

LUCAS ANJOS DE SOUZA

**“CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS DE *Dolichos lablab* L. AO CÁDMIO”**

Campinas
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

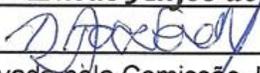
INSTITUTO DE BIOLOGIA

LUCAS ANJOS DE SOUZA

**“CARACTERIZAÇÃO DE RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E
BIOQUÍMICAS DE *Dolichos lablab* L. AO CÁDMIO”**

Este exemplar corresponde à redação final
da Tese defendida pelo candidato

Lucas Anjos de Souza


e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
UNICAMP para obtenção do Título de Doutor
em Biologia Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo

CAMPINAS,
2014

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

So89c Souza, Lucas Anjos, 1985-
Caracterização de respostas fisiológicas e bioquímicas de *Dolichos lablab* L.
ao cádmio / Lucas Anjos de Souza. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Ricardo Antunes de Azevedo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fitorremediação. 2. Estresse oxidativo. 3. Proteoma. I. Azevedo, Ricardo
Antunes. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of physiological and biochemical responses of
Dolichos lablab L. to cadmium

Palavras-chave em inglês:

Phytoremediation

Oxidative stress

Proteome

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Doutor em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Ricardo Antunes de Azevedo [Orientador]

Cláudia Regina Baptista Haddad

Renato Rodrigues Ferreira

Liliane Santos de Camargos

Fernando Angelo Piotto

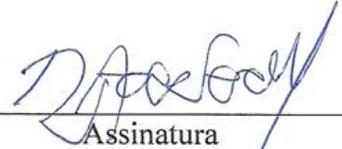
Data de defesa: 28-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 28 de fevereiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo (orientador)



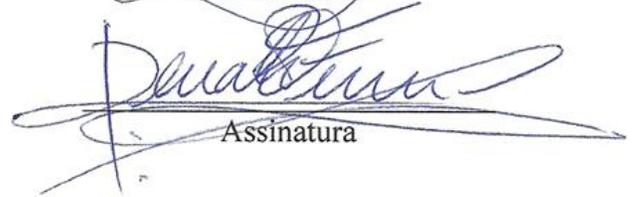
Assinatura

Profa. Dra. Liliane Santos de Camargos



Assinatura

Dr. Renato Rodrigues Ferreira



Assinatura

Dra. Sara Adrián López de Andrade

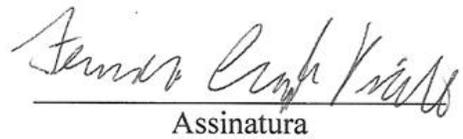
Assinatura

Profa. Dra. Claudia Regina Baptista Haddad



Assinatura

Prof. Dr. Fernando Angelo Piotto



Assinatura

Prof. Dr. Rafael Vasconcelos Ribeiro

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

Assinatura

RESUMO

Um dos grandes problemas de poluição ambiental é a contaminação do solo e corpos d'água com metais pesados. Alguns desses elementos não possuem funções metabólicas e são extremamente tóxicos podendo levar o organismo à morte. Com o aumento de atividades industriais e o manejo inapropriado de resíduos que contenham esses elementos, a quantidade e disponibilidade de metais pesados no solo aumentam consideravelmente assim, se tornando um problema sério. O cádmio (Cd) é um metal pesado que não possui função metabólica e é altamente tóxico. Técnicas de engenharia para remediação de solos contaminados por metal pesado são utilizadas, mas geralmente trazem outros impactos ao meio ambiente. Assim, a fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas para remediar solos contaminados com metais pesados, utilizando a capacidade de absorção e acumulação do elemento em tecidos vegetais, dessa forma sendo caracterizada como uma opção ambientalmente adequada. No entanto, poucas plantas que produzem altas quantidades de biomassa têm sido estudadas para utilização nessa fitotecnologia. Dessa maneira, esse estudo buscou caracterizar a resposta de *Dolichos lablab* L. ao Cd, uma leguminosa forrageira tolerante aos estresses por salinidade e seca. Realizamos a avaliação do potencial fitorremediador para solos contaminados com Cd, a caracterização da resposta da via antioxidativa enzimática e perfil proteico. Observamos que *Dolichos lablab* L. pode ser utilizada como fitoestabilizadora de Cd em solos cujo grau de contaminação seja moderado, até 5 mg kg^{-1} ; observamos, também, que a resposta do sistema antioxidante é tecido específica, sendo a resposta radicular mais eficiente que a resposta foliar; por meio da análise do proteoma de *Dolichos lablab* L. expostas ao Cd, observamos que enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e metabolismo energético são, frequentemente moduladas positivamente e proteínas relacionadas à resposta a estresses abióticos diversos são induzidas tanto em raízes quanto em folhas.

Palavras-chave: Fitorremediação, Estresse oxidativo, Proteoma.

ABSTRACT

One of the major problems of environmental pollution is the contamination of soil and water bodies with heavy metals. Some of these elements do not have metabolic functions and are extremely toxic and can lead organisms to death. With the increase of industrial activities and inappropriate management of waste containing these elements, the amount and availability of heavy metals in the soil greatly increased, thus becoming a serious problem. Cadmium (Cd) is a heavy metal that has no metabolic function and is highly toxic. Engineering techniques for remediate heavy metals contaminated soils are used, but usually bring other environmental impacts. Thus, phytoremediation is a technique that uses plants for remediating heavy metals contaminated soil, using the plant ability to uptake and accumulate the toxic element in plant tissues, thus being characterized as an environmentally friendly option. However, few plants that produce high amounts of biomass have been studied to be used in this phytotechnology. Thus, this study aimed to characterize the response of *Dolichos lablab* L. to Cd, a leguminous plant used as forage that is tolerant salt and drought stresses. We performed the evaluation of the potential use for phytoremediation of Cd-contaminated soil, the characterization of the antioxidant pathway response and protein profile. We observed that *Dolichos lablab* L. can be used for Cd phytoestabilization in soils with a moderate degree of contamination, up to 5 mg kg⁻¹; we also observed that the enzymatic antioxidant response is tissue specific, being root response more efficient than that of foliar; by the proteome analysis of *Dolichos lablab* L. under Cd stress, we observed that enzymes related to carbohydrate and energetic metabolisms are, frequently, up regulated and that proteins related to abiotic stress response are up regulated in both roots and leaves.

Keywords: Phytoremediation, Oxidative stress, Proteome.

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

O presente trabalho foi idealizado a partir de resultados obtidos do grupo de pesquisa em fitorremediação da Prof. Dra. Marlene Aparecida Schiavinato e Dra. Sara Adrián López de Andrade, que visa obter conhecimento do padrão de resposta a metais pesados de leguminosas herbáceas ou arbóreas para posterior aplicação como fitorremediadoras de solo contaminado por esses elementos. A ideia de utilização da espécie *Dolichos lablab* L. ocorreu após a realização de um trabalho de iniciação científica júnior, desenvolvido por alunos do ensino médio, sob orientação de alunos de mestrado e doutorado, no programa Ciência e Arte nas Férias da UNICAMP, onde observamos que a referida espécie apresentava tolerância ao elemento zinco (Zn^{+2}) e que suas raízes eram pouco prejudicadas, em termos de crescimento, pelo excesso desse elemento. Pela semelhança química entre os elementos zinco e cádmio (Cd^{+2}) e a experiência da equipe do Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo com o último elemento, resolvemos avaliar se, assim como com o Zn, a espécie *D. lablab* L. apresentaria tolerância ao Cd, por meio de avaliação de seu potencial fitorremediador em solo, resposta antioxidativa enzimática e identificação de proteínas que são afetadas pela presença do Cd, assim gerando subsídios para determinação de concentrações para utilização como fitorremediadora. O trabalho está inserido dentro da perspectiva de utilização de espécies vegetais que não são hiperacumuladoras de metais pesados, mas que apresentam grande produção de biomassa e crescimento rápido, características que podem, uma vez confirmada a tolerância da planta, sobrepor a capacidade de hiperacumulação que outras espécies apresentam, pois essas não apresentam a produção de biomassa e crescimento mencionadas. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi de determinar se essa espécie é tolerante ao Cd e pode ser utilizada para fitorremediação de solos contaminados por Cd bem como determinação de como essa planta responde bioquimicamente à presença desse elemento.

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	xi
SUMÁRIO	xiii
AGRADECIMENTOS	xxi
1 REVISÃO DE LITERATURA	1
1.1 METAIS PESADOS E O MEIO AMBIENTE	1
1.2 CÁDMIO.....	2
1.3 CÁDMIO E ESTRESSE OXIDATIVO.....	4
1.4 FITORREMEDIAÇÃO.....	7
1.5 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO CÁDMIO.....	13
1.6 CONSIDERAÇÃO.....	15
REFERÊNCIAS	16
2 POTENCIAL DE <i>Dolichos lablab</i> L. NA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR CÁDMIO: ANÁLISE DE CRESCIMENTO, ACÚMULO DE CÁDMIO E NUTRIÇÃO MINERAL	27
2.1 INTRODUÇÃO	27
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
2.2.1 Preparo do solo e montagem do experimento	29
2.2.2 Medidas de crescimento	30
2.2.3 Análises elementares	30
2.2.3.1 Solo.....	30
2.2.3.2 Tecidos vegetais	31
2.2.4 Avaliação do potencial fitorremediador	31
2.2.5 Análise estatística.....	32
2.3 RESULTADOS	32
2.3.1 Efeito do Cd no status nutricional I: macronutrientes	32
2.3.2 Efeito do Cd no status nutricional II: micronutrientes	33
2.3.3 Efeito do Cd no crescimento e potencial fitorremediador de <i>Dolichos lablab</i> L.	33
2.4 DISCUSSÃO.....	35
2.5 CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS	39

3 METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE <i>Dolichos lablab</i> L. SUBMETIDA A ESTRESSE POR CÁDMIO.....	47
3.1 INTRODUÇÃO.....	47
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	49
3.2.1 Condução do experimento.....	49
3.2.2 Quantificação de cádmio.....	50
3.2.3 Peroxidação lipídica.....	50
3.2.4 Peróxido de hidrogênio.....	51
3.2.5 Quantificação de tióis não protéicos totais (TNPTs).....	51
3.2.6 Extração proteica.....	51
3.2.7 Dosagem de proteínas.....	52
3.2.8 Atividade e caracterização de isoformas de Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) em gel de poliacrilamida em sistema não-desnaturante.....	52
3.2.9 Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	53
3.2.10 Atividade de Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7).....	53
3.2.11 Atividade de Ascorbato Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11).....	54
3.2.12 Atividade de Glutathione Redutase (GR, EC 1.6.4.2).....	54
3.3 RESULTADOS.....	55
3.3.1 Acúmulo de cádmio.....	55
3.3.1.1 Cádmio em folhas e raízes.....	55
3.3.2 Indicadores de estresse.....	55
3.3.2.1 Peroxidação lipídica.....	55
3.3.2.2 Quantificação de peróxido de hidrogênio.....	56
3.3.2.3 Quantificação de tióis não proteicos totais (TNPTs).....	57
3.3.2.4 Proteínas.....	57
3.3.3 Enzimas do sistema antioxidante.....	58
3.3.3.1 Caracterização e atividade de superóxido dismutase – SOD.....	58
3.3.3.2 Atividade de catalase – CAT.....	59
3.3.3.3 Atividade de guaiacol peroxidase – GPOX.....	60
3.3.3.4 Atividade de ascorbato peroxidase – APX.....	61
3.3.3.5 Atividade de glutathione redutase – GR.....	62
3.3.3.6 Comparação entre atividade de CAT, GPOX E APX em folhas e em raízes.....	62
3.3.3.7 Comparação da atividade de CAT, GPOX, APX e GR entre folhas e raízes.....	63
3.4 DISCUSSÃO.....	64
3.5 CONCLUSÕES.....	69

REFERÊNCIAS	70
4 ANÁLISE DO PROTEOMA DE <i>Dolichos lablab</i> SOB STRESSE POR CÁDMIO	79
4.1 INTRODUÇÃO	79
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	81
4.2.1. Montagem, condução e coleta do experimento	81
4.2.2 Quantificação de cádmio	82
4.2.3 Extração proteica.....	82
4.2.3.1 Métodos para extração proteica.....	82
4.2.3.2 TCA/Acetona.....	82
4.2.3.3 Tris-base/TCA-Acetona	83
4.2.4 Quantificação proteica.....	84
4.2.5 Focalização isoeletrica – 1ª dimensão	85
4.2.5.1 Focalização isoeletrica de proteínas foliares e radiculares	85
4.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – 2D – PAGE.....	86
4.2.7 Coloração dos géis.....	87
4.2.8 Obtenção, tratamento e análise de imagens.....	87
4.2.9 Processamento <i>in gel</i> dos spots selecionados para o sequenciamento	88
4.2.10 Identificação de proteínas por MALDI TOF-TOF MS/MS	90
4.2.11 Análise estatística.....	91
4.3 RESULTADOS.....	91
4.3.1 Acúmulo de cádmio.....	91
4.3.2 Análise da diferença entre “spots” de folhas controle (FC) e folhas tratadas (FT)	92
4.3.3 Análise da diferença entre “spots” de raízes controle (RC) e raízes tratadas (RT)	93
4.3.4 Identificação de proteínas por MALDI TOF-TOF MS/MS	93
4.4 DISCUSSÃO.....	97
4.5 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS	101
CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	107
ANEXO I.....	109
ANEXO II	110

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedico esse trabalho:

À minha amada esposa Dirleine, ao meu amado filho Mikael e à minha amada filha Rafaela.

À minha amada mãe Maria de Lourdes e meu amado pai Arlindo (Em memória),

Ofereço.

AGRADECIMENTOS

A Deus por propiciar as condições necessárias para realização desse ideal;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo pela orientação, confiança, paciência, ensinamentos e troca de experiência proporcionada;

À Dra. Salate Aparecida Gaziola pela amizade, paciência, sugestões, conselhos, confiança, ajuda e ensinamentos durante esses quatro anos de doutorado;

Ao Departamento de Genética da ESALQ e todos seus funcionários administrativos, manutenção, campo e limpeza pela permissão em realizar o trabalho em suas dependências e ajuda nos preparos de experimentos;

À FAPESP pela concessão da bolsa (Processo 2010/50167-0), vinculada ao projeto temático (Processo 2009/54676-0);

Aos amigos de jornada laboratorial: Salete, Fernando, Gicka, Paula, Mônica, Daiana, Felipe, Xiua, Lucélia, Berenice, Fabiana, Manu, Vanessa, Márcia, Daniel, Georgia, Roberta e Milca;

Aos amigos que contribuíram de uma maneira mais distante, geograficamente, mas com discussões e conversas muito produtivas, além de muita confiança: Leandro, Liliane, Renatão, Joni, Sara, Luciano, Raphael e Íses;

Ao casal Cláudia e Maurício pela extrema confiança depositada, jamais me esquecerei do que fizeram;

À minha esposa Dirleine, meu filho Mikinha e minha filha Rafinha pelo companheirismo, compreensão e paciência que vocês tiveram comigo, sempre, por todos esses anos, mas em especial nos últimos 4, sei que não deve ter sido fácil, mas vocês fizeram tudo valer a pena;

À minha mãe, novamente, pelo amor e confiança de sempre;

Aos meus irmãos Levi e Luan, também pela paciência durante todos os anos de coexistência e convivência.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 METAIS PESADOS E O MEIO AMBIENTE

Por definição, metal pesado (MP) é todo elemento químico metálico ou metalóide cuja densidade é maior que 5 mg cm^{-3} e apresenta toxicidade mesmo em concentrações extremamente baixas (Bhargava *et al.*, 2012). Dentro do grupo dos MPs temos os não necessários ao desenvolvimento das plantas tal como cádmio (Cd), mercúrio (Hg), cromo (Cr) e chumbo (Pb) e os que são necessários tal como cobre (Cu), níquel (Ni), zinco (Zn), ferro (Fe), cobalto (Co), molibdênio (Mo) e manganês (Mn), os micronutrientes. Porém, considerando os elementos metálicos que são micronutrientes, a sua toxicidade é observada apenas quando sua disponibilidade no solo excede as quantidades requeridas pelas plantas (Hänsch & Mendel, 2009); assim sendo necessário um controle adequado da disponibilidade que não limite o vegetal pela escassez nem pelo excesso.

Os MPs existem em condições naturais em ambientes como rios, solos, água do mar, sedimentos em geral e sua entrada nesses ambientes é favorecida pelo intemperismo de diversos tipos de rochas bem como por meio das atividades vulcânicas (Babula *et al.*, 2008), mas a disponibilidade desses elementos, no solo, tem aumentado e vem se tornando um problema cada vez mais recorrente, principalmente em áreas com intensa atividade industrial e agrícola (Sainger *et al.*, 2011).

Em atividades industriais o manejo e descarte inadequados dos resíduos contendo MPs são as principais portas de entrada dessa classe de contaminantes nos solos e corpos d'água (Bhagure & Mirgane, 2011); já em relação às áreas com intensa atividade agrícola o fator mais importante que contribui para o incremento das concentrações de MPs nos solos é o uso em demasia de fertilizantes fosfatados (Chien *et al.*, 2011), pois esses possuem quantidades vestigiais de MPs oriundos da rocha

mãe da qual foram extraídos, e com a sucessão de ciclos de aplicação de fertilizantes a tendência é de aumento das concentrações de MPs no solo.

O aumento da concentração de MPs no solo traz consequências extremamente sérias ao equilíbrio ecológico reduzindo a biodiversidade. Para demonstrar o espectro de ação dos metais pesados, Salińska *et al.* (2012) observaram que o Cd é capaz de causar alterações morfofisiológicas em tecidos hepáticos e renais de roedores silvestres, Hagerberg *et al.* (2011) demonstraram a capacidade de baixas doses de Cu em diminuir a capacidade de fungos micorrízicos arbusculares colonizarem o solo, assim ficando claro que os MPs afetam os organismos de diferentes grupos biológicos desde mamíferos até fungos.

Em plantas, a contaminação do solo por MPs pode levar a consequências muito maiores, uma vez que a disponibilidade do contaminante em órgãos comestíveis é uma via direta de contaminação para os seres humanos, como foi demonstrado por Kisku *et al.* (2011). Não obstante, a diminuição da produtividade de espécies cultivadas é um fato comprovado (Tezotto *et al.*, 2012) que, conseqüentemente leva a prejuízos financeiros aos produtores e aumento de preço de revenda devido à baixa oferta do produto.

1.2 CÁDMIO

Especificamente, o Cd é um metal pesado de densidade $8,6 \text{ g cm}^{-3}$ e que não apresenta função no metabolismo vegetal. Apesar da concentração de Cd na litosfera ser baixa, sua entrada no meio ambiente e agrícola tem sido favorecida por atividades antrópicas (Pagani *et al.*, 2012), atividades como sistemas de aquecimento, acabamento metálico, incinerador de rejeitos, subproduto da produção de fertilizantes fosfatados e resíduos da combustão de combustíveis (Sanità di Toppi & Gabrielli, 1999) são exemplos de atividade responsáveis pelo aumento de Cd no solo.

Esse elemento é extremamente tóxico aos organismos e concentrações no solo abaixo de 10 mg kg⁻¹ já reduzem o crescimento vegetal (Wierzbicka *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008); já em solução hidropônica concentrações abaixo de 500 µM exercem o mesmo efeito (Rascio *et al.*, 2008; Gonçalves *et al.*, 2009). No Brasil, segundo determinação da CETESB (CETESB, 2005), a referência de qualidade para teores de Cd em solo é de menos de 0,5 mg kg⁻¹ e o teor que indica uma condição de prevenção é de 1,3 mg kg⁻¹. Também de acordo com a CETESB, os níveis máximo permitido de Cd em solo para áreas agrícolas, residenciais e industriais são de 3, 8 e 20 mg kg⁻¹, respectivamente, indicando que áreas apresentando esses valores necessitam de intervenção.

Em solos, a disponibilidade desse elemento é extremamente dependente das condições físico-químicas, portanto a disponibilidade desse elemento vai variar significativamente entre solos arenosos a argilosos e também em solos com variação de pH ácido à básico (Shaheen & Tsadilas, 2010); sendo que as condições de arenosidade e acidez favorecem a disponibilidade e mobilidade desse elemento no solo (Melo *et al.*, 2011).

A raiz é o primeiro órgão vegetal a entrar em contato com o contaminante, portanto os efeitos nocivos são observados primeiramente nela. Como consequência, a diminuição de massa bem como comprimento da raiz são os primeiros indícios morfológicos da toxicidade do Cd (Monteiro *et al.*, 2011). Esse efeito sobre o crescimento da raiz se dá muito por conta do Cd se ligar fortemente a parede celular (Hu *et al.*, 2009) assim restringindo a expansão das células. Essa característica de ligação do Cd na parede celular é o que justifica as altas concentrações encontradas desse elemento em tecidos radiculares (Lin *et al.*, 2007; Andrade *et al.*, 2008). Entretanto, espécies adaptadas à presença de MPs podem reter o contaminante nas raízes sem que esse lhes cause prejuízos; como demonstrado por Hu *et al.* (2009) a retenção do Cd na parede celular de espécies tolerantes contribui para manutenção da tolerância a esse elemento.

Obviamente, o desenvolvimento da parte aérea pode ficar comprometido com o comprometimento funcional do sistema radicular, pois a ineficiência da absorção e transporte de nutrientes minerais acarreta prejuízos ao desenvolvimento de caule e folhas. Os sintomas visuais da toxicidade do Cd são espessamento e escurecimento do caule, clorose internerval em folhas adultas e jovens e diminuição da área foliar (Gallego *et al.*, 2012).

Todos esses efeitos visuais mencionados acima são consequências do efeito do Cd sobre o funcionamento do metabolismo celular dos diferentes tecidos que compõe a planta. O metabolismo fotossintético é extremamente afetado pelo Cd (Iqbal *et al.*, 2010), tão importante quanto a fotossíntese, a assimilação de nitrogênio também é fortemente afetada por esse elemento (Wahid *et al.*, 2007). Grande parte dos efeitos negativos do Cd sobre vias metabólicas, por fim leva ao desencadeamento de estresse oxidativo, que é basicamente a prevalência de moléculas oxidantes sobre moléculas antioxidantes.

1.3 CÁDMIO E ESTRESSE OXIDATIVO

Qualquer situação de estresse pode desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são moléculas de oxigênio que não foram reduzidos completamente, dessa forma possuem pares de elétrons desemparelhados, o que as tornam extremamente reativas com capacidade para oxidar uma infinidade de substratos (Apel & Hirt, 2004).

Exemplos de ERO bastante reativas são, o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O^{\bullet}_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$), este último sendo o mais reativo (Apel & Hirt, 2004). Apesar da reatividade desses compostos e de sua capacidade em oxidar moléculas orgânicas, eles não são apenas moléculas destruidoras, mas sim, muitas vezes, funcionam como sinalizadores que desencadeiam respostas celulares (Suzuki *et al.*, 2012). Apesar das ERO serem prejudiciais pelo fato de oxidarem moléculas orgânicas importantes, essa toxidez só existe quando

ocorre desequilíbrio e há produção em demasia de ERO. Entretanto, esses compostos são produzidos normalmente durante o funcionamento de organelas como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, cuja principal atividade envolve reações de oxidação e redução, mas dentro dessas condições de homeostase celular esses compostos são combatidos por substâncias antioxidantes não enzimáticas e/ou enzimáticas (Foyer & Noctor, 2009).

O combate enzimático de ERO é realizado pela via metabólica antioxidativa. No início dessa via, a redução parcial do oxigênio molecular (O_2) gera, rapidamente, superóxido que é eliminado pela enzima superóxido dismutase (SOD – EC 1.15.1.1), essa reação de dismutação tem como produto outra ERO, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, uma vez produzido dentro da célula é eliminado pela enzima catalase (CAT – 1.11.1.6) por uma reação de dismutação ou por enzimas peroxidases, essas últimas necessitando de substratos reduzidos como doadores de elétrons para redução do peróxido de hidrogênio; uma molécula de água é produzida como produto final das reações catalisadas por essas enzimas (Gratão *et al.*, 2008; Gill & Tuteja, 2010). As peroxidases diferem entre si de acordo com o substrato que utilizam como doador de elétrons; como por exemplo, as enzimas guaiacol peroxidase (GPOD – EC 1.11.1.7), glutathiona peroxidase (GPX – EC 1.11.1.9) e ascorbato peroxidase (APX – EC 1.11.1.11) sendo essa última a mais responsiva à presença de H_2O_2 (Mittler & Poulos, 2007) e sua atividade está estreitamente ligada com a regeneração de glutathiona reduzida (GSH) por meio da atividade da enzima glutathiona redutase (GR – EC 1.6.4.2) (Gill *et al.*, 2013a).

A interdependência entre as enzimas APX e GR se dá por conta de o produto gerado na reação da APX, o deidroascorbato que deve ser reduzido utilizando elétrons provenientes da GSH, reação que é catalisada pela enzima deidroascorbato redutase (DHAR – EC 1.8.5.1); uma molécula intermediária entre o ascorbato e o deidroascorbato é o monodeidroascorbato que também pode ser reduzido a ascorbato pela enzima monodeidroascorbato redutase (MDHAR – EC 1.6.5.4) utilizando

NADH como doador de elétrons (Noctor & Foyer, 1998), dessa forma é evidente que a relação entre a atividade da APX e GR é de fundamental importância na manutenção do potencial redox da célula e é conhecida como ciclo ascorbato-glutationa (Figura 1.1).

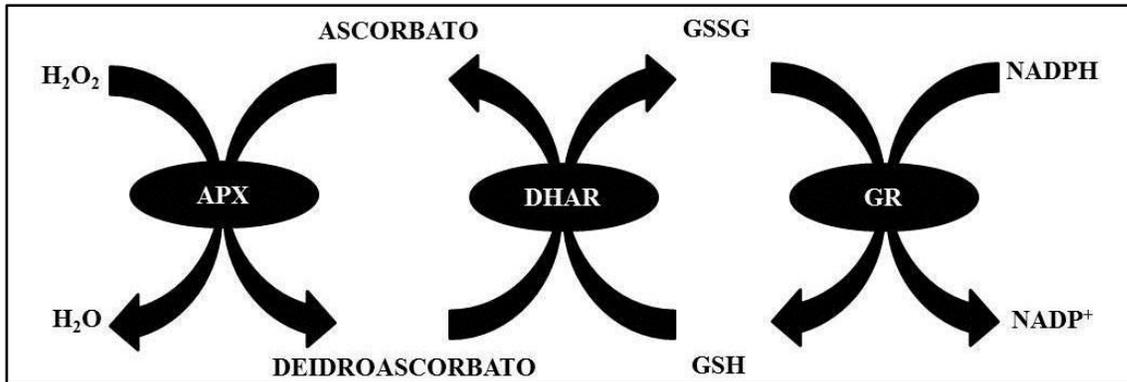


Figura 1.1 – Representação esquemática da regeneração do ascorbato pelo ciclo ascorbato-glutationa.

Já em relação aos mecanismos de eliminação de ERO por antioxidantes não enzimáticos estes se dão por reação direta entre o antioxidante e o pró-oxidante. Dentre os compostos antioxidantes os mais conhecidos e extensivamente estudados são o ascorbato, glutatona, prolina, α -tocoferol, carotenóides e flavonóides (Gill & Tuteja, 2010).

Dentro do cenário do estresse oxidativo, foram consideradas as causas naturais que favorecem a geração de ERO dentro das células bem como os mecanismos que os combatem. Assim, como a exposição a MP influencia a produção de ERO que culminará em estresse oxidativo? De acordo com Schützendübel & Polle (2002) existem três mecanismos que acentuam a produção de ERO na presença de MPs: (a) reação de Fenton por autooxidação do MP, geralmente ocorre na presença de metais de transição com estado de oxidação variável tal como Cu, Fe e Cr – (b) bloqueio de grupos funcionais essenciais em biomoléculas, geralmente ocorre na presença de metais com estado de oxidação fixo tal como Cd, Pb e Hg – (c) substituição de íons metálicos essenciais em

enzimas, geralmente grupos sulfidrilas (-SH), esse processo pode ocorrer na presença de MP com estado de oxidação variável ou fixo.

Considerando o Cd, os mecanismos (b) e (c) citados acima são os que contribuem para formação de ERO nas células, muito por conta da interferência desse elemento no fluxo de elétrons nos cloroplastos (Iqbal *et al.*, 2010) e mitocôndrias. Diversos estudos indicam aumento da concentração de algumas ERO na presença de Cd (Gill *et al.*, 2013b; Wang *et al.*, 2013). Por esse motivo, o potencial redox da célula tende para um estado mais oxidante que, antes de atingir níveis críticos, sinalizam para modificação do padrão de atividade de enzimas do sistema antioxidante; por isso alterações nas atividades de diversas enzimas antioxidantes são observadas quando uma planta está sob estresse por Cd. Essas alterações são sensíveis, tendo enzimas que são influenciadas positivamente enquanto outras negativamente, mas atuando orquestradamente para manter a homeostase redox celular.

1.4 FITORREMEDIAÇÃO

A fitorremediação é uma técnica que utiliza plantas na recuperação de solos contaminados por MPs (Gratão *et al.*, 2005) e compostos orgânicos. Métodos físicos e químicos associados às técnicas de engenharia são conhecidos e utilizados na recuperação de solos contaminados por metais pesados (MPs), entretanto, o custo desses procedimentos é bastante elevado (Yao *et al.*, 2012). Por isso o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis, efetivas e de baixo custo para recuperação de áreas contaminadas por MPs é de extrema necessidade (LeDuc & Terry, 2005).

A fitorremediação pode ser dividida em algumas classes que, segundo Pilon-Smits (2005) são classificadas da seguinte maneira: (a) fitoestabilização – o contaminante é complexado nos tecidos radiculares e assim diminuindo a sua movimentação no solo, (b) fitoestimulação – o contaminante, geralmente orgânico, é degradado por microrganismos que se desenvolvem

especificamente na região da rizosfera devido às condições particulares existentes, (c) fitovolatilização – o contaminante, uma vez absorvido, tem seu estado físico alterado para uma forma gasosa e assim é volatilizado, podendo ocorrer tanto para contaminantes orgânicos como inorgânicos, (d) fitodegradação – processo semelhante à fitoestimulação, mas que ocorre em partes aéreas, (e) fitoextração – o contaminante é absorvido e a maior parte é transportada para a parte aérea, o que possibilita a colheita e remoção efetiva do contaminante do meio ambiente (Figura 1.2). A escolha e aplicação do método devem levar em conta o tipo de contaminante bem como o meio em que esse está presente.

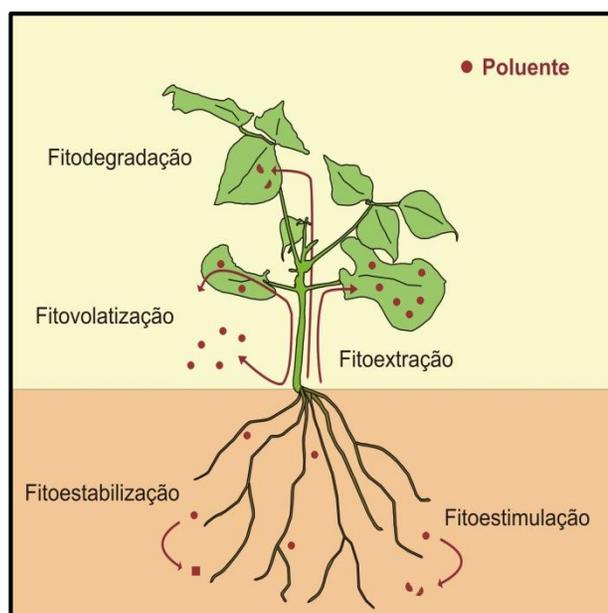


Figura 1.2 – Representação ilustrativa dos tipos de fitorremediação. Figura adaptada de Pilon-Smits (2005).

A questão principal está em qual planta utilizar para a fitorremediação? Há muito tempo já foi descrito um padrão de comportamento de plantas que possuem a capacidade de acumular em partes aéreas quantidades extremamente altas de certos elementos da classe dos MPs, plantas que possuem essa capacidade são denominadas hiperacumuladoras e um caso clássico é o de *Noccaea caerulescens* (antes, *Thlaspi caerulescens*), uma Brassicaceae hiperacumuladora de Zn (Baker *et al.*, 1994).

Mas quais são os fatores que nos permitem caracterizar uma planta desconhecida como hiperacumuladora? Na resposta a essa pergunta deve-se levar em conta qual MP estamos nos referindo. Krämer (2010) sugere uma lista com valores de concentração de MP que uma planta deve acumular em parte aérea para que seja considerada uma hiperacumuladora (Tabela 1.1). No entanto, outro critério, descrito por Baker *et al.* (1994) leva em consideração que a razão da concentração do elemento entre parte aérea e raízes deve ser superior a 1, indicando que maior parte do contaminante está sendo acumulada na parte aérea. Mas independente do parâmetro escolhido para caracterizar uma planta como hiperacumuladora, é evidente que o interesse é que a planta acumule a maior parte do MP absorvido na parte aérea.

Tabela 1.1 – Concentração requerida de alguns metais pesados na parte aérea de plantas para serem consideradas hiperacumuladoras de acordo com Krämer (2010).

Elemento	Nível Crítico de Toxicidade (mg kg⁻¹)	Concentração em Hiperacumuladoras (mg kg⁻¹)
Antimônio	< 2	> 1000
Arsênio	< 2 – 80	> 1000
Cádmio	6 – 10	> 100
Cobalto	0,4	> 1000 (*)
Cobre	20 – 30	> 1000 (*)
Chumbo	0,6 – 28	> 1000
Manganês	200 – 3500	> 10000
Níquel	10 – 50	> 1000
Selênio	3 – 100	> 1000
Zinco	100 – 300	> 10000 (*)

(*) possuem novos valores, sugeridos, para concentração encontrada em plantas como se segue: para cobalto e cobre > 300 mg kg⁻¹ e para zinco > 3000 mg kg⁻¹.

As plantas que foram classificadas até o momento como hiperacumuladoras, de fato, obedecem pelo menos um dos critérios mencionados acima, mas em contrapartida apresentam baixa produção de biomassa, o que inviabiliza a aplicação prática dessas plantas na técnica de fitorremediação. Dessa maneira esses modelos biológicos capazes de acumular concentrações extremamente altas de certos elementos são bastante úteis para elucidação dos mecanismos de tolerância a concentrações consideradas extremamente fitotóxicas; assim, esses organismos

fornecem subsídios para compreendermos os mecanismos de tolerância, e possivelmente aplicarmos esse conhecimento em plantas que possuam características mais favoráveis à fitorremediação.

Por essa razão, plantas não hiperacumuladoras também devem ser estudadas para caracterização do potencial fitorremediador, em especial espécies que apresentam alta produção de biomassa (Peuke & Rennenberg, 2005) e também tolerância a outros fatores abióticos. Como exemplo, plantas de girassol, feijão-de-porco, mucuna-preta, mamona, entre outras têm sido exploradas extensivamente quanto à tolerância e potencial fitorremediador de MPs em solos (Andrade *et al.*, 2005; Giordani *et al.*, 2005; Andrade *et al.*, 2008; de Souza *et al.*, 2011; Adhikari & Kumar, 2012). Os estudos são realizados em casa de vegetação em sistemas hidropônicos para conhecer o padrão de resposta, distribuição e acúmulo do MP, mas também com uma visão mais prática, o sistema experimental também é realizado em vasos com solo, assim gerando resultados mais consistentes do comportamento da planta numa situação real de descontaminação de solos.

Pesquisas têm mostrado como espécies não hiperacumuladoras podem ser utilizadas em fitorremediação (Andrade *et al.*, 2010; de Souza *et al.*, 2012), pois apesar de não acumularem MPs nas concentrações requeridas para serem consideradas hiperacumuladoras (Tabela 1.1), a sua produção de biomassa ultrapassa em várias ordens de magnitude a produção de biomassa de uma hiperacumuladora típica. Por isso é importante avaliar a tolerância de culturas que produzem grande quantidade de biomassa, associando o uso de indutores de fitoextração, que são compostos que favorecem o acúmulo de MPs mesmo em plantas que não são hiperacumuladoras (Komárek *et al.*, 2008).

Tendo em vista o conceito de fitoextração, plantas que não são hiperacumuladoras, mas que apresentam boa tolerância ao contaminante podem ter seu potencial acumulador melhorado pela aplicação de agentes quelantes diretamente no solo. Quelantes sintéticos como EDTA, DTPA e EGTA são utilizados com bastante êxito na fitoextração induzida (Pereira *et al.*, 2010), mas em

contrapartida apresentam um risco ao meio ambiente, pois são altamente móveis no solo podendo transportar o contaminante para locais distantes do ponto de contaminação (Luo *et al.*, 2006). Seth *et al.* (2011) demonstraram que aplicação de EDTA juntamente com Pb aumentou mais de 80% a quantidade de Pb acumulada em parte aérea de plantas de girassol; Kos *et al.* (2003) também identificaram que aplicação de EDTA favorece o acúmulo de Pb, Cd e Zn em diversas espécies de famílias diferentes. Porém, a questão da lixiviação do contaminante para áreas não contaminadas ainda necessita de uma maior discussão científica.

Uma alternativa mais interessante dentro do mesmo conceito de fitoextração induzida seria o uso de agentes quelantes orgânicos também chamados de ácidos orgânicos de baixo peso molecular, como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido vanílico, ácido gálico e outros que apresentam como maior vantagem a sua alta degradabilidade no solo (Nascimento *et al.*, 2006; Quartacci *et al.*, 2005). Resultados de Nascimento (2006) e Freitas *et al.* (2009) demonstram a eficácia da aplicação de ácidos orgânicos como assistentes na fitoextração de diversos MPs, e em alguns casos os ácidos orgânicos mostraram se mais eficientes que o EDTA.

Por isso, o uso de substâncias estimuladoras da fitoextração em plantas não hiperacumuladoras se faz necessário por conta do padrão de acúmulo de MP ser diferente entre plantas hiperacumuladoras e não hiperacumuladoras (Figura 1.3 A e 1.3 B).

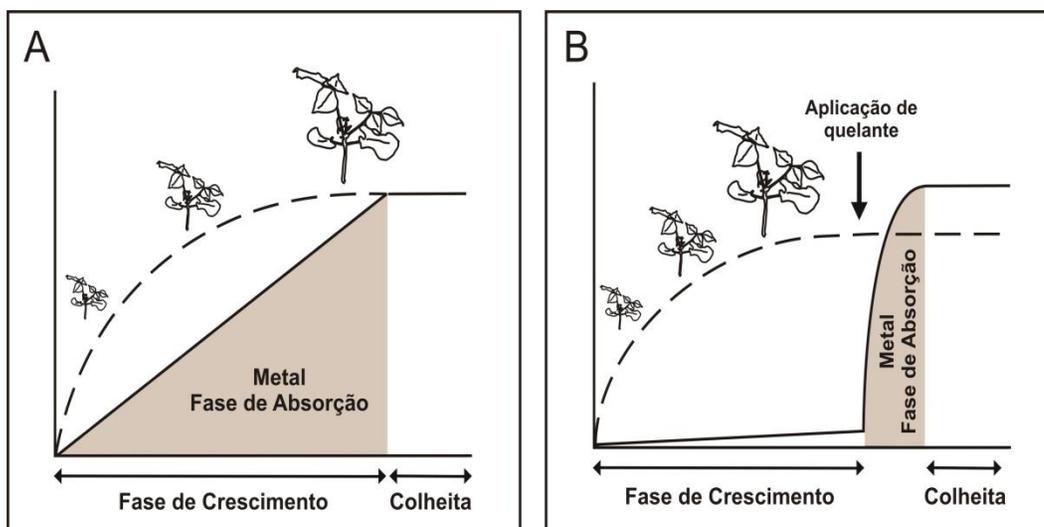


Figura 1.3 – Representação esquemática contrastando o padrão de absorção de MP em função do tempo entre plantas hiperacumuladoras (A) e não hiperacumuladoras (B) adicionando suplementos quelantes ao solo. Figura adaptada de Salt *et al.* (1998).

O processo de fitoextração ocorre durante a fase de crescimento vegetativo da planta, na qual o acúmulo de biomassa é mais intenso, favorecendo assim a absorção dos elementos contaminantes disponíveis no solo; tendo isso em vista, para que o processo de fitoextração seja efetivo, o importante é maximizar transporte do contaminante da raiz à parte aérea (Bhargava *et al.*, 2012).

Para isso é necessário uma triagem inicial de avaliação da resposta da planta a diversos MPs com a finalidade de determinar a quais MPs a planta é mais tolerante e absorve mais. Uma vez determinado o comportamento da planta e o padrão de acúmulo do MP, testes com diferentes quelantes orgânicos devem ser realizados para determinação da melhor época de aplicação e quantidade de quelante que favorecerá o maior acúmulo do MP desejado. Outro ponto importante é que a aplicação desses agentes quelantes orgânicos deve ser realizada em períodos próximos ao da coleta do material, pois são fontes de carbono para microrganismos do solo, sendo rapidamente degradados, apresentando um tempo de atuação relativamente curto.

1.5 MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO CÁDMIO

Plantas submetidas à exposição de cádmio precisam lidar com a presença desse elemento para obter sucesso durante o crescimento e a reprodução. Dois mecanismos básicos de tolerância a MPs em geral são conhecidos: exclusão – plantas exclusoras são capazes de crescer em ambiente contaminado devido à capacidade de excluir o elemento absorvido, assim mantendo baixa a concentração de Cd que leva a uma menor translocação à parte aérea; acumulação – plantas acumuladoras são capazes de atenuar o efeito tóxico de metais pesados através de mecanismos de complexação desses elementos a compostos orgânicos celulares, dessa forma o complexo formado não permite a interação do MP com componentes celulares que também podem ser armazenados em compartimentos da célula (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Uma vez dentro da célula, a planta possui diversos mecanismos para atenuar o efeito tóxico do cádmio. O principal ponto de retenção de Cd é a própria parede celular vegetal, como reportado por Sun *et al.* (2013) e também por Huguet *et al.* (2012), pois essa estrutura possui muitas cargas negativas que acabam favorecendo a interação com íons metálicos, diminuindo a disponibilidade do Cd e atenuando em parte o efeito tóxico.

Após a entrada do Cd nas células, para que esse não exerça efeito tóxico é necessário que esse elemento esteja em uma forma não reativa, que, geralmente pode ocorrer por meio de seu armazenamento no vacúolo de forma livre ou ligada a substâncias orgânicas celulares (Hall, 2002); dessa maneira compostos que se destacam na complexação de Cd livre dentro da célula são as fitoquelatinas e metalotioneínas (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Genericamente, fitoquelatinas são peptídeos compostos por resíduos de glutamato, cisteína e glicina $(\gamma\text{glu-cys})_n\text{-gli}$ onde “n” pode variar de 2 a 11; esses peptídeos são sintetizados enzimaticamente a partir da glutationa, pela enzima fitoquelatina sintase, e podem se ligar ao Cd e outros metais pesados devido ao grupo sulfidril que compõe o resíduo de cisteína (Inouhe, 2005). A

capacidade de tolerar Cd por plantas que produzem altas quantidades de fitoquelatinas foi revisada por Bhargava *et al.* (2012). Shanmugaraj *et al.* (2012) observaram aumento na expressão do gene de fitoquelatina sintase em plantas de *Brassica juncea* submetidas a doses crescentes de Cd; entretanto Lee *et al.* (2003) usando linhagens transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando genes de fitoquelatina sintase observaram que essas linhagens ficaram mais sensíveis ao Cd devido ao alto consumo de glutatona; a sensibilidade foi eliminada ao adicionar-se glutatona ao meio de crescimento, isso demonstra que apenas um fator não é suficiente para manipular a capacidade de tolerância ao Cd em plantas.

Metalotioneínas, diferentemente das fitoquelatinas, são sintetizadas a partir do processo de tradução de mRNA; mas semelhantemente às fitoquelatinas são ricas em cisteína, aminoácido sulfurado. Essas proteínas são agrupadas em quatro grandes grupos distintos: MT1, MT2, MT3 e MT4 que possuem diferentes padrões de expressão e são classificadas por similaridade de suas sequências (Hassinen *et al.*, 2011). Já é bem estabelecido que plantas submetidas a doses crescentes de Cd apresentam, como resposta, aumento no acúmulo de transcritos que codificam para metalotioneínas (Pagani *et al.*, 2012), mas níquel também foi capaz de induzir o acúmulo de metalotioneínas em *Solanum nigrum* L. (Ferraz *et al.*, 2012). Dessa maneira é evidente o papel dessas proteínas como um mecanismo de tolerância a MPs; por outro lado também é discutido o papel dessas proteínas no controle da homeostase de íons metálicos necessários ao funcionamento normal do metabolismo celular (Hamer, 1986; Stillman, 1995; Sainger *et al.*, 2011).

Pequenas moléculas, como ácidos orgânicos e alguns aminoácidos, também são capazes de ligar-se a íons metálicos (Hall, 2002). Acúmulo de ácido oxálico em resposta ao aumento de doses de Cd e Mn em *Phytolacca americana* foi reportado por Gao *et al.* (2012); semelhantemente, Xu *et al.* (2012) demonstraram que o acúmulo de aminoácidos e ácidos orgânicos estão relacionados à tolerância de *Solanum nigrum* ao Cd. Juntamente com a capacidade dessas pequenas moléculas se

ligarem ao Cd, mecanismo de armazenamento do complexo formado é um fator de grande importância na tolerância de plantas ao Cd, pois uma vez complexado e armazenado no vacúolo o elemento é incapaz de interagir com componentes celulares e induzir diversos estresses dentro da célula.

Os mecanismos de armazenamento vacuolar são mediados por transportadores da membrana vacuolar, em que podem agir transportadores de metais e também transportadores de complexos formado entre o metal e um ligante (Rea *et al.*, 1998; Haydon & Cobbett, 2007). Transportadores metálicos atuam no transporte de metais das raízes para a parte aérea e também do citosol para dentro dos vacúolos (Zorrig *et al.*, 2011), mediante uso de ATP. Da mesma maneira que os transportadores de metais, os transportadores do tipo ABC são bastante conhecidos por mediar o transporte de complexos ligantes de metais para dentro do vacúolo, assim sendo de fundamental importância na tolerância de plantas ao Cd (Park *et al.*, 2012)

1.6 CONSIDERAÇÃO

Dessa forma, é claro que vários fatores influenciam na disponibilidade e toxicidade do Cd em plantas crescendo em solo contaminado com esse elemento. Diversos mecanismos fisiológicos e bioquímicos são responsáveis por conferir tolerância às plantas e estão sujeitos a diversos mecanismos de ativação e modulação diante de uma situação de estresse agudo ou crônico. Por isso, a busca pela compreensão de como as plantas toleram níveis tóxicos de metais pesados é de fundamental importância, pois associando o conhecimento gerado com a possibilidade de utilização de plantas tolerantes capazes de produzir grandes quantidades de biomassa em espaço curto de tempo será cada vez mais plausível a aplicação da técnica de fitorremediação de solos contaminados por metais pesados.

REFERÊNCIAS

- Adhikari, T. & Kumar, A. (2012) Phytoaccumulation and tolerance of *Riccinus communis* L. to nickel. *International Journal of Phytoremediation* 14: 481-492.
- Andrade, S.A.L.; Gratão, P.L.; Azevedo, R.A.; Silveira, A.P.D.; Schiavinato, M.A. & Mazzafera, P. (2010) Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany* 68: 18-207.
- Andrade, S.A.L.; Jorge, R.A. & Silveira, A.P.D. (2005) Cadmium effect on the association of jackbean (*Canavalia ensiformis*) and arbuscular mycorrhizal fungi. *Scientia Agricola* 62: 389-394.
- Andrade, S.A.L.; Silveira, A.P.D.; Jorge, R.A. & Abreu, M.F. (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International Journal of Phytoremediation* 10: 1-14.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Babula, P.; Adam, V.; Opatrilova, R.; Zehnalek, J.; Havel, L. & Kizek, R. (2008) Uncommon heavy metals, metalloids and their plant toxicity: a review. *Environmental Chemistry Letters* 6: 189-213.
- Baker, A.J.M.; Reeves, R.D. & Hajar, A.S.M. (1994) Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C. Presl (Brassicaceae). *New Phytologist* 127: 61-68.

- Bhagure, G. & Mirgane, S. (2011) Heavy metal concentrations in groundwaters and soils of Thane Region of Maharashtra, India. *Environmental Monitoring and Assessment* 173: 643-652.
- Bhargava, A.; Carmona, F.F.; Bhargava, M. & Srivastava, S. (2012) Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management* 105: 103-120.
- CETESB (2005) Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente.
- Chien, S.H.; Prochnow, L.I.; Tu, S. & Snyder, C.S. (2011) Agronomic and environmental aspects of phosphate fertilizers varying in source and solubility: an update review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 89: 229-255.
- Cobbett, C. & Goldsbrough, P. (2002) Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 159-182.
- de Souza, L.A.; Andrade, S.A.L.; Souza, S.C.R. & Schiavinato, M.A. (2011) Tolerance and phytoremediation potential of *Stizolobium aterrimum* associated to the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus etunicatum* in lead-contaminated soil. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 35: 1441-1451.
- de Souza, L.A.; de Andrade, S.A.L.; de Souza, S.C.R. & Schiavinato, M.A. (2012) Arbuscular mycorrhiza confers Pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 523-531.
- Ferraz, P.; Fidalgo, F.; Almeida, A. & Teixeira, J. (2012) Phytostabilization of nickel by the zinc and cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. Are metallothioneins involved? *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 254-260.

- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: Signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 11: 861-905.
- Freitas, E.V.D.; Nascimento, C.W.A.; Silva, A.J. & Duda, G.P. (2009) Citric acid enhances lead phytoextraction from a soil contaminated by automotive batteries. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 33: 467-473.
- Gallego, S.M.; Pena, L.B.; Barcia, R.A.; Azpilicueta, C.E.; Iannone, M.F.; Rosales, E.P.; Zawoznik, M.S.; Groppa, M.D. & Benavides, M.P. (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83: 33-46.
- Gao, L.; Peng, K.; Xia, Y.; Wang, G.; Niu, L.; Lian, C. & Shen, Z. (2012) Cadmium and manganese accumulation in *Phytolacca americana* L. and the roles of non-protein thiols and organic acids. *International Journal of Phytoremediation* 15: 307-319.
- Gill, S.S.; Anjum, N.A.; Hasanuzzaman, M.; Gill, R.; Trivedi, D.K.; Ahmad, I.; Pereira, E. & Tuteja, N. (2013a) Glutathione and glutathione reductase: A boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 204-212.
- Gill, S.S.; Hasanuzzaman, M.; Nahar, K.; Macovei, A. & Tuteja, N. (2013b) Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 254-261.
- Gill, S.S. & Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

- Giordani, C.; Cecchi, S. & Zanchi, C. (2005) Phytoremediation of soil polluted by nickel using agricultural crops. *Environmental Management* 36: 675-681.
- Gonçalves, J.; Tabaldi, L.; Cargnelutti, D.; Pereira, L.; Maldaner, J.; Becker, A.; Rossato, L.; Rauber, R.; Bagatini, M.; Bisognin, D.; Schetinger, M. & Nicoloso, F. (2009) Cadmium-induced oxidative stress in two potato cultivars. *Biometals* 22: 779-792.
- Gratão, P.L.; Monteiro, C.C.; Peres, L.E.P. & Azevedo, R.A. (2008) The isolation of antioxidant enzymes from mature tomato (cv. Micro-Tom) plants. *HortScience* 43: 1608-1610.
- 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.
- Hagerberg, D.; Manique, N.; Brandt, K.K.; Larsen, J.; Nybroe, O. & Olsson, S. (2011) Low concentration of copper inhibits colonization of soil by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and changes the microbial community structure. *Microbial Ecology* 61: 844-852.
- Hall, J.L. (2002) Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Hamer, D.H. (1986) Metallothioneins. *Annual Review of Biochemistry* 55: 913-951.
- Hänsch, R. & Mendel, R.R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12: 259-266.
- Hassinen, V.H.; Tervahauta, A.I.; Schat, H. & Kärenlampi, S.O. (2011) Plant metallothioneins – metal chelators with ROS scavenging activity? *Plant Biology* 13: 225-232.

- Haydon, M.J. & Cobbett, C.S. (2007) Transporters of ligands for essential metal ions in plants. *New Phytologist* 174: 499-506.
- Hu, P.J.; Qiu, R.L.; Senthilkumar, P.; Jiang, D.; Chen, Z.W.; Tang, Y.T. & Liu, F.J. (2009) Tolerance, accumulation and distribution of zinc and cadmium in hyperaccumulator *Potentilla griffithii*. *Environmental and Experimental Botany* 66: 317-325.
- Huguet, S.; Bert, V.; Laboudigue, A.; Barthes, V.; Marie-Pierre, I.; Llorens, I.; Schat, H. & Sarret, G. (2012) Cd speciation and localization in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Environmental and Experimental Botany* 82: 54-65.
- Inouhe, M. (2005) Phytochelatins. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 65-78.
- Iqbal, N.; Masood, A.; Nazar, R.; Syeed, S. & Khan, N. (2010) Photosynthesis, growth and antioxidant metabolism in mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in cadmium tolerance. *Agricultural Science in China* 9: 519-527.
- Kisku, G.C.; Pandey, P.; Negi, M.P.S. & Misra, V. (2011) Uptake and accumulation of potentially toxic metals (Zn, Cu and Pb) in soils and plants of Durgapur industrial belt. *Journal of Environmental Biology* 32: 831-838.
- Komárek, M.; Tlustos, P.; Szakova, J. & Chrastny, V. (2008) The use of poplar during a two-year induced phytoextraction of metals from contaminated agricultural soils. *Environmental Pollution* 151: 27-38.
- Kos, B.; Grcman, H. & Lestan, D. (2003) Phytoextraction of lead, zinc and cadmium from soil by selected plants. *Plant Soil and Environment* 49: 548-553.

- Krämer, U. (2010) Metal hyperaccumulation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61: 517-534.
- LeDuc, D.L. & Terry, N. (2005) Phytoremediation of toxic trace elements in soil and water. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 32: 514-520.
- Lee, S.; Moon, J.S.; Ko, T.-S.; Petros, D.; Goldsbrough, P.B. & Korban, S.S. (2003) Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress. *Plant Physiology* 131: 656-663.
- Lin, R.; Wang, X.; Luo, Y.; Du, W.; Guo, H. & Yin, D. (2007) Effects of soil cadmium on growth, oxidative stress and antioxidant system in wheat seedlings (*Triticum aestivum* L.). *Chemosphere* 69: 89-98.
- Luo, C.; Shen, Z.; Li, X. & Baker, A.J.M. (2006) Enhanced phytoextraction of Pb and other metals from artificially contaminated soils through the combined application of EDTA and EDDS. *Chemosphere* 63: 1773-1784.
- Melo, L.C.A.; Alleoni, L.R.F.; Carvalho, G. & Azevedo, R.A. (2011) Cadmium- and barium-toxicity effects on growth and antioxidant capacity of soybean (*Glycine max* L.) plants, grown in two soil types with different physicochemical properties. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174: 847-859.
- Mittler, R. & Poulos, T.L. (2007) Ascorbate Peroxidase. In: Smirnoff N (ed) *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd, pp 87-100.

- Monteiro, C.C.; Carvalho, R.F.; Gratão, P.L.; Carvalho, G.; Tezotto, T.; Medici, L.O.; Peres, L.E.P. & Azevedo, R.A. (2011) Biochemical responses of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Environmental and Experimental Botany* 71: 306-320.
- Nascimento, C.W.A.; Amarasiriwardena, D. & Xing, B. (2006) Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. *Environmental Pollution* 140: 114-123.
- 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.
- Pagani, M.A.; Tomas, M.; Carrillo, J.; Bofill, R.; Capdevila, M.; Atrian, S. & Andreo, C.S. (2012) The response of the different soybean metallothionein isoforms to cadmium intoxication. *Journal of Inorganic Biochemistry* 117: 306-315.
- Park, J.; Song, W.Y.; Ko, D.; Eom, Y.; Hansen, T.H.; Schiller, M.; Lee, T.G.; Martinoia, E. & Lee, Y. (2012) The phytochelatin transporters AtABCC1 and AtABCC2 mediate tolerance to cadmium and mercury. *Plant Journal* 69: 278-288.
- Pereira, B.F.F.; Abreu, C.A.; Herpin, U.; Abreu, M.F. & Berton, R.S. (2010) Phytoremediation of lead by jack beans on a Rhodic Hapludox amended with EDTA. *Scientia Agricola* 67: 308-318.
- Peuke, A.D. & Rennenberg, H. (2005) Phytoremediation: Molecular biology, requirements for application, environmental protection, public attention and feasibility. *European Molecular Biology Organization* 6: 497-501.

- Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Quartacci, M.F.; Baker, A.J.M. & Navari-Izzo, F. (2005) Nitritotriacetate- and citric acid-assisted phytoextraction of cadmium by Indian mustard (*Brassica juncea* (L.) Czernj, *Brassicaceae*). *Chemosphere* 59: 1249-1255.
- Rascio, N.; Dalla Vecchia, F.; La Rocca, N.; Barbato, R.; Pagliano, C.; Raviolo, M.; Gonnelli, C. & Gabbrielli, R. (2008) Metal accumulation and damage in rice (*cv.* Vialone nano) seedlings exposed to cadmium. *Environmental and Experimental Botany* 62: 267-278.
- Rea, P.A.; Li, Z.S.; Lu, Y.P.; Drozdowicz, Y.M. & Martinoia, E. (1998) From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 727-760.
- Sainger, P.A.; Dhankhar, R.; Sainger, M.; Kaushik, A. & Singh, R.P. (2011) Assessment of heavy metal tolerance in native plant species from soils contaminated with electroplating effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 2284-2291.
- Salińska, A.; Włostowski, T. & Zambrzycka, E. (2012) Effect of dietary cadmium and/or lead on histopathological changes in the kidneys and liver of bank voles *Myodes glareolus* kept in different group densities. *Ecotoxicology* 1-9.
- Salt, D.E.; Smith, R.D. & Raskin, I. (1998) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 643-668.
- Sanità di Toppi, L. & Gabbrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.

- Schützendübel, A. & Polle, A. (2002) Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* 53: 1351-1365.
- Seth, C.S.; Misra, V.; Singh, R.R. & Zolla, L. (2011) EDTA-enhanced lead phytoremediation in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hydroponic culture. *Plant and Soil* 347: 231-242.
- Shaheen, S.M. & Tsadilas, C.D. (2010) Influence of fly ash and sewage sludge application on cadmium and lead sorption by an acidic alfisol. *Pedosphere* 20: 436-445.
- Shanmugaraj, B.M.; Chandra, H.M.; Srinivasan, B. & Ramalingam, S. (2012) Cadmium induced physio-biochemical and molecular response in *Brassica juncea*. *International Journal of Phytoremediation* 15: 206-218.
- Stillman, M.J. (1995) Metallothioneins. *Coordination Chemistry Reviews* 144: 461-511.
- Sun, J.; Cui, J.; Luo, C.; Gao, L.; Chen, Y. & Shen, Z. (2013) Contribution of cell walls, nonprotein thiols, and organic acids to cadmium resistance in two cabbage varieties. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 64: 243-252.
- Suzuki, N.; Koussevitzky, S.; Mittler, R. & Miller, G. (2012) ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell and Environment* 35: 259-270.
- Tezotto, T.; Favarin, J.L.; Azevedo, R.A.; Alleoni, L.R.F. & Mazzafera, P. (2012) Coffee is highly tolerant to cadmium, nickel and zinc: Plant and soil nutritional status, metal distribution and bean yield. *Field Crops Research* 125: 25-34.

- Wahid, A.; Ghani, A.; Ali, I. & Ashraf, M.Y. (2007) Effects of cadmium on carbon and nitrogen assimilation in shoots of mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] seedlings. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193: 357-365.
- Wang, L.; Zhou, Q.X.; Ding, L.L. & Sun, Y.B. (2008) Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials* 154: 818-825.
- Wang, X.; Zhang, Z.W.; Tu, S.H.; Feng, W.Q.; Xu, F.; Zhu, F.; Zhang, D.W.; Du, J.B.; Yuan, S. & Lin, H.H. (2013) Comparative study of four rice cultivars with different levels of cadmium tolerance. *Biologia* 68: 74-81.
- Wierzbicka, M.H.; Przedpelska, E.; Ruzik, R.; Ouerdane, L.; Polec-Pawlak, K.; Jarosz, M.; Szpunar, J. & Szakiel, A. (2007) Comparison of the toxicity and distribution of cadmium and lead in plant cells. *Protoplasma* 231: 99-111.
- Xu, J.; Zhu, Y.Y.; Ge, Q.; Li, Y.L.; Sun, J.H.; Zhang, Y. & Liu, X.J. (2012) Comparative physiological responses of *Solanum nigrum* and *Solanum torvum* to cadmium stress. *New Phytologist* 196: 125-138.
- Yao, Z.; Li, J.; Xie, H. & Yu, C. (2012) Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environmental Sciences* 16: 722-729.
- Zorrig, W.; Abdelly, C. & Berthomieu, P. (2011) The phylogenetic tree gathering the plant Zn/Cd/Pb/Co P-1B-ATPases appears to be structured according to the botanical families. *Comptes Rendus Biologies* 334: 863-871.

2 POTENCIAL DE *Dolichos lablab* L. NA FITORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO POR CÁDMIO: ANÁLISE DE CRESCIMENTO, ACÚMULO DE CÁDMIO E NUTRIÇÃO MINERAL

2.1 INTRODUÇÃO

O cádmio (Cd) é um metal pesado altamente tóxico que pode estar presente naturalmente no solo em concentrações baixas. Entretanto, atividades humanas como mineração, siderurgia, aplicação excessiva de fertilizantes fosfatados e/ou pesticidas contribuem para o aumento da concentração desse elemento no meio ambiente (Vrbová *et al.*, 2013). Por ser um elemento que, geralmente, não apresenta função biológica para os organismos vivos traz consequências bastante danosas aos organismos que estão sujeitos à exposição desse contaminante. O principal efeito, visível, da exposição de plantas ao Cd é a redução do crescimento radicular, que reflete diretamente na capacidade da planta em desenvolver órgãos aéreos saudáveis; já dentro das células que compõem o tecido foliar, o Cd além de retardar a expansão celular também influencia o funcionamento normal da fotossíntese, sendo que um dos principais sintomas da exposição ao Cd é o aparecimento de clorose internerval.

Considerando a toxicidade do Cd, é interessante que ambientes aquáticos e terrestres tenham concentrações desse elemento abaixo do nível mínimo de segurança, que de acordo com a CETESB (2005) é de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ e 3mg kg^{-1} , respectivamente. Quando esses ambientes atingem quantidades de Cd acima do permitido pela legislação, é necessário que haja intervenção humana para recuperação dessas áreas contaminadas. Os tratamentos mecânico e químico são as formas mais tradicionais de tratamento de solos contaminados por metais pesados, no primeiro é comum realizar a remoção da camada de solo que está contaminada enquanto que no segundo método é realizada a imobilização do contaminante por meio de reações químicas que geram complexos insolúveis incapazes de serem

lixiviados. No entanto, esses métodos trazem consequências ambientais desfavoráveis como mudança do perfil de solo expondo camadas mais profundas e também alterando as características químicas do solo, que podem refletir na sua biodiversidade e fertilidade. (Yao *et al.*, 2012).

Uma técnica recente que pode ser utilizada para recuperação de solos contaminados por metais pesados é a fitorremediação, técnica que utiliza plantas tolerantes e capazes de absorver e acumular o contaminante em seus tecidos. Para remoção de metais pesados do solo a técnica é chamada especificamente de fitoextração, e, considerando a aplicação dessa técnica em solos contaminados por metais pesados, é importante que a planta absorva e acumule o metal pesado em suas partes aérea, dessa maneira tornando possível a realização do manejo do material coletado, destinando-o a locais apropriados sem risco de contaminação do solo novamente.

Estudos vêm sendo realizados utilizando plantas hiperacumuladoras de metais, essas plantas possuem a capacidade de acumular concentrações extremamente altas de metais pesados em folhas e caules, concentrações que são tóxicas para qualquer outro organismo. Existem poucas plantas hiperacumuladoras de Cd, sendo que a mais amplamente conhecida é *Noccaea caerulescens* (antes chamada de *Thlaspi caerulescens*) (Lovy *et al.*, 2013), mas também *Arabidopsis halleri* e *Solanum nigrum* (Wei *et al.*, 2005; Huguet *et al.*, 2012) compõem esse grupo de plantas. O grande problema da utilização dessas plantas para fitoextração é que a seu crescimento é lento e a produção de biomassa é baixa configurando um cenário que levaria muito tempo para recuperação de uma área contaminada.

A abordagem de utilização de plantas tolerantes, mas que não são hiperacumuladoras de Cd, é uma estratégia bastante interessante, principalmente considerando culturas agronômicas que produzem altas quantidades de biomassa (Bhargava *et al.*, 2012). Dentro dessa abordagem, a utilização de leguminosas forrageiras torna-se uma opção bastante atraente, pois são plantas robustas com crescimento rápido que fixam nitrogênio e podem ser utilizadas como adubo verde. Essa

possibilidade já foi demonstrada por Souza *et al.* (2013) utilizando *Canavalia gladiata*, espécie tolerante ao chumbo (Pb) mas não hiperacumuladora desse elemento. Essas plantas mesmo não sendo hiperacumuladoras podem ter seu potencial de acumulação aumentado pela adição de substâncias que podem melhorar a capacidade da planta em acumular metais, podendo ser quelantes sintéticos ou ácidos orgânicos, e também substâncias que aumentam a tolerância das plantas a esses metais por imobilizá-los no solo. A aplicação de quelantes sintéticos ou orgânicos tem se mostrado eficaz em aumentar a capacidade de absorção de metais pesados (Gunawardana *et al.*, 2011).

Uma planta que apresenta características morfológicas e de crescimento que são favoráveis para aplicação na fitorremediação é *Dolichos lablab* L., conhecida popularmente como labe-labe. Essa planta, que é uma leguminosa forrageira, já foi caracterizada como tolerante a estresse salino (D'Souza & Devaraj, 2010), tolerante a déficit hídrico (Younis, 2010) e indicada para fitorremediação de solo contaminado pelo herbicida trifloxysulfuron sódio (Procópio *et al.*, 2004).

Dessa maneira o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial fitorremediador de *Dolichos lablab* L., ao metal pesado Cd por meio de seu desempenho de crescimento, acúmulo de Cd e indicadores do potencial para fitorremediação, além de relacionar o efeito do Cd sobre o estado nutricional das plantas.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Preparo do solo e montagem do experimento

O solo de cada vaso foi contaminado individualmente adicionando-se 10 mL de solução CdCl₂ nas respectivas concentrações de Cd livre (0,5 mg mL⁻¹, 1 mg mL⁻¹ e 1,5 mg mL⁻¹). O solo foi, então, acondicionado em sacos plásticos mantidos em repouso, em casa de vegetação, por 15 dias para estabilização e distribuição uniforme do Cd. As concentrações escolhidas para o

experimento foram estabelecidas de acordo com os valores orientadores apresentados pela CETESB (2005). As características do solo estão apresentadas na tabela 2.1.

As sementes foram esterilizadas por 20 minutos em solução a 10% (v/v) de hipoclorito de sódio comercial. Após a esterilização as sementes permaneceram em água por um período adicional de uma hora para embebição e então foram semeadas diretamente no solo previamente preparado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado composto por quatro tratamentos de doses de Cd (0, 5, 10 e 15 mg kg⁻¹) com quatro repetições biológicas, contabilizando 16 unidades experimentais. Após 45 dias de exposição ao Cd, as plantas foram coletadas e subdivididas em: parte aérea e raízes que, foram lavadas em água corrente e armazenadas em compartimentos de papel em estufa com circulação forçada a 60 °C por 72 horas até que apresentassem massa constante.

Tabela 2.1 – Características químicas do solo utilizado no experimento com concentração de Cd disponível após contaminação artificial.

Cd mg kg ⁻¹	pH	S.B	M.O	P	K	Ca	Mg	H+Al						
		V %	g dm ⁻³						mmolc dm ⁻³			mg dm ⁻³		
0	4,5	24	21	5	1,2	10	4	47	0,49	0,6	86	5,8	2,5	0,05
5	4,5	24	21	5	1,2	10	4	47	0,49	0,6	86	5,8	2,5	3,3
10	4,5	24	21	5	1,2	10	4	47	0,49	0,6	86	5,8	2,5	7,0
15	4,5	24	21	5	1,2	10	4	47	0,49	0,6	86	5,8	2,5	14,7

2.2.2 Medidas de crescimento

A análise de massa seca de parte aérea e raízes foi realizada por simples aferição de massa em balança analítica.

2.2.3 Análises elementares

2.2.3.1 Solo

Em amostras de solo, após o experimento, o Cd foi extraído em solução de extração composta de: 5 mM de DTPA (ácido dietilenotriaminopentaacético), 100 mM de TEA

(trietanolamina) e 10 mM de CaCl_2 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) com pH 7,3 na proporção de 10:20 (m/v) de acordo com Lindsay & Novell (1978). A mistura permaneceu em agitação constante por três horas; após o período de agitação o material foi vertido para um novo recipiente passando antes por papel filtro quantitativo faixa azul de filtração lenta durante 12 horas; a solução filtrada resultante foi analisada por espectrômetro de absorção atômica.

2.2.3.2 Tecidos vegetais

As amostras de material vegetal foram moídas e 250 mg foram digeridas em 3 mL de solução ácida de $\text{HNO}_3:\text{HClO}_4$ (5:1 – v/v) durante 12 horas, posteriormente a temperatura do bloco digestor foi elevada a 50 °C a cada 30 minutos até atingir 200 °C, o extrato límpido resultante foi completado até 25 mL com água mili-Q e foi analisado diretamente em espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por argônio (ICP-OES) para determinação dos teores de P, S, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn, Mn e Cd; o mesmo extrato ácido foi utilizado para leitura em fotômetro de chama para determinação dos teores de K e Na. O nitrogênio total foi quantificado, após digestão sulfúrica de 200 mg de tecido vegetal, pelo método de micro Kjeldahl.

2.2.4 Avaliação do potencial fitorremediador

O potencial fitorremediador foi avaliado por meio de análise do índice de tolerância ($IT = \text{BM}_i/\text{BM}_c$) onde BM_i é a biomassa acumulada em cada tratamento e BM_c é a biomassa acumulada no tratamento controle; do índice de translocação ($IT\% = 100 * C_{PA}/C_P$) onde C_{PA} é a quantidade, em microgramas, de Cd acumulado em parte aérea e C_P é a quantidade, em microgramas, de Cd acumulado na planta toda; e do fator de transferência solo-planta ($TF = \text{CC}_P/\text{CC}_S$) onde CC_P é a concentração, em mg kg^{-1} , de Cd na planta toda e CC_S é a concentração, em mg kg^{-1} , de Cd

disponível no solo; a categorização pelo TF foi obtido de acordo com Kabata-Pendias e Pendias (2001).

2.2.5 Análise estatística

A análise de variância e comparação de média pelo teste de Tukey a 5% foi realizada pelo software e estatística SISVAR[®].

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Efeito do Cd no status nutricional I: macronutrientes

Em parte aérea, as concentrações de fósforo (P), potássio (K), enxofre (S) e cálcio (Ca) não foram influenciadas pela presença de Cd, enquanto que as concentrações de nitrogênio (N) e magnésio (Mg) aumentaram com o aumento das doses de Cd (Tabela 2.2). Já em raízes, o Cd não influenciou as concentrações de N, P, K e S; a concentração de Mg diminuiu enquanto que a concentração de Ca aumentou nos tratamentos com Cd (tabela 2.1).

Tabela 2.2 – Concentração de macronutrientes (g kg^{-1}) em parte aérea e raízes de *Dolichos lablab* L. submetida a doses crescentes de cádmio.

Cd (mg kg^{-1})	N	P	K	S	Mg	Ca
	Parte aérea					
0	30,25 b	2,45 a	30,25 a	2,40 a	3,82 b	21,24 a
5	34,50 ab	2,67 a	30,88 a	2,94 a	4,03 b	19,18 a
10	37,95 a	2,84 a	30,57 a	3,38 a	4,57 ab	20,61 a
15	39,94 a	2,66 a	28,36 a	3,56 a	5,62 a	19,52 a
Raízes						
0	25,36 a	2,74 a	26,08 a	7,14 a	7,46 a	7,31 b
5	26,58 a	2,65 a	24,89 a	7,82 a	4,71 b	8,02 ab
10	27,42 a	2,93 a	24,10 a	7,37 a	4,34 b	9,56 a
15	29,11 a	2,69 a	20,79 a	7,21 a	3,27 b	9,63 a

Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; n = 4.

4.3.2 Efeito do Cd no status nutricional II: micronutrientes

Em parte aérea não observamos influencia do Cd sobre as concentrações de ferro (Fe) e manganês (Mn), já a concentração de cobre (Cu) e zinco (Zn) diminuiu no tratamento com maior dose de Cd; em raízes, os elementos Cu, Fe, Zn e Mn apresentaram maior concentração no tratamento de 10 mg kg⁻¹ de Cd, e uma queda pode ser observada no tratamento de maior dose de Cd (tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Concentração de micronutrientes (mg kg⁻¹) em parte aérea e raízes de *Dolichos lablab* L. submetida a doses crescentes de cádmio.

Cd (mg kg ⁻¹)	Cu	Fe	Zn	Mn
	Parte aérea			
0	5,0 a	106,68 a	43,34 ab	10,48 a
5	4,5 ab	85,68 a	48,87 a	9,94 a
10	3,5 bc	109,80 a	45,46 ab	12,59 a
15	3,2 c	105,06 a	40,34 b	11,90 a
Raízes				
0	8,63 b	2463 c	60,13 b	21,76 b
5	9,77 ab	3551 bc	66,89 b	24,07 b
10	12,53 a	5281 a	88,80 a	43,68 a
15	11,33 ab	4431 ab	75,00 ab	33,04 ab

Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; n = 4.

2.3.3 Efeito do Cd no crescimento e potencial fitorremediador de *Dolichos lablab* L.

O Cd afetou o acúmulo de massa de *D. lablab* L.. Observamos diminuição de mais de 75% na produção de massa seca de parte aérea e diminuição de mais de 60% na produção de massa seca radicular no tratamento na maior dose de Cd; a biomassa total foi diminuída em 75% no tratamento de maior dose de Cd (tabela 2.4).

Tabela 2.4 – Variáveis de crescimento de *Dolichos lablab* L. submetida a doses crescentes de cádmio.

Doses de Cd (mg kg ⁻¹)	Massa seca de parte aérea (g)	Massa seca de Raízes (g)	Biomassa total (g)
0	3,63 a	0,62 a	4,25 a
5	2,08 ab	0,42 ab	2,49 ab
10	1,18 b	0,32 ab	1,51 b
15	0,86 b	0,23 b	1,04 b

Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; n = 4.

A concentração de Cd aumentou de acordo com o aumento das doses de Cd aplicada no solo, tanto em parte aérea (Figura 2.1 A) como em raízes (Figura 2.1 B); a concentração de Cd foi maior no tratamento de maior dose de Cd aplicada (15 mg kg⁻¹) tanto em parte aérea como em raízes (Figura 2.1 A e B).

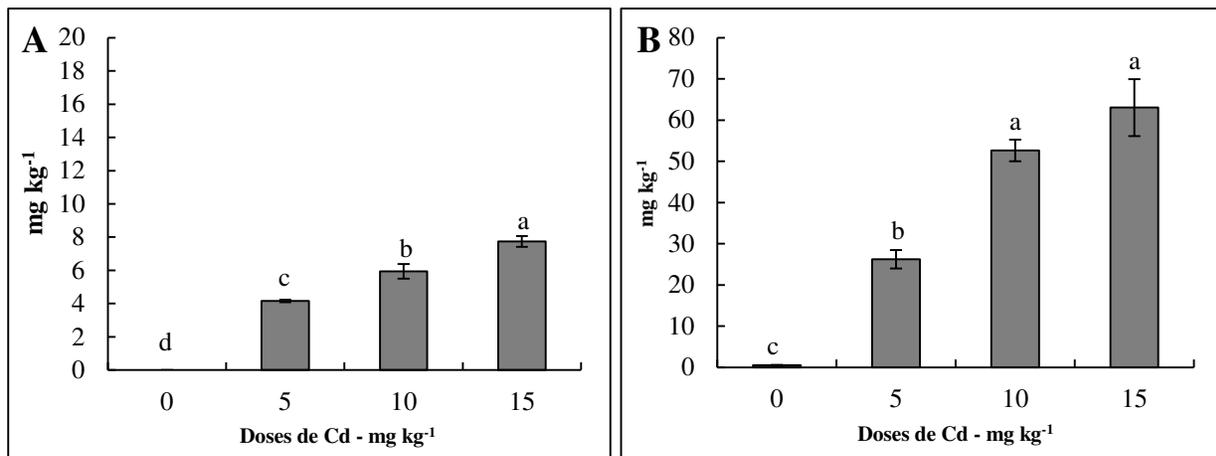


Figura 2.1 – Concentração de cádmio em parte aérea (A) e em raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetida a doses crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; n = 4.

Observamos valores de fator de transferência solo-plantas semelhantes entre as doses de 5 e 10 mg kg⁻¹ de Cd e, no tratamento de maior dose de Cd esse índice diminuiu (tabela 2.5), o índice de translocação foi maior no tratamento de menor dose de Cd (5 mg kg⁻¹) e semelhante entre as doses

intermediária e maior de Cd (tabela 2.4). O índice de tolerância foi maior no tratamento com menor dose de Cd e o menor índice de tolerância foi observado para o tratamento de maior dose de Cd (tabela 2.5).

Tabela 2.5 – Parâmetros indicadores do potencial fitorremediador de *Dolichos lablab* L. submetida a doses crescentes de cádmio.

Doses de Cd (mg kg ⁻¹)	Fator de transferência	Índice de translocação (%)	Índice de tolerância
0	-	-	-
5	2,44 a	44,23 a	0,60 a
10	2,28 a	29,18 b	0,40 b
15	1,37 b	30,70 b	0,27 c

Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5%; n = 4.

2.4 DISCUSSÃO

O aumento da industrialização e uso excessivo de fertilizantes fosfatados tem levado ao aumento da concentração e disponibilidade de diversos metais pesados (MPs) no meio ambiente (Niu *et al.*, 2011). O cádmio (Cd), sendo um MP altamente tóxico é prejudicial à vida dos organismos por interferir diretamente na fisiologia desses (Kabata-Pendias & Pendias, 2001). Em animais o problema mais severo é em relação à sua neurotoxicidade (Ciesielski *et al.*, 2013), enquanto que em plantas e microrganismos o principal efeito deletério está na restrição do crescimento, levando a morte (Benavides *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2008).

Áreas impactadas por metais pesados perdem a vegetação, deixando o solo mais susceptível à erosão e lixiviação de nutrientes (Salt *et al.*, 1995), sendo que a perda de vegetação deve-se principalmente à incapacidade das plantas crescerem no solo contaminado. Sabe-se que diversas plantas apresentam uma diminuição drástica no crescimento e no acúmulo de biomassa quando expostas a doses tóxicas de Cd (Gratão *et al.*, 2008; Melo *et al.*, 2011; Broadhurst *et al.*, 2013).

Em plantas, o excesso de MPs, entre esses o Cd, pode levar a distúrbios na maneira como os nutrientes minerais são absorvidos, transportados e utilizados pelas plantas. A importância dos macronutrientes é inquestionável e qualquer fator que possa prejudicar a utilização de um desses nutrientes (N, P, K, S e Mg) pode levar a prejuízos no crescimento da planta (Maathuis, 2009). A exposição a MPs pode prejudicar a maneira como plantas utilizam esses elementos; Vernay *et al.* (2007) observaram que o excesso de cromo (Cr) afeta principalmente o conteúdo de Ca, Mg e Fe em *Lolium perene* L., fato que está relacionado ao declínio no crescimento dessa planta. A não observação de efeitos do Cd sobre o padrão de acúmulo de P em *D. lablab* L. é bastante relevante, pois devido ao papel desempenhado por esse elemento no metabolismo celular acreditamos que a capacidade da planta em manter estável a concentração desse elemento seja favorável para suprir a demanda energética e crescimento em condições de estresse por Cd, como reportado por Sarwar *et al.* (2010).

Elementos relacionados à descontaminação e metabolismo energético, como o S e o Mg, que tiveram suas concentrações aumentadas quando a planta foi exposta ao Cd, podem indicar que a manutenção desses elementos seja uma estratégia para manter o metabolismo ativo afim de aumentar o crescimento resultando em um efeito de diluição na quantidade de Cd acumulada pela planta, como demonstrado por de Souza *et al.* (2012).

De modo geral, a diminuição da concentração de nutrientes em função do aumento das doses de Cd é devida à inibição da absorção ou competição de interação em proteínas carreadoras, como observado por Bertoli *et al.* (2012), que observou que os níveis de K diminuíram em tomateiro submetido a doses crescentes de Cd. Por outro lado, o aumento de elementos nos tecidos, como o Ca, pode ser explicado pela maior afinidade do Cd pelas cargas negativas das pectinas, podendo dessa forma ocorrer a remoção do Ca das estruturas pectínicas que compõem a parede celular (Marmiroli *et al.*, 2005; Dominguez *et al.*, 2009). Como observado no presente estudo, o Cd afetou

somente a concentração de K e Mg radicular e na menor dose (5 mg kg^{-1}) os demais macronutrientes não diferiram dos valores observados no controle, portanto, consideramos que a planta não foi capaz de manter a homeostase desses elementos nas raízes, indicando que o transporte desses elementos não é afetado.

Em relação aos micronutrientes, esses são de extrema importância para manutenção metabólica celular, pois, geralmente, estão envolvidos em reações de redução/oxidação (redox) catalisadas por enzimas que necessitam desses elementos como cofatores enzimáticos (Hänsch & Mendel, 2009). A resposta de cada planta pode diferir muito em relação à absorção, transporte e acúmulo de micronutrientes em função do aumento de doses de Cd, como demonstrado por Safarzadeh *et al.* (2013) onde a exposição de plantas de arroz ao Cd resultou em diminuição da concentração de Zn, Cu, Mn e Fe. Devido à essencialidade desses elementos, concentrações abaixo dos níveis adequados podem comprometer muito a fisiologia da planta. Resultados semelhantes também foram observados por Rezvani *et al.* (2012) em *Aeluropus littoralis*, uma gramínea. Diferentemente, nos resultados observados no presente estudo, principalmente em raízes, a concentração de micronutrientes aumentou em resposta ao aumento das doses de Cd, dessa forma pode-se sugerir que o modo como o Cd exerce sua toxicidade sobre *D. lablab* L. não está diretamente relacionado às alterações que comprometem a absorção e transporte de minerais essenciais ao crescimento.

Geralmente, a exposição ao Cd está relacionada à diminuição do crescimento (Konotop *et al.*, 2012), entretanto em nosso estudo não pudemos atribuir essa diminuição do crescimento a problemas associados à absorção e/ou transporte de nutrientes minerais das raízes à parte aérea.

Como se sabe, o Cd afeta o crescimento e desenvolvimento das plantas, também observamos tal resposta, em que na maior dose de Cd (15 mg kg^{-1}) houve diminuição do crescimento em 77%, que apesar de ter sido a dose a qual a planta acumulou maior quantidade de Cd não justificaria seu

uso para fitorremediação. Já na menor dose de Cd (5 mg kg^{-1}) a diminuição do crescimento foi de 42%, dessa forma, nessa situação a planta é capaz produzir aproximadamente 60% da biomassa total que produziria na condição de solo não contaminado; associada a essa resposta o sistema radicular apresenta crescimento de aproximadamente 70% em relação ao controle demonstrando que o desenvolvimento radicular é menos afetado que a parte aérea. Essa resposta difere do observado em diversos trabalhos em que a diminuição da biomassa chega a ser maior que 90% (López-Millán *et al.*, 2009; Hediji *et al.*, 2010). Dessa forma, a utilização de *D. lablab* é uma opção para fitorremediação de áreas leve ou moderadamente contaminadas cujo objetivo seja fitoestabilização, assim diminuindo a disponibilidade do Cd para posterior estabelecimento de novas espécies (Pilon-Smits, 2005), pois observamos que o Cd é acumulado principalmente nas raízes.

Pelos dados disponibilizados pela CETESB (2005) a quantidade de Cd no solo que já necessita de intervenção é de 3 mg kg^{-1} ; dessa forma, pelas nossas análises sabemos que o desempenho de *D. lablab* L., em condições de contaminação abaixo da menor dose que utilizamos (5 mg kg^{-1}), seria bem sucedido criando uma condição de imobilização do Cd.

De acordo com a quantidade de Cd acumulada em parte aérea e com os índices analisados, não é possível categorizar *D. lablab* L. como uma hiperacumuladora de Cd, pois segundo Reeves & Baker (2000) o limiar de acúmulo de Cd em parte aérea deve ser de 0,01%; indicando que a planta deve apresentar uma concentração de Cd de pelo menos 100 mg kg^{-1} de massa seca. Entretanto, a concentração acumulada no tratamento de menor dose, aproximadamente 4 mg kg^{-1} é maior que o limite estabelecido como fitotóxico para plantas segundo Smolders & Mertens (2013), indicando que a *D. lablab* L. apresenta boa tolerância ao Cd.

De fato, plantas hiperacumuladoras de Cd como *Arabidopsis halleri*, *Noccaea caerulescens* (Peer *et al.*, 2003; Peer *et al.*, 2006) e *Solanum nigrum* (Wei *et al.*, 2005) apresentam concentrações superiores às mencionadas acima, entretanto essas plantas hiperacumuladoras geralmente não são

integralmente viáveis para aplicação em fitorremediação devido a sua taxa de crescimento lenta e baixa produção de biomassa (Alford *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Dessa forma, pelo fato de *Dolichos lablab* L. ser tolerante ao Cd, sugerimos seu uso como fitoestabilizadora de solos que apresentam concentração de Cd livre de no máximo 5 mg kg⁻¹ pois além de crescimento satisfatório nessa faixa de concentração de Cd o fator de transferência (FT) observado é considerado alto segundo Kabata-Pendias & Pendias (2001). Adicionalmente apresenta índice de translocação (IT) de aproximadamente 45%, que pode ser considerado elevado comparativamente com plantas de girassol, que apresentam IT de aproximadamente 22% (Andrade *et al.*, 2008). Dessa forma é bastante evidente seu potencial de aplicação prática como fitoestabilizadora.

2.5 CONCLUSÕES

- A planta *Dolichos lablab* L. não apresenta prejuízo nutricional quando exposta a doses de Cd de até 5 mg kg⁻¹.
- A concentração de Cd acumulada pela planta não permite que ela seja considerada hiperacumuladora.
- A planta *Dolichos lablab* L. pode ser utilizada como fitoestabilizadora de solos cuja disponibilidade de Cd seja de até 5 mg kg⁻¹.

REFERÊNCIAS

Alford, E.R.; Pilon-Smits, E.A.H. & Paschke, M.W. (2010) Metallophytes-a view from the rhizosphere. *Plant and Soil* 337: 33-50.

- Andrade, S.A.L.; Silveira, A.P.D.; Jorge, R.A. & Abreu, M.F. (2008) Cadmium accumulation in sunflower plants influenced by arbuscular mycorrhiza. *International Journal of Phytoremediation* 10: 1-14.
- Benavides, M.P.; Gallego, S.M. & Tomaro, M.L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 21-34.
- Bertoli, A.C.; Cannata, M.G.; Carvalho, R.; Ribeiro Bastos, A.R.; Freitas, M.P. & Augusto, A.d.S. (2012) *Lycopersicon esculentum* submitted to Cd-stressful conditions in nutrition solution: Nutrient contents and translocation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 86: 176-181.
- Bhargava, A.; Carmona, F.F.; Bhargava, M. & Srivastava, S. (2012) Approaches for enhanced phytoextraction of heavy metals. *Journal of Environmental Management* 105: 103-120.
- Broadhurst, C.L.; Baughan, G.R.; Murphy, C.A.; Tang, Y.T.; Pooley, C.; Davis, A.P. & Chaney, R.L. (2013) Accumulation of zinc and cadmium and localization of zinc in *Picris divaricata* Vant. *Environmental and Experimental Botany* 87: 1-9.
- CETESB (2005) Valores orientadores para solos e águas subterrâneas no estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente.
- Ciesielski, T.; Bellinger, D.C.; Schwartz, J.; Hauser, R. & Wright, R.O. (2013) Associations between cadmium exposure and neurocognitive test scores in a cross-sectional study of US adults. *Environmental Health* 12.
- D'Souza, M.R. & Devaraj, V.R. (2010) Biochemical responses of hyacinth bean (*Lablab purpureus*) to salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 341-353.

- de Souza, L.A.; de Andrade, S.A.L.; de Souza, S.C.R. & Schiavinato, M.A. (2012) Arbuscular mycorrhiza confers Pb tolerance in *Calopogonium mucunoides*. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 523-531.
- Dominguez, M.T.; Madrid, F.; Maranon, T. & Murillo, J.M. (2009) Cadmium availability in soil and retention in oak roots: Potential for phytostabilization. *Chemosphere* 76: 480-486.
- Gratão, P.L.; Monteiro, C.C.; Antunes, A.M.; Peres, L.E.P. & Azevedo, R.A. (2008) Acquired tolerance of tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) plants to cadmium-induced stress. *Annals of Applied Biology* 153: 321-333.
- Gunawardana, B.; Singhal, N. & Johnson, A. (2011) Effects of amendments on copper, cadmium, and lead phytoextraction by *Lolium perenne* from multiple-metal contaminated solution. *International Journal of Phytoremediation* 13: 215-232.
- Hänsch, R. & Mendel, R.R. (2009) Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B, Cl). *Current Opinion in Plant Biology* 12: 259-266.
- Hediji, H.; Djebali, W.; Cabasson, C.; Maucourt, M.; Baldet, P.; Bertrand, A.; Zoghalmi, L.B.; Deborde, C.; Moing, A.; Brouquisse, R.; Chaibi, W. & Gallusci, P. (2010) Effects of long-term cadmium exposure on growth and metabolomic profile of tomato plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1965-1974.
- Huguet, S.; Bert, V.; Laboudigue, A.; Barthes, V.; Marie-Pierre, I.; Llorens, I.; Schat, H. & Sarret, G. (2012) Cd speciation and localization in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Environmental and Experimental Botany* 82: 54-65.

Kabata-Pendias, A. & Pendias, H. (2001) Trace Elements in Soil and Plants. 3rd edn. CRC Press, Boca Raton

Konotop, Y.; Meszaros, P.; Spiess, N.; Mistrikova, V.; Pirselova, B.; Libantova, J.; Moravcikova, J.; Taran, N.; Hauptvogel, P. & Matusikova, I. (2012) Defense responses of soybean roots during exposure to cadmium, excess of nitrogen supply and combinations of these stressors. *Molecular Biology Reports* 39: 10077-10087.

Lindsay, W.L. & Norvell, W.A. (1978) Development of a DTPA soil test for zinc, iron, manganese, and copper. *Soil Science Society of America Journal* 42: 421-428.

López-Millán, A.F.; Sagardoy, R.; Solanas, M.; Abadía, A. & Abadía, J. (2009) Cadmium toxicity in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants grown in hydroponics. *Environmental and Experimental Botany* 65: 376-385.

Lovy, L.; Latt, D. & Sterckeman, T. (2013) Cadmium uptake and partitioning in the hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* exposed to constant Cd concentrations throughout complete growth cycles. *Plant and Soil* 362: 345-354.

Maathuis, F.J.M. (2009) Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 250-258.

Marmioli, M.; Antonioli, G.; Maestri, E. & Marmioli, N. (2005) Evidence of the involvement of plant ligno-cellulosic structure in the sequestration of Pb: an X-ray spectroscopy-based analysis. *Environmental Pollution* 134: 217-227.

Melo, L.C.A.; Alleoni, L.R.F.; Carvalho, G. & Azevedo, R.A. (2011) Cadmium- and barium-toxicity effects on growth and antioxidant capacity of soybean (*Glycine max* L.) plants,

- grown in two soil types with different physicochemical properties. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 174: 847-859.
- Niu, Z.X.; Sun, L.N. & Sun, T.H. (2011) Characteristics of cadmium and lead phytoextraction by sunflower (*Helianthus annuus* L.) in sand culture. *Advanced Material Research* 183-185: 1496-1504.
- Pacheco, C.C.; Passos, J.F.; Castro, A.R.; Moradas-Ferreira, P. & De Marco, P. (2008) Role of respiration and glutathione in cadmium-induced oxidative stress in *Escherichia coli* K-12. *Archives of Microbiology* 189: 271-278.
- Peer, W.A.; Mahmoudian, M.; Freeman, J.L.; Lahner, B.; Richards, E.L.; Reeves, R.D.; Murphy, A.S. & Salt, D.E. (2006) Assessment of plants from the Brassicaceae family as genetic models for the study of nickel and zinc hyperaccumulation. *New Phytologist* 172: 248-260.
- Peer, W.A.; Mamoudian, M.; Lahner, B.; Reeves, R.D.; Murphy, A.S. & Salt, D.E. (2003) Identifying model metal hyperaccumulating plants: germplasm analysis of 20 Brassicaceae accessions from a wide geographical area. *New Phytologist* 159: 421-430.
- Pilon-Smits, E. (2005) Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology* 56: 15-39.
- Procópio, S.O.; Santos, J.B.; Silva, A.A.; Pires, F.R.; Ribeiro Júnior, J.I.; Santos, E.A. & Ferreira, L.R. (2004) Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de solos contaminados com o herbicida trifloxysulfuron sodium. *Planta Daninha* 22: 315-322.
- Reeves, R.D. & Baker, A.J.M. (2000) Metal-accumulating plants. In: *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment* 193-230.

- Rezvani, M.; Zaefarian, F.; Miransari, M. & Nematzadeh, G.A. (2012) Uptake and translocation of cadmium and nutrients by *Aeluropus littoralis*. Archives of Agronomy and Soil Science 58: 1413-1425.
- Safarzadeh, S.; Ronaghi, A. & Karimian, N. (2013) Effect of cadmium toxicity on micronutrient concentration, uptake and partitioning in seven rice cultivars. Archives of Agronomy and Soil Science 59: 231-245.
- Salt, D.E.; Blaylock, M.; Kumar, N.P.B.A.; Dushenkov, V.; Ensley, B.D.; Chet, I. & Raskin, I. (1995) Phytoremediation: a novel strategy for the removal of toxic metals from the environment using plants. Nature Biotechnology 13: 468-474.
- Sarwar, N.; Saifullah; Malhi, S.S.; Zia, M.H.; Naeem, A.; Bibi, S. & Farid, G. (2010) Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 925-937.
- Smolders, E. & Mertens, J. (2013) Cadmium. In: Alloway BJ (ed) Heavy Metals in Soils, vol 22. Environmental Pollution. Springer Netherlands, pp 283-311.
- Souza, L.A.; López Andrade, S.A.; Ribeiro Souza, S.C. & Schiavinato, M.A. (2013) Evaluation of mycorrhizal influence on the development and phytoremediation potential of *Canavalia gladiata* in Pb-contaminated soils. International Journal of Phytoremediation 15: 465-476.
- Vernay, P.; Gauthier-Moussard, C. & Hitmi, A. (2007) Interaction of bioaccumulation of heavy metal chromium with water relation, mineral nutrition and photosynthesis in developed leaves of *Lolium perenne* L. Chemosphere 68: 1563-1575.

- Vrbová, M.; Kotrba, P.; Horáček, J.; Smykal, P.; Svábová, L.; Vetrovcová, M.; Smykalová, I. & Griga, M. (2013) Enhanced accumulation of cadmium in *Linum usitatissimum* L. plants due to overproduction of metallothionein alpha-domain as a fusion to beta-glucuronidase protein. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 112: 321-330.
- Wei, S.; Zhou, Q.; Wang, X.; Zhang, K.; Guo, G. & Ma, L. (2005) A newly-discovered Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Chinese Science Bulletin* 50: 33-38.
- Yao, Z.; Li, J.; Xie, H. & Yu, C. (2012) Review on remediation technologies of soil contaminated by heavy metals. *Procedia Environmental Sciences* 16: 722-729.
- Younis, M. (2010) Response of *Lablab purpureus* (L.) sweet/rhizobium symbiosis and growth to potassium supply under different water regimes. *Journal of Plant Nutrition* 33: 1400-1409.
- Zhang, Z.C.; Chen, B.X. & Qiu, B.S. (2010) Phytochelatin synthesis plays a similar role in shoots of the cadmium hyperaccumulator *Sedum alfredii* as in non-resistant plants. *Plant Cell and Environment* 33: 1248-1255.

3 METABOLISMO ANTIOXIDATIVO DE *Dolichos lablab* L. SUBMETIDA A ESTRESSE POR CÁDMIO

3.1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente sofre continuamente com a poluição dos solos, águas e ar com contaminantes orgânicos ou inorgânicos. Dentre os contaminantes inorgânicos, nos últimos anos, especial atenção tem sido direcionada aos metais pesados, devido o grande aumento industrial e urbanização, tem levado a um aumento na deposição de resíduos que contem esses elementos, como consequência a quantidade de metais pesados no solo e águas subterrâneas tem aumentado. Como esses elementos podem ser são altamente tóxicos aos seres vivos (Bhagure & Mirgane, 2011), é necessário conhecer os mecanismos de toxicidade e resposta dos organismos a esses elementos.

O Cd, cuja forma ativa é o íon Cd^{+2} é um metal pesado contaminante que não possui funções metabólicas (Benavides *et al.*, 2005) e devido a sua alta solubilidade em água e toxicidade afeta severamente o desenvolvimento de todos os organismos vivos; sua entrada no ambiente ocorre principalmente por processos industriais e uso indiscriminado de fertilizantes fosfatados (Dominguez *et al.*, 2010). Em plantas, o Cd^{+2} é extremamente tóxico e causa efeitos deletérios rapidamente quando em contato com a planta, levando a alterações na absorção de nutrientes, abertura estomática, transpiração e fotossíntese (Benavides *et al.*, 2005).

A planta *D. lablab* L., cujo nome popular é labe-labe é uma leguminosa da família Fabaceae de origem africana, cultivada amplamente em regiões pan-tropicais. É uma planta robusta que se desenvolve bem tanto em solos arenosos como em solos argilosos com pH variando entre 4,5 – 7,5. Existem relatos científicos que *D. lablab* L. é uma planta relativamente tolerante a seca e estresse salino, comparada a outras leguminosas (D'Souza & Devaraj, 2010). Por ser uma leguminosa tropical geralmente utilizada como planta de cobertura de solo (também chamada de adubo verde), possui diversas características agronômicas favoráveis, como crescimento rápido,

sistema radicular denso e profundo, grande produção de biomassa e pouca exigência de qualidade do solo, sendo uma potencial candidata para tolerância a metais pesados.

Uma questão importante em relação ao efeito do Cd no metabolismo vegetal é a indução da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), o que pode resultar na oxidação de macromoléculas orgânicas (Zhang *et al.*, 2009). O íon superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são exemplos de ERO gerados, naturalmente, pelo metabolismo vegetal (Gratão *et al.*, 2005). O processo de produção de todos esses radicais livres estão interconectados, como por exemplo: o H_2O_2 pode ser gerado a partir do O_2^- e o radical $\bullet OH$ pode ser gerado a partir do H_2O_2 através da reação Haber-Weiss e de Fenton, sendo que esse último mecanismo utiliza íons metálicos, que podem ser oxidados ou reduzidos, como doador/receptor de elétrons (Bartosz, 1997).

A reação de Fenton gera o radical hidroxila ($\bullet OH$) diretamente pela interação do metal com o peróxido de hidrogênio, entretanto em relação ao Cd isso não ocorre, pois esse elemento não é um metal que possui diferentes estados de oxidação (Clemens, 2006; Zhang *et al.*, 2009); então, o que ocorre é a geração excessiva de ERO por vias indiretas sob influência do Cd como por exemplo pelo impedimento do fluxo de elétrons, ligação a grupos sulfidril de enzimas específicas e substituição de íons metálicos que são cofatores enzimáticos específicos em metaloenzimas; assim, esses são alguns mecanismos pelo qual o Cd pode influenciar no desequilíbrio da homeostase de ERO dentro da célula (Guimarães *et al.*, 2008).

As células possuem mecanismos diversos para controlar a produção de ERO, sendo a via metabólica antioxidativa a maior responsável pelo controle desses compostos. Duas enzimas são responsáveis pela eliminação direta de compostos potencialmente geradores de radicais livres; a superóxido dismutase e a catalase que, catalisam respectivamente, a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (Zhao *et al.*, 2009; Pilon

et al., 2010). Entretanto, para manter o controle da produção de peróxido de hidrogênio é necessária a atividade de peroxidases (nome genérico designado a um grupo de enzimas oxido-redutase que oxidam compostos orgânicos para reduzirem o peróxido de hidrogênio à água e oxigênio).

Dentre as peroxidases, destacam-se a ascorbato peroxidase (APX) e guaiacol peroxidase (GPOX), que utilizam respectivamente, ascorbato e guaiacol como substrato para reduzir o peróxido de hidrogênio (Gill & Tuteja, 2010). A enzima ascorbato peroxidase (APX) é responsável pela oxidação do ascorbato enquanto que a enzima guaiacol peroxidase (GPOX) oxida o guaiacol e ambas direcionam os elétrons provenientes dessas oxidações, para a conversão do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio molecular.

Dessa maneira, o objetivo desse estudo foi avaliar como as enzimas da via antioxidante de lablab respondem a doses crescentes de Cd.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Condução do experimento

As sementes foram germinadas em uma mistura de vermiculita e substrato de crescimento Basaplant[®] até a expansão total das folhas cotiledonares e, então, foram transplantadas para vasos individuais contendo areia lavada e autoclavada. Durante 20 dias após o transplante as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland. Após esse período foram estabelecidos os tratamentos nas seguintes doses de Cd (0, 50, 100 e 200 μM – respectivamente equivalentes a 5,62, 11,24 e 24,48 mg kg^{-1}), adicionados juntamente com a solução nutritiva. As plantas ficaram expostas ao cádmio por um período total de 10 dias e os tecidos foliares e radiculares foram amostrados após 5 e 10 dias de exposição ao Cd, designados como 5 D.E e 10 D.E, respectivamente. As segunda e terceira folhas trifoliolada completamente expandida bem como o terço médio radicular foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em biofreezer $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises enzimáticas

posteriores; enquanto que a parte aérea e o sistema radicular remanescente foram acondicionados em sacos de papel e levados para estufa a 60 °C por 72 horas até adquirir massa constante, para pesagem e quantificação de Cd.

3.2.2 Quantificação de cádmio

O material vegetal coletado, previamente seco em estufa a 60 °C, foi moído e 250 mg foi digerida em 3 mL de solução nítrico-perclórica (5:1) e deixada em temperatura ambiente por 12 horas. A solução foi submetida a aumento gradual de temperatura de 50 °C a cada trinta minutos até atingir 200 °C. O extrato remanescente, aproximadamente 0,5 mL, foi completado para 25 mL com água mili-Q. A leitura do extrato ácido resultante foi realizada em ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry* – Espectrometria de Emissão Ótica Induzida por Plasma).

3.2.3 Peroxidação lipídica

A quantificação de malondialdeído (MDA) foi realizada de acordo com o método descrito por Cakmak & Horst (1991) baseado em Heath & Packer (1968). Aproximadamente 250 mg de raízes ou folhas foram maceradas em N₂ líquido e homogenizadas em 3 mL em solução 0,1% de TCA (m/v) com 20% de PVPP (m/m). O homogenizado foi dividido em dois microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 12100 g por 5 minutos; 0,25 mL do sobrenadante foi transferido a um novo microtubo o qual recebeu 1 mL de solução contendo 20% de TCA (m/v) e 0,5% de TBA (m/v) e então aquecido a 95 °C por 30 minutos e em seguida foi resfriado em banho de gelo. Após o resfriamento os tubos foram centrifugados novamente a 12100 g por 10 minutos, seguido de leitura em espectrofotômetro a 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi determinada utilizando $E = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (MDA:TBA) e expressa em nmol g^{-1} de massa fresca.

3.2.4 Peróxido de hidrogênio

A quantificação de peróxido de hidrogênio foi realizada de acordo com o método descrito por Alexieva *et al.* (2001). Aproximadamente 250 mg de raízes ou folhas foram maceradas em N₂ líquido e homogenizadas em 3 mL de solução 0,1% de TCA (m/v) com 20% de PVPP (m/m). O homogenizado foi dividido em dois microtubos de 1,5 mL e centrifugado a 12100 g por 5 minutos; 0,2 mL do sobrenadante foram transferido a um novo microtubo o qual recebeu 0,8 mL de solução 1 M de KI e 0,2 mL de solução 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,5; essa mistura foi incubada no gelo e escuro por 1 hora, após esse período foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 390 nm.

3.2.5 Quantificação de tióis não protéicos totais (TNPTs)

A quantificação de TNPTs foi realizada de acordo com o método proposto por Devos *et al.* (1992) com algumas adequações. Aproximadamente 500 mg de tecido foliar e 700 mg de tecido radicular foram macerados em N₂ líquido e homogenizados em 2 mL e 1,7 mL, respectivamente, de solução 5% de ácido sulfosalicílico (m/v) e reservado em gelo até a centrifugação. O material foi centrifugado a 23700 g por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante recuperado. Em uma fração de 0,22 mL de sobrenadante foram adicionados 0,8 mL de solução 100 mM de K₂HPO₄ e 50 µL de solução 3 mM de DTNB (preparada em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7). A reação ocorreu em temperatura ambiente durante 2 minutos e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 412 nm. Para se calcular a concentração de TNPTs foi utilizado $E = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (TNB).

3.2.6 Extração proteica

Amostras de folhas ou raízes foram maceradas em N₂ líquido e homogenizadas em solução tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) acrescido de 1 mM de EDTA e 3 mM de DTT nas

proporção de 1:5 e 1:1,5 (m/v) para folhas e raízes, respectivamente. Foi adicionado 5% de PVPP (m/m) no momento da homogenização. O extrato resultante foi centrifugado a 12100 g a 4 °C durante 30 minutos, após esse período o sobrenadante foi alíquotado e armazenado em freezer -80 °C até o momento das análises.

3.2.7 Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976), com pequenas modificações, no qual em 20 µL de amostra é adicionado 1 mL de reagente de Bradford. A solução é deixada em temperatura ambiente por 2 minutos e a leitura realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

3.2.8 Atividade e caracterização de isoformas de Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) em gel de poliacrilamida em sistema não-desnaturante

Do extrato proteico foram utilizados 30 µg de proteínas para separação eletroforética em PAGE não desnaturante a 14%, 20 mA/placa por aproximadamente 4,5 horas de acordo com Laemmli (1970). A revelação do gel seguiu o método descrito por Beauchamp & Fridovich (1971), com modificações de Azevedo *et al.* (1998) no qual o gel foi lavado em água destilada e deionizada e, posteriormente, incubado a temperatura ambiente no escuro durante 30 minutos em 50 mL de solução tampão fosfato de potássio a 50 mM (pH 7,8) contendo 1 mM de EDTA; 0,05 mM de riboflavina; 0,1 mM de nitroblue tetrazolium e 0,3% de N,N,N',N', (tetrametiletilenodiamina). Após o período de incubação o gel foi lavado em água destilada e deionizada e exposto à luz para revelação das bandas. Para caracterização das isoformas de SOD, um único gel foi dividido em três partes e cada uma das partes passou por um pré-tratamento antes da revelação. Os pré-tratamentos foram: a primeira parte do gel foi incubada em solução tampão fosfato de potássio a 100 mM, a

segunda parte do gel foi incubada em solução 2 mM de KCN em tampão fosfato de potássio a 100 mM, e a terceira parte do gel foi incubada em solução de 9,1 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio a 100 mM, todas durante 20 minutos no escuro. Em seguida, os géis foram submetidos à revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H₂O₂. As bandas foram então classificadas como Cu/Zn-SOD, Fe-SOD ou Mn-SOD. A Cu/Zn-SOD é inativada por KCN e H₂O₂ que geralmente está presente no citoplasma e cloroplasto. Fe-SOD, que é inativada por H₂O₂ e resistente a KCN, ocorre no cloroplasto. A forma Mn-SOD é resistente a ambos inibidores (KCN e H₂O₂) e está presente nas mitocôndrias.

3.2.9 Atividade de Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade de catalase (CAT) foi determinada em espectrofotômetro de acordo com o método descrito por Kraus *et al.* (1995), com modificações de Azevedo *et al.* (1998). O meio de reação continha 0,975 mL de solução 30 mM de H₂O₂ em tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,5). A reação foi iniciada pela adição de 25 µL de extrato vegetal e a atividade determinada seguindo-se a decomposição do H₂O₂ em intervalos de 10 segundos durante 1 minuto, em absorbância de 240 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando $E = 39,4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (peróxido de hidrogênio) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.2.10 Atividade de Guaiacol Peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7)

A atividade de guaiacol peroxidase (GPOX) foi determinada de acordo com o método descrito por Matsuno & Uritani (1972), em 1 mL de meio de reação contendo 905 µL (raízes) ou 880 µL (folhas) de tampão fosfato-citrato a 200 mM (pH 5,0); 50 µL de solução 0,5% de guaiacol (v/v); 5 µL (raízes) ou 20 µL (folhas) de extrato proteico; os tubos foram agitados e então foram

acrescentados 50 µL de solução 3% de peróxido de hidrogênio (v/v), a reação foi incubada em banho maria a 30 °C por 15 minutos e ao final desse período foram adicionados 50 µL de solução 2% de metabissulfito de sódio (m/v) para encerrar a reação. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando $E = 25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (tetraidroguaiacol) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.2.11 Atividade de Ascorbato Peroxidase (APX, EC 1.11.1.11)

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi determinada de acordo com o método descrito por Nakano & Asada (1981), em 1 mL do meio de reação contendo 50 µL de amostra e 650 µL de solução tampão fosfato de potássio a 80 mM (pH 7,0); 100 µL de solução 5 mM de ascorbato, 100 µL de solução 1 mM de EDTA e 100 µL de solução 1,45 mM de peróxido de hidrogênio. A leitura foi realizada durante 1 minuto em espectrofotômetro a 290 nm. A atividade enzimática foi determinada utilizando $E = 2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (ascorbato) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.2.12 Atividade de Glutathiona Redutase (GR, EC 1.6.4.2)

A atividade de glutathiona redutase (GR) foi determinada de acordo com o método descrito por Smith *et al.* (1988), com modificações de Azevedo *et al.* (1998), no qual 1,7 mL do meio de reação contendo 1 mL de solução tampão fosfato de potássio a 100 mM (pH 7,5) 500 µL de solução 3 mM de DTNB (aquecido a 30 °C); 100 µL de solução 20 mM de GSSG, 100 µL de solução 2 mM de NADPH e 50 µL de amostra proteica. A leitura foi realizada durante 1 minuto a 412 nm. A atividade foi calculada utilizando uma curva analítica de TNB (cromóforo) e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Acúmulo de cádmio

3.3.1.1 Cádmio em folhas e raízes

A concentração de Cd em folhas e em raízes aumentou de acordo com o aumento das doses de Cd aplicadas. O tempo de exposição influenciou na concentração de Cd acumulada no tratamento de 200 μM em folhas e nos tratamentos de 100 e 200 μM em raízes (Figura 3.1 A e B).

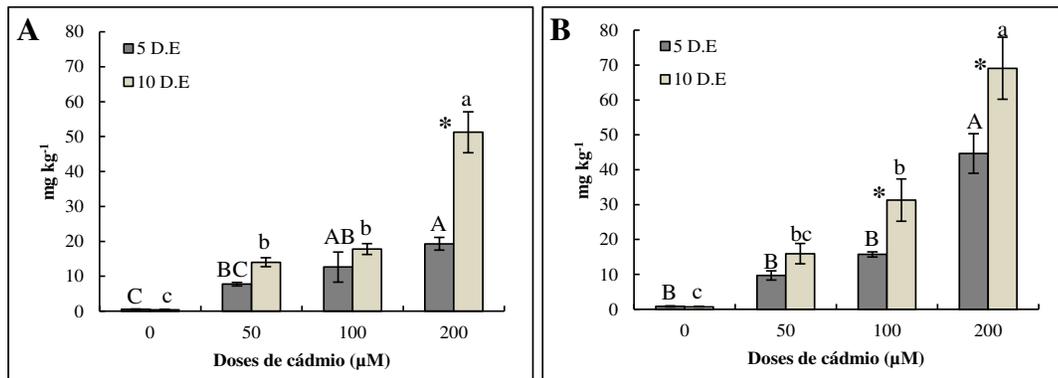


Figura 3.1 – Concentração de cádmio em folhas (A) e em raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E.; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.2 Indicadores de estresse

3.3.2.1 Peroxidação lipídica

Observamos em folhas e em raízes que a peroxidação lipídica foi desencadeada pela presença do Cd, mostrando que a maior dose de Cd utilizada nos tratamentos foi responsável pela maior quantidade de MDA em ambos os tecidos. O aumento da peroxidação lipídica foi maior em 5 D.E tanto em folhas como em raízes; já em raízes, aos 10 D.E observamos que a peroxidação lipídica diminuiu, em relação a 5 D.E., em todos os tratamentos (Figura 3.2 A e 3.2 B).

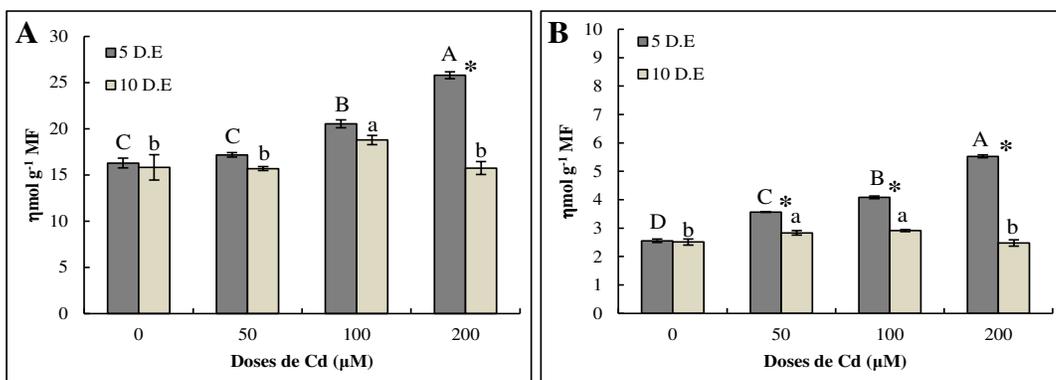


Figura 3.2 – Concentração de MDA em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.2.2 Quantificação de peróxido de hidrogênio

A presença de Cd não influenciou significativamente a concentração de H₂O₂ em folhas em 5 D.E, entretanto a concentração desse composto diminuiu em 10 D.E nos tratamentos de 100 e 200 µM de Cd (Figura 3.3 A). Já em raízes observamos aumento da concentração de H₂O₂ de acordo com o aumento das doses de Cd; assim como em folhas, em raízes observamos que em 10 D.E houve diminuição da concentração de peróxido de hidrogênio (Figura 3.3 B) em todos os tratamentos com Cd (Figura 3.3 B).

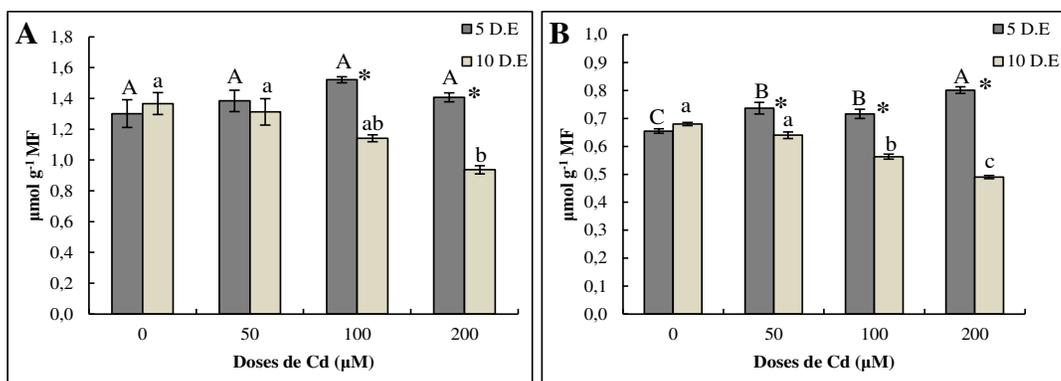


Figura 3.3 – Concentração de H₂O₂ em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.2.3 Quantificação de tióis não proteicos totais (TNPTs)

A concentração de TNPTs foi afetada pelo Cd apenas em raízes em 10 D.E, em que observamos diminuição da concentração desses compostos (Figura 3.4 A e B). O tempo de exposição ao Cd influenciou apenas a concentração de TNPTs em folhas (Figura 3.4 A).

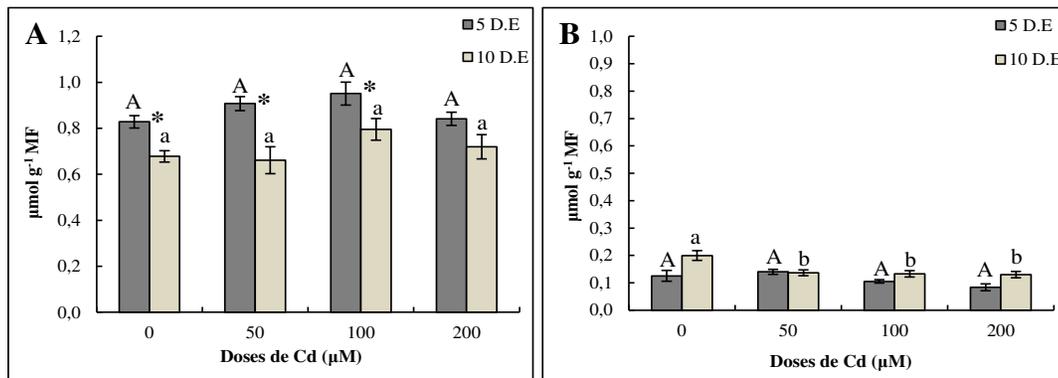


Figura 3.4 – Teor de tióis não proteicos totais em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a doses crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.2.4 Proteínas

Os tratamentos de Cd não influenciaram o teor de proteínas solúveis totais tanto em folhas como em raízes aos 5 D.E (Figura 3.5 A e B). Em folhas, aos 10 D.E, observamos maior teor de proteínas no tratamento de 200 μM de Cd e o menor teor de proteína foi observado no tratamento controle; já em raízes aos 10 D.E o maior teor de proteínas foi observado no tratamento de 50 μM de Cd e o menor teor de proteínas foi observado no tratamento de 200 μM de Cd (Figura 3.5 A e B). O tempo de exposição influenciou apenas o teor de proteínas foliares nos tratamentos de 100 e 200 μM de Cd (Figura 3.5 A e B).

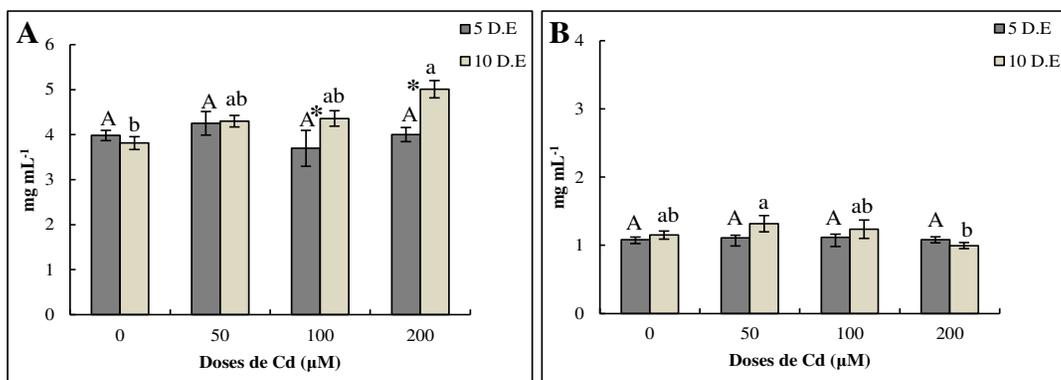


Figura 3.5 – Concentração de proteínas em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.3 Enzimas do sistema antioxidante

3.3.3.1 Caracterização e atividade de superóxido dismutase – SOD

Em folhas, foram identificadas 5 isoformas de SOD: 1 Mn-SOD, 2 Fe-SOD e 2 Cu/Zn-SOD (Figura 3.6 A). Em raízes, foram identificadas 6 isoformas de SOD: 1 Mn-SOD, 2 Fe-SOD e 3 Cu/Zn-SOD (Figura 3.6 B). O padrão de atividade de todas isoformas pode ser observado nas figuras 3.7 A e B para folhas e raízes, respectivamente. As isoformas radiculares de Cu/Zn-SOD são mais ativas que as isoformas Mn-SOD e Fe-SOD.

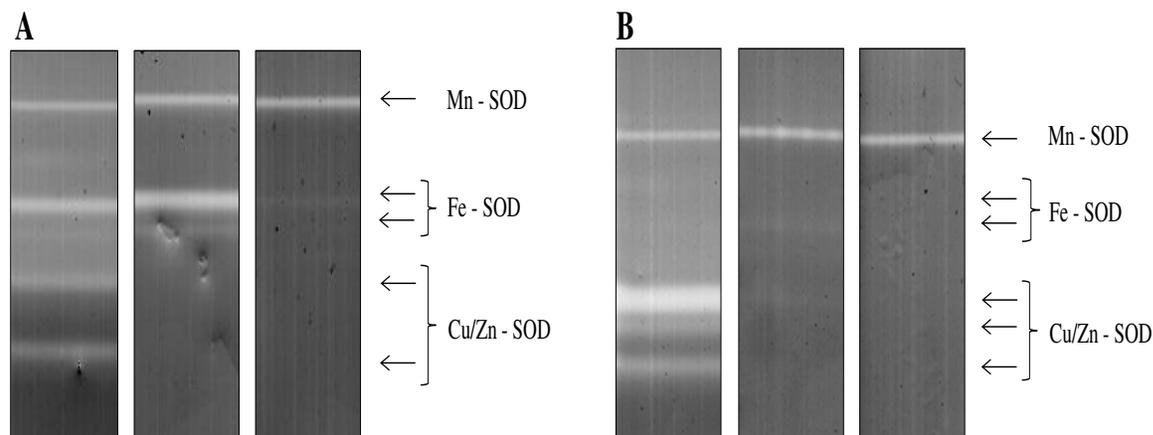


Figura 3.6 – Caracterização de isoformas de superóxido dismutase (SOD) em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L.

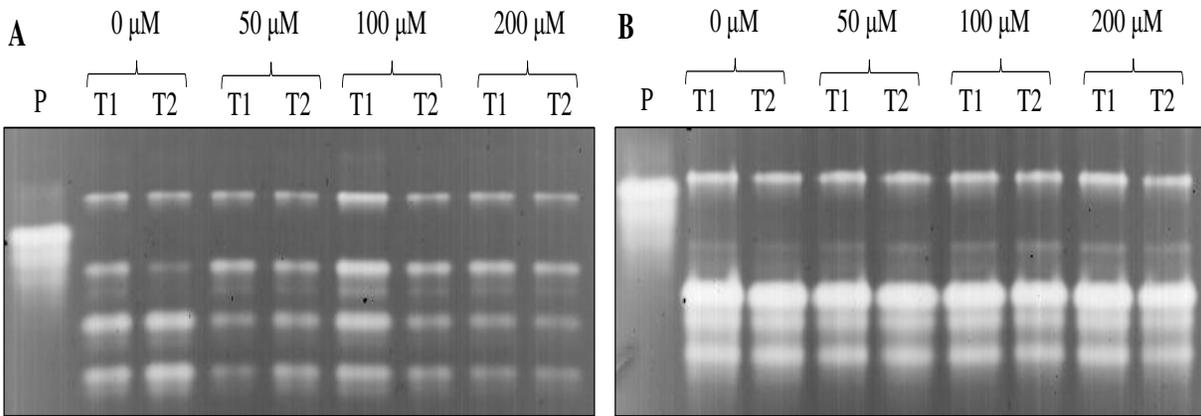


Figura 3.7 – Atividade de superóxido dismutase em PAGE não desnaturante em folhas (A) e raízes (B). T1 = 5 D.E; T2 = 10 D.E. D.E = Dias de Exposição.

3.3.3.2 Atividade de catalase – CAT

Em folhas, após 5 D.E observamos que CAT apresentou maior atividade no tratamento de 100 µM de Cd, no tratamento de maior dose de Cd a atividade dessa enzima diminuiu atingindo níveis iguais ao do tratamento controle (Figura 3.8 A); após 10 D.E a atividade de CAT não foi influenciada pela presença de Cd (Figura 3.8 A). Diferenças significativas da atividade de CAT entre os tempos de exposição foram observadas nos tratamentos de 50 e 100 µM (Figura 3.8 A). Em raízes não foram observadas variações na resposta de CAT em função do aumento das doses de cádmio aplicadas em nenhum dos tempos de exposição estudados (Figura 3.8 B).

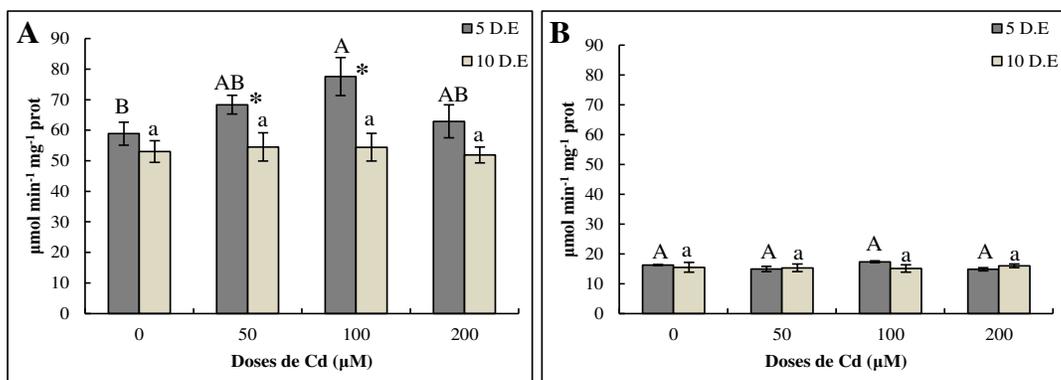


Figura 3.8 – Atividade específica de catalase (CAT) em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.3.3 Atividade de guaiacol peroxidase – GPOX

Em folhas, observamos que a atividade da enzima GPOX aumentou de acordo com o aumento das doses de Cd tanto em 5 D.E como em 10 D.E, não havendo diferenças entre as atividades entre os tempos de exposição (Figura 3.9 A). Em raízes a resposta da GPOX foi afetada pelo Cd de modo que a atividade decresceu de acordo com o aumento das doses de Cd (Figura 3.9 B), o tempo de exposição influenciou na atividade dessa enzima nos diferentes tratamentos de Cd (Figura 3.9 B). Em raízes observamos que os tratamentos com Cd levaram à diminuição da atividade de GPOX em ambos os tempos de exposição, também observamos que houve diferença na atividade dessa enzima entre os 5 D.E e 10 D.E (Figura 3.9 B).

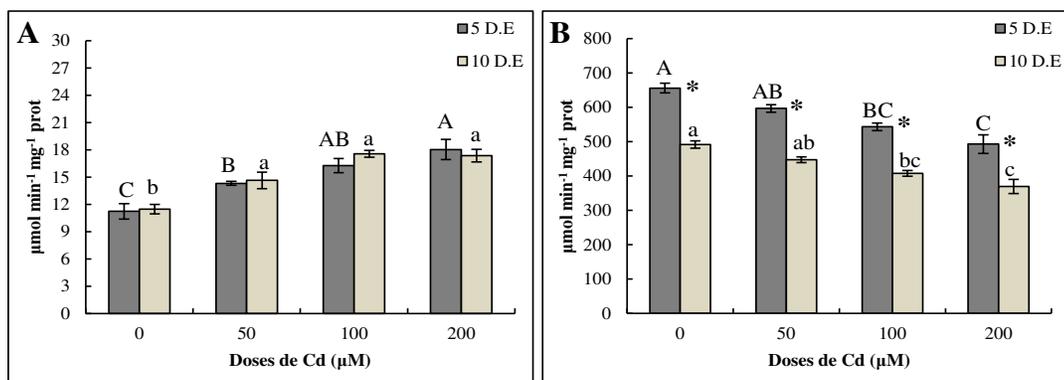


Figura 3.9 – Atividade específica de guaiacol peroxidase (GPOX) em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.3.4 Atividade de ascorbato peroxidase – APX

Observamos que a enzima ascorbato peroxidase (APX) teve sua atividade estimulada em resposta ao aumento das doses de cádmio tanto em folhas quanto em raízes (Figura 3.10 A e B). Apesar da grande diferença de atividade entre a atividade foliar e radicular, em ambos os órgãos, a maior atividade foi observada no tratamento de 100 µM (Figura 3.9 A e B). Também foi observada influência do tempo de exposição sobre a atividade de APX tanto em folhas como em raízes (Figura 3.9 A e B).

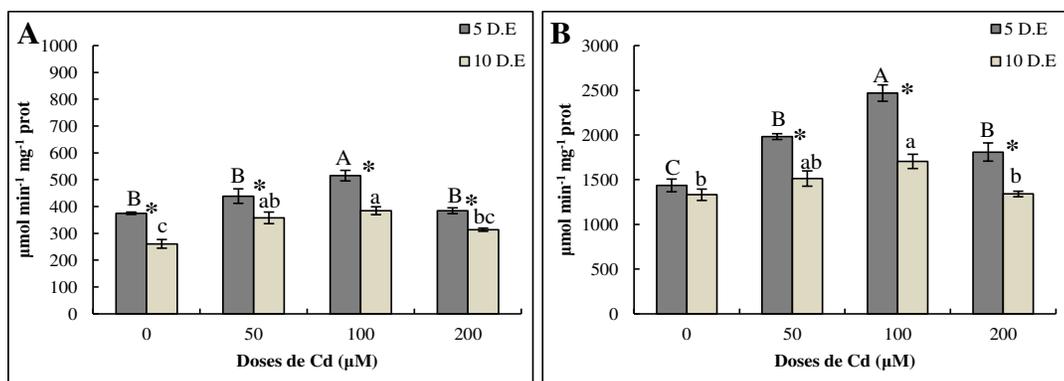


Figura 3.10 – Atividade específica de ascorbato peroxidase (APX) em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.3.5 Atividade de glutatona redutase – GR

Em folhas após 5 D.E., a atividade de GR apresentou maior atividade no tratamento de 50 μM de Cd, nos demais tratamentos de Cd a atividade diminuiu aos níveis do tratamento controle (Figura 3.11 A). Após 10 D.E. a atividade de GR diminuiu, apresentando diferenças na atividade entre os tempos de exposição (Figura 3.11 A). Em raízes, o Cd influenciou a atividade dessa enzima após 5 D.E, no qual a atividade dessa enzima foi maior nos tratamento em relação ao controle (Figura 3.11 B); enquanto após 10 D.E não foi observado efeito do Cd sobre a atividade de GR.

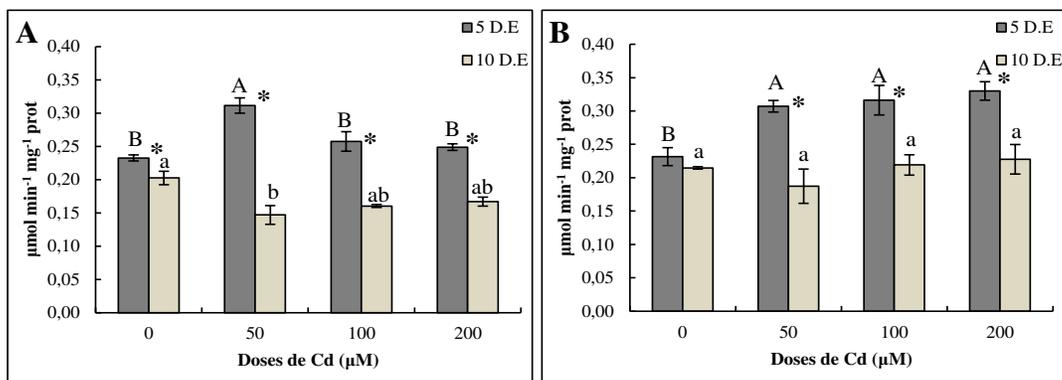


Figura 3.11 – Atividade específica de glutatona redutase (GR) em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio. Médias com letras iguais não diferem significativamente pelo teste Tukey a 5%. Letras maiúsculas comparam as médias em 5 D.E; letras minúsculas comparam as médias em 10 D.E. Asterisco (*) indica diferença significativa entre os tempos de exposição dentro de dose. n = 4. D.E = Dias de Exposição.

3.3.3.6 Comparação entre atividade de CAT, GPOX E APX em folhas e em raízes

Os resultados obtidos mostraram, em cada órgão da planta, qual das enzimas responsáveis pela eliminação do peróxido de hidrogênio apresentava maior atividade na presença do Cd. Os resultados demonstraram, claramente, que a APX foi a principal enzima atuante na eliminação do peróxido de hidrogênio, tanto em tecido foliar como radicular. Representando esquematicamente em função da atividade das enzimas temos a seguinte ordem de melhor resposta: APX > CAT > GPOX (Figura 3.12 A), em folhas; em raízes a ordem é: APX > GPOX > CAT (Figura 3.12 B).

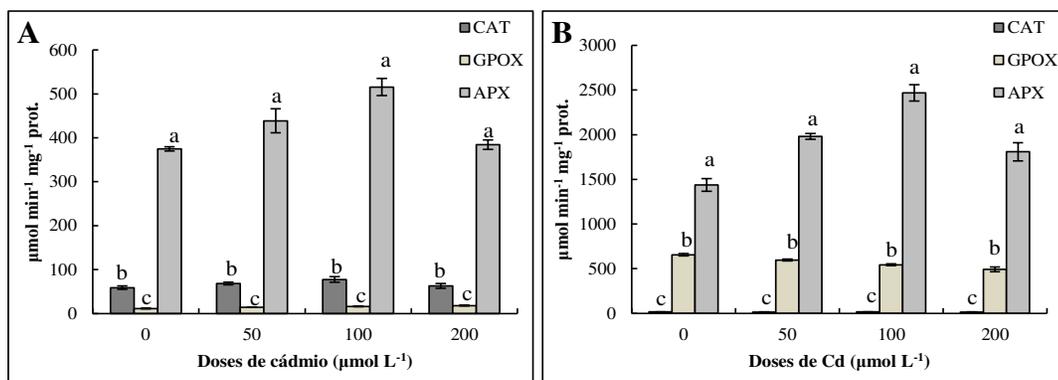


Figura 3.12 – Comparação da atividade específica de catalase (CAT), guaiacol peroxidase (GPOX) e ascorbato peroxidase (APX) em folhas (A) e raízes (B) de *Dolichos lablab* L. submetidas a concentrações crescentes de cádmio aos 5 D.E. Teste de Tukey 5% entre as atividades de cada enzima dentro de cada dose de cádmio, n = 4.

3.3.3.7 Comparação da atividade de CAT, GPOX, APX e GR entre folhas e raízes

Observamos que a enzima CAT apresenta maior atividade em folhas (Figura 3.13 A), enquanto que APX e GPOX apresentam maior atividade em raízes (Figura 3.13 B e C), já a enzima GR apresenta atividade semelhante em ambos os órgãos avaliados, apresentando diferença apenas nos tratamentos de 100 e 200 µM de Cd (Figura 3.13 D). Os dados utilizados para essa comparação foram os dados obtidos em 5 D.E.

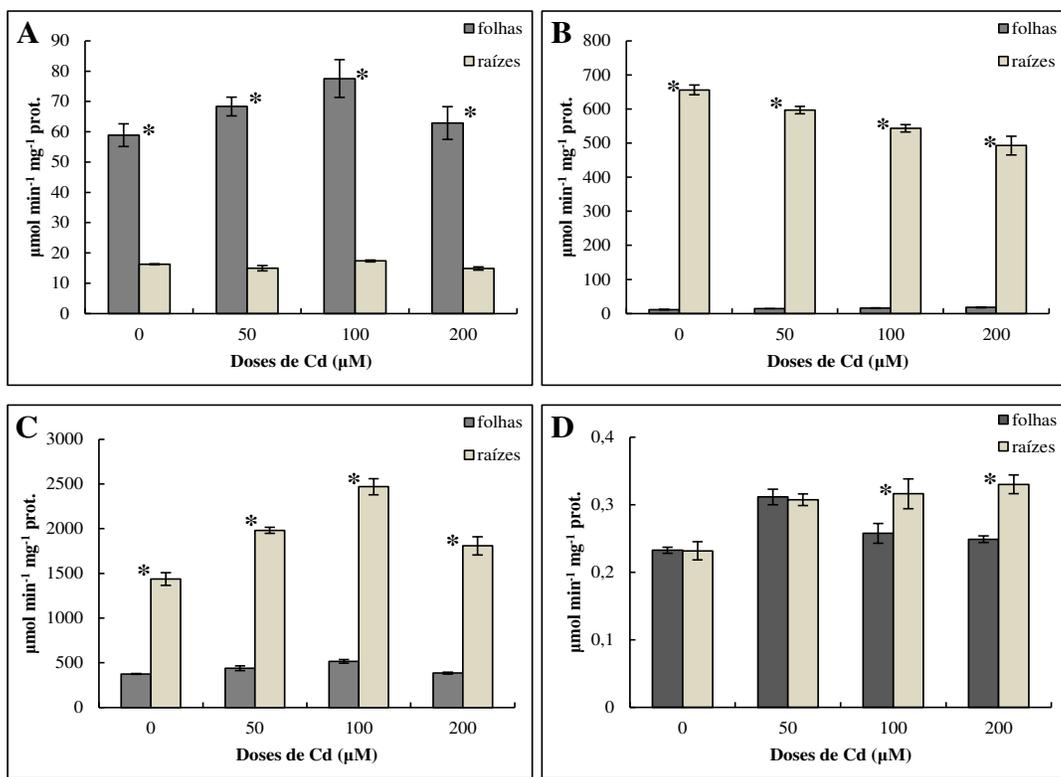


Figura 3.13 – Comparação da atividade enzimática de CAT (A), GPOX (B), APX (C) e GR (D) entre folhas e raízes. Asterisco (*) indica diferença significativa da atividade enzimática entre folhas e raízes. n = 4.

3.4 DISCUSSÃO

O Cd é um elemento metálico que não possui função biológica na célula vegetal, assim os vegetais evoluíram e desenvolveram mecanismos para lidar com a presença desse elemento (Benavides *et al.*, 2005).

A presença desse elemento dentro do ambiente celular pode interferir no processo normal de transferência de elétrons durante fotossíntese e respiração celular, interagir com compostos protetores antioxidantes e alterar a homeostase do ferro (Fe) (Smeets *et al.*, 2005). Adicionalmente, também pode se ligar em sítios regulatórios enzimáticos e assim influenciar suas atividades. Esses efeitos do Cd são responsáveis pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO) que, na incapacidade da célula eliminar esses compostos, geram desequilíbrio no potencial redox celular culminando em estresse oxidativo (Bartosz, 1997; Apel & Hirt, 2004; Foyer & Noctor, 2005b).

A capacidade do Cd induzir estresse oxidativo é bem descrita na literatura (Chaoui *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2009; Dominguez *et al.*, 2010) e pudemos corroborar esses achados com nossos dados que demonstraram o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio e malondialdeído, compostos que quando em excesso indicam que o equilíbrio redox foi afetado e está ocorrendo estresse oxidativo. A condição fisiológica de estar sobre estresse oxidativo é crítica ao desenvolvimento do organismo (Foyer & Noctor, 2005a), pois ao mesmo tempo em que as ERO agem como moléculas destruidoras de componentes celulares, algumas delas também funcionam como sinalizadores celulares que indicam como o ambiente exterior deve ser percebido pelos vegetais (Gallego *et al.*, 2012); dessa maneira o controle sensível dos níveis de ERO é realizado pela atividade de diversas enzimas do sistema antioxidante e também por antioxidantes não enzimáticos (Halliwell, 2006).

A enzima SOD é a primeira enzima da via antioxidativa e pode apresentar respostas diferentes de acordo com o órgão e espécie estudados. De acordo com Gonçalves *et al.* (2009), estudando a resposta dos cultivares Asterix e Macaca de batata submetidas a doses crescentes de Cd, observaram que a atividade da enzima SOD na raiz é acentuada na cultivar Macaca enquanto que na cultivar Asterix a atividade dessa enzima é diminuída Andrade *et al.* (2010) também observaram aumento na atividade de SOD foliar em resposta ao aumento de doses de cobre (Cu), assim, ficando evidente que a resposta dessa enzima é variável dependendo também do metal pesado causador do estresse.

Nossos resultados, de modo similar, mas com mais profundidade, mostram que de fato a SOD apresenta resposta diferente entre folha e raiz, nesse último órgão apresentando atividade muito mais intensa que em folhas; fato que, interessantemente não pudemos atribuir à presença de Cd uma vez que a intensidade das bandas não foi alterada independentemente da dose de Cd aplicada. Essa diferença de padrão de atividade sugere que o padrão de resposta do metabolismo

celular na presença de Cd é tecido dependente. De qualquer modo, é evidente que a alta atividade de Cu/Zn-SOD radicular pode sugerir um mecanismo preventivo contra estresse oxidativo (Mahanty *et al.*, 2012) sendo também um indicativo de que a planta pode apresentar tolerância a diferentes tipos de estresses abióticos agudos que resultam em estresse oxidativo, como demonstrado por Gill *et al.* (2010).

Como parte da via antioxidativa, o peróxido de hidrogênio é produzido como produto da atividade da SOD, e uma vez produzido como produto do estresse oxidativo, pode reagir com íons metálicos de estado de oxidação variável gerando o radical hidroxila, ($\bullet\text{OH}$), que é altamente reativo e responsável pelos maiores danos oxidativos celulares (Apel & Hirt, 2004; Kim *et al.*, 2008). Por isso, um sistema eficiente para eliminação do excesso de peróxido de hidrogênio produzido é requerido pelas células. Na via metabólica antioxidativa, as enzimas responsáveis pela eliminação do peróxido de hidrogênio são catalase e peroxidases sendo que últimas oxidam compostos orgânicos para reduzir o peróxido de hidrogênio à água (Jouili *et al.*, 2011).

O efeito do estresse oxidativo induzido por metais sobre a atividade de CAT já foi demonstrado na presença de Al (Pereira *et al.*, 2011), Cu (Andrade *et al.*, 2010), Zn (Remans *et al.*, 2012) e Cd (Dominguez *et al.*, 2010), sendo que a resposta pode variar como aumento ou diminuição da atividade, pois o padrão de resposta é, também, tecido/organismo dependente. Yu *et al.* (2013) reportaram aumento significativo da atividade de diversas enzimas do sistema antioxidante, inclusive de CAT, dessa maneira corroborando com nossos resultados de que o excesso de peróxido de hidrogênio, induzido pelo Cd, é combatido por várias enzimas dessa via.

A eliminação do peróxido de hidrogênio pode ocorrer também pela atividade das enzimas GPOX e APX que atuam também diretamente sobre o peróxido de hidrogênio produzido (Caverzan *et al.*, 2012), sendo muitas vezes mais eficientes que CAT.

Nossos resultados nos permitem sugerir que essas peroxidases atuam fortemente na eliminação do peróxido de hidrogênio, além de apresentar padrão de resposta diferencial entre tecidos. Diversos fatores estressantes como exposição à radiação UV, exposição ao ozônio, estresse hídrico, senescência e metais pesados indicam o aumento da atividade enzimática de peroxidases (Foyer *et al.*, 1994; Gratão *et al.*, 2008; Cruz *et al.*, 2013). A principal enzima responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio é a APX que apresentou maior atividade em raiz. Essas diferenças de padrão de resposta podem ser explicadas pelo *K_m* de cada enzima (Mittler, 2002), quantidade de isoformas que cada enzima apresenta e também pela disponibilidade de substratos (Mittler & Poulos, 2007). Nadgorska-Socha *et al.* (2013) observaram aumento da atividade de GPOX em folhas submetidas a altas doses de Cd, fato também observado em nossos estudos, sugerindo que esse padrão de resposta em folhas pode ser comum, pois essa resposta foi observada em outros trabalhos (Monteiro *et al.*, 2011; Roychoudhury *et al.*, 2012). Em contrapartida, a resposta dessa enzima em raízes ocorreu de forma contrária, onde observamos diminuição da atividade, que pode indicar que o Cd pode influenciar no padrão de resposta de uma mesma enzima em tecidos diferentes. Outro fator que poderia explicar o declínio da atividade de GPOX em raízes seria a alta atividade de APX observada nesse órgão; em observação semelhante realizada por Wang *et al.* (2008), foi notada a diminuição da atividade de CAT acompanhada do aumento da atividade de peroxidases genéricas.

Como já mencionado, a enzima APX é muito mais ativa na eliminação de peróxido celular. Essa enzima não é apenas importante por sua alta capacidade de eliminar o peróxido, mas também por integrar o ciclo ascorbato-glutationa (Mittler & Poulos, 2007). Para que essa enzima seja ativa seu substrato, o ascorbato, precisa ser constantemente produzido, fato que depende da atividade da GR, pois o composto fornecedor de elétrons para redução do deidroascorbato (forma oxidada do ascorbato) é a glutatona reduzida (GSH) (Mittler, 2002; Zhao *et al.*, 2009). Sabemos que GR é

fortemente induzida quando a planta está submetida a diversos estresses ambientais (Opdenakker *et al.*, 2012). O ponto chave é, então, destacar a importância da GR em manter a homeostase redox celular, o que nos permite sugerir, novamente, que *D. lablab* L. pode ser considerada tolerante ao Cd em situações de exposição aguda ao Cd; devido ao fato de apresentar um sistema antioxidante enzimático bastante responsivo frente a produção excessiva ERO, o que contribui para a tolerância da planta em condição de estresse agudo.

A inter-relação entre as atividades das enzimas APX e GR é bastante perceptível, uma vez que observamos aumento da atividade de GR em raízes, que provavelmente está relacionado com a demanda de regeneração do ascorbato. Em concordância com os resultados obtidos, Smeets *et al.* (2005) observaram que a eficiência de funcionamento do ciclo ascorbato-glutationa é o principal mecanismo de proteção antioxidante em feijão sob estresse por Cd. Li *et al.* (2013) também confirmaram, em *Pistia estratiotes* L., aumento da atividade de POD e SOD. Assim, esses resultados em concordância com os obtidos sugerem que uma vez alterado o equilíbrio na produção de peróxido de hidrogênio o ciclo ascorbato-glutationa e outras peroxidases respondem rapidamente no sentido de manter os níveis de peróxido de hidrogênio baixo o suficiente para evitar que essa molécula interaja para formação de radicais livres, que culminam em estresse oxidativo, permitindo-nos inferir que uma resposta antioxidante eficiente está relacionada a maiores chances de sobrevivência frente ao estresse oxidativo induzido por Cd.

Concluindo, as enzimas do metabolismo antioxidativo respondem diferentemente, sendo que a redução da atividade de uma enzima pode levar ao aumento da atividade de outra enzima relacionada, configurando um mecanismo compensatório como reportado por Gratão *et al.* (2005). Como altas atividades de enzimas do sistema antioxidante estão relacionadas a um melhor desempenho de crescimento em situação de estresse (Siddiqui *et al.*, 2013), podemos inferir que o comportamento observado pode ser um indicativo de que *D. lablab* L. seja capaz de obter sucesso

ao enfrentar situação aguda de exposição e toxicidade do Cd. O padrão de resposta observado em raízes, que é diferente do observado em folhas, pode ser explicado pelo fato de as raízes serem o primeiro órgão vegetal a entrar em contato com esse tipo de agentes contaminantes, portanto necessitando apresentar respostas mais rápidas.

Dessa maneira, acreditamos que a eficiência do tecido radicular em manter baixo o nível de moléculas precursoras de radicais livres, peróxido de hidrogênio e superóxido, está relacionada com a tolerância dessa planta em situação aguda de estresse por Cd. Com o avanço dos estudos, poderemos determinar o tempo máximo de exposição ao Cd que essa planta é capaz de tolerar e retomar sua atividade metabólica normal e sugerir seu cultivo em áreas propensas a “inputs” ocasionais de cádmio.

3.5 CONCLUSÕES

- A resposta antioxidante é tecido específica, sendo o tecido radicular mais responsivo ao estresse oxidativo induzido pelo Cd.
- A isoforma Cu/Zn – SOD é a mais ativa em raízes independentemente da presença de Cd.
- A enzima APX é a principal enzima responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio tanto em raízes como em folhas.
- A planta *D. lablab* L. apresenta tolerância ao estresse agudo, e a modulação da atividade das enzimas antioxidantes atuam controlando o estresse oxidativo após 10 dias de exposição ao Cd.

REFERÊNCIAS

- Alexieva, V.; Sergiev, I.; Mapelli, S. & Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell and Environment* 24: 1337-1344.
- Andrade, S.A.L.; Gratão, P.L.; Azevedo, R.A.; Silveira, A.P.D.; Schiavinato, M.A. & Mazzafera, P. (2010) Biochemical and physiological changes in jack bean under mycorrhizal symbiosis growing in soil with increasing Cu concentrations. *Environmental and Experimental Botany* 68: 198-207.
- Apel, K. & Hirt, H. (2004) Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Azevedo, R.A.; Alas, R.M.; Smith, R.J. & Lea, P.J. (1998) Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. *Physiologia Plantarum* 104: 280-292.
- Bartosz, G. (1997) Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19: 47-64.
- Beauchamp, C.H. & Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Benavides, M.P.; Gallego, S.M. & Tomaro, M.L. (2005) Cadmium toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 21-34.
- Bhagure, G. & Mirgane, S. (2011) Heavy metal concentrations in groundwaters and soils of Thane Region of Maharashtra, India. *Environmental Monitoring and Assessment* 173: 643-652.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Cakmak, I. & Horst, W.J. (1991) Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum* 83: 463-468.
- Caverzan, A.; Passaia, G.; Rosa, S.B.; Ribeiro, C.W.; Lazzarotto, F. & Margis-Pinheiro, M. (2012) Plant responses to stresses: role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. *Genetics and Molecular Biology* 35: 1011-1019.
- Chaoui, A.; Mazhoudi, S.; Ghorbal, M.H. & El Ferjani, E. (1997) Cadmium and zinc induction of lipid peroxidation and effects on antioxidant enzyme activities in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 127: 139-147.
- Clemens, S. (2006) Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88: 1707-1719.
- Cruz, F.J.R.; Castro, G.L.S.; Silva Junior, D.D.; Festucci-Buselli, R.A. & Pinheiro, H.A. (2013) Exogenous glycine betaine modulates ascorbate peroxidase and catalase activities and prevent lipid peroxidation in mild water-stressed *Carapa guianensis* plants. *Photosynthetica* 51: 102-108.
- D'Souza, M.R. & Devaraj, V.R. (2010) Biochemical responses of hyacinth bean (*Lablab purpureus*) to salinity stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 341-353.

- Devos, C.H.R.; Vonk, M.J.; Vooijs, R. & Schat, H. (1992) Glutathione depletion due to copper-induced phytochelatin synthesis causes oxidative stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiology* 98: 853-858.
- Dominguez, D.M.; Garcia, F.C.; Raya, A.C. & Santiago, R.T. (2010) Cadmium-induced oxidative stress and the response of the antioxidative defense system in *Spartina densiflora*. *Physiologia Plantarum* 139: 289-302.
- Foyer, C.H.; Lelandais, M. & Kunert, K.J. (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiologia Plantarum* 92: 696-717.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2005a) Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell and Environment* 28: 1056-1071.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2005b) Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Gallego, S.M.; Pena, L.B.; Barcia, R.A.; Azpilicueta, C.E.; Iannone, M.F.; Rosales, E.P.; Zawoznik, M.S.; Groppa, M.D. & Benavides, M.P. (2012) Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany* 83: 33-46.
- Gill, S.S. & Tuteja, N. (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

- Gill, T.; Sreenivasulu, Y.; Kumar, S. & Ahuja, P.S. (2010) Over-expression of superoxide dismutase exhibits lignification of vascular structures in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology* 167: 757-760.
- Gonçalves, J.; Tabaldi, L.; Cargnelutti, D.; Pereira, L.; Maldaner, J.; Becker, A.; Rossato, L.; Rauber, R.; Bagatini, M.; Bisognin, D.; Schetinger, M. & Nicoloso, F. (2009) Cadmium-induced oxidative stress in two potato cultivars. *Biometals* 22: 779-792.
- 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.
- Gratão, P.L.; Pompeu, G.B.; Capaldi, F.R.; Vitorello, V.A.; Lea, P.J. & Azevedo, R.A. (2008) Antioxidant response of *Nicotiana tabacum* cv. bright yellow 2 cells to cadmium and nickel stress. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 94: 73-83.
- Guimarães, M.A.; Santana, T.A.; Silva, E.V.; Zenzen, I.L. & Loureiro, M.E. (2008) Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. *Revista Trópica - Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 58-69.
- Halliwell, B. (2006) Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology* 141: 312-322.
- Heath, R.L. & Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 125: 189-198.
- Jouili, H.; Bouazizi, H. & El Ferjani, E. (2011) Plant peroxidases: biomarkers of metallic stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 2075-2082.

- Kim, C.; Meskauskiene, R.; Apel, K. & Laloi, C. (2008) No single way to understand singlet oxygen signalling in plants. *Embo Reports* 9: 435-439.
- Kraus, T.E.; McKersie, B.D. & Fletcher, R.A. (1995) Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. *Journal of Plant Physiology* 145: 570-576.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li, Y.; Zhang, S.; Jiang, W. & Liu, D. (2013) Cadmium accumulation, activities of antioxidant enzymes, and malondialdehyde (MDA) content in *Pistia stratiotes* L. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 1117-1123.
- Mahanty, S.; Kaul, T.; Pandey, P.; Reddy, R.A.; Mallikarjuna, G.; Reddy, C.S.; Sopory, S. & Reddy, M.K. (2012) Biochemical and molecular analyses of copper-zinc superoxide dismutase from a C-4 plant *Pennisetum glaucum* reveals an adaptive role in response to oxidative stress. *Gene* 505: 309-317.
- Matsuno, H. & Uritani, I. (1972) Physiological behavior of peroxidase isoenzymes in sweet potato root tissue injured by cutting or with black root. *Plant and Cell Physiology* 13: 1091-1101.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Mittler, R. & Poulos, T.L. (2007) Ascorbate Peroxidase. In: Smirnoff N (ed) *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants*. Blackwell Publishing Ltd, pp 87-100.

- Monteiro, C.C.; Carvalho, R.F.; Gratão, P.L.; Carvalho, G.; Tezotto, T.; Medici, L.O.; Peres, L.E.P. & Azevedo, R.A. (2011) Biochemical responses of the ethylene-insensitive *Never ripe* tomato mutant subjected to cadmium and sodium stresses. *Environmental and Experimental Botany* 71: 306-320.
- Nadgorska-Socha, A.; Kafel, A.; Kandziora-Ciupa, M.; Gospodarek, J. & Zawisza-Raszka, A. (2013) Accumulation of heavy metals and antioxidant responses in *Vicia faba* plants grown on monometallic contaminated soil. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 1124-1134.
- Nakano, Y. & Asada, K. (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867-880.
- Opdenakker, K.; Remans, T.; Keunen, E.; Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2012) Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environmental and Experimental Botany* 83: 53-61.
- Pereira, L.; de A. Mazzanti, C.; Cargnelutti, D.; Rossato, L.; Gonçalves, J.; Calgaroto, N.; Dressler, V.; Nicoloso, F.; Federizzi, L.; Morsch, V. & Schetinger, M. (2011) Differential responses of oat genotypes: oxidative stress provoked by aluminum. *Biometals* 24: 73-83.
- Pilon, M.; Ravet, K. & Tapken, W. (2010) The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*.
- Remans, T.; Opdenakker, K.; Guisez, Y.; Carleer, R.; Schat, H.; Vangronsveld, J. & Cuypers, A. (2012) Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environmental and Experimental Botany* 84: 61-71.

- Roychoudhury, A.; Basu, S. & Sengupta, D.N. (2012) Antioxidants and stress-related metabolites in the seedlings of two indica rice varieties exposed to cadmium chloride toxicity. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 835-847.
- Siddiqui, M.H.; Al-Whaibi, M.H.; Sakran, A.M.; Ali, H.M.; Basalah, M.O.; Faisal, M.; Alatar, A. & Al-Amri, A.A. (2013) Calcium-induced amelioration of boron toxicity in radish. *Journal of Plant Growth Regulation* 32: 61-71.
- Smeets, K.; Cuypers, A.; Lambrechts, A.; Semane, B.; Hoet, P.; Van Laere, A. & Vangronsveld, J. (2005) Induction of oxidative stress and antioxidative mechanisms in *Phaseolus vulgaris* after Cd application. *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 437-444.
- Smith, I.K.; Vierheller, T.L. & Thorne, C.A. (1988) Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithilbis (2-nitrobenzoic acid). *Analytical Biochemistry* 175: 408-413.
- Wang, Z.; Zhang, Y.; Huang, Z. & Huang, L. (2008) Antioxidative response of metal-accumulator and non-accumulator plants under cadmium stress. *Plant and Soil* 310: 137-149.
- Yu, F.; Liu, K.; Li, M.; Zhou, Z.; Deng, H. & Chen, B. (2013) Effects of cadmium on enzymatic and non-enzymatic antioxidative defences of rice (*Oriza sativa* L.). *International Journal of Phytoremediation* 15: 513-521.
- Zhang, F.; Zhang, H.; Wang, G.; Xu, L. & Shen, Z. (2009) Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials* 168: 76-84.

Zhao, F.Y.; Liu, W. & Zhang, S.Y. (2009) Different responses of plant growth and antioxidant system to the combination of cadmium and heat stress in transgenic and non-transgenic rice. *Journal of Integrative Plant Biology* 51: 942-950.

4 ANÁLISE DO PROTEOMA DE *Dolichos lablab* SOB STRESSE POR CÁDMIO

4.1 INTRODUÇÃO

O conjunto de proteínas de um tecido é chamado de proteoma, enquanto que o estudo desse conjunto é a proteômica. A análise do proteoma é uma abordagem que complementa os conhecimentos gerados pela genômica funcional; não obstante possibilita a identificação de mudanças que ocorrem em nível proteico, sendo que tais mudanças não podem ser previstas a partir da análise genômica (Park, 2004).

O estudo do proteoma em diferentes circunstâncias tem sido aplicado em diversas áreas do conhecimento dentro da ciência vegetal, como por exemplo: desenvolvimento (Quiala *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012), metabolismo (Kim *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012a), estresse biótico (Li *et al.*, 2011), estresse abiótico (Bokhari *et al.*, 2007; Zoerb *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011) e interações biológicas (Lim *et al.*, 2010).

No que se refere ao estudo do proteoma de plantas submetidas a estresse por metais pesados, modelos biológicos não tolerantes como *Arabidopsis thaliana* (Semane *et al.*, 2010) ou tolerante como *Arabidopsis halleri* (Farinati *et al.*, 2009) têm sido amplamente utilizados com o objetivo de compreender e conhecer proteínas que são moduladas na presença do contaminante ou, também para identificação de proteínas envolvidas na tolerância ao metal.

Dentre a variedade de metais pesados existentes, a análise do proteoma já foi investigada em plantas de arroz sob estresse por cobre (Ahsan *et al.*, 2007), em *Arabidopsis* sob estresse por cádmio (Cd) e zinco (Zn) (Farinati *et al.*, 2009), em choupo e soja sob estresse por cádmio (Kieffer *et al.*, 2009; Ahsan *et al.*, 2012), demonstrando que ainda existe uma infinidade de possibilidades de combinações e investigações a serem exploradas, pois os objetivos podem ser tão diferentes quantas são as possibilidades de exploração da interação entre planta e metais pesados.

Em plantas, já se sabe que o Cd é um metal pesado extremamente tóxico mesmo em doses bastante baixas (Sanità di Toppi & Gabbrielli, 1999; Dourado *et al.*, 2013). Seus efeitos no crescimento e desenvolvimento de plantas são severos. Apenas poucas espécies como *Solanum nigrum* (Gao *et al.*, 2010) e *Thlaspi praecox* (Vogel-Mikus *et al.*, 2006) são conhecidas como tolerantes e hiperacumuladoras desse metal. Portanto, áreas contaminadas com Cd são improdutivas apesar de serem potencialmente utilizadas por plantas que apresentam tolerância a esse metal. Essa tecnologia, denominada fitorremediação, utiliza espécies capazes de realizar a acumulação de metais pesados, sendo essas plantas denominadas como hiperacumuladoras. Porém os modelos biológicos que têm sido estudados não se adequam à realidade por não apresentarem características agronômicas, como alta produção de biomassa e crescimento rápido, favoráveis para aplicação da técnica.

A fitorremediação, que tem como objetivo a utilização de plantas na remediação de solos contaminados com metais pesados, baseia-se em observações e caracterizações simples como, medidas de crescimento de raízes e caule, produção de massas seca aérea e radicular, quantidade do elemento acumulado nos órgãos, além de utilizar índices para extrapolar o potencial de aplicação prático de uma espécie vegetal interagindo com um metal ou vários (Baker *et al.*, 2000). Por isso, se faz importante o início de estudos utilizando técnicas avançadas, como a proteômica, que nos fornecerá um conhecimento mais profundo sobre o funcionamento metabólico de espécies com potencial para utilização em fitorremediação.

A exploração da abordagem proteômica tem papel fundamental na geração de conhecimento de respostas de plantas a metais pesados para melhorar a capacidade de crescimento em solos contaminados, e assim ampliar o potencial da fitorremediação que ainda não vem sendo explorado. Sendo assim, se faz necessária a exploração dessa nova ferramenta tecnológica na busca

de mais conhecimento, possibilitando melhorias para tecnologias ambientalmente corretas de descontaminação de solos.

Portanto, o objetivo desse estudo foi realizar a identificação de proteínas moduladas na presença do Cd em *D. lablab*, uma leguminosa que apresenta média tolerância a esse elemento, para aprimorar seu potencial como fitorremediadora de Cd.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Montagem, condução e coleta do experimento

As sementes foram germinadas em uma mistura de substrato basaplant[®] e vermiculita (1:1) até a expansão total das folhas cotiledonares e, então, foram transplantadas para vasos individuais contendo areia lavada e autoclavada. Após o transplante, as plantas receberam solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950). Os tratamentos, nas concentrações de 0 e 100 μM de CdCl_2 , foram realizados juntamente com uma aplicação de solução nutritiva (100 mL – o estoque de Cd 1000 μM foi diluído nesse volume) após as plantas apresentarem 3 folhas trifolioladas completamente expandidas, aproximadamente 30 dias após os transplantes. Foram utilizados um total de 6 repetições biológicas para cada tratamento e as foram plantas expostas ao Cd por um período total de 5 dias.

Ao final do tratamento, os tecidos foliares e radiculares de 3 repetições foram coletados em saquinhos de alumínio e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido e posteriormente armazenados em biofreezer a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise proteômica. Os mesmos tecidos das outras 3 repetições remanescentes de cada tratamento foram coletados e armazenados em saquinhos de papel e mantidos em estufa com circulação de ar forçada a $60\text{ }^\circ\text{C}$ até atingirem massa constante para posterior digestão e quantificação de Cd.

4.2.2 Quantificação de cádmio

Para quantificação de Cd, 250 mg de tecido foliar ou radicular secos e moídos foram submetidos a digestão nítrico-perclórica, 2,5 mL e 0,25 mL respectivamente. O material foi mantido em tubos de bloco digestor por 14 horas. Após esse período a temperatura do bloco digestor foi elevada 50 °C a cada 30 minutos até atingir a temperatura de 300 °C. À mistura remanescente foi recebido 25 mL de água milli-Q. A leitura desses extratos ácidos foi realizada diretamente em um espectrômetro de emissão ótica de plasma acoplado induzido (ICP-OES) no Instituto Agrônomo de Campinas – IAC.

4.2.3 Extração proteica

4.2.3.1 Métodos para extração proteica

A extração de proteínas solúveis totais foi realizada por dois métodos diferentes devido a diferenças de rendimento proteico de cada tecido: o primeiro método (TCA/Acetona) de acordo com Xu *et al.* (2008) é baseado na precipitação de proteínas de uma amostra utilizando uma solução 10% de TCA (m/v) e 0,07% de β -ME (v/v) em acetona (P.A.) e, posteriormente as proteínas foram solubilizadas novamente em solução de solubilização (SS); o segundo método (Tris-base/TCA-Acetona) de acordo com Lee *et al.* (2011) é baseado na extração das proteínas de uma amostra para uma solução tampão Tris 100 mM, a qual posteriormente recebeu uma solução 20% de TCA (m/v) em acetona (P.A.) para precipitação das proteínas solúveis; nesse método, o pellet resultante é composto apenas por proteínas que, serão solubilizadas em tampão específico.

4.2.3.2 TCA/Acetona

Aproximadamente 500 mg de tecido foliar fresco foi macerado em N₂ líquido até obtenção de um pó extremamente fino. O pó resultante foi transferido para tubos de centrifuga com tampa e

em seguida foi adicionado 10 mL de solução de precipitação, composta por 10% de TCA e 0,07% de β -ME em acetona (P.A.). Os tubos já contendo a mistura de tecido foliar e solução de precipitação foram acondicionados horizontalmente em pequenas caixas térmicas, cobertos por gelo e agitados vigorosamente durante 20 minutos em mesa agitadora. Após o período de agitação o material foi centrifugado a 23700 g a 4 °C durante 30 minutos, posteriormente o sobrenadante foi descartado e se iniciou o processo de lavagem do pellet dentro dos tubos. O pellet foi lavado com 10 mL de solução 0,07% de β -ME em acetona (P.A.); foram realizados 3 ciclos de lavagem, onde cada ciclo consiste em repouso do pellet por 2 horas, a -20 °C, em solução de lavagem; após o terceiro ciclo foi realizada centrifugação a 23700 g a 4 °C durante 20 minutos na qual o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o pellet foram acondicionados destampados em dessecador a vácuo a 4 °C durante 2 dias para secagem.

Do pellet seco resultante, aproximadamente 50 mg foi utilizado para solubilização das proteínas. Em tubos eppendorfs de 1,5 mL a cada 50 mg foi adicionado 700 μ L de solução de solubilização, composta por 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% de CHAPS e 0,4% de triton X-100. A mistura, de pellet e solução de resolubilização, passou por 3 ciclos de agitação e sonicação em gelo por 2 e 20 minutos respectivamente. Posteriormente, o homogenizado foi centrifugado durante 15 minutos a 12100 g e o sobrenadante foi recuperado para quantificação de proteínas.

4.2.3.3 Tris-base/TCA-Acetona

Aproximadamente 2 g de tecido radicular fresco foram macerados em N₂ líquido até obtenção de um pó extremamente fino. O pó resultante foi transferido para tubos de centrifuga com tampa e em seguida foi adicionado 10 mL de tampão de extração, composto por 100 mM de Tris, 5 mM de DTT, 1 mM de EDTA e 1 mM de PMSF (pH 8,5). Os tubos contendo a mistura de tecido radicular e tampão de extração foram acondicionados horizontalmente em pequenas caixas térmicas,

cobertos por gelo e agitados vigorosamente durante 20 minutos em mesa agitadora. Após o período de agitação o material foi centrifugado a 23700 g a 4 °C durante 30 minutos e o sobrenadante foi recuperado e dividido em duas frações de 5 mL. Nessas frações foram adicionados 30 mL de solução de precipitação – 20% de TCA (m/v) em acetona (P.A.), então os tubos foram deixados em repouso por 18 horas, a -20 °C, para precipitação das proteínas.

Após a precipitação, a mistura foi centrifugada a 23700 g a 4 °C durante 30 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet resultante foi lavado com 35 mL de solução 0,07% de β -ME em acetona (P.A.); foram realizados 3 ciclos de lavagem do pellet seguido de centrifugação, onde cada ciclo consiste em repouso do pellet por 1 hora, a -20 °C, em solução de lavagem; após o terceiro ciclo foi realizada centrifugação a 23700 g a 4 °C durante 20 minutos na qual o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o pellet foram acondicionados destampados em dessecador a vácuo a 4 °C durante 2 dias para secagem.

Nos tubos contendo o pellet seco, foram adicionados 300 μ L de solução de solubilização, composta por 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 2% de CHAPS e 0,4% de triton X-100. O pellet e a solução de solubilização foram homogenizados e mantidos em sonicador durante 30 minutos. As amostras, de um mesmo tratamento, foram transferidas para um único tubo eppendorf que foi submetido à nova agitação e centrifugação a 12100 g durante 15 minutos para remoção de possíveis contaminantes; o sobrenadante foi então transferido para um novo tubo eppendorf para proceder com a quantificação proteica.

4.2.4 Quantificação proteica

A quantificação de proteínas totais provenientes dos extratos solubilizados no tampão de solubilização foi realizada de acordo com o método proposto por Bradford (1976), utilizando-se como padrão uma curva analítica de BSA.

4.2.5 Focalização isoeétrica – 1ª dimensão

A focalização isoeétrica foi realizada em focalizador Ettan™ IPGphor 3 sob gerenciamento do software de mesmo nome, ambos fabricados e desenvolvidos pela GE Healthcare. Fitas de 18 cm, “Immobiline Dry Strip” da mesma marca, contendo gel de poliacrilamida desidratado com um gradiente de pH imobilizado, 4-7 não linear (NL).

4.2.5.1 Focalização isoeétrica de proteínas foliares e radiculares

Foi utilizado 800 µg de proteína extraída (folhas) e 500 µg de proteína extraída (raízes) para realização da focalização isoeétrica. Ao volume de extrato proteico contendo 800 ou 500 µg de proteína foi adicionado tampão de solubilização até o volume final de 375 µL/sarcófago, ao final a solução proteica para focalização continha 0,3% de DTT (m/v), 2% de IPG buffer (v/v) e 0,5% de azul de bromofenol (v/v).

Então, os 375 µL de solução proteica preparada foram distribuídos igualmente no sarcófago de cerâmica, e em seguida foi colocada a fita com gradiente de pH imobilizado. Uma fina camada de óleo mineral foi utilizada como cobertura da fita e solução proteica para impedir a evaporação.

As fitas, uma vez preparadas e os sarcófagos devidamente fechados, foram submetidas à focalização isoeétrica do tipo “step”. Para proteínas foliares a programação de focalização foi: reidratação 6 horas, 30 V 12 horas, 100 V 1 hora, 200 V 1 hora, 400 V 1 hora, 700 V 1 hora, 1000 V 1 hora, 5000 V 10 horas, 8000 V 4 horas e 100 V 3 horas, enquanto que para proteínas radiculares a programação foi: reidratação 6 horas, 200 V 1 hora, 500 V 1 hora, 1000 V 1 hora, 5000 V 8 horas, 8000 V 3:30 horas, 200 V 2 horas.

Encerrando a focalização, as fitas foram lavadas em água milli-Q para retirada do excesso de óleo mineral e então foram conservadas em tubos e congeladas em biofreezer a -80 °C. A

focalização das proteínas foi sempre realizada entre as repetições de um mesmo tratamento, totalizando três fitas por focalização.

4.2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante – 2D – PAGE

A separação eletroforética em 2ª dimensão foi realizada em cuba vertical da marca Bio-Rad®; modelo XL utilizando um gel de poliacrilamida a 12,5% com tampão de “corrida” composto por 25 mM de Tris, 192 mM de glicina e 1% de SDS (Laemmli, 1970). Antes de alocar as fitas sobre o gel de separação, as proteínas focalizadas foram submetidas ao processo de equilíbrio de fitas, que consiste em redução e alquilação das mesmas.

A redução das proteínas na fita foi realizada em tubos sob leve agitação utilizando-se um volume de 6 mL/fita de solução 72 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 8 M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS e 1% de DTT, durante 15 minutos em mesa agitadora. A alquilação das proteínas foi realizada sob leve agitação em um volume de 6 mL/fita de solução 72 mM de Tris-HCl (pH 8,8), 8 M de uréia, 30% de glicerol, 2% de SDS, 2,5% de iodoacetamida e 0,002% de azul de bromofenol, as fitas ficaram sob agitação leve, durante 15 minutos em mesa agitadora.

A eletroforese foi conduzida a 4 °C com 15 mA/placa durante 20 minutos e posteriormente a 30 mA/placa até que a linha de “front” atingisse o final do gel num total de aproximadamente 4:30 horas.

A separação proteica em 2ª dimensão (2-D PAGE) foi realizada sempre entre as repetições de um mesmo tratamento, assim como foi realizado para focalização isoeletrica, totalizando a produção de 3 géis para cada separação eletroforética.

4.2.7 Coloração dos géis

Os géis quando prontos foram mantidos durante uma hora em solução aquosa fixadora que é composta por etanol e ácido acético a 40% e 10%, respectivamente. Posteriormente, os géis foram acondicionados em recipientes contendo 250 mL de solução de coloração coloidal de coomassie blue G-250 e mantidos sob agitação leve em mesa agitadora por 16 horas. Após esse período a solução corante foi removida e o excesso de corante remanescente nos géis foi removido por lavagem simples dos géis em água milli-Q. Os géis foram armazenados em recipientes contendo 250 mL de solução aquosa de ácido acético 7% até a digitalização.

4.2.8 Obtenção, tratamento e análise de imagens

Os géis foram escaneados no scanner ImageScanner utilizando o software LabScan™ V. 5.0, ambos da marca Amersham Biosciences.

A detecção dos spots nos géis foi realizada por meio do software ImageMaster 2D Platinum 7.0 e os seguintes parâmetros foram ajustados igualmente para o conjunto de géis de um mesmo órgão: contraste, suavidade, saliência e área mínima. Como a detecção foi automática, foi necessário realizar o tratamento das imagens por meio de deleção de falsos spots, divisão de spots que ficaram agrupados ou agrupamento de spots que ficaram divididos (Figura 4.1 A, B, C e D).

Os spots foram analisados por densitometria pelo software ImageMaster 7.0, e a análise estatística considera o valor numérico atribuído ao volume do spot que foi determinado para cada spot na análise de densitometria e então é realizada uma análise de variância, considerando spots diferentes os que apresentam $p < 0,05$.

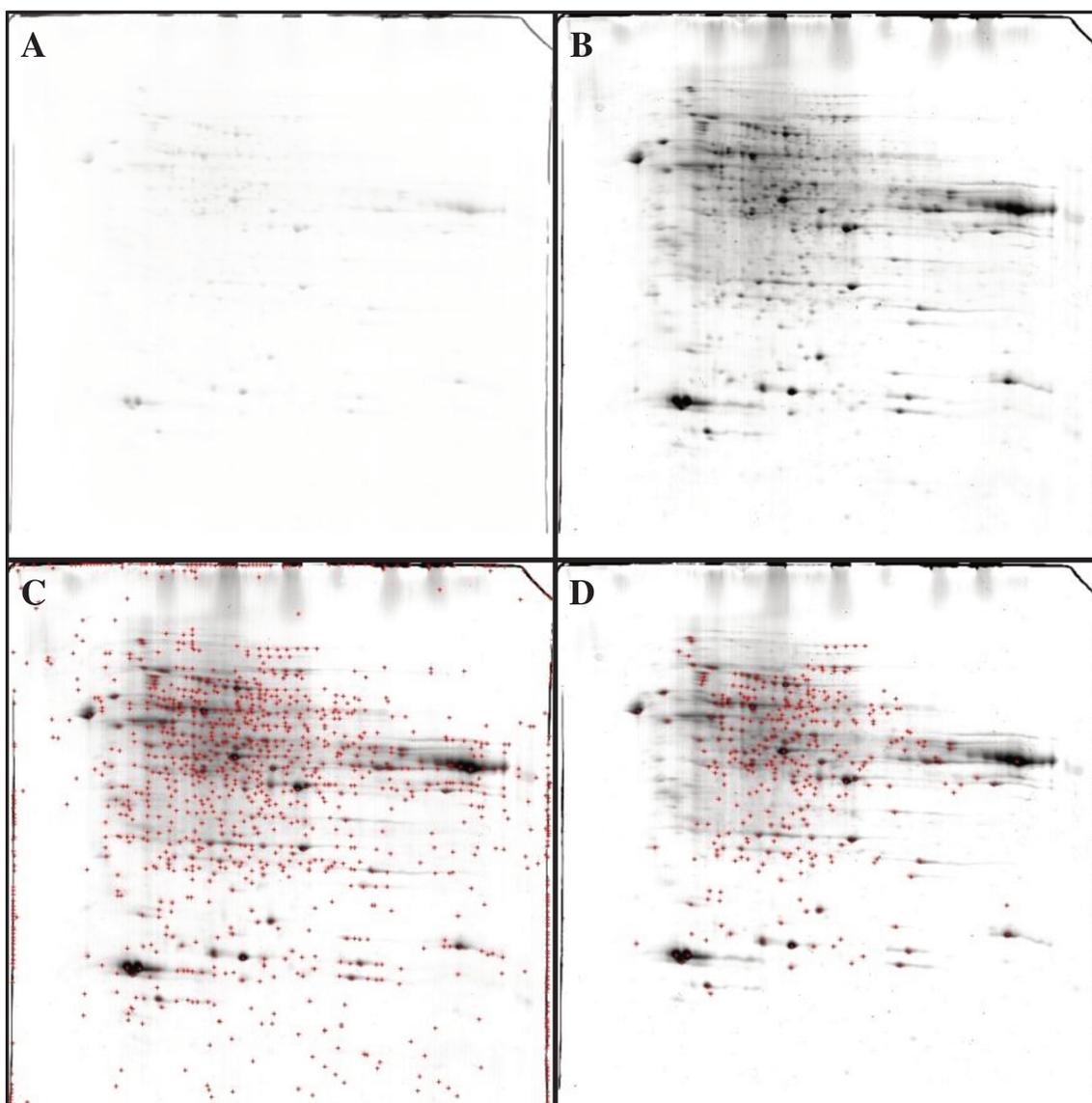


Figura 4.1 – Processo de tratamento de géis: gel sem tratamento (A), gel com escala de contraste ajustada (B), gel com “spots” detectados automaticamente (C) e gel com conjunto de “spots” tratados (D).

4.2.9 Processamento *in gel* dos spots selecionados para o sequenciamento

Os spots que apresentaram diferenças estatísticas significativas, como descrito no item anterior, foram excisados dos géis de cada uma das repetições biológicas e, então, submetidos ao processamento *in gel*.

Descoloração e desidratação: Os spots excisados foram picados, dentro de um tubo eppendorf, com auxílio de um bisturi cirúrgico e a eles foi adicionado 200 μL de solução de

descoloração (25 mM de bicarbonato de amônio em acetonitrila : água – 1 : 1); os tubos foram agitados em vórtex, pelo menos 3 vezes num período de 10 minutos; foi realizado pelo menos 3 ciclos de substituição da solução de descoloração. Ao final da descoloração, o excesso da solução de descoloração foi removido e os spots foram desidratados adicionado 200 μ L de acetonitrila 100% e permanecendo nessa solução por 10 minutos, esse procedimento foi realizado por 2 vezes e o excesso de acetonitrila removido, deixando os spots secarem em temperatura ambiente dentro de capela de exaustão.

Redução e alquilação: aos spots desidratados, foi adicionado 50 μ L de solução de redução (20 mM de DTT em solução aquosa 50 mM de bicarbonato de amônio), os quais permaneceram por 40 minutos a 56 °C; posteriormente a solução de redução foi removida e aos spots foi adicionado 50 μ L de solução de alquilação (55 mM de iodoacetamida em solução aquosa 50 mM de bicarbonato de amônio) e deixados em temperatura ambiente e no escuro durante 30 minutos; posteriormente a solução de alquilação foi removida e os spots lavados com solução 25 mM de bicarbonato de amônio durante 5 minutos com agitação eventual em vórtex. Após a remoção da solução 25 mM de bicarbonato de amônio, os spots foram desidratados adicionando 200 μ L de acetonitrila 100% durante 20 minutos, o excesso foi removido e a acetonitrila remanescente foi deixada evaporar em capela de exaustão em temperatura ambiente.

Digestão tríptica: aos spots desidratados, foi adicionado 25 μ L de solução 20 ng μ L⁻¹ de tripsina, deixados em gelo durante 5 minutos para penetração da tripsina no gel e após esse período, foi adicionado mais 40 μ L de solução 52 mM de bicarbonato de amônio para cobertura total dos spots, então foram incubados por pelo menos 14 horas em banho seco a 37 °C para digestão. Após a digestão, aos tubos contendo os spots, foram adicionados 15 μ L de solução bloqueadora [5% de ácido fórmico (v/v) em acetonitrila 50%]. O excesso de solução após a digestão foi recuperado e transferido à um novo tubo eppendorf, então deu-se inicio a eluição dos peptídeos dos spots.

Eluição de peptídeos: Eluição I – aos spots foi adicionado 40 μL de solução de eluição I (6% de ácido fórmico em metanol 60%) seguido de agitação em vórtex e aquecimento a 40 °C durante 15 minutos, o sobrenadante foi recuperado e armazenado; esse procedimento foi realizado 2 vezes. **Eluição II** – aos spots foi adicionado 40 μL de solução de eluição II (1% de ácido fórmico em acetonitrila 50%) seguido de agitação em vórtex e aquecimento a 40 °C durante 15 minutos, o sobrenadante foi recuperado e armazenado; esse procedimento foi realizado 2 vezes. **Eluição III** – aos spots foi adicionado 80 μL de solução de eluição III (acetonitrila 100%) e mantidos em temperatura ambiente durante 10 minutos; o sobrenadante foi recuperado e armazenado.

Em todos os passos em que os sobrenadantes foram recuperados, os mesmos foram estocados em tubo eppendorf correspondente ao spot que já continha o sobrenadante proveniente da digestão trípica, perfazendo um volume final de aproximadamente 295 μL . A solução recuperada nas eluições foi seca em concentrador a vácuo tipo speed-vac até o momento da dessalinização e purificação dos peptídeos.

Purificação dos peptídeos: os peptídeos foram ressuspensos e solubilizados em 10 μL de solução 0,1% de ácido fórmico (v/v) e então dessalinizados e purificados com auxílio de uma ponteira do tipo “zip-tip”; a dessalinização foi realizada com solução 0,1% de ácido fórmico em metanol a 5% (v/v) e a eluição foi realizada com solução de 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila a 50% (v/v). A solução obtida, de peptídeos purificados, foi seca em concentrador a vácuo tipo speed-vac e ressuspensa em 5 μL de solução aquosa 0,1% de ácido trifluoracético em acetonitrila a 50% imediatamente antes da aplicação na placa de MALDI.

4.2.10 Identificação de proteínas por MALDI TOF-TOF MS/MS

Para o sequenciamento de proteínas, foram consideradas apenas as proteínas que apresentaram sequências cuja significância das diferenças foi aferida estatisticamente pela análise de

imagem; então, de 17 proteínas foliares que apresentaram diferenças pelas análises de imagens, 10 proteínas geraram sequências com diferenças significativas; em raízes, de 44 proteínas que apresentaram diferenças pelas análises de imagem, 17 proteínas geraram sequências com diferenças significativas.

As sequências obtidas foram comparadas por meio da ferramenta BLAST contra o banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) por meio do software plataforma MASCOT[®].

4.2.11 Análise estatística

A análise estatística dos spots nos géis foi realizada pela análise de variância e teste T de Student, considerando como diferencialmente expresso quando $p < 0,05$.

Os resultados referentes à quantidade de Cd acumulada nos tecidos foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Acúmulo de cádmio

Observamos que o Cd foi absorvido efetivamente pela planta e foi acumulado em sua maioria nos tecidos radiculares (Figura 4.2).

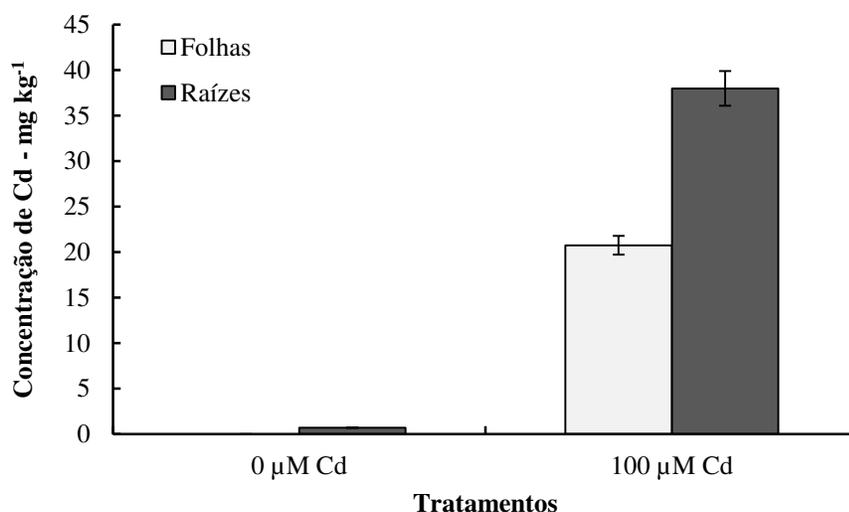


Figura 4.2 – Acúmulo de Cd em folhas e raízes de *Dolichos lablab* (L.) em tratamento controle (0 μM Cd) e tratamento com cádmio (100 μM Cd).

4.3.2 Análise da diferença entre “spots” de folhas controle (FC) e folhas tratadas (FT)

Observamos que em folhas de plantas tratadas com Cd, a quantidade de “spots” detectados foi superior ao número de “spots” detectados em folhas de plantas controle (Tabela 4.1). Do total de “spots” detectados em ambas as condições, somente os “spots” que apresentaram $p < 0,05$ foram considerados como diferencialmente expressos. Observamos 17 “spots” comuns aos dois tratamentos que sofreram modulação em função da presença de Cd, sendo que 11 “spots” tiveram sua expressão estimulada e 6 “spots” tiveram sua expressão reprimida (Tabela 4.1). Imagens dos géis de referência de folhas controle e tratada, sem e com “spots” detectados estão no anexo I.

Tabela 4.1 – Número de “spots” comuns ao controle e tratamento (FC & FT), exclusivos do controle (FC) e exclusivos do tratamento (FT) em tecido foliar.

	SPOTS			
	Total	$p < 0,05$	Estimuladas	Reprimidas
FC & FT	227	17	11	6
FC	139	91	-	-
FT	165	139	-	-
Total	531	247	-	-

Dentro das condições estatísticas estabelecidas, consideramos como “spots” estimulados aqueles que apresentaram volume 50% maior em relação ao controle e consideramos como “spots” reprimidos aqueles que apresentaram volume 50% inferior em relação ao controle. FC: folha controle (0μM Cd); FT: folha do tratamento (100μM Cd).

4.3.3 Análise da diferença entre “spots” de raízes controle (RC) e raízes tratadas (RT)

Os resultados obtidos mostram que em raízes de plantas tratadas com Cd a quantidade de “spots” detectados foi superior ao número de “spots” detectados em raízes de plantas controle (Tabela 4.2). Do total de “spots” detectados em ambas as condições, somente os “spots” que apresentaram $p < 0,05$ foram considerados como proteínas diferencialmente expressas. Observamos 44 “spots” comuns aos dois tratamentos que sofreram modulação em função da presença de Cd, sendo que 26 “spots” tiveram sua expressão estimulada e 18 “spots” tiveram sua expressão reprimida (Tabela 4.2). Imagens dos géis de referência de raízes de plantas controle e tratada, sem e com “spots” detectados estão no anexo II.

Tabela 4.2 – Número de “spots” comuns ao controle e tratamento (RC & RT), exclusivos do controle (RC) e exclusivos do tratamento (RT) em tecido radicular.

	SPOTS			
	Total	p < 0,05	Estimuladas	Reprimidas
RC & RT	179	44	26	18
RC	55	45	-	-
RT	143	143	-	-
Total	377	232	-	-

Dentro das condições estatísticas estabelecidas, consideramos como “spots” estimulados aqueles que apresentaram volume 50% maior em relação ao controle e consideramos como “spots” reprimidos aqueles que apresentaram volume 50% inferior em relação ao controle. RC: raiz controle (0 μ M Cd); RT: raiz do tratamento (100 μ M Cd).

4.3.4 Identificação de proteínas por MALDI TOF-TOF MS/MS

Foram selecionados 44 “spots” provenientes de tecido radicular e 17 “spots” provenientes do tecido foliar que apresentaram variação da modulação em resposta à presença de Cd de acordo com a análise de imagem. Apenas 18 spots radiculares (Tabela 4.3) e 9 spots foliares (Tabela 4.4) apresentaram identificações proteicas após sequenciadas.

Tabela 4.3 – Características de proteínas radiculares identificadas por MALDI TOF-TOF MS/MS.

<i>Spot</i>	Proteína	Função Metabólica	Modulação	% Expressão	Organismo	Acesso	Score	MP^a	CS%^b
1	Taumatina like-proteína	Sinalização celular	+	+ 141%	<i>Phaseolus vulgaris</i>	P83959.1	101	2	76
9	Triosefosfato isomerase	Metabolismo de carboidrato	+	+ 55%	<i>Glycine max</i>	C6T7V6	90	13	43
34	Metionina sintase	Metabolismo de aminoácidos	+	+ 78%	<i>Cicer arietinum</i>	ACL14488.1	103	15	22
50	Cinnamoyl CoA redutase	Metabolismo secundário	+	+ 113%	<i>Corymbia citriodora</i>	ABQ95552.1	100	9	47
52	Isocitrato desidrogenase-NADP ⁺	Metabolismo energético	+	+ 64%	<i>Passiflora edulis</i>	BAG84436.1	83	23	47
55	Isoflavona redutase	Metabolismo secundário	+	+ 122%	<i>Vitis vinifera</i>	CAI56335.1	85	5	25
70	Triose fosfato isomerase	Metabolismo de carboidrato	+	+ 65%	<i>Glycine max</i>	ABA86966 .1	109	14	50
83	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	Metabolismo de carboidrato	+	+ 75%	<i>Glycine max</i>	ABC75834.1	87	7	29
84	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase citosólica	Metabolismo de carboidrato	+	+ 122%	<i>Antirrhinum majus</i>	G3PC_ANTM A	85	8	30
120	Quitinase	Resposta a estresse biótico	+	+ 209%	<i>Medicago truncatula</i>	CAA71402.1	88	6	18
14	Acil-peptideo hidrolase	Metabolismo de proteína	-	- 65%	<i>Medicago truncatula</i>	XP_003600065	124	9	21

22	Enolase	Metabolismo de carboidrato	-	- 50%	<i>Glycine max</i>	AAS18240	209	15	34
24	Fosfoglicomutase	Metabolismo de carboidrato	-	- 65%	<i>Glycine max</i>	XP_003525238	78	11	13
44	Cisteína sintase	Metabolismo de aminoácido	-	- 55%	<i>Ricinus communis</i>	XP_002517133	76	7	28
101	Proteína induzida por auxina	Sinalização celular	-	- 65%	<i>Medicago truncatula</i>	CBI34180.3	64	13	35
104	Glutamina sintetase citosolica	Metabolismo de aminoácido	-	- 67%	<i>Glycine max</i>	AAG24873.1	229	16	37
130	Monodeidroascorbato redutase	Metabolismo antioxidativo	-	- 63%	<i>Vitis vinifera</i>	XP_002278648.1	80	14	30

a: Matched Peptides

b: Cobertura da sequencia

Tabela 4.4 – Características de proteínas foliares identificadas por MALDI TOF-TOF MS/MS.

<i>Spot</i>	Proteínas	Função Metabólica	Modulação	% Expressão	Organismo	Acesso	Score	MP^a	CS%^b
7	Heat Shock Protein	Metabolismo de proteínas/resposta a estresse	+	+ 108%	<i>Pisum sativum</i>	AAA33637.1	301	13	18
43	UDP-glicose pirofosforilase	Metabolism de carboidratos	+	+ 216%	<i>Amorpha fruticosa</i>	AAL33919.1	68	11	23
146	Lectina - Galactose/N-acetilgalactosamina	Resposta a estresse	+	+ 77%	<i>Lablab purpureus</i>	ABM92662.2	67	4	14
225	Citocromo P450	Metabolismo antioxidativa	+	+ 187%	<i>Triticum monococcum</i>	AAS58486.1	61	11	18
47	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase	Sinalização celular	-	- 64%	<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002891093.1	76	13	11
76	Glutamina sintetase-plastideo	Metabolismo de aminoácidos	-	- 64%	<i>Vigna radiata</i>	ADK27329.1	134	10	26
139	Quinona oxidoreductase	Metabolismo antioxidativo e energético	-	- 66%	<i>Glycine max</i>	ACU19769.1	82	13	54
186	Ribulose bisfosfato carboxilase – cadeia pequena	Metabolismo fotossintético	-	- 56%	<i>Ricinus communis</i>	XP_002532149.1	139	15	37
190	Oxygen-evolving enhancer protein 2	Metabolismo fotossintético	-	- 50%	<i>Brassica juncea</i>	Q96334.1	71	5	23

a: Matched Peptides

b: Cobertura da sequencia

4.4 DISCUSSÃO

A possibilidade de avaliação qualitativa e quantitativa do perfil proteico de tecidos vegetais nos permite uma análise bastante precisa do comportamento bioquímico celular diante de diversas condições, como resposta a fatores abióticos (Chen & Harmon, 2006).

A análise do proteoma de plantas submetidas a diferentes tipos de estresse tem se mostrado uma ferramenta bastante eficaz na compreensão de vias metabólicas que são afetadas nessas circunstâncias estressantes (Bokhari *et al.*, 2007; Bona *et al.*, 2007; Hossain *et al.*, 2012), dessa maneira estratégias podem ser desenvolvidas para aumentar a produtividade agrícola de plantas sob condições de estresse.

Estudos relacionados a variações no proteoma de plantas submetidas a estresse por metais pesados têm aumentado e vêm contribuindo significativamente para compreensão de vias metabólicas que são afetadas e na identificação de possíveis mecanismos de tolerância (Farinati *et al.*, 2009; Sharmin *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012b). Plantas hiperacumuladoras de metais pesados têm sido o principal foco de pesquisas de avaliação do proteoma (Ingle *et al.*, 2005; Tuomainen *et al.*, 2006; Farinati *et al.*, 2009; Walliwalagedara *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2011), entretanto plantas não hiperacumuladoras, mas que são tolerantes a metais pesados também necessitam ser caracterizadas, com o objetivo de aprimorar o potencial de aplicação dessas espécies em fitorremediação de solos contaminados por metais pesados.

Por exemplo, a análise do proteoma de *Alyssum lesbiacum*, sob estresse por níquel (Ni), revelou que diversas proteínas envolvidas no metabolismo de compostos sulfurados são influenciadas pela presença desse elemento, sugerindo que o aumento da abundância dessas proteínas pode estar relacionado à capacidade dessa planta em tolerar e acumular altas concentrações de Ni (Ingle *et al.*, 2005). Hradilova *et al.* (2010) também observaram que proteínas envolvidas no metabolismo de enxofre são afetadas pelo Cd. Interessantemente os autores

correlacionam o aumento da abundância de glutamina sintetase com a tolerância da planta, uma vez que essa enzima fornece um dos substratos para síntese de glutathione, o glutamato. No presente trabalho, essa enzima foi identificada tanto em tecido foliar como radicular, mas teve menor abundância no tratamento com Cd, o que indica que além do prejuízo ao fornecimento de substrato para síntese de glutathione, a assimilação de nitrogênio também pode ter sido comprometida, configurando assim uma das causas que podem comprometer o estabelecimento e desenvolvimento vegetal na presença de Cd.

Esses grupos funcionais contendo enxofre são considerados como grupos chave para a sobrevivência de qualquer organismo, e uma vez afetados comprometem o desenvolvimento do organismo. Bona *et al.* (2007) sugerem que diminuição da abundância de proteínas chave do metabolismo antioxidativo é bastante prejudicial ao desenvolvimento, pois espécies reativas de oxigênio (ERO) são formadas constantemente pelo metabolismo celular e sua produção é acentuada quando plantas são expostas à metais pesados; assim como observado nesse estudo, em raízes, a abundância de monodeidroascorbato redutase foi diminuída assim sendo um indicativo que o Cd prejudicou a regeneração de ascorbato que é utilizado para eliminação de peróxido de hidrogênio via ciclo ascorbato-glutathione.

Algumas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos como enolase e fosfoglicomutase também apresentaram diminuição de expressão; a interferência no metabolismo de carboidratos é uma resposta comum de plantas na presença de diferentes metais pesados (Zhao *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012b), mas algumas enzimas como triose fosfato isomerase e gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase apresentaram um aumento de abundância; essa diferença de efeito do Cd sobre diferentes enzimas de uma mesma via sugere uma plasticidade metabólica do organismo, regulando diferentemente enzimas de uma mesma via para suprimento energético.

Não podendo dissociar o metabolismo de carboidratos do processo fotossintético, o fato de termos observado que proteínas envolvidas na fotossíntese (rubisco e proteína potencializadora da evolução de oxigênio) também tiveram abundância diminuída quando expostas ao Cd corroboram com os resultados de Zhao *et al.* (2011) que também observaram drástica diminuição das proteínas associadas à fotossíntese; de acordo com Kieffer *et al.* (2009) o Cd exerce seu efeito tóxico principalmente em vias do metabolismo primário, que inclui a fotossíntese. Dessa maneira, podemos sugerir que, em grande parte, a incapacidade de plantas crescerem normalmente em ambientes contaminados com Cd deve-se ao seu efeito direto sobre a fotossíntese.

Dentre as proteínas que tiveram a abundância aumentada estão: HSP, UDP-glicose pirofosforilase e citocromo P450 em folhas; e taumatina, metionina sintase, cinnamoyl CoA redutase, isocitrato desidrogenase NADPH dependente, triose fosfato isomerase, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e quitinase em raízes; essas proteínas, apesar de pertencerem a grupos funcionais distintos, podem responder positivamente frente a estresses abióticos diversos.

A maioria das proteínas identificadas que respondem positivamente à presença de Cd está relacionada ao metabolismo de carboidratos, geralmente relacionadas à via glicolítica; outras são relacionadas ao processamento proteico e metabolismo de compostos sulfurados; de acordo com Kieffer *et al.* (2009) o aumento na expressão de HSP está relacionado ao processamento de novas proteínas que sofreram danos mas também pode atuar na prevenção do mal dobramento de novas proteínas, tudo em função da presença de Cd no ambiente celular. Segundo Thapa *et al.* (2012) é comum que proteínas relacionadas a processo patogênico (Pathogenesis Related Proteins) aumentem sua abundância, como o aumento da expressão de quitinase observado em raízes e também de lectina em folhas, enzima e proteína que previnem o ataque fúngico. De acordo com as observações, acreditamos em dois possíveis mecanismos sendo que o primeiro pode indicar que o estresse imposto pelo Cd pode deixar a planta mais susceptível ao ataque de fungos patogênicos, justificando

o aumento da expressão dessa classe de proteínas como uma maneira preventiva, ou também, assim como o Cd, o ataque de patógenos desencadeia uma resposta generalizada de estresse o que leva ao aumento da abundância dessas proteínas de defesa na planta, assim tanto a presença de Cd como o ataque de patógenos podem compartilhar vias de sinalização semelhantes, que indica situação adversa.

Proteínas envolvidas em vias do metabolismo secundário também apresentaram aumento de abundância em plantas tratadas com Cd, aumento de resposta de enzimas de vias secundárias é comum (He *et al.*, 2011), esse comportamento foi observado para a enzima cinnamoyl CoA redutase, que participa da via de biossíntese de lignina, e segundo Elobeid *et al.* (2012) essa resposta está relacionada ao efeito do Cd sobre a biossíntese de auxina, resultando em maior lignificação e diminuição do alongamento radicular.

Proteínas relacionadas ao metabolismo de carboidratos ou metabolismo energético também apresentaram aumento de abundância, como por exemplo, algumas enzimas do ciclo do ácido tricarbóxico, o que nos leva a acreditar que possivelmente essas enzimas mais ativas tenham ligação com fornecimento de substratos para vias de síntese de compostos nitrogenados como aminoácidos, responsáveis por conferir tolerância à planta em situação de estresse. Essa observação reflete o caso da enzima isocitrato desidrogenase radicular, indicando que o ciclo do ácido tricarbóxico ainda permanece bastante ativo para suprimento de energia à célula; como demonstrado por Sánchez-Pardo *et al.* (2013) que observaram redução de 22% na atividade dessa enzima e relacionaram essa diminuição de atividade com efeitos drásticos no metabolismo de nitrogênio, pois o produto da atividade dessa enzima, o α -cetogluturato, é o substrato para incorporação do nitrogênio em cadeias carbônicas, podendo indicar um acúmulo desse composto devido à diminuição da atividade de glutamina sintetase ou, como sugerido previamente, desviar o uso do α -cetogluturato para outra via.

Dessa maneira, acreditamos que a tentativa da planta em manter equilibrado o metabolismo de carboidratos seja uma estratégia de sobrevivência em situações críticas de estresse, assim como reportado por Sanità di Toppi & Gabbrielli (1999), já que essa via é fundamental para a geração de energia e fornecimento de esqueletos carbônicos para assimilação de nitrogênio; também acreditamos que a modulação da abundância de proteínas que não estão diretamente relacionadas ao metabolismo de carboidratos ou energético exerçam efeitos benéficos na superação do estresse imposto.

4.5 CONCLUSÕES

- O cádmio altera o proteoma dos tecidos radicular e foliar.
- Enzimas de diferentes vias metabólicas são moduladas diferentemente.
- Enzimas do metabolismo de carboidratos e bioenergético, geralmente, são moduladas positivamente.
- Enzimas relacionadas ao processo fotossintético apresentam diminuição da expressão.

REFERÊNCIAS

- Ahsan, N.; Lee, D.G.; Lee, S.H.; Kang, K.Y.; Lee, J.J.; Kim, P.J.; Yoon, H.S.; Kim, J.S. & Lee, B.H. (2007) Excess copper induced physiological and proteomic changes in germinating rice seeds. *Chemosphere* 67: 1182-1193.
- Ahsan, N.; Nakamura, T. & Komatsu, S. (2012) Differential responses of microsomal proteins and metabolites in two contrasting cadmium (Cd)-accumulating soybean cultivars under Cd stress. *Amino Acids* 42: 317-327.

- Baker, A.J.M.; McGrath, S.P.; Reeves, R.D. & Smith, J.A.C. (2000) Metal Hyperaccumulator Plants: A Review of the Ecology and Physiology of a Biological Resource for Phytoremediation of Metal-Polluted Soils. In: Terry N (ed) Phytoremediation of Contaminated Soil and Water, pp 85-107.
- Bokhari, S.A.; Wan, X.Y.; Yang, Y.W.; Zhou, L.; Tang, W.L. & Liu, J.Y. (2007) Proteomic response of rice seedling leaves to elevated CO₂ levels. *Journal of Proteome Research* 6: 4624-4633.
- Bona, E.; Marsano, F.; Cavaletto, M. & Berta, G. (2007) Proteomic characterization of copper stress response in *Cannabis sativa* roots. *Proteomics* 7: 1121-1130.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Chen, S. & Harmon, A.C. (2006) Advances in plant proteomics. *Proteomics* 6: 5504-5516.
- Dourado, M.N.; Martins, P.F.; Quecine, M.C.; Piotto, F.A.; Souza, L.A.; Franco, M.R.; Tezotto, T. & Azevedo, R.A. (2013) *Burkholderia* sp. SCMS54 reduces cadmium toxicity and promotes growth in tomato. *Annals of Applied Biology* 163: 494-507.
- Elobeid, M.; Goebel, C.; Feussner, I. & Polle, A. (2012) Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *Journal of Experimental Botany* 63: 1413-1421.
- Farinati, S.; DalCorso, G.; Bona, E.; Corbella, M.; Lampis, S.; Cecconi, D.; Polati, R.; Berta, G.; Vallini, G. & Furini, A. (2009) Proteomic analysis of *Arabidopsis halleri* shoots in response to the heavy metals cadmium and zinc and rhizosphere microorganisms. *Proteomics* 9: 4837-4850.

- Gao, Y.; Zhou, P.; Mao, L.; Shi, W.J. & Zhi, Y.E. (2010) Phytoextraction of cadmium and physiological changes in *Solanum nigrum* as a novel cadmium hyperaccumulator. Russian Journal of Plant Physiology 57: 501-508.
- He, J.; Qin, J.; Long, L.; Ma, Y.; Li, H.; Li, K.; Jiang, X.; Liu, T.; Polle, A.; Liang, Z. & Luo, Z.B. (2011) Net cadmium flux and accumulation reveal tissue-specific oxidative stress and detoxification in *Populus x canescens*. Physiologia Plantarum 143: 50-63.
- Hoagland, D.R. & Arnon, D.I. (1950) The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experimental Station Bulletin 347.
- Hossain, Z.; Nouri, M.-Z. & Komatsu, S. (2012) Plant cell organelle proteomics in response to abiotic stress. Journal of Proteome Research 11: 37-48.
- Hradilova, J.; Rehulka, P.; Rehulkova, H.; Vrbova, M.; Griga, M. & Brzobohaty, B. (2010) Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure. Electrophoresis 31: 421-431.
- Ingle, R.; Smith, J.A.C. & Sweetlove, L. (2005) Responses to nickel in the proteome of the hyperaccumulator plant *Alyssum lesbiacum*. Biometals 18: 627-641.
- Kieffer, P.; Schröder, P.; Dommès, J.; Hoffmann, L.; Renaut, J. & Hausman, J.-F. (2009) Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. Journal of Proteomics 72: 379-396.
- Kim, S.G.; Wang, Y.; Lee, C.N.; Mun, B.G.; Kim, P.J.; Lee, S.Y.; Kim, Y.C.; Kang, K.Y.; Rakwal, R.; Agrawal, G.K. & Kim, S.T. (2011) A comparative proteomics survey of proteins responsive to phosphorous starvation in roots of hydroponically-grown rice seedlings. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry 54: 667-677.

- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lee, J.; Jiang, W.; Qiao, Y.L.; Cho, Y.I.; Woo, M.O.; Chin, J.H.; Kwon, S.W.; Hong, S.S.; Choi, I.Y. & Koh, H.J. (2011) Shotgun proteomic analysis for detecting differentially expressed proteins in the reduced culm number rice. *Proteomics* 11: 455-468.
- Li, K.; Xu, C. & Zhang, J. (2011) Proteome profile of maize (*Zea Mays* L.) leaf tissue at the flowering stage after long-term adjustment to rice *black-streaked dwarf virus* infection. *Gene* 485: 106-113.
- Lim, C.W.; Park, J.Y.; Lee, S.H. & Hwang, C.H. (2010) Comparative proteomic analysis of soybean nodulation using a supernodulation mutant, SS2-2. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 74: 2396-2404.
- Park, O.K. (2004) Proteomic studies in plants. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 37: 133-138.
- Quiala, E.; Jesus Canal, M.; Rodriguez, R.; Yaguee, N.; Chavez, M.; Barbon, R. & Valledor, L. (2012) Proteomic profiling of *Tectona grandis* L. leaf. *Proteomics* 12: 1039-1044.
- Sánchez-Pardo, B.; Carpena, R.O. & Zornoza, P. (2013) Cadmium in white lupin nodules: Impact on nitrogen and carbon metabolism. *Journal of Plant Physiology* 170: 265-271.
- Sanità di Toppi, L. & Gabrielli, R. (1999) Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105-130.
- Semane, B.; Dupae, J.; Cuypers, A.; Noben, J.-P.; Tuomainen, M.; Tervahauta, A.; Kärenlampi, S.; Van Belleghem, F.; Smeets, K. & Vangronsveld, J. (2010) Leaf proteome responses of

Arabidopsis thaliana exposed to mild cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 167: 247-254.

Sharmin, S.A.; Alam, I.; Kim, K.H.; Kim, Y.G.; Kim, P.J.; Bahk, J.D. & Lee, B.H. (2012) Chromium-induced physiological and proteomic alterations in roots of *Miscanthus sinensis*. *Plant Science* 187: 113-126.

Thapa, G.; Sadhukhan, A.; Panda, S.K. & Sahoo, L. (2012) Molecular mechanistic model of plant heavy metal tolerance. *Biometals* 25: 489-505.

Tuomainen, M.H.; Nunan, N.; Lehesranta, S.J.; Tervahauta, A.I.; Hassinen, V.H.; Schat, H.; Koistinen, K.M.; Auriola, S.; McNicol, J. & Karenlampi, S.O. (2006) Multivariate analysis of protein profiles of metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* accessions. *Proteomics* 6: 3696-3706.

Vogel-Mikus, K.; Pongrac, P.; Kump, P.; Necemer, M. & Regvar, M. (2006) Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environmental Pollution* 139: 362-371.

Walliwagedara, C.; Atkinson, I.; van Keulen, H.; Cutright, T. & Wei, R. (2010) Differential expression of proteins induced by lead in the dwarf sunflower *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* 71: 1460-1465.

Wang, X.; Bian, Y.; Cheng, K.; Zou, H.; Sun, S.S.M. & He, J.X. (2012a) A comprehensive differential proteomic study of nitrate deprivation in *Arabidopsis* reveals complex regulatory networks of plant nitrogen responses. *Journal of Proteome Research* 11: 2301-2315.

Wang, Y.; Hu, H.; Zhu, L.Y. & Li, X.X. (2012b) Response to nickel in the proteome of the metal accumulator plant *Brassica juncea*. *Journal of Plant Interactions* 7: 230-237.

Xu, C.; Xu, Y. & Huang, B. (2008) Protein extraction for two-dimensional gel electrophoresis of proteomic profiling in turfgrass. *Crop Science* 48: 1608-1614.

Xu, H.; Zhang, W.; Gao, Y.; Zhao, Y.; Guo, L. & Wang, J. (2012) Proteomic analysis of embryo development in rice (*Oryza sativa*). *Planta* 235: 687-701.

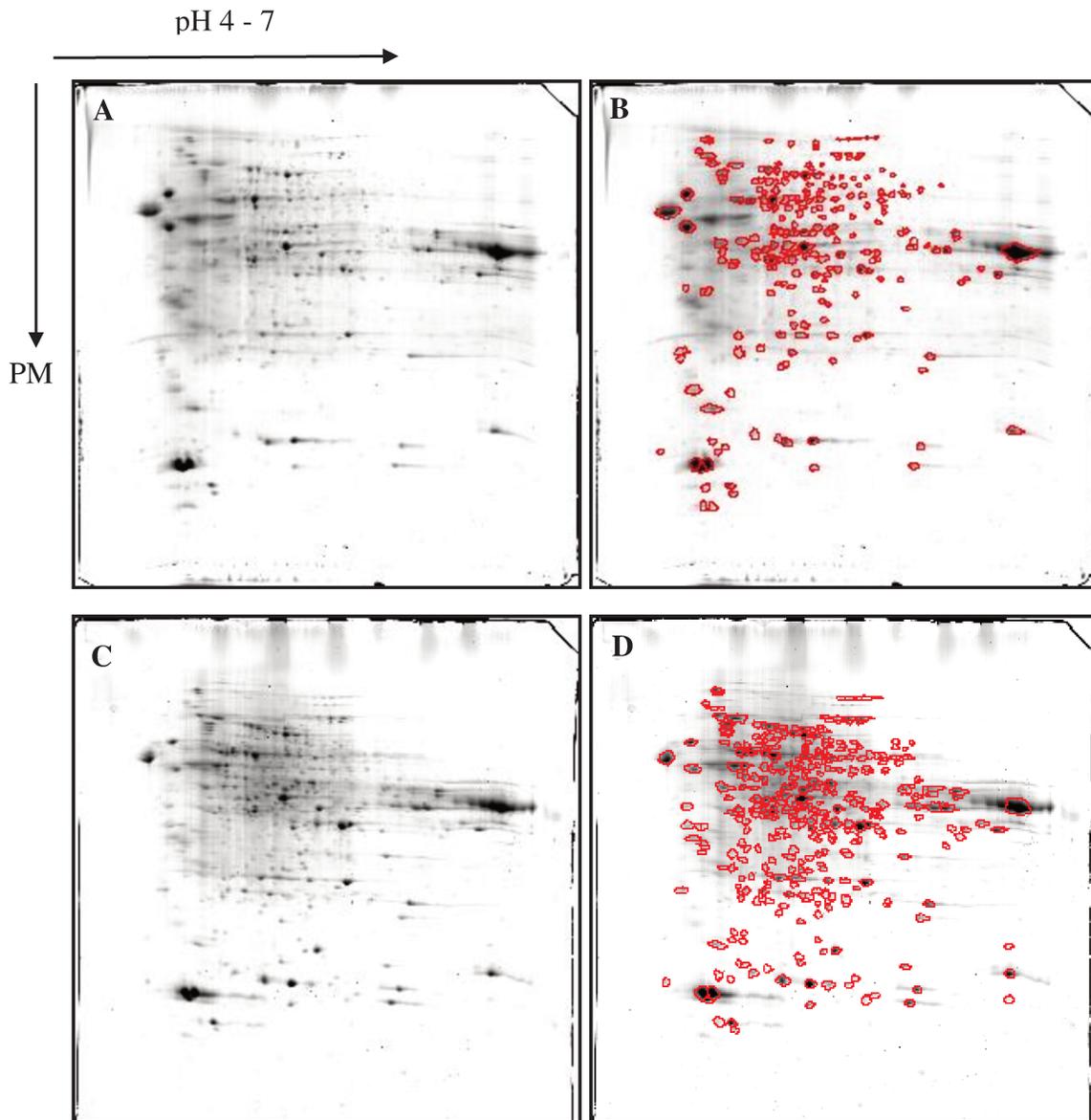
Zhao, L.; Sun, Y.L.; Cui, S.X.; Chen, M.; Yang, H.M.; Liu, H.M.; Chai, T.Y. & Huang, F. (2011) Cd-induced changes in leaf proteome of the hyperaccumulator plant *Phytolacca americana*. *Chemosphere* 85: 56-66.

Zoerb, C.; Schmitt, S. & Muehling, K.H. (2010) Proteomic changes in maize roots after short-term adjustment to saline growth conditions. *Proteomics* 10: 4441-4449.

CONCLUSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

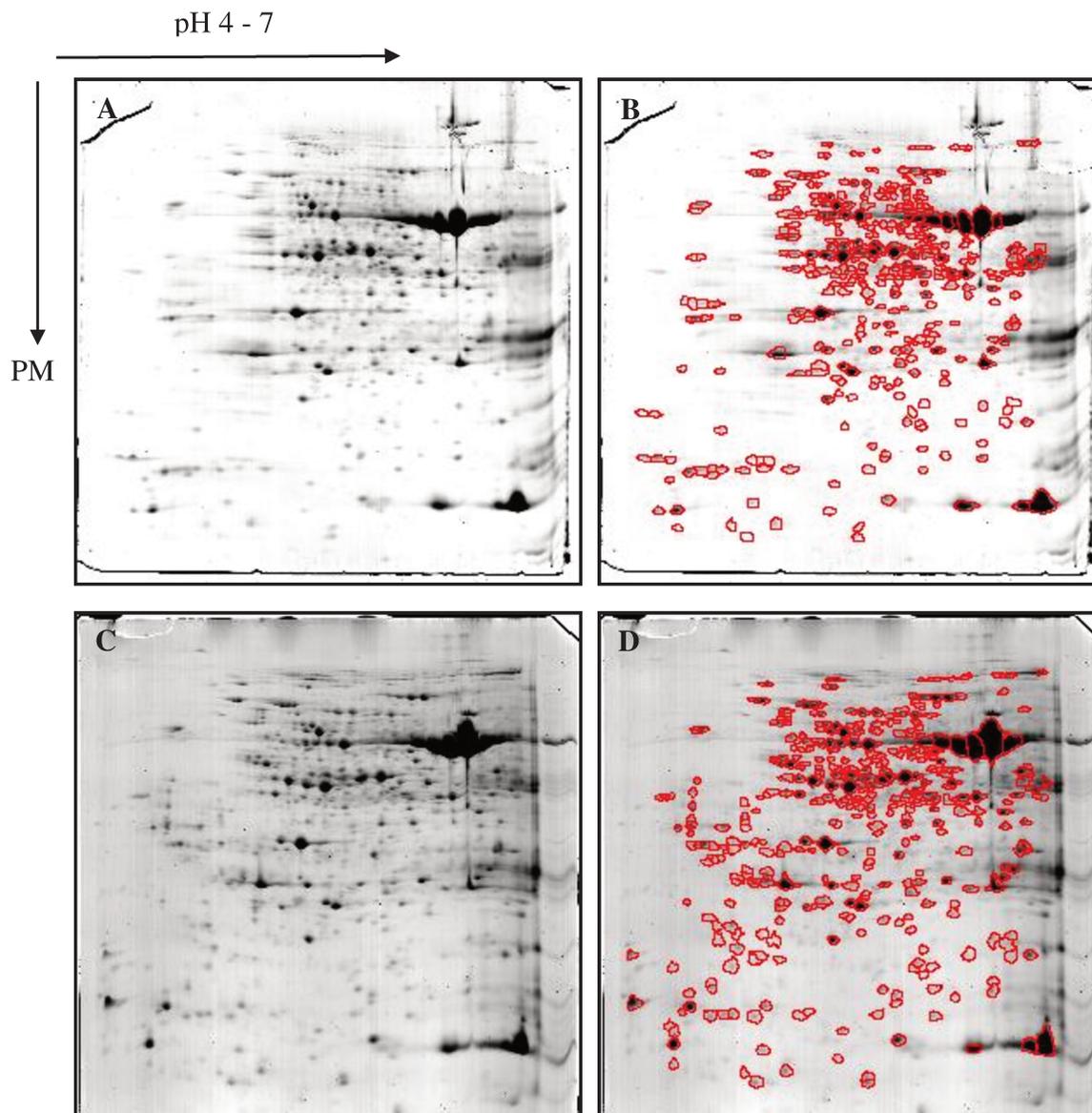
Após a realização desse trabalho podemos concluir que plantas não hiperacumuladoras, de metais pesados, de um modo geral, são viáveis, sim, para utilização como fitorremediadora de solos contaminados por esse tipo de contaminante. A ideia de utilização de não hiperacumuladoras vai de encontro com uma linha de pensamento que defende que apenas hiperacumuladoras naturais são uteis para aplicação dessa técnica. No entanto a capacidade de produção de biomassa, crescimento rápido e tolerância a outros fatores abióticos fazem desse grupo de plantas um grupo bastante interessante do ponto de vista científico e tecnológico aplicado para recuperação de áreas impactadas por metais pesados. Mas ainda é necessário amplos estudos visando a caracterização de respostas primárias dessas plantas bem como a tolerância delas a diferentes tipos de metais pesados bem como em situações de multicontaminação, com a finalidade de conhecermos o comportamento delas nessas situações. O próximo passo, seria após essa ampla caracterização a realização de experimentos *in situ* em locais com contaminação real, assim poderemos contrastar as respostas de crescimento, tolerância e potencial de acúmulo de metal pesado em situações simuladas em casa de vegetação com as condições reais. Dessa forma é bastante plausível a possibilidade de aplicação e transformação dessa técnica, pouco explorada no Brasil, em uma fitotecnologia comercialmente disponível como uma solução ambientalmente correta com geração de poucos resíduos tóxicos e favorecendo o restabelecimento da biodiversidade.

ANEXO I



Anexo III – Imagens dos géis de referência de raízes controle sem e com “spots” detectados e tratados (A) e (B), respectivamente; e imagens dos géis de referência de raízes tratadas com Cd sem e com “spots” detectados e tratados (C) e (D), respectivamente. PM – Peso Molecular.

ANEXO II



Anexo II – Imagens de géis de referência de folhas controle sem e com “spots” detectados e tratados (A) e (B), respectivamente; e imagens de géis de referência de folhas tratadas com Cd sem e com “spots” detectados e tratados (C) e (D), respectivamente. PM – Peso Molecular.