação, pelo Cu, de parte dos grupos funcionais mais ávidos das partículas reativas do solo localizadas na camada superficial do solo. Por causa disso, ocorre a sua migração no perfil do solo, porém as maiores concentrações de CuHCl foram observadas nos solos Cambissolos e Argissolos nas camadas 0 - 5 e 5 - 10 cm de profundidade. Isso ocorre por causa do não revolvimento do solo cultivado com videiras, por causa da unidirecionabilidade da aplicação dos fungicidas cúpricos na planta, pelo escoamento do Cu das folhas durante as precipitações pluviométrica ou ainda, pela queda das folhas senescentes contendo cobre (Nachtigall et al., 2007; Casali et al., 2008). Aliado a isso, o teor de Cu livre na solução do solo é muito baixo devido à alta reatividade com os grupos funcionais, em especial, aqueles da matéria orgânica do solo (Croué et al., 2003). Desse modo, a migração no perfil do solo se dá, preferencialmente, na forma coloidal (Citeau et al., 2003; Ponthieu, 2003) e o fluxo turbulento e a bioturbação assumem grande importância (Rheinheimer et al., 2007). Nesse sentido, a formação de bioporos e a presença em solução de ácidos orgânicos de baixo peso molecular também podem desempenhar um importante papel no aumento da mobilidade do Cu em solos de vinhedos. A formação de complexos de metal com compostos orgânicos de baixo peso molecular altera o equilíbrio entre os metais lábeis na fase sólida e na solução do solo e, assim, também pode aumentar a liberação de metais pesados da fase sólida o que, por consequência, aumenta a sua mobilidade no solo (Qin et al., 2004). Isso explicaria o aumento da concentração de Cu na camada de 30 - 40 cm de profundidade nos solos coletados sob vinhedos na Serra e na Campanha Gaúcha.

Tabela 2. Atributos químicos dos solos no momento da sua coleta sob vinhedos nas regiões da Serra e da Campanha Gaúcha.

Solo	Camada	MO	pH-H ₂ O	Al troc.	Ca troc.	Mg troc.	CTC pH 7,0	K troc.	P disp.	Zn HCl	Cu HCl
	--cm--	-g kg ⁻¹ -		-----cmol _c kg ⁻¹ -----				-----mg kg ⁻¹ -----			
Cambi MN	0-5	43,4	6,1	0,0	18,3	2,2	22,8	170	18,8	14,9	0,5
	5-10	47,6	6,0	0,0	11,2	2,5	16,6	118	5,3	3,2	1,3
	10-15	27,4	5,3	0,2	4,0	1,4	9,1	70	4,9	2,2	2,0
	15-20	20,4	5,0	0,5	3,1	1,2	8,0	56	4,5	1,9	2,4
	20-25	17,6	4,8	1,1	2,0	1,1	8,9	50	5,5	1,0	3,1
	25-30	18,2	4,8	1,2	2,7	1,1	9,9	58	5,3	1,1	3,2
	30-40	18,5	4,8	2,4	3,4	1,2	18,0	70	5,6	0,9	0,5
Cambi Vn1	0-5	28,5	5,8	0,0	12,4	2,8	17,9	160	251,6	17,9	55,5
	5-10	29,2	6,0	0,0	7,4	2,2	12,2	100	67,4	8,5	75,4
	10-15	29,6	5,9	0,0	3,7	1,4	7,8	40	48,2	5,6	87,5
	15-20	26,0	5,7	0,0	4,3	1,8	8,8	42	28,3	4,0	62,9
	20-25	25,9	5,3	0,4	2,5	1,2	6,7	48	10,3	1,1	10,4
	25-30	18,1	5,2	0,6	2,1	1,4	6,7	48	11,2	0,6	6,2
	30-40	17,6	5,1	0,8	2,4	1,3	8,3	36	12,6	0,8	7,7
Cambi Vn2	0-5	38,3	5,4	0,1	7,8	3,1	14,5	170	28,7	17,2	232,6
	5-10	36,3	5,8	0,0	5,2	2,2	10,6	142	6,1	40,1	174,1
	10-15	28,9	5,8	0,0	4,3	2,2	9,6	138	2,7	6,4	99,6
	15-20	25,3	5,7	0,0	3,9	2,4	9,3	116	3,8	3,4	95,0
	20-25	26,8	5,4	0,3	3,3	1,8	8,7	76	4,7	2,6	74,3
	25-30	20,4	5,2	0,7	2,4	1,9	8,4	48	4,6	2,7	36,2
	30-40	22,2	4,8	1,2	2,2	1,1	10,0	46	3,9	4,4	29,5
Cambi Vn3	0-5	43,6	5,8	0,0	14,9	3,6	21,9	134	109,5	27,4	372,7
	5-10	45,8	6,1	0,0	19,5	5,1	27,6	100	100,7	24,4	493,3
	10-15	31,5	6,2	0,0	8,6	2,3	13,1	104	60,5	24,8	240,9
	15-20	26,0	6,3	0,0	7,4	2,1	11,7	82	11,0	7,4	74,7
	20-25	25,8	6,1	0,0	6,4	1,9	10,5	62	4,7	4,1	31,2
	25-30	21,9	6,0	0,0	4,0	2,1	8,4	52	4,8	3,7	8,8
	30-40	17,7	5,8	0,0	3,1	2,2	7,5	50	6,0	2,0	7,5
Argi	0-5	11,6	5,3	0,1	1,4	0,5	3,6	96	79,3	4,0	1,2
	5-10	9,5	5,4	0,2	1,2	0,4	3,3	114	67,4	3,8	1,1
	10-15	8,6	5,3	0,1	1,2	0,3	3,0	102	48,2	3,5	1,1
	15-20	7,9	5,3	0,1	1,1	0,3	3,0	88	28,3	2,2	0,8
	20-25	7,5	5,4	0,1	1,2	0,4	2,9	64	58,1	1,8	0,6
	25-30	7,3	5,4	0,1	1,2	0,4	2,9	64	57,2	1,8	0,8
	30-40	5,1	5,6	0,1	1,2	0,4	2,8	68	35,4	0,7	0,5
Argi Vn1	0-5	12,4	5,7	0,0	2,1	0,8	4,9	150	85,1	12,5	89,2
	5-10	9,9	5,0	0,4	0,9	0,5	3,7	116	84,1	1,8	28,0
	10-15	9,9	4,8	0,7	0,6	0,3	3,5	100	85,2	1,8	12,3
	15-20	7,7	5,5	1,0	0,5	0,2	3,8	84	67,7	1,7	4,1
	20-25	7,4	4,6	1,1	0,5	0,1	4,4	102	31,0	1,6	2,3
	25-30	6,6	4,5	1,2	0,5	0,1	4,4	108	16,9	1,0	0,8
	30-40	7,7	4,6	1,2	0,5	0,2	4,5	98	10,6	0,9	0,7
Argi Vn2	0-5	13,2	5,9	0,0	2,5	0,7	4,5	92	60,3	15,5	104,2
	5-10	9,1	6,0	0,0	1,2	0,4	2,7	60	46,9	6,6	50,9
	10-15	7,5	6,1	0,0	1,0	0,4	2,4	60	37,8	4,7	23,6
	15-20	7,0	5,7	0,0	1,4	0,6	3,4	62	32,0	1,9	10,0
	20-25	7,3	5,5	0,0	1,8	0,7	4,4	72	22,8	0,4	4,2
	25-30	7,0	5,2	0,5	1,7	0,7	4,8	80	18,1	0,2	3,0
	30-40	7,1	4,9	0,9	1,2	0,5	4,5	60	15,0	0,2	2,0

Formas de Cu no solo

Nos solos controle, sem cultivo de videiras (Cambi MN, Cambi MN + PK e Argi), a maior parte do Cu foi encontrada na fração residual, seguida pelas frações orgânica e mineral (Tabela 3), indicando a forte adsorção do Cu aos grupos funcionais, em especial, da matéria orgânica. Em consequência, os teores extraídos com água ou $MgCl_2$ são muito baixos, representando menos do que 1,0 % do total, no entanto, seriam suficientes para a manutenção de altas produtividades das plantas (CQFS-RS/SC, 2004).

Nos solos Cambissolos cultivados com videiras, a utilização de fungicidas cúpricos aumentou os teores de Cu extraídos por todos os extratores, inclusive o valor da fração residual, comparativamente ao solo sob mata nativa (Cambi MN) (Tabela 3). Por outro lado, nos solos Argissolos coletados sob vinhedos (Argi Vn1 e Vn2) somente se observou incremento nas frações consideradas biodisponíveis (trocável, orgânica e mineral) (Tessier et al., 1979), não sendo observado aumento nos teores de Cu na fração residual, quando comparado ao solo sem adição de Cu (Argi).

Os teores da fração trocável tiveram incremento em ambos os solos Cambissolos (Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3) e Argissolos (Argi Vn1 e Argi Vn2) coletados sob vinhedos, respectivamente, quando comparado aos solos controle Cambi MN e Argi (Tabela 3). Esta fração de Cu, extraída por $MgCl_2$, corresponde àqueles adsorvidos fracamente, em particular aos retidos na superfície dos colóides com interação eletrostática (Tessier et al., 1979). As proporções de Cu extraído com $MgCl_2$, em relação ao Cu total, variaram entre 0,8 a 4,5 %, sendo a maior porcentagem em relação ao total encontrado no solo Argi Vn1. Desta forma, assim como observado por Casali et al. (2008) e Nogueirol et al. (2010), em solos cultivados com videiras na Região Sul do Brasil, as frações de Cu no solo, como a trocável, com menor energia de adsorção ou com maior solubilidade também são aumentadas em solos cultivados com videiras. Comparando-se os solos Cambissolos e Argissolos coletados sob vinhedos, observa-se maior proporção do Cu na fração trocável nos Argissolos (Tabela 3), o que indica maior dessortividade do Cu nestes solos.

Tabela 3. Fracionamento químico de Cu presente nas amostras de solos, quando da coleta a campo, em vinhedos nas regiões da Serra e da Campanha Gaúcha, na camada de 0 - 20 cm de profundidade.

Solo	Solúvel ⁽¹⁾	Trocável ⁽²⁾	Fração mineral ⁽³⁾	Fração orgânica ⁽⁴⁾	Residual	Som. Formas	Total
	-µg kg ⁻¹ -	-----		mg kg ⁻¹	-----		
Cambi MN	≤ 0,4 .	0,22 ^{e*} (0,4) ⁽⁵⁾	1,28 ^f (2,2)	2,39 ^d (4,1)	53,74 ^d (93,2)	57,63	47,80
Cambi MN + PK	≤ 0,4 .	0,32 ^e (0,5)	1,67 ^f (2,8)	1,85 ^d (3,1)	55,78 ^d (93,0)	60,02	48,43
Cambi Vn1	0,41 .	1,92 ^d (0,8)	94,10 ^c (41,9)	34,02 ^b (15,1)	94,56 ^c (42,1)	224,60	213,84
Cambi Vn2	0,49 .	5,03 ^b (0,9)	302,54 ^b (56,6)	118,70 ^a (22,1)	107,69 ^b (20,1)	534,60	455,97
Cambi Vn3	0,53 .	8,72 ^a (1,5)	342,30 ^a (57,9)	116,52 ^a (19,7)	123,08 ^a (20,8)	591,15	520,13
Argi	≤ 0,4 .	0,36 ^e (3,6)	1,98 ^f (20,0)	1,41 ^d (14,3)	6,12 ^e (62,0)	9,87	14,47
Argi Vn1	0,53 .	2,61 ^c (4,5)	32,59 ^e (56,5)	13,15 ^c (22,8)	8,84 ^e (15,3)	57,72	56,92
Argi Vn2	0,49 .	2,00 ^d (2,6)	51,80 ^d (67,3)	14,45 ^c (18,8)	8,12 ^e (10,6)	76,92	91,51

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. *Dados seguidos pelas mesmas letras em cada linha não diferem significativamente (teste de Tukey, p <0,05); ⁽¹⁾Extraído com água deionizada; ⁽²⁾Extraído com MgCl₂; ⁽³⁾Extraído com NH₂OHHCl; ⁽⁴⁾Extraído com HNO₃ + H₂O₂; ⁽⁵⁾ Número entre parênteses representa a porcentagem em relação ao somatório das formas.

Em ambos os solos Cambissolos e Argissolos cultivados com videiras, a fração mineral se tornou o principal dreno do Cu adicionado, seguido pela fração orgânica (Tabela 3). Além disso, comparando os solos Cambissolos coletados sob videira com maiores teores de Cu (Cambi Vn2 e Cambi Vn3), não se observou aumento no teor de Cu ligado à fração orgânica no solo com maior teor de Cu (Cambi Vn3), quando comparado ao solo Cambi Vn2 (Tabela 3), o que indica uma possível saturação dos grupos funcionais da MO. Comportamento semelhante foi observado nos solos Argi Vn1 e Argi Vn2 e isso também foi determinado por Casali et al. (2008), que utilizou a metodologia proposta por Tessier et al., (1979) para extração sequencial de Cu na camada de 0 - 20 cm de profundidade de Neossolos e Cambissolos, coletados sob vinhedos com longo histórico de aplicação de fungicidas à base de Cu. Contudo, estes resultados diferem de trabalhos realizados em zonas temperadas onde a fração orgânica parece ter maior importância na retenção do Cu. Segundo Pérez-Novo et al.

(2008) os teores totais de Cu variaram de 166 a 359 mg kg⁻¹ em solos de vinhedos da Espanha, onde a fração orgânica foi o principal dreno do Cu adicionado ao solo. Em acordo com esses resultados, Viti et al. (2008) observaram valores de Cu de 177 mg kg⁻¹ em solos de vinhedos da Toscana (Itália), principalmente ligados a fração húmica.

O Cu da fração residual também teve sua concentração aumentada nos solos Cambissolos coletados sob vinhedos (Cambi Vn1, Vn2 e Vn3) (Tabela 3). Isto sugere que o Cu adicionado ao solo proveniente de fungicidas à base de Cu também acumula em formas menos lábeis (Arias-Estévez et al., 2007; Komárek et al., 2008; Fernández-Calviño et al., 2009; Nogueirol et al., 2010). Contudo, essa fração é considerada inerte, não sendo extraída nas outras etapas do fracionamento químico (Tessier et al., 1979), sendo considerada uma fração quimicamente estável e biologicamente inativa (Lima et al., 2001). Entretanto, nestes solos, as frações consideradas biodisponíveis (trocável, mineral e orgânica) foram as que apresentaram maiores incrementos, representando 58, 80 e 79% do somatório das frações de Cu, respectivamente para os solos Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3. Isso mostra a tendência do Cu em acumular em frações biodisponíveis no solo, sendo os maiores teores de Cu encontrados na forma mineral e orgânica no solo.

Acúmulo de Cu no solo e crescimento das plantas

Para avaliar o acúmulo de Cu no solo foram utilizados quatro métodos de extração simples, CuTot, CuEPA, CuHCl e CuEDTA. Destes métodos os extratores HCl 0,1 mol L⁻¹ (CuHCl) e a extração com Na₂-EDTA 0,01 mol L⁻¹/acetato de amônio 1,0 mol L⁻¹ (CuEDTA) estimam a fração de Cu no solo considerada ambientalmente disponível, ou relatada por alguns autores como a fração potencialmente disponível para as plantas e os organismos do solo (Brun et al., 1998; Brun et al., 2001). Já a extração com a mistura de H₂O₂ + HF + HClPO₄ (CuTot) e com a mistura de H₂O₂ + HNO₃ + HCl (CuEPA) se caracterizam pela ação fortemente ácida, onde é extraído não só o Cu biodisponível, mas também frações de Cu com maior energia de ligação com os colóides do solo. Apesar de princípios de ação diferenciados dos métodos testados, os extratores mostraram tendências semelhantes na comparação entre os solos. Isso

porque os solos Cambissolo, coletados sob vinhedos da Serra, apresentaram teores mais elevados de Cu, quando comparado aos Argissolos, coletados sob vinhedos na Campanha Gaúcha, ambos com histórico de aplicação de fungicidas cúpricos (Tabela 4). Esse incremento nos teores biodisponíveis de Cu (CuHCl e CuEDTA) está associado ao uso frequente e ao longo dos anos de fungicidas e/ou caldas à base de Cu, como a calda bordalesa ($\text{CuSO}_4 + \text{Ca}(\text{OH})_2$), comumente utilizada no controle de doenças fúngicas foliares (Mirlean et al., 2007; Fernández-Calviño et al., 2009; Mirlean et al., 2009; Banas et al., 2010). Em adição, foi realizada a extração da solução do solo após a coleta das plantas aos 40 DAE e determinado os teores solúveis de Cu (CuSol40DAE). Nesta determinação se observou teores de Cu mais elevados nos solos Argissolos coletados sob vinhedos, quando comparado aos solos Cambissolos coletados sob vinhedos (Tabela 4). Estes resultados indicam maior biodisponibilidade de Cu nestes solos, o que não foi observado nas outras metodologias testadas (CuTot, CuEPA, CuHCl e CuEDTA) onde se constatou maiores teores de Cu nos solos Cambissolos coletados sob vinhedos (Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi Vn3), quando comparado com os solos Argissolos (Argi Vn1 e Argi Vn2).

Os teores de Cu totais (CuTot) encontrados nos solos coletados em vinhedos da Serra Gaúcha são elevados, contudo são inferiores aos relatados por Mirlean et al. (2007) e Casali et al. (2008), que encontraram teores de Cu total no solo superiores à $600 \text{ mg de Cu kg}^{-1}$, em solos coletados sob vinhedos com 30 anos de cultivo localizados na região da Serra Gaúcha do RS.

Em adição, como pode se observar na tabela 4, os teores pseudo-totais de Cu (CuEPA) nos solos coletados em vinhedos da Serra Gaúcha (Cambi Vn2 e Vn3), apresentaram valores acima do limiar de referência de qualidade, que seria de 200 mg kg^{-1} para o Cu, estabelecido pelo CONAMA (2009), o que indica o acúmulo excessivo do elemento do solo. Contudo, quando considerado o limite crítico estabelecido pela União Européia ($140 \text{ mg Cu kg}^{-1}$ - CEC,1986) o solo Cambi Vn1 também apresentaria valores acima da concentração considerada crítica para a camada superficial do solo (0 - 25 cm de profundidade). Por outro lado, os solos Argissolos coletados sob vinhedos (Argi Vn1 e Vn2) apresentaram teores menores aos considerado críticos pela normativa estabelecida pelo CONAMA (2009) e pela CEC (1986).

Tabela 4. Teores de Cu extraídos por diferentes extratores nos solos coletados em vinhedos nas regiões da Serra e da Campanha Gaúcha, na camada de 0 - 20 cm, e acúmulo de matéria seca (MS) de raízes e parte aérea e concentração de Cu (Con. de Cu) nas raízes e parte área aos 40 dias após a emergência (DAE) das plantas de aveia preta, cultivadas em casa de vegetação.

Solo	Cu Total	Cu EPA	Cu EDTA	Cu HCl	Cu 40DA E sol	MS		Con. de Cu	
						Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
					$\mu\text{g L}^{-1}$	$\text{---mg planta}^{-1}\text{---}$		$\text{---mg kg}^{-1}\text{MS---}$	
Cambi MN⁽¹⁾	47,8e*	29,8f	5,5f	1,8f	12,1f	21,0d	55,0d	19,5d	16,8ef
Cambi MN+PK	48,4e	29,0f	5,2f	1,9f	15,0f	34,0ab	155,0a	18,9d	15,0ef
Cambi Vn1	213,8c	183,0c	95,7c	96,9c	12,0f	26,0c	99,0c	230,5c	38,3a
Cambi Vn2	456,0b	408,3b	270,5b	273,1b	31,2d	25,0cd	33,0e	523,3b	18,0de
Cambi Vn3	520,1a	490,3a	328,7a	361,4a	53,9c	23,0cd	39,0e	666,5a	32,3b
Argi	14,5f	11,3g	2,2g	2,3f	25,7e	38,0a	160,0a	24,2d	13,7f
Argi Vn1	56,9e	51,6e	36,8e	41,3e	182,5a	37,0b	117,0b	223,2c	21,7d
Argi Vn2	91,5d	73,1d	67,2d	69,6d	260,2a	32,0b	64,0d	738,9a	27,7c

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. * Letras diferentes indicam diferença significativa em cada avaliação particular (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Contudo, as plantas de aveia preta cultivadas nos solos Argissolos coletados sob vinhedos Argi Vn1 e Argi Vn2, assim como as cultivadas nos solos Cambi Vn2 e Cambi Vn3, apresentaram drástica redução no acúmulo de matéria seca de raízes e da parte aérea, respectivamente, quando comparado aos solos Cambi MN + PK e Argi (Tabela 4). Também se verificou que as plantas de aveia cultivadas nos solos com os maiores teores de CuEPA e coletados sob vinhedos das duas regiões (Cambi Vn2 e Vn3 e Argi Vn2), aos 40 DAE, apresentaram ausência de perfilhos e clorose internerval. Estes resultados demonstram claramente que o acúmulo excessivo de Cu nos solos Cambissolos e Argissolos coletados sob vinhedos é capaz de promover fitotoxidez em plantas de aveia preta. Assim, se observa a necessidade da criação de níveis críticos de Cu no solo, para os quais deveria ser considerada a classe textural do solo.

O acúmulo de Cu ocorreu predominantemente nas raízes das plantas de aveia, não ocorrendo translocação proporcional para a parte aérea das plantas (Tabela 4).

Isso evidencia que as plantas de aveia, assim como outras espécies, possuem mecanismos em seu sistema radicular que podem impedir e/ou reduzir a translocação à parte aérea de parte do excedente de Cu absorvido, como observado em outras espécies (Brun et al., 2001; Chaignon et al., 2003; Chaignon e Hinsinger, 2003; Cornu et al. 2007; Michaud et al., 2007). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a maior parte do Cu acumulado nas raízes das plantas de aveia preta permanece nestas, não sendo translocado para a parte aérea das plantas. Nesse sentido, como ressaltado em estudos anteriores, a concentração de Cu na raiz seria um indicador muito mais sensível do acúmulo de Cu no solo (Brun et al. 2001; McBride 2001; Chaignon e Hinsinger 2003; Chaignon et al., 2003), contudo pode não apresentar fitoxidez causada pelo acúmulo de Cu no solo.

Biodisponibilidade do Cu no solo

O padrão de efeito dos oito solos sobre as variáveis de planta foi avaliado por meio da análise de componentes principais (ACP). Dessa forma, semelhanças em termos de biodisponibilidade de Cu foram identificadas com base na tendência de agrupamento dos solos dispostos no diagrama da ACP (Figura 1). Os dois primeiros componentes principais contêm 85,6% da variância dos dados e representam a maior parte da variabilidade dos dados (Tabela 5). As outras duas componentes explicaram juntas 14,4% da variância dos dados, e foram consideradas de pouca importância para descrever a estrutura principal dos dados. Dessa forma, foram usadas as duas primeiras componentes, simbolizadas por CP1 e CP2. A CP1 é um contraste entre a massa seca (dos compartimentos parte aérea e raízes) e a concentração de Cu nesses dois compartimentos e, portanto, pode ser considerada como descritora da biodisponibilidade de Cu para as plantas (Tabela 5). A CP2 é um índice que expressa certa relação entre o acúmulo de Cu nos tecidos e o crescimento radicular (variável que mede o crescimento e que exerce maior peso na CP2) (Tabela 5).

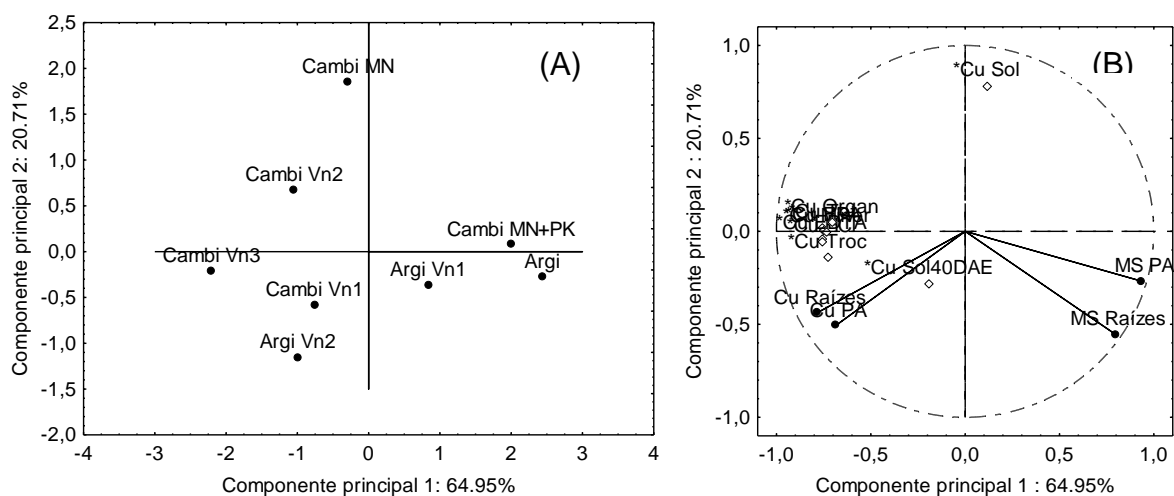


Figura 1. Escores dos solos de vinhedos das regiões da Serra e da Campanha Gaúcha, utilizados para o cultivo de aveia preta em casa de vegetação, para a primeira e segunda componentes (A) e correlação entre as variáveis e as componentes principais (B).

Tabela 5. Descritores de variabilidade e do padrão de relação dos solos de vinhedos das regiões da Serra e da Campanha Gaúcha e variáveis de plantas de aveia preta, cultivadas nestes solos e em casa de vegetação.

Autovalores			Variáveis		Autovetores	
Autovalor	Variância parcial	Variância Acumulada			1	2
--	%	%				
2,598	64,946	64,946	MS Raízes		0,494	-0,609
0,828	20,706	85,652	MS PA		0,581	-0,294
0,563	14,076	99,729	Cu Raízes		-0,487	-0,482
0,011	0,271	100	Cu PA		-0,426	-0,557

Com base na CP1 se observa que a biodisponibilidade de Cu para as plantas é maior no Cambi Vn3 e menor no Argi. Verifica-se também que os solos Cambi MN + PK e Argi, solos sem adição de Cu, apresentam efeitos semelhantes sobre as plantas. Em adição, o solo Argi Vn1, teve similaridade a estes, em termos de efeito sobre as plantas de aveia preta, o que indica ainda baixa biodisponibilidade de Cu às plantas. Em adição, estes solos foram os que apresentaram os menores teores de CuEDTA sendo

seu agrupamento influenciado principalmente pelo acúmulo de MS das raízes e parte aérea das plantas (Figura 1B). Além disso, se observa, com base na CP1, que os solos Cambi Vn2, Cambi Vn1 e Argi Vn2 também apresentaram efeitos semelhantes sobre as plantas. Chama a atenção que os teores de CuEDTA, nestes solos, variam entre 67,2 a 270,5 mg de Cu kg⁻¹ de solo (Tabela 3). Contudo, o efeito semelhante sobre as plantas indica a biodisponibilidade semelhante de Cu no solo. Isso ocorre porque a biodisponibilidade, toxicidade e mobilidade do Cu no solo é grandemente influenciada pela sua cinética de distribuição entre a solução e a fase sólida do solo, e pela variação na quantidade dos componentes da fase sólida (Han et al., 2001). Assim, características de solo como a CTC, a quantidade e a constituição da matéria orgânica, o teor e o tipo argilominerais influenciam a biodisponibilidade de Cu no solo (Brun et al., 1998) e o efeito de determinada concentração de Cu sobre o crescimento das plantas. Em adição se observa que o solo Cambi Vn3 possui certa similaridade com os solos Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Argi Vn2. Contudo, o solo Cambi Vn3 apresenta maior biodisponibilidade de Cu no solo sendo influenciado principalmente pelo acúmulo de Cu nas raízes e parte aérea.

Com base na CP2, verifica-se que a relação entre o acúmulo de Cu nos tecidos e o crescimento radicular se expressa apenas nos solos Cambi MN, Cambi Vn2 e Argi Vn2. Considerando as diferenças mais evidentes na CP2, observa-se que a concentração de Cu nas raízes foi menor quando o crescimento radicular foi pequeno (Cambi MN), onde o solo apresentava baixa disponibilidade de P. Por outro lado, se observou grande crescimento radicular na maior concentração de Cu nas raízes das plantas (Argi Vn2), o que indica que a concentração de Cu nas raízes pode ser utilizada como indicativo de biodisponibilidade de Cu no solo. Contudo, não é um indicador adequado de efeito de determinada concentração de Cu no solo sobre o crescimento das plantas.

Ainda em relação aos parâmetros de solo se observa alta correlação entre os teores de Cu extraíveis pelas extrações simples (CuTot, CuEPA, CuHCl e CuEDTA) e as fração extraíveis de Cu na forma seqüencial (CuTroc, CuMin e CuOrg) (Figura 1B). Com isso, se pode inferir que o Cu adicionado ao solo, através das sucessivas aplicações de fungicidas à base de Cu, tende a se distribuir nas formas pré-existentes

(Rheinheimer et al., 2003), porém em maior proporção em frações com menor energia de ligação como as CuTroc, CuMin e CuOrg. Por outro lado, a fração CuSol40DAE, teve menor relação com os teores extraíveis do solo e alta relação com os teores de Cu nas raízes e na parte aérea das plantas como observado na análise de correlação de Person (Tabela 6).

Tabela 6. Correlação linear de Pearson entre os teores extraídos de Cu por diferentes métodos e a produção de matéria seca de raízes e parte aérea, e os teores de Cu nas raízes e na parte aérea aos 40 dias após a emergência (DAE) das plantas de aveia preta, cultivadas em casa de vegetação.

	Matéria seca		Concentração de Cu	
	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
Cambissolos				
CuTot	-0,28	-0,70**	0,98**	0,37
CuEPA	-0,29	-0,70**	0,99**	0,38
CuEDTA	-0,36	-0,71**	0,99**	0,36
CuHCl	-0,37	-0,70**	0,98**	0,38
CuSol40DAE	-0,28	-0,57	0,90**	0,86**
CuSol	-0,71	-0,92**	0,81**	-0,96**
CuTroc	-0,30	-0,67**	0,96**	0,38
CuMin	-0,28	-0,71**	0,98**	0,31
CuOrg	-0,26	-0,71**	0,97**	0,26
Argissolos				
CuTot	-0,90**	-0,99**	0,95**	0,98**
CuEPA	-0,90**	-0,98**	0,91**	0,99**
CuEDTA	-0,84**	-0,99**	0,96**	0,98**
CuHCl	-0,86**	-0,98**	0,94**	0,98**
CuSol40DAE	-0,92**	-0,97**	0,90**	0,98**
CuSol	-0,18	-0,30	0,37	0,37
CuTroc	-0,75*	-0,67*	0,50	0,74*
CuMin	-0,87**	-0,97**	0,92**	0,98**
CuOrg	-0,86**	-0,88**	0,77*	0,92**

* e ** indicam correlação significativa ao nível de probabilidade de $p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente.

O CuSol40DAE foi a fração extraível de Cu que apresentou correlação positiva elevada com os teores de Cu nas raízes e parte aérea das plantas cultivadas em ambos os solos Cambissolos e Argissolos (Tabela 6), o que indica sua capacidade de representar a biodisponibilidade de Cu em solos com características físico-químicas bem

distintas como os solos Cambissolos e Argissolos usados no presente trabalho (Tabela 1).

As frações extraíveis CuTot, CuEPA, CuEDTA, CuHCl, CuSol40DAE e CuMin foram as que apresentaram nível de correlação $\geq 0,90$ com os teores de Cu nas raízes das plantas de aveia preta cultivada em ambos os solos Cambissolos e Argissolos, aos 40 DAE. Assim, mesmo metodologias mais destrutivas como CuTot e CuEPA, que não representariam de forma adequada a biodisponibilidade de Cu (Tessier et al., 1979; Feng et al., 2005; Alvarez et al., 2006), apresentaram alta correlação com os teores de Cu nas raízes das plantas. Essa alta correlação se justifica em função das sucessivas aplicações de Cu via fungicidas ocasionar o aumento da quantidade de Cu que é adsorvido com menor energia de ligação, passível de ser absorvido pelas plantas, uma vez que aqueles sítios mais ávidos foram paulatinamente sendo saturados. Em adição, este comportamento está de acordo com os resultados obtidos por Brun et al. (2001), Chaignon et al. (2003) e Nolan et al. (2005) que relataram em experimentos realizados em vaso, que a concentração de Cu total no solo poderia ser utilizada como indicador adequado da disponibilidade de Cu para as plantas, especialmente para a concentração de Cu nas raízes das plantas (Tabela 4).

Por outro lado, nos solos Cambissolos somente a fração extraível CuSol40DAE teve correlação positiva com a concentração de Cu na parte aérea das plantas de aveia preta. Contudo, como relatado em outros estudos a concentração de Cu na parte das plantas pode não ser um bom indicador da contaminação de Cu (Chaignon e Hinsinger, 2003). No entanto, a concentração de Cu nas raízes das plantas é um indicador mais sensível do nível de contaminação de Cu no solo, como salientado por vários trabalhos já realizados (Brun et al., 2001; Chaignon et al., 2003). Isso porque independente do solo, as maiores concentrações de Cu tendem a ser observadas nas raízes, onde se observou correlação positiva entre a maioria das frações extraíveis de Cu e os teores totais de Cu nas raízes das plantas, a exceção do CuSol.

8.6 Conclusões

A aplicação de fungicidas cúpricos em videiras aumentou o teor de cobre extraído por HCl 0,1 mol L⁻¹ no perfil do solo, inclusive até a camada de 30-40 cm de profundidade.

O cobre adicionado ao solo via aplicação foliar nas videiras acumula no solo predominantemente em formas biodisponíveis, especialmente aquelas ligadas à fração mineral do solo.

Extrações de CuTot, CuEPA, CuEDTA e CuHCl são indicadores adequados de biodisponibilidade do cobre em grupos de solos, com atributos químicos e físicos semelhantes.

Os solos Cambissolo Húmico e Argissolo Vermelho, com longo histórico de aplicação de fungicidas cúpricos apresentaram teores de cobre tóxicos para as plantas de aveia preta.

A concentração de Cu nas raízes pode ser utilizada como indicativo de biodisponibilidade de Cu no solo, mas não é indicador para avaliar fitotoxidez às plantas.

O cobre acumulado nos solos Argissolos da Campanha do Rio Grande do Sul apresentam maior biodisponibilidade, quando comparado ao cobre acumulado nos Cambissolos da Serra Gaúcha.

8.7 Referências

- ARIAS-ESTÉVEZ, M.; NÓVOA-MUÑOZ, J.C.; PATEIRO, M; LÓPEZ-PERIAGO, E. Influence of aging on copper fractionation in an acid soil. *Soil Sci.*, 172:225-32, 2007a.
- BANAS, D.; MARIN, B.; SKRABER, S.; CHOPIN, E.I.B.; ZANELLA, A. Copper mobilization affected by weather conditions in a stormwater detention system receiving runoff waters from vineyard soils (Champagne, France). *Environ. Pollut.*, 158:476-482, 2010.
- BRUN, L.A.; MAILLET, J.; RICHARTE, J.; HERRMANN, P.; RÉMY, J.C. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ. Pollut.*, 102:151-61, 1998.

- BRUN, L.A.; MAILLET, J.; HINSINGER, P.; PÉPIN, M. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environ. Pollut.*, 111:293-302, 2001.
- BRUNETTO, G.; CERETTA, C.A.; KAMINSKI, J.; MELO, G.W.B.; LOURENZI, C.R.; FURLANETTO, V.; MORAES, A. Aplicação de nitrogênio em videiras na Campanha Gaúcha: Produtividade e características químicas do mosto da uva. *Cienc. Rural*, 37:389-393, 2007.
- CASALI, C.A.; MOTERLE, D.F.; RHEINHEIMER, D.S; BRUNETTO, G.; CORCINI, A.L.M.; KAMINSKI, J. Copper forms and desorption in soils under grapevine in the Serra Gaúcha of Rio Grande do Sul. *R. Bras. Ci. Solo*, 32:1479-1487, 2008.
- CATTANI, I.; FRAGOULIS, G.; BOCCELLI, R.; CAPRI, E. Copper bioavailability in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) grown in two Italian soils. *Chemosphere*, 64: 1972-1979, 2006.
- CEC (Commission of the European Communities). Council directive on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture. *Off J. Eur. Commun L.*, 181, 1986 (Annex 1A).
- 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.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 420, de 28 de dezembro e 2009. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620/>. Acessado em 20 janeiro de 2010.
- CHAIGNON, V.; HINSINGER, P.A. Biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *J. Environ. Qual.*, 32:824-33, 2003.
- CHAIGNON, V.; SANCHEZ-NEIRA, I.; HERMANN, P.; JAILLARD, B.; HINSINGER, P. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. *Environ. Pollut.*, 123: 229-238, 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.*, 157:3363-3369, 2009.

- CITEAU, L.; LAMY, I.; VAN OORT, F.; ELSASS, F. Colloidal facilitated transfer of metals in soils under different land use. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 217:11-19, 2003.
- CORNU, J.Y.; STAUNTON, S.; HINSINGER, P. Copper concentration in plants and in the rhizosphere as influenced by the iron status of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant and Soil* 292, 63-77, 2007.
- CROUÉ, J.P.; BENEDETTI, M.F.; VIOLLEAU, D.; LEENHEER, J.A. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environ. Sci. Technol.*, 37:328-336, 2003.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solo. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa, 2006. 306p.
- EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Manual de métodos de análises de solo. 2.ed. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997, 212p.
- EPA - ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3050B. Acid digestion of sediments, sludges, and soils, 1996.<[http:// www.epa.gov/sw-846/pdfs/3005A.pdf](http://www.epa.gov/sw-846/pdfs/3005A.pdf)> (20 apr. 2006).
- FENG, M.H.; SHAN, X.Q.; ZHANG, S.; WEN, B. A comparison of the rhizosphere based method with DTPA, EDTA, CaCl₂, and NaNO₃ extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environ. Poll.*, 137:231-240, 2005.
- FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; RODRÍGUEZ-SUÁREZ, J.A.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; ARIAS-ESTÉVEZ, M.; SIMAL- GÁNDARA, J. Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components. *Geoderma*, 145:91-97, 2008b.
- FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D.; NÓVOA-MUÑOZ, J.C.; DÍAZ-RAVIÑA, M.; ARIAS-ESTÉVEZ, M. Copper accumulation and fractionation in vineyard soils from temperate humid zone (NW Iberian Peninsula). *Geoderma*, 153:119-29, 2009b.
- GUPTA, M.; CUYPERS, A.; VANGRONSVELO, J.; CLIJSTERS, H. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant*, 106: 262-267, 1999.

- HAN, F.X.; HARGREAVES, J.; KINGERY, W. L.; HUGGETT, D. B.; SCHLENK, D. K. Accumulation, distribution and toxicity of copper in soils of catfish pond receiving periodic copper sulfate applications. *J. Environ. Qual.*, 30:912-919, 2001b.
- LIMA, M.C.; GIACOMELLI, M.B.O.; STÜPP, V.; ROBERGE, F.D. Especificação de cobre e chumbo em sedimento do rio tubarão (SC) pelo método Tessier. *Quím. Nova*, 24:734-742, 2001.
- KAMINSKI, J.; GATIBONI, L.C.; RHEINHEIMER, D.S.; MARTINS, J.R.; SANTOS, E.J.S.; TITSSOT, C.A. Estimativa da acidez potencial em solos e sua implicação no cálculo da necessidade de calagem. *R. Bras. Ci. Solo*, 26:1107-1113, 2002.
- KOMÁREK, M.; SZÁKOVÁ, J.; ROHOŠKOVÁ, M.; JAVORSKÁ, H.; CHRASTNÝ, V.; BALÍK, J. Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: a case study from the Czech Republic. *Geoderma*, 147:16–22, 2008.
- MELLO, L.M.R. Vineyard Inventory for Rio Grande do Sul: 2001 to 2004, National Research Center of Grapes and Wine, Ibravin, Brazil, 2005 (in Portuguese).
- 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 Soil*, 298:99–111, 2007.
- McBRIDE, M.B. Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. *J. Environ. Qual.*, 30:78-84, 2001.
- MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A.; CHIES, J. O. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). *Environ. Pollut.*, 149:10–17, 2007.
- MIRLEAN, N.; BAISCH, P.; MEDEANIC, S. Copper bioavailability and fractionation in copper-contaminated sandy soils in the wet subtropics (southern Brazil). *B. Environ. Contam. Tox.*, 82:373-377, 2009.
- PÉREZ-NOVO, C.; FERNÁNDEZ-CALVINO, D.; NÓVOA-MUNOZ, J.C.; LÓPEZ-PERIAGO, E.; ARIAS-ESTÉVEZ, M. Acid–base adjustment and chemical fractionation to assess copper availability in Spanish vineyards soils and sediments. *Soil Sci.*, 173: 807–819, 2008.
- MURPHY, J.; RILEY, J.P. A Modified single solution method for determination of phosphate in natural waters. *Anal. Chem. Acta*, 27:31-36, 1962.

- NACHTIGALL, G.R.; NOGUEIROL, R.C.; ALLEONI, L.R.F. Formas de cobre em solos de vinhedos em função do pH e da adição de cama-de-frango. *Pesq. Agropec. Bras.*, 42: 427-434, 2007.
- NOLAN, A.L.; MCLAUGHLIN, M.J.; MASON, S.D. Chemical speciation of Zn, Cd, Cu and Pb in pore waters of agricultural and contaminated soils using donnan dialysis. *Environ. Sci. Technol.*, 37:90–98, 2003.
- NOGUEIROL, R.C.; ALLEONI, L. R. F.; NACHTIGALL, G. R.; MELO, G. W. Sequential extraction and availability of copper in Cu fungicide-amended vineyard soils from Southern Brazil. *J. Hazard. Mater.*, 181: 931-937, 2010.
- PIETRZAK, U.; MCPHAIL, D.C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma*, 122:151-66, 2004.
- PONTHIEU, M. Spéciation des éléments traces métalliques dans les sols et les solutions des sols: du modèle au terrain. Thèse de l'Univ. d'Aix Marseille III. 2003. 252p. (Tese de Doutorado)
- QIN, F.; SHAN, X.; WEI, B. Effects of low-molecular-weight organic acids and residence time on desorption of Cu, Cd and Pb from soils. *Chemosphere*, 57:253-263, 2004.
- RHEINHEIMER, D.S.; LABANOWSKI, J.; ELSASS, F.; CAMBIER, P.; SANTOS, M.A.S.; TESSIER, D. Heavy metal transport modelling in soil: sorption/desorption phenomena, water fluxes and contaminat fate. *Tópicos Especiais em Ciência do Solo*, 5:135-180, 2007.
- RHEINHEIMER, D.S.; CONTE, E.; ANGHINONI, I. Formas de acumulação de fósforo pela aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:893-900, 2003.
- SODRÉ, F.F.; LENZI, E.; COSTA, A.C. Utilização de modelos físico-químicos de adsorção no estudo do comportamento do cobre em solos argilosos. *Quím. Nova*, 24:324-330, 2001.
- SENA, M.M.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J.; TOKESHI, H.; POPPI, R.J. Discrimination of management effects on soil parameters by using principal component analysis: a multivariate analysis case study. *Soil Till. Res.*, 67: 171-181. 2002.

- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. Análises de solo, planta e outros materiais. 2. ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 174, 1995.
- TESSIER, A.; CAMPBELL, P.G.C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the apeciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, 51:844-850, 1979.
- TOSELLI, M.; SCHIATTI, P.; ARA, D.; BERTACCHINI, A.; QUARTIERI, M. The accumulation of copper in soils of the Italian region Emilia-Romagna. *Plant Soil Environ.*, 55:74-79, 2009.
- VITI, D.C.; QUARANTA, R.; DEPHILIPPIS, G.; CORTI, A.; AGNELLI, R.; CUNIGLIO, L.; GIOVANNETTI, L. Characterizing cultivable soil microbial communities from copper fungicide amended olive orchard and vineyard soils. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24:309-318, 2008.

9 DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo são abordadas duas situações distintas com relação a fontes potenciais de contaminação do solo com Cu e Zn. Uma com o uso de dejetos líquidos de suínos em um experimento de longa duração, onde o dejetos era utilizado como fonte de nutrientes para culturas anuais, e o outro com solos de vinhedos que receberam sucessivas aplicações, ao longo dos anos, com fungicidas a base de Cu. Nestas duas situações existem condições distintas, tendo em vista a forma/composição e a taxa de aplicação anual de Cu e Zn. Além disso, o tipo e o uso do solo também é outra variável a ser considerada devido a influência dos atributos do solo no comportamento destes metais.

No solo com aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos se observou incremento significativo nos teores de Cu e Zn na camada de 0 - 20 cm de profundidade (Tabela 1 – Artigo I). Contudo, os teores de Cu extraído por HCl 0,1 mol L⁻¹ (Tabela 1 – Artigo I), são bem inferiores àqueles encontrados nos solos de vinhedos (Tabela 4 – Artigo III). Essa diferença pode ser explicada, em partes, pelo tempo de aplicação e taxa de aplicação anual. Enquanto no solo com aplicação de 80 m³ ha⁻¹ de dejetos líquido de suínos, a taxa anual de aplicação de Cu foi de 8,2 kg ha⁻¹ ano⁻¹ e de Zn foi de 10,1 kg ha⁻¹ ano⁻¹, durante os sete anos com aplicação de dejetos, a taxa estimada para vinhedos da Almadén para o solo Argi Vn2 foi de 11,1 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de Cu, adicionado na forma de sulfato de cobre.

Em adição, as sucessivas aplicações de dejetos de suínos ocasionaram aumento significativo nos teores de nutrientes P, K, Ca e Mg. O P foi o nutriente que apresentou maiores incrementos, evidenciando que as altas quantidades de P adicionadas ao solo nas 19 aplicações de dejetos, foram muito elevadas em relação às quantidades de P exportadas pelas culturas. Essa resposta é comum em áreas com aplicações de dejetos de suínos e também foi observado por Scherer et al. (2007) que observou a formação de gradientes de P disponível nas camadas superficiais (0 - 5 e 5 - 10 cm) de Latossolo Vermelho após aplicação de 0, 40 e 115 m³ ha⁻¹ ano⁻¹ de dejetos, num período de três anos. O aumento significativo tanto de Cu, quanto Zn e P pode ser justificado no

presente trabalho, porque, por exemplo, onde foram feitas 19 aplicações de dejetos de suínos em sete anos, significou que, com a dose de $80 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de dejetos, foram aplicadas anualmente $216 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de dejetos líquidos de suínos, bem acima da maior quantidade aplicada no trabalho de Scherer et al. (2007), além de ter sido em sete anos e não três como no trabalho de Scherer et al. (2007).

Nesse sentido se observa que o acúmulo de Cu e Zn em solos com sucessivas aplicações de dejetos líquidos de suínos ocorre de forma simultânea com o incremento de macronutrientes como P, K, Ca e Mg. Isso porque ao contrário dos fertilizantes químicos, que podem ser formulados para as condições específicas de cada cultura e solo, os dejetos de suínos apresentam, simultaneamente, vários nutrientes em quantidades desproporcionais em relação à necessidade das plantas (CQFS - RS/SC, 2004). Em função disso, estes elementos tendem a acumular no solo. Contudo, o acúmulo será diferenciado por vários motivos, sendo um deles o fato de que as características dos dejetos são diferentes, dependendo do tipo de criação e alimentação dos suínos e do manejo dado aos dejetos, fazendo com que, por exemplo, as quantidades de Cu e Zn adicionados ao solo possam ser muito variáveis como observado por Mattias et al. (2010).

O fato de ter sido observado incremento na CTC efetiva e no teor de MO do solo com sucessivas aplicações de 20, 40 e $80 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ de dejetos líquidos de suínos (Tabela 1 – Artigo I) é relevante porque a MO tem grande importância na adsorção de metais na fase sólida do solo por apresentar alta afinidade com metais como Cu e Zn. Com isso ocorrem maior retenção e diminuição do potencial de fitotoxicidade de Cu e Zn. Essa característica da MO é resultante da sua elevada superfície específica, carga líquida negativa dependente do pH do solo e da capacidade de formar quelatos orgânicos, diminuindo a atividade de íons em solução (SAUVÉ et al., 1997; SAUVÉ et al., 1998). Além disso, a grande variabilidade das características dos compostos orgânicos proporciona a formação de ligações dos grupos funcionais das substâncias húmicas com os metais com diferentes graus de energia como fracas, por exemplo, nos grupos carboxílicos, ou fortes, com grupos fenólicos, nitrogenados e sulfurados (CROUÉ et al., 2003). O Cu apresenta alta afinidade com os grupos –SH da matéria orgânica, enquanto que a maior afinidade do Zn se dá com os grupos carboxílicos (AIKEN et al.,

2003). Isso mostra o maior potencial de ligação do Cu com a MO, quando comparado com o Zn.

Quando se compara o crescimento das plantas de milho cultivadas nas amostras de solo indeformadas e deformadas, se observa maior acúmulo de matéria fresca da parte aérea nas plantas cultivadas nas amostras de solo indeformadas (Figura 2 – Artigo I). Isso pode ser justificado pelo fato de que somente se observou indicadores de toxidez às plantas, através da inibição da enzima SOD e aumento no nível de peroxidação lipídica nas plantas de milho cultivadas nas amostras de solo deformadas com sucessivas aplicações dejetivo líquido de suínos, quando comparado ao tratamento PK, o que indica aumento no estresse oxidativo. Isso pode ter ocorrido, em função do revolvimento mecânico do solo promover a homogeneização entre as camadas, o que torna a concentração de Cu e Zn homogênea e menor em toda a massa de solo. Por outro lado, nas amostras indeformadas a estrutura e distribuição dos metais são preservadas no solo. Isso porque as maiores alterações nos atributos químicos do solo como acúmulo de Cu, Zn, P e MO ocorrem nas camadas superficiais do solo como pode ser observado nos trabalhos de Girotto et al. (2010) e Lourenzi (2010), realizados na mesma área experimental deste estudo. Em adição, a maior concentração de Cu e Zn ocorreu nas camadas superficiais do solo, onde os teores de MO são elevados, o que pode diminuir a atividade principalmente do Cu em solução, como já referido anteriormente. Além disso, o grande incremento de P na camada de 10 - 20 cm de profundidade (LOURENZI, 2010) proporciona ambiente propício para o desenvolvimento do sistema radicular em camadas do solo com menor concentração de Cu e Zn, no solo indeformado. Contudo, é importante considerar na interpretação dos resultados, que a quantidade de solo nas amostras indeformadas foi de 10 kg, enquanto que nos solos deformados, a quantidade foi de 4 kg de solo. Isso pode ter interferido em certo grau no crescimento das plantas, apesar do período de cultivo das plantas ter se limitado à 25 dias após a emergência das plantas.

O manejo dos solos utilizados como áreas de descarte de resíduos orgânicos deverá ser planejado de acordo com o tipo de resíduo utilizado. Isso porque o revolvimento do solo provoca a eliminação do gradiente das concentrações de Cu e Zn no perfil do solo, o que pode reduzir as perdas de nutrientes por escoamento

superficial. Contudo, com relação à fitotoxidez, mais estudos são necessários, onde se avalie o efeito da distribuição dos metais no perfil do solo sobre o efeito fitotóxico.

Nos solos cultivados com videiras na Serra e Campanha Gaúcha se observou grandes incrementos nos teores de Cu, quando comparado aos solos sem cultivo de videiras. Contudo, se observou teores de Cu na forma total (Cu total), em torno de 5,7 vezes maiores no Cambissolo com maior teor de Cu (Cambi Vn3), quando comparado ao Argissolo com maior teor de Cu (Argi Vn2) (Tabela 2- Artigo II). Em parte, esses maiores teores de Cu nos Cambissolos podem ser explicados devido a maior aplicação de fungicidas em função do clima mais úmido da região da Serra Gaúcha. Isso porque quanto mais alta a umidade e precipitação, maior é a frequência de aplicação de fungicidas à base de cobre, o que contribui para a contaminação ambiental (MIRLEAN et al., 2007). Contudo, cabe ressaltar que as características físico-químicas iniciais dos solos que influenciam o acúmulo de metais como Cu, são distintas nos solos estudados, onde se observa maiores teores de argila, óxido de Fe em formas cristalinas (Fe extraído por DCB) e amorfas (Fe extraído por oxalato) e teores de MO nos solos Cambissolos (Tabela 1 – Artigo III). Os maiores teores de argila, MO e de óxido de Fe presentes nos solos Cambissolos proporcionam maior capacidade de adsorção dos metais, quando comparado ao Argissolos deste estudo. Soma-se a isso, o fato de que o solo Cambissolo naturalmente apresenta maiores teores total de Cu, como se observa no solo sem cultivo de videiras (Cambi MN) que apresentava teor total de Cu 3,3 vezes maior que Argissolo sem cultivo de videira (Argi). Isso ocorre em função do solo Cambissolo ser originado de rocha basáltica, que possui maiores teores de Cu, quando comparado ao Argissolo da Campanha Gaúcha que é originado de rocha sedimentar.

Neste estudo, assim como observado por Casali et al. (2008) e Mirlean et al. (2007), o Cu adicionado aos solos de vinhedos acumulou-se principalmente nas camadas superiores do solo. Isso pode levar a um problema ambiental, devido à natureza não biodegradável do Cu e suas altas concentrações em solos de vinhedos. Em adição, o Cu presente nas camadas superficiais do solo é suscetível tanto ao escoamento superficial no solo como ao transporte no perfil do solo por lixiviação (RIBOLZI et al., 2002) e, portanto, pode afetar negativamente os organismos aquáticos (ZYADAH e ABDEL-BAKU, 2000).

Nos solos coletados sob vinhedos na Serra Gaúcha (Cambi Vn1, Cambi Vn2 e Cambi vn3) e na Campanha Gaúcha (Argi Vn1 e Argi Vn2) as plantas de aveia preta apresentaram drástica redução no acúmulo de matéria seca de raízes e parte aérea. Além disso, se observou sintomas de clorose internerval e ausência de perfilhos aos 40 dias após a emergência (DAE) (Tabela 2 – Artigo II) das plantas nos solos com maiores teores de Cu (Cambi Vn2, Cambi Vn3 e Argi Vn2). De forma concomitante, se observou aumento do nível de peroxidação lipídica e da concentração de H_2O_2 na parte aérea das plantas de aveia preta, o que indica aumento do nível de estresse oxidativo, em função das altas concentrações de Cu no solo e pode explicar também a inibição do crescimento da planta. Além disso, o acúmulo excessivo de Cu no solo também alterou a atividade de antioxidantes enzimáticos como a enzima SOD, onde se observou inibição desta enzima aos 40 DAE, na parte aérea das plantas de aveia preta. Em adição, nas plantas de milho cultivadas nos solos com sucessivas aplicações dejetos líquido de suínos também se observou redução da atividade da enzima SOD, aos 25 DAE, o que indica uma resposta semelhante nas duas espécies vegetais ao acúmulo de Cu no solo.

Por outro lado, a atividade das enzimas CAT e APX, outros importantes antioxidantes enzimáticos responsáveis pela degradação de H_2O_2 , tiveram sua atividade aumentada na parte aérea das plantas de aveia preta cultivadas nos solos com maiores teores de Cu, em ambos os solos Cambissolos e Argissolos. Assim, o sistema antioxidante da aveia preta, mesmo sendo ativado, não foi eficiente na remoção das espécies reativas de oxigênio (EROs). Nesse sentido, foi confirmado o observado em alguns estudos, nos quais o excesso de Cu promoveu a geração excessiva de EROs, levando a um aumento na atividade das enzimas antioxidantes, ou seja, um aumento no sistema de defesa das plantas (WECKX e CLIJESTERS, 1997; DEVI e PRASAD, 1998; LOMBARDI e SEBASTIANI, 2005). Este comportamento indica aumento no nível de estresse oxidativo nas plantas. Além dos antioxidantes enzimáticos, os antioxidantes não enzimáticos foram alterados nas plantas de aveia preta cultivadas nos solos coletados sob vinhedos. Os resultados deste estudo demonstraram que aos 40 DAE, os maiores teores de AsA e NPSH foram encontrados

na parte aérea nas maiores concentrações de Cu e no solo coletado sob mata, onde a disponibilidade de P era baixa.

Nos solos com maiores teores de CuEDTA, em ambos os solos Cambissolos e Argissolos, se observou os maiores teores de Cu nas raízes das plantas de aveia preta. Contudo, a translocação do Cu acumulado, nas raízes, para a parte aérea foi pequena (Tabela 4 – Artigo III). Nesse sentido, como ressaltado em outros estudos, a concentração de Cu nas raízes parece ser um indicador sensível ao acúmulo de Cu no solo (BRUN et al. 2001; McBRIDE 2001; CHAIGNON e HINSINGER 2003; CHAIGNON et al. , 2003). Contudo, a concentração de Cu nas raízes parece não representar de forma adequada o efeito de determinada concentração de Cu no solo sobre a planta, presumivelmente devido ao controle eficaz da translocação do Cu das raízes para a parte aérea.

Nas plantas de aveia preta cultivada no solo Cambissolo com maior teor de Cu (Cambi Vn3) também se observou redução nos teores de clorofila total (Figura 1). Essa redução nos teores de clorofila pode ocorrer em função da peroxidação lipídica nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos e degradação da clorofila, mediada pela produção excessiva de EROs (BASZYNSKI et al, 1988;. VINIT-DUNAND et al, 2002). Em adição, a diminuição do conteúdo de clorofila provoca perturbação na homeostase celular redox, visto que esta molécula desempenha a função de acceptor de elétrons, aumentando assim a produção de EROs (MITTLER, 2002). Contudo, o teor de clorofila parece não ser um bom indicador do aumento no estresse oxidativo na parte aérea das plantas de aveia preta, porque não se observou tendência clara de redução nos teores de clorofila com a redução do crescimento das plantas ou com o aumento nos teores de Cu nas folhas.

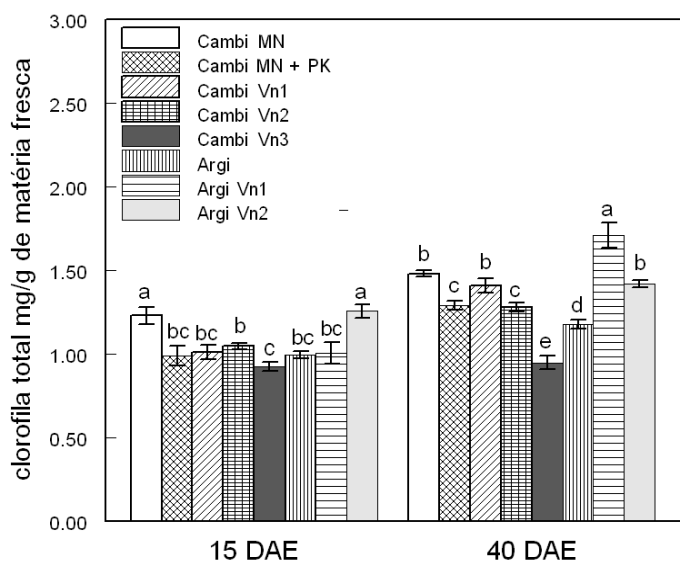


Figura 1. Concentração de clorofila total na parte aérea de plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas cúpricos. Plantas coletas aos 15 e 40 dias após a emergência das plantas (DAE). Os dados são médias \pm DP de três repetições diferentes. Letras diferentes indicam diferença significativa em uma coleta em particular (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Nas plantas cultivadas nos solos coletados sob vinhedos se observou redução intensa na concentração e acúmulo de Fe e P. O antagonismo observado entre Cu e Fe nas raízes e parte aérea, ou seja, a redução na absorção e translocação do Fe para a parte aérea (Tabela 1 e 2), pode ter resultado na deficiência de Fe, como os sintomas de clorose indicaram nas maiores concentrações de Cu. Esse sintoma é característico de fitotoxicidade de Cu, onde o excesso de Cu induz a deficiência de Fe (TAYLOR e FOY, 1985; McBRIDE, 2001). Chama atenção a drástica redução na concentração e no acúmulo de P, nas raízes e parte aérea das plantas de aveia preta, nas maiores concentrações de Cu nas raízes, mesmo que os solos apresentem alta disponibilidade de P. Além disso, também se observou alteração na atividade da enzima fosfatase ácida que é envolvida no processo de manutenção da homeostase do fósforo presente nas plantas (Figura 2).

Tabela 1. Concentração de fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Ferro (Fe) nas raízes e parte aérea aos 15 e 40 dias após a emergência (DAE), em plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos na Serra e na Campanha Gaúcha.

Solo	P, g kg ⁻¹		K, g kg ⁻¹		Ca, g kg ⁻¹		Mg, g kg ⁻¹		Fe, mg kg ⁻¹	
	Raiz	PA	Raiz	PA	Raiz	PA	Raiz	PA	Raiz	PA
15 DAE										
Cambi MN⁽¹⁾	0,84 ^{c*}	2,15 ^e	2,39 ^d	61,71 ^{bc}	1,54 ^b	2,57 ^d	1,91 ^b	2,20 ^d	1788 ^c	98 ^{cd}
Cambi MN + PK	1,30 ^b	3,35 ^c	3,15 ^d	56,55 ^{cd}	1,15 ^c	2,61 ^d	2,48 ^a	2,06 ^d	2618 ^a	189 ^a
Cambi Vn1	0,17 ^d	2,52 ^e	6,52 ^c	74,23 ^a	2,14 ^a	2,41 ^d	1,69 ^{bc}	1,47 ^e	2224 ^b	70 ^d
Cambi Vn2	0,16 ^d	2,13 ^e	8,17 ^c	54,26 ^{cd}	1,04 ^{cd}	7,12 ^a	1,47 ^{cd}	4,56 ^b	310 ^d	57 ^d
Cambi Vn3	0,15 ^d	1,97 ^e	6,52 ^c	49,38 ^d	0,94 ^{cd}	5,98 ^b	0,99 ^e	4,40 ^b	248 ^d	67 ^d
Argi	2,38 ^a	5,53 ^a	12,53 ^b	71,17 ^a	0,89 ^d	2,74 ^d	1,03 ^e	1,56 ^e	235 ^d	166 ^{ab}
Argi Vn1	0,32 ^d	4,84 ^b	16,28 ^a	70,59 ^{ab}	1,09 ^{cd}	4,12 ^c	1,13 ^{de}	3,60 ^c	208 ^d	137 ^{bc}
Argi Vn2	0,20 ^d	3,30 ^d	7,54 ^c	51,09 ^d	1,00 ^{cd}	6,60 ^{ab}	1,29 ^{de}	5,08 ^a	201 ^d	91 ^d
40 DAE										
Cambi MN⁽¹⁾	0,55 ^e	1,14 ^{de}	2,40 ^e	42,90 ^{ab}	1,83 ^a	7,69 ^a	1,44 ^c	3,89 ^{ab}	3605 ^a	213 ^a
Cambi MN + PK	1,30 ^c	2,85 ^b	12,24 ^{bc}	46,34 ^a	1,26 ^b	6,72 ^{ab}	3,64 ^a	4,11 ^a	2752 ^b	185 ^{ab}
Cambi Vn1	1,34 ^c	2,16 ^{bc}	20,07 ^a	47,85 ^a	1,15 ^{bc}	6,39 ^{ab}	1,79 ^{bc}	3,08 ^d	1561 ^c	180 ^{ab}
Cambi Vn2	0,85 ^d	0,96 ^{de}	8,11 ^d	39,32 ^{ab}	1,11 ^{bc}	6,04 ^{bc}	1,88 ^b	3,63 ^{bc}	1183 ^d	198 ^a
Cambi Vn3	0,83 ^{de}	0,80 ^e	9,62 ^{cd}	30,17 ^b	1,20 ^{bc}	4,53 ^c	1,63 ^{bc}	3,35 ^{cd}	689 ^e	147 ^{bc}
Argi	1,98 ^b	3,93 ^a	15,54 ^b	47,16 ^a	0,94 ^{cd}	5,79 ^{bc}	1,87 ^b	3,34 ^{cd}	536 ^{ef}	198 ^a
Argi Vn1	2,53 ^a	3,93 ^a	21,17 ^a	31,90 ^b	0,85 ^d	4,7 ^{6c}	1,95 ^b	3,56 ^{bc}	274 ^f	166 ^{bc}
Argi Vn2	1,37 ^c	1,62 ^{cd}	12,37 ^{bc}	41,80 ^{ab}	1,07 ^c	5,90 ^{bc}	3,82 ^a	3,83 ^{ab}	433 ^{ef}	119 ^c

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. *Os dados são médias ± DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa em cada avaliação particular (teste de Tukey, p <0,05).

Tabela 2. Acúmulo de fósforo (P), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg) e Ferro (Fe) nas raízes e parte aérea aos 15 e 40 dias após a emergência (DAE), em plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos na Serra e na Campanha Gaúcha.

Solo	P, µg planta ⁻¹		K, µg planta ⁻¹		Ca, µg planta ⁻¹		Mg, µg planta ⁻¹		Fe, µg planta ⁻¹	
	Raiz	PA	Raiz	PA	Raiz	PA	Raiz	PA	Raiz	PA
15 DAE										
Cambi MN⁽¹⁾	8,5 ^{c*}	48,4 ^c	24,7 ^e	1339 ^{ab}	13,6 ^b	56,1 ^{bc}	17,0 ^b	48,1 ^{bc}	17,8 ^b	2,2 ^{bc}
Cambi MN+PK	12,6 ^b	76,1 ^b	30,7 ^{de}	1285 ^{ab}	11,3 ^{bc}	59,7 ^{bc}	24,2 ^a	47,3 ^{bc}	25,6 ^a	4,3 ^a
Cambi Vn1	1,6 ^d	45,2 ^c	60,7 ^{cd}	1323 ^{ab}	20,1 ^a	43,0 ^c	15,8 ^{bc}	26,2 ^d	20,8 ^{ab}	1,2 ^d
Cambi Vn2	1,6 ^d	28,0 ^c	82,8 ^c	704 ^c	10,5 ^{bc}	92,8 ^a	14,8 ^{bc}	59,4 ^b	3,1 ^c	0,7 ^d
Cambi Vn3	1,7 ^d	26,1 ^c	71,1 ^c	660 ^c	10,3 ^{bc}	79,9 ^{ab}	10,7 ^c	58,6 ^b	2,7 ^c	0,9 ^d
Argi	23,9 ^a	121,2 ^a	125,8 ^b	1559 ^a	8,9 ^c	59,5 ^{bc}	10,3 ^c	33,9 ^{cd}	2,3 ^c	3,6 ^a
Argi Vn1	3,6 ^d	80,0 ^b	179,2 ^a	1162 ^b	12,0 ^{bc}	68,1 ^b	12,4 ^{bc}	59,5 ^b	2,3 ^c	2,2 ^b
Argi Vn2	2,3 ^d	48,9 ^c	87,1 ^c	754 ^c	11,6 ^{bc}	97,2 ^a	15,0 ^{bc}	75,0 ^a	2,3 ^c	1,3 ^{cd}
40 DAE										
Cambi MN⁽¹⁾	11,5 ^d	62,8 ^d	49,9 ^e	2360 ^d	38,2 ^{ab}	421,7 ^{cd}	30,7 ^d	213,8 ^e	75,1 ^b	11,7 ^c
Cambi MN+PK	44,9 ^b	442,1 ^b	421,3 ^c	7180 ^a	43,2 ^a	1039,8 ^a	125,4 ^a	637,0 ^a	94,7 ^a	28,6 ^a
Cambi Vn1	34,8 ^{bc}	214,5 ^c	520,0 ^{bc}	4746 ^b	29,8 ^{bcd}	637,3 ^b	46,4 ^{cd}	306,8 ^d	40,6 ^c	17,9 ^b
Cambi Vn2	21,1 ^{cd}	38,3 ^d	200,2 ^{de}	1582 ^{de}	27,6 ^d	238,8 ^{ef}	45,0 ^d	143,9 ⁱ	29,7 ^{cd}	7,8 ^{cd}
Cambi Vn3	18,9 ^d	26,0 ^d	217,2 ^d	1006 ^e	27,2 ^{cd}	150,0 ^f	37,1 ^d	110,6 ^f	15,7 ^e	4,8 ^d
Argi	76,4 ^a	632,8 ^a	598,0 ^{ab}	7581 ^a	36,2 ^{abc}	931,3 ^a	71,7 ^b	536,1 ^b	20,6 ^{de}	31,8 ^a
Argi Vn1	84,8 ^a	463,1 ^b	711,2 ^a	3746 ^{bc}	28,4 ^{cd}	559,7 ^{bc}	65,5 ^{bc}	418,6 ^c	9,1 ^e	19,5 ^b
Argi Vn2	44,4 ^b	103,7 ^{cd}	400,0 ^c	2670 ^{cd}	34,6 ^{abc}	378,2 ^{de}	123,7 ^a	245,6 ^d	14,0 ^e	7,6 ^{cd}

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. *Os dados são médias ± DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa em cada avaliação particular (teste de Tukey, p <0,05).

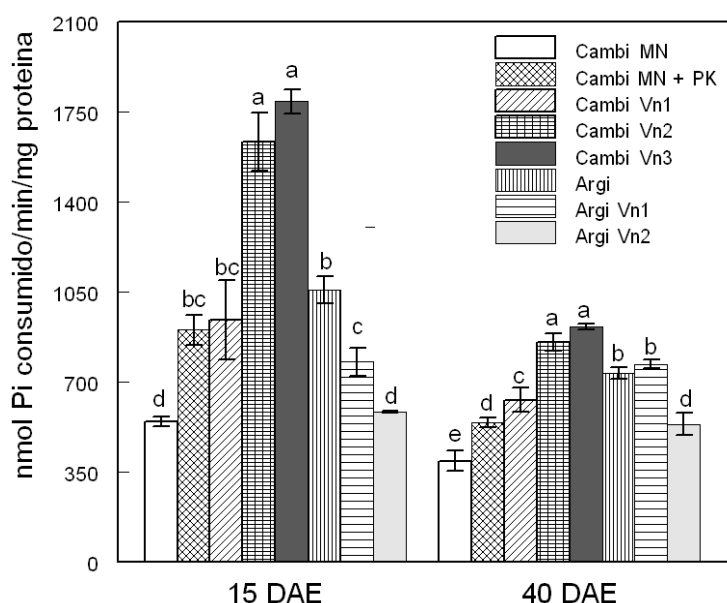


Figura 2. Atividade da enzima fostatase ácida na parte aérea de plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos com histórico de aplicação de fungicidas cúpricos. Plantas coletas aos 15 e 40 dias após a emergência das plantas (DAE). Os dados são médias \pm DP de três repetições diferentes. Letras diferentes indicam diferença significativa em uma coleta particular (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Nos solos coletados sob vinhedos também se observou incremento nos teores de Zn totais e extraído com EDTA (Tabela 2 – Artigo II). Isto indica que este metal também está presente em insumos utilizados nos vinhedos e que também pode se tornar um problema em potencial em função de seu acúmulo excessivo no solo, como observado nos solos coletados sob vinhedos da Serra e da Campanha Gaúcha. Nas raízes e parte aérea das plantas de aveia preta se observou grande incremento nos teores e no conteúdo de Zn (Tabela 3), o que é consequência do aumento da disponibilidade deste metal no solo. Este incremento nos teores de Zn também pode ter causado redução no crescimento da aveia preta. Isso porque altas concentrações de Zn no solo podem causar inibição no crescimento vegetal, danos em raízes, cloroses, e redução na taxa fotossintética e o conteúdo de clorofila nas folhas (LIN et al., 2005, BROADLEY et al., 2007, PAVLÍKOVA et al., 2008). Além disso, altas concentrações de Zn em plantas inibem o aparato fotossintético, e atividade de várias enzimas tais como

a Rubisco (Pavlíkova et al., 2008). A redução na taxa fotossintética ocorre devido a inibição do fotossistema II, como observado por Quartacci et al. (2000).

Em adição, o aumento pronunciado nos teores de Zn nas raízes e na parte aérea da aveia preta ocorreram concomitantemente com o aumento nos teores de Cu e com a redução nos teores de Fe e P, o que indica um possível efeito do Zn na absorção de Fe e P pelas plantas de aveia preta. Desta forma, estes resultados indicam que a redução no crescimento das plantas também pode ter sido ocasionada pelo aumento nos teores de Zn no solo. Contudo, o acúmulo de Cu foi mais pronunciado em ambos os solos Argissolos e Cambissolos coletados sob vinhedos com longo histórico com aplicação de fungicidas a base de Cu (Tabela 2 – Artigo II).

Ainda com relação aos solos coletados sob vinhedos, cabe salientar que as aplicações de fungicidas à base de Cu são anuais. Então se espera que os teores de Cu tendam a aumentar nos solos. Além disso, como observado no artigo III, o cobre adicionado ao solo acumula predominantemente em formas biodisponíveis, sendo que os maiores teores de cobre estavam ligados à fração mineral do solo. O fato de ter sido observada uma aparente saturação da fração orgânica do solo com Cu, sugere que a biodisponibilidade de Cu possa aumentar de forma muito mais rápida em função da saturação dos grupos funcionais mais ávidos pelo Cu adicionado ao solo. Isso passa a ser mais preocupante devido a videira ser uma planta perene onde é comum encontrar vinhedos com 30 anos ou mais. Além disso, é comum na Serra Gaúcha e na Campanha Gaúcha, na década de 2000, a substituição dos vinhedos mais antigos, por novos vinhedos nas mesmas áreas, onde a adição de Cu via fungicida é contínua.

Nestas áreas de replantação de vinhedos, em função da acentuada redução do crescimento das plantas de aveia preta cultivada nos solos com maiores teores de Cu, é possível que novas mudas de videiras possam ter seu crescimento inicial prejudicado, em função dos efeitos fitotóxicos do acúmulo excessivo de Cu no solo. Essa é uma possibilidade que precisa ser melhor investigada.

Tabela 3. Concentração e acúmulo de Zn nas raízes e parte aérea, aos 15 e 40 dias após a emergência (DAE), em plantas de aveia preta cultivadas em solos coletados em vinhedos na Serra e na Campanha Gaúcha.

Solo	Concentração de Zn, mg kg ⁻¹ MS		Conteúdo de Zn, µg planta ⁻¹	
	Raízes	Parte aérea	Raízes	Parte aérea
15 DAE				
Cambi MN ⁽¹⁾	57,30 ^{cd}	2,07 ^e	0,51 ^e	0,04 ^e
Cambi MN + PK	56,53 ^{cd}	24,40 ^d	0,55 ^{cd}	0,56 ^d
Cambi Vn1	145,73 ^a	25,85 ^d	1,36 ^a	0,46 ^d
Cambi Vn2	77,27 ^{bc}	133,80 ^b	0,78 ^{cde}	1,73 ^b
Cambi Vn3	78,37 ^{bc}	116,75 ^b	0,86 ^{bcd}	1,55 ^{bc}
Argi	47,52 ^d	22,55 ^{de}	0,47 ^e	0,48 ^d
Argi Vn1	88,72 ^b	81,87 ^c	0,98 ^{bc}	1,31 ^c
Argi Vn2	98,22 ^b	173,70 ^a	1,14 ^{ab}	2,56 ^a
40 DAE				
Cambi MN ⁽¹⁾	62,47 ^e	38,93 ^g	1,30 ^e	2,13 ^e
Cambi MN + PK	166,07 ^d	80,55 ^{ef}	5,69 ^d	12,45 ^b
Cambi Vn1	260,78 ^c	121,40 ^{cd}	6,78 ^{cd}	12,08 ^b
Cambi Vn2	352,37 ^b	196,65 ^b	8,68 ^{bc}	7,82 ^{cd}
Cambi Vn3	382,62 ^{ab}	138,20 ^c	8,67 ^{bc}	4,62 ^{de}
Argi	166,37 ^d	45,20 ^g	6,41 ^{cd}	7,29 ^{cd}
Argi Vn1	313,87 ^{bc}	92,15 ^{de}	10,52 ^b	10,83 ^{bc}
Argi Vn2	456,02 ^a	266,25 ^a	14,73 ^a	17,08 ^a

⁽¹⁾MN=mata nativa; MN + PK= mata nativa fertilizado com fósforo e potássio; Vn= vinhedo. Os dados são médias ± DP de quatro repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa em cada avaliação particular (teste de Tukey, p <0,05).

Em função da dificuldade para remover por fitorremediação metais pesados de solo contaminado, recentemente uma série de substâncias inorgânicas, tais como calcário, fertilizantes fosfatados e biossólidos alcalinos foram testados com o intuito de promover a imobilização de metais pesados no solo (BOLAN et al., 2003). Nesse sentido, estudos indicam que a adição de fosfatos pode efetivamente reduzir a fitotoxicidade de metais pesados (SPARROW e SALARDINI, 1997; BOLAN et al., 2003; LI et al., 2008). Isso porque a adição de fosfatos pode aumentar o número de cargas negativas do solo, promovendo a adsorção de metais como o Cu, a partir da superfície do solo e a precipitação de metais em compostos fosfatados (SPARROW e SALARDINI, 1997; BOLAN et al., 2003). Assim, a adição de fosfato pode ser uma alternativa a ser estudada como forma de amenizar os efeitos fitotóxicos do excesso de Cu em solos de vinhedos.

Nas condições dos solos da região da Serra e da Campanha Gaúcha, onde já se observa acúmulo de Cu e onde o acúmulo não é tão elevado até o momento, o melhor

meio para evitar os problemas de alta concentração de Cu no solo é diminuir a quantidade adicionada anualmente, o que requer cuidados com as dosagens, número de aplicações por safra, concentração de Cu na calda e substituição da calda bordalesa por outros insumos menos contaminantes. Em adição, novos estudos são necessários para estabelecer faixa de toxidez de acordo com as características físico-química dos solos. Isso porque se verificou grande redução no crescimento nas plantas cultivadas em solos Argissolos coletados em vinhedos da Campanha Gaúcha em solos que apresentavam teores 2,7 vezes menores que os 200 mg de Cu kg⁻¹ de solo, estabelecido como limiar de toxidez (CONAMA, 2009). Com isso, se pode inferir que o valor estabelecido por essa normativa não é adequada para solos arenosos, como é o caso dos solos Argissolos coletados em vinhedos da região da Campanha Gaúcha.

Com o auxílio da análise de componentes principais (ACP) se observou efeitos semelhantes sobre as plantas cultivadas em solos com teores de Cu EDTA, variando entre 67,2 a 270,5 mg de Cu kg⁻¹ de solo (Tabela 4 – Artigo III). Isso ocorre porque a biodisponibilidade, toxicidade e mobilidade do Cu no solo são grandemente influenciadas pela sua cinética de distribuição entre a solução e a fase sólida do solo, e pela variação na quantidade dos componentes da fase sólida (HAN et al., 2001b). Nesse sentido, se observa a necessidade de características de solo como a CTC, teor de argila e MO serem levados em consideração para avaliar o nível de contaminação de cada solo. A ACP com a introdução de parâmetros de plantas como acúmulo de matéria seca de raízes e parte aérea pode ser utilizada para agrupar solos com diferentes características físico-químicas e diferentes teores de Cu (extraído por determinado método), mas com efeitos similares sobre determinada espécie vegetal.

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De forma geral os parâmetros bioquímicos ligados ao estresse oxidativo não foram alterados de forma intensa nas plantas de milho, indicando que as 19 aplicações de dejetos líquidos de suínos não causaram acúmulo excessivo de cobre e zinco no solo.

Os solos Cambissolo Húmico de vinhedos da Serra Gaúcha e os solos Argissolo Vermelho da região da Campanha, com longo histórico de aplicação de fungicidas cúpricos apresentam teores de cobre tóxicos para as plantas de aveia preta. Contudo, cabe salientar que estes resultados foram obtidos em experimentos com solo proveniente da camada de 0 - 20 cm de profundidade onde o acúmulo de Cu é mais elevado no solo. Além disso, em condição de campo as raízes podem se desenvolver abaixo desta camada onde os teores de Cu não são elevados.

Os efeitos fitotóxicos do excesso de cobre no solo incluem a drástica redução na concentração e no conteúdo de fósforo e ferro nas raízes e na parte aérea das plantas de aveia preta. Nesse sentido, novos estudos são necessários para avaliar um possível efeito do aumento da disponibilidade de fósforo na redução da fitotoxidez causada pelo excesso de cobre no solo.

O acúmulo excessivo de cobre e zinco também pode ocorrer em solos com sucessivas aplicações de dejetos líquidos de suínos. Contudo, o acúmulo de cobre e zinco ocorre de forma concomitante com grandes incrementos nos teores de fósforo no solo, o que pode diminuir os efeitos fitotóxicos do acúmulo excessivo de metais como o cobre e o zinco no solo.

A concentração de cobre nas raízes da aveia preta é um indicador sensível da biodisponibilidade do cobre acumulado em solos de vinhedos com sucessivas aplicações de fungicidas à base de cobre. Por outro lado, é importante ressaltar que os resultados evidenciaram que o cobre absorvido pelas plantas foi acumulado predominantemente nas raízes das plantas, sendo pequena a sua translocação para a parte aérea das plantas.

Os solos coletados sob vinhedos apresentam acúmulo significativo de zinco, o indica que o acúmulo de zinco também pode se tornar excessivo em solos de vinhedos. Nesse sentido, novos estudos são necessários para avaliar o efeito fitotóxico do acúmulo de zinco em solos de vinhedos.

Os limites estabelecidos pelo CONAMA (2009) para acúmulo de cobre no solo são superestimados para os solos arenosos como os solos Argissolos coletados sob vinhedos da Campanha Gaúcha. Nesse sentido, novos estudos são necessários para estabelecer limites de toxidez de acordo com as características físico-química dos solos.

Extrações de CuTot, CuEPA, CuEDTA e CuHCl são indicadores adequados de biodisponibilidade do cobre em grupos de solos, com atributos químicos e físicos semelhantes. Desta forma, os atributos físico-químicos dos solos devem ser levados em consideração para estabelecer faixas disponibilidade do cobre no solo, independente do método de extração utilizado.

A aplicação de fungicidas cúpricos em videiras aumentou o teor de cobre extraído por HCl 0,1 mol L⁻¹, principalmente nas camadas superficiais do solo. Contudo, se observou incremento no perfil do solo, inclusive até a camada de 30 - 40 cm de profundidade, indicando a migração do cobre no perfil do solo o que preocupa pela possibilidade de contaminação de águas sub-superficiais.

O cobre adicionado ao solo via aplicação foliar nas videiras acumula no solo predominantemente em formas biodisponíveis, especialmente aquelas ligadas à fração mineral do solo. Em adição, se observou aparente saturação da fração orgânica do solo com cobre, o que faz acreditar que aplicações futuras de Cu no solo, irão proporcionar, cada vez mais, a ocorrência de formas biodisponíveis de Cu, em função da saturação dos grupos funcionais mais ávidos pelo cobre adicionado ao solo. Por isso, nas condições dos solos da região da Serra e da Campanha Gaúcha recomenda-se a redução na quantidade adicionada anualmente de Cu, o que requer cuidados com as dosagens, número de aplicações por safra e concentração de cobre nos agroquímicos utilizados nesta cultura.

11 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, C. A.; LOPES, A. S.; SANTOS, G. Micronutrientes. In: NOVAIS, R. F. et al., (Eds) **Fertilidade do Solo**. Viçosa, MG. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 645 – 736.

ALLEONI, L. R. F.; BORBA, R. P.; CAMARGO, O. A. Metais pesados: da cosmogênese aos solos brasileiros. In: **Tópicos em Ciência do Solo**, v. 4, p. 2-36, 2005.

ALLOWAY, B. J. **Heavy Metals in Soils**. 2nd. Glasgow: Blackie Academic & Professional, 1995. 368 p.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331–1341, 2002.

ALVAREZ, J. M. et al. Comparison of EDTA and sequential extraction tests for phytoavailability prediction of manganese and zinc in agricultural alkaline soils. **Geoderma**, v. 132, p. 450–463, 2006.

ANDRIGUETTO, J. M. et al. **Nutrição animal. As bases e os fundamentos da nutrição animal**. São Paulo. Ed Nobel. 4º Ed. v1. 1981. 394 p.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373–399, 2004.

ARTETXE, U. et al. Low light grown duckweed plants are more protected against the toxicity induced by Zn and Cd. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 40, p. 859–863, 2002.

ASADA, K. Ascorbate peroxidase: a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, v. 85, p. 235-241, 1992.

BASSO, C. J. et al. Dejeito líquido de suínos: II-Perdas de nitrogênio e fósforo por percolação no solo sob plantio direto. **Ciência Rural**, v. 35, p. 1305-1312, 2005.

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

BASZYSKI, T. et al. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. **Journal of Plant Physiology**, v. 132, p. 708-713, 1988.

BERNAL, M. et al. Excess copper effect on growth, chloroplast ultrastructure, oxygen-evolution activity and chlorophyll fluorescence in *Glycine max* cell suspensions. **Physiologia Plantarum**, v. 127, p. 312–325, 2006.

BERWANGER, A. L. **Alterações e transferências de fósforo do solo para o meio aquático com o uso de dejetos líquidos de suínos**. 2006. 105f. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

BESNARD, E.; CHENU, C.; ROBERT, M. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. **Environmental Pollution**, v. 112, p. 329–37, 2001.

BOLAN, N. S. et al. Distribution and bioavailability of copper in a farm. **Science of the Total Environment**, v. 309, p. 225-236, 2003.

BONAZZI, G.; CORTELLINI, L.; PICCININI, S. Presenza di rame e zinco nei liquami suinicoli e rischio di contaminazione dei suoli. **L'Informatore Agrario**, v. 36, p. 55–59, 1994.

BRIAT, J. F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 322, 43–54, 1999.

BROADLEY, M. R. et al. Zinc in plants. **New Phytologist**, v.173, p. 677–702, 2007.

BRUN, L. A. et al. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. **Environmental Pollution**, v. 102, p. 151–61, 1998.

BRUN, L. A. et al. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. **Environmental Pollution**, v. 111, p. 293–302, 2001.

CASALI, C. A. et al. Copper forms and desorption in soils under grapevine in the Serra Gaúcha of Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1479–87, 2008.

CERETTA, C. A. et al. Dejeito líquido de suínos: I - perdas de nitrogênio e fósforo na solução escoada na superfície do solo, sob plantio direto. **Ciência Rural**, v.35, p.1296-1304, 2005.

CERETTA, C. A. et al. Características químicas de solo sob aplicação de esterco líquido de suínos em pastagem natural. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 729-735, 2003.

CHAIGNON, V.; HINSINGER, P. A. Biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 824-33, 2003.

CHAIGNON, V. et al. Copper bioavailability and extractability as related to chemical properties of contaminated soils from a vine-growing area. **Environmental Pollution**, v. 123, p. 229-238, 2003.

CHAQUI, A. et al. Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Science**, v.127, p. 139–147, 1997.

CHEN, J., GOLDSBROUGH, P. B. Increased activity of γ -glutamyl cysteine synthetase in tomato cells selected for cadmium tolerance. **Plant Physiology**, v. 106, p. 233 – 239, 1994.

CHOPIN, E. I. B.; ALLOWAY, B. J. Distribution and mobility of trace elements in soils and vegetation around the mining and smelting areas of Tharsis, Riotinto and Huelva, Iberian Pyrite Belt, SW Spain. **Water Air Soil Pollution**, v. 182, p. 245–261, 2007.

CLEMENS, S. Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. **Biochimie**, v. 88, p. 1707 – 1719, 2006.

COMISSÃO DE QUÍMICA E FERTILIDADE DO SOLO - RS/SC. **Manual de adubação e calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. 10. ed. Porto Alegre: SBCS: NRS: UFRGS, 2004. 400 p.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 420**, de 28 de dezembro e 2009. <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620/>. Acessado em 20 janeiro de 2010.

CROUÉ, J. P. et al. Characterization and copper binding of humic and nonhumic organic matter isolated from the South Platte River: Evidence for the presence of nitrogenous binding site. *Environmental Science & Technology*, v. 37, p. 328-336, 2003.

CUYPERS, A.; VANGRONSVELD, J.; CLIJSTERS, H. The redox status of plant cells (AsA and GSH) is sensitive to zinc imposed oxidative stress in roots and primary leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology Biochemistry*, v.39, p.657–664, 2001.

DEVI, S. R.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: responses of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant Science*, v. 138, p. 157–165, 1998.

DÍAZ-RAVIÑA, M.; CALVO DE ANTA, R.; BÅÅTH, E. Tolerance (PICT) of the bacterial communities to copper in vineyards soils from Spain. *Journal Environmental of Quality*, v. 36, p. 1760–1764, 2007.

DURIGON, R. et al. Produção de forragem em pastagem natural com o uso de esterco líquido de suíno. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 22, p. 983-992, 2002.

FATIMA, R. A.; AHMAD, M. Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment*, v. 346, p. 256–273, 2004.

FENG, M.-H. et al. A comparison of the rhizosphere based method with DTPA, EDTA, CaCl₂, and NaNO₃ extraction methods for prediction of bioavailability of metals in soil to barley. *Environmental Pollution*, v. 137, p. 231–240, 2005.

FERNÁNDEZ-CALVIÑO, D. et al. Copper content of soils and river sediments in a winegrowing area, and its distribution among soil or sediment components. **Geoderma**, v. 145, 91–97, 2008.

FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiology Plant**, v. 92, p. 696 – 717, 1994.

GIROTTTO, E. **Cobre e zinco no solo sob uso intensivo de dejetos líquidos 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. et al. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 955-965, 2010.

GRÄBER, I. et al. Accumulation of Copper and Zinc in Danish Agricultural Soils in Intensive Pig Production Areas. **Danish Journal of Geography**, v.105, p.15-22, 2005.

GRANT, C. M.; MACIVER, F. H., DAWES, I. W. Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. **Molecular Biology of the Cell**, v. 8, p. 1699 - 1707, 1997.

HAN, F. X.; BANIN, A.; TRIPLETT, G. B. Redistribution of heavy metals in arid-zone soils under a wetting–drying soil moisture regime. **Soil Science**, v.166, p. 18–28, 2001a.

HAN, F. X. et al. Accumulation, distribution and toxicity of copper in soils of catfish pond receiving periodic copper sulfate applications. **Journal Environmental of Quality**, v. 30, p. 912–919, 2001b.

HEDLEY, M. J.; STEWART, J. W. B.; CHAUHAN, B. S. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. **Soil Science Society American Journal**, v. 46, p. 970-976, 1982.

HSU, J. H., AND LO, S. L. Effect of composting on characterization and leaching of copper, manganese, and zinc from swine manure. **Environmental Pollution**, v.114, p. 119–127, 2000.

JONDREVILLE, C.; REVY, P. S.; DOURMAD, J. Y. Dietary means to better control the environmental impact of copper and zinc by pigs from weaning to slaughter. **Livestock Production Science**, v. 84, p. 147-156, 2003.

KABAŁA, K. et al. Comparison of heavy metal effect on the proton pumps of plasma membrane and tonoplast in cucumber root cells. **Journal of Plant Physiology**, v.165, p. 278-288, 2008.

KNOX, J. P.; DODGE, A. D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, v. 24, p. 889–896, 1985.

KOMÁREK, M. et al. Copper contamination of vineyard soils from small wine producers: a case study from the Czech Republic. **Geoderma**, v. 147, p. 16–22, 2008.

KONZEN, E. A. Dejetos de suínos fermentados em biodigestores e seu impacto ambiental como insumo agrícola. **Seminários Técnicos de Suinocultura**. VII Simpósio Goiano de avicultura e II Simpósio de suinocultura, Goiânia - GO, 2005.

KOPITTKE, P. M.; MENZIES, N. W. Effect of Cu toxicity on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Plant and Soil**, v. 279, p. 287–296, 2006.

L'HERROUX, L. et al. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). **Environmental Pollution**, v.97, p. 119-130, 1997.

LI, P. et al. Effects of several amendments on rice growth and uptake of copper and cadmium from a contaminated soil. **Journal of Environmental Science**, v. 20, p. 449–455, 2008.

LIN, C.; CHANG, H.; HUANG, H. Zinc induces mitogen-activated protein kinase activation mediated by reactive oxygen species in rice roots. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p. 963–968, 2005.

LIORENS, N. et al. Effects of copper exposure upon nitrogen metabolism in tissue cultured *Vitis vinifera*, **Plant Science**, v.160, p. 159–163, 2000.

LOMBARDI, L.; SEBASTIANI, L. Copper toxicity in *Prunus cerasifera*: growth and antioxidant enzymes responses of in vitro grown plants. **Plant Science**, v. 168, p. 797–802, 2005.

LOURENZI, C. R. **Alterações em atributos químicos de argissolo submetido a sucessivas aplicações de dejetos líquidos de suínos**. 2010. 54f. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

MADHAVA RAO, K. V.; SRESTY, T. V. S. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses. **Plant Science**, v. 157, p. 113–128, 2000.

MAGALHÃES, M. J.; SEQUEIRA, E. M.; LUCAS, M. D. Copper and zinc in vineyards of Central Portugal. **Water Air Soil Pollution**, v. 26, p. 1–17, 1985.

MALLICK, N. Copper-induced oxidative stress in the chlorophycean microalga *Chlorella vulgaris*: response of the antioxidant system. **Journal Plant Physiology**, v.161, p. 591–597, 2004.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of Higher Plants**, Academic Press, London, pp 889, 1995.

MATTIAS, J. L. **Metais pesados em solos sob aplicação de dejetos líquidos de suínos em duas microbacias hidrográficas de Santa Catarina**. 2006. 165f. Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo. Tese (Doutorado em Ciência do Solo). Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

MATTIAS, J. L. et al. Copper, zinc and manganese in soils of two watersheds in Santa Catarina with intensive use of pig slurry. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 445-1454, 2010.

McBRIDE, M. B. Cupric ion activity in peat soil as a toxicity indicator for maize. **Journal Environmental of Quality**, v. 30, p. 78–84, 2001.

McBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York, Oxford University Press, 1994. 406p.

MICHAUD, A. M.; CHAPPELLAZ, C.; HINSINGER, P. Copper phytotoxicity affects root elongation and iron nutrition in durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.). **Plant and Soil**, v. 310, p. 151–165, 2008.

MICHAUD, A. M. et al. Copper uptake and phytotoxicity as assessed in situ for durum wheat (*Triticum turgidum durum* L.) cultivated in Cucontaminated, former vineyard soils. **Plant Soil**, v. 298, p. 99–111, 2007.

MIGUÉNS, T. et al. Biochemical properties of vineyard soils in Galicia, Spain. **Science of the Total Environment**, v. 378, p. 218–222, 2007.

MIRLEAN, N.; ROISENBERG, A.; CHIES, J. O. Metal contamination of vineyard soils in wet subtropics (southern Brazil). **Environmental Pollution**, v. 149, p. 10–17, 2007.

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

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

NELSON, N. Metal ion transporters and homeostasis. **European Molecular Biology Organization Journal**, v. 18, p. 4361 – 4371, 1999.

NOCTOR, G.; FOYER, C. H. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249 – 279, 1998.

PÄTSIKKÄ, E.; ARO, E. M.; TYYSTJÄRVI, E. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. **Plant Physiology**, v.117, p. 619-627, 1998.

PAVLÍKOVÁ, D. et al. The effect of potentially toxic elements and sewage sludge on the activity of regulatory enzyme glutamate kinase. **Plant Soil Environmental**, v.53, p. 201–206, 2007.

PÉREZ-NOVO, C. et al. Acid–base adjustment and chemical fractionation to assess copper availability in Spanish vineyards soils and sediments. **Soil Science**, v. 173, p. 807–819. 2008.

PIETRZAK, U.; MCPHAIL, D. C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. **Geoderma**, v. 122, p. 151–66, 2004.

QUARTACCI, M. F. et al. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. **Physiology Plant**, v.108, p. 87–93, 2000.

RADOTIC, K.; DUCIC, T.; MUTAVDZIC, D. Changes in peroxidase activity and isozymes in spruce needles after exposure to different concentrations of cadmium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 44, p. 105–113, 2000.

RAUSER, W. E. Structure and function of metal chelators produced by plants. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 31, p. 19 – 33, 1999.

REDDY, A. R.; CHAITANYA, K. V.; VIVEKANANDAN, M. Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1189-1202, 2004.

RHEINHEIMER, D. S.; CONTE, E.; ANGHINONI, I. Formas de acumulação de fósforo pela aplicação de fosfato em solo no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, p. 893-900, 2003.

RIBOLZI, O. et al. Speciation and origin of particulate copper in runoff water from a Mediterranean vineyard catchment. **Environmental Pollution**, v. 117, p. 261-271, 2002.

ROSEN, B. P. Biochemistry of arsenic detoxification. FEBS; **Federation of European Biochemical Societies**, Letters, v. 529, p. 86 – 92, 2002.

SAIRAM, R. K.; DESHMUKH, P. S.; SAXENA, D. C. Role of antioxidant systems in wheat genotypes tolerance to water stress. **Biology Plantarum**, v. 41, p. 384-394, 1998.

SAUVÉ, S.; McBRIDE, M.; HENDERSHOT, W. Soil solution speciation of lead(II): effects of organic matter and pH. **Soil Science Society of America Journal**, v. 62, p. 618–621, 1998.

SAUVÉ, S. et al. Copper solubility and speciation of in situ contaminated soils: effects of copper level, pH and organic matter. **Water Air Soil Pollution**, v. 100, p. 133–149, 1997.

SCHNEIDER, S.; BERGMANN, L. Regulation of glutathione synthesis in suspension cultures parsley and tobacco. **Botanica Acta**, v. 108, p. 34 – 40, 1995.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal Experimental Botany**, v.53, p.1351–1365, 2002.

SEGANFREDO, M. A.; GIROTTO, A. F. O impacto econômico do tratamento dos dejetos em unidades terminadoras de suínos. Concórdia: EMBRAPA, 2004. (<http://www.porkworld.com.br/porkworld/publicacoes.asp>. Acesso: em 15 maio 2005).

SEGANFREDO, M. A. A questão ambiental na utilização dejetos de suínos como fertilizante do solo. Concórdia, EMBRAPA-CNPISA, **Circular técnica**, No 22, 2000.

SHELDON, A. R.; MENZIES, N. W. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodes grass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture. **Plant and Soil**, v. 278, p. 341-349, 2005.

SCHERER, E. E.; BALDISSERA, I. T.; NESI, C. N. Propriedades químicas de um latossolo vermelho sob plantio direto e adubação com esterco de suínos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 31, p. 123-131, 2007.

SMIRNOFF, N. Ascorbic acid: Metabolism and functions of a multifaceted molecule. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 3, p. 229 – 235, 2000.

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic Press, 1995. 276p.

SPARROW, L. A.; SALARDINI, A. A. Effects of residues of lime and phosphorus fertilizer on cadmium uptake and yield of potatoes and carrots. **Journal of Plant Nutrition**, v. 20, p. 1333–49, 1997.

TAYLOR, G. J.; FOY, C. D. Differential uptake and toxicity of ionic and chelated copper in *Triticum aestivum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 63, p. 1271–1275, 1985.

TESSIER, A.; CAMPBELL, P. G. C.; BISSON, M. Sequential extraction procedure for the apéciation of particulate trace metals. **Analytical Chemistry**, v. 51, p. 844-850, 1979.

TOSELLI, M. et al. The accumulation of copper in soils of the Italian region Emilia-Romagna. **Plant, Soil and Environment**, v. 55, p. 74-79, 2009.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effect of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 3, p.195-206, 1990.

VINIT-DUNAND, F. et al. Effects of copper on growth and photosynthesis on mature and expanding leaves in cucumber plants. **Plant Science**, v. 163, p. 53–58, 2002.

WANG, C. et al. The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. **Chemosphere**, v. 75, p. 1468–1476, 2009.

WECKX, J. E. J.; CLIJSTERS, H. M. M. Zn phytotoxicity induces oxidative stress in primary leaves of *Phaseolus vulgaris*, **Plant Physiology Biochemistry**, v. 35, p. 405–410, 1997.

WEDEKIND, K. J.; HORTIN, A. E.; BAKER, D. H. Methodology for assessing zinc bioavailability: Efficacy estimates for zinc methionine, zinc sulfate, and zinc oxide. **Journal Animal Science**, v. 70, p. 178-187, 1992.

YRUELA I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, p. 145–146, 2005.

ZYADAH, M. A.; ABDEL-BAKY, T. E. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc, and cadmium in some aquatic organisms. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 740–747, 2000.