



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ADOLPH ANNDERSON GONÇALVES COSTA BARRETO

**TOXICIDADE DO CHUMBO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP:
ENZIMAS ANTIOXIDANTES E POTENCIAL FITORREMEIADOR**

FORTALEZA

2014

ADOLPH ANNDERSON GONÇALVES COSTA BARRETO

**TOXICIDADE DO CHUMBO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP:
ENZIMAS ANTIOXIDANTES E POTENCIAL FITORREMEIADOR**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Coorientadora: Ma. Nila Maria Bezerril Fontenele

FORTALEZA

2014

ADOLPH ANNDERSON GONÇALVES COSTA BARRETO

**TOXICIDADE DO CHUMBO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP:
ENZIMAS ANTIOXIDANTES E POTENCIAL FITORREMEIADOR**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo

Coorientadora: Ma. Nila Maria Bezerril Fontenele

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ma. Nila Maria Bezerril Fontenele (Coorientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Déborah Moura Rebouças

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Comunidade Científica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar presente em todos os momentos da minha vida, guiando meus passos e dando forças para vencer as dificuldades.

A Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo por ter criado e iniciado o curso de Bacharelado em Biotecnologia na UFC e, assim, proporcionar-me a oportunidade de responder ao meu chamado profissional, por ter guiado com Calma, Coragem e Confiança (CCC), imenso carinho e mão maternal os quatros primeiros anos do curso. Por sua grande generosidade, dedicação, paciência e conhecimento científico ter guiado meus passos, não somente durante o meu período de IC em seu laboratório, mas por diversos momentos no curso. Pelos conselhos e histórias que proporcionaram momentos de alegria, aprendizagem e reflexão. Enfim, por ser essa pessoa incrível que acredita no potencial e estimula o crescimento de outras pessoas.

A minha coorientadora Ma. Nila Maria Bezerril Fontenele por também ser uma pessoa incrível dotada de grande carinho, perseverança e otimismo. Por me proporcionar a oportunidade de pesquisar em uma área da ciência até então pouco explorada localmente e poder enfrentar e vencer os desafios inerentes a pesquisa nessa nova área. Por também proporcionar e estimular o crescimento científico e pessoal com seus conselhos.

Aos demais membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento do laboratório de Elementos Traços, a Profa. Dra Raquel Miranda do laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos e a Central Analítica da UFC, por proporcionarem espaço para a realização de experimentos.

A todos os componentes do laboratório de Bioenergética e ao Prof. Dr. Hélio Costa pelo desenho dos iniciadores.

Ao Prof. Dr. Edmund Rucker e ao Prof. Benildo Cavada e demais integrantes do laboratório de Moléculas Biologicamente Ativas-BioMol por também me proporcionarem espaço para o crescimento acadêmico.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular por acolher os estudantes de Biotecnologia.

A coordenação do curso de Bacharelado em Biotecnologia pela grande dedicação aos estudantes.

A minha família por me apoiar e incentivar durante toda a minha caminhada estudantil.

Aos meus amigos, colegas de faculdade e colegas de laboratório, especialmente: Lia, Cláudia, Yasmine, Mayara, Beatriz, Raissa, Vinícius, Vanir, João Victor, Dalton, Léo e Guilherme, por todos os momentos incríveis de alegria, dificuldade e aprendizagem que tivemos em sala e nos laboratórios.

Aos meus amigos do Ciência sem Fronteiras: Aitan, Jamile, Dani, Fábio, André, Natália, Melissa, Júlia, Camila, Clinton, Renan, Nei e Leonardo e demais amigos do Roselle e Smith que também fizeram parte da minha vida e contribuíram para o meu crescimento pessoal.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e por me proporcionar a oportunidade de participar do programa Ciência sem Fronteiras.

“O prazer mais nobre é a alegria da compreensão”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

A contaminação de diferentes ecossistemas com chumbo é uma grande preocupação mundial, pois ele apresenta efeito acumulativo no ambiente e em organismos vivos, é recalcitrante, além de que, mesmo em baixas concentrações, apresenta efeitos tóxicos para todos os seres vivos. Um dos efeitos causados pelo chumbo em plantas é a produção excessiva e acúmulo de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que, por sua vez, causam danos celulares. Para evitar esse acúmulo, diversas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), a ascorbato peroxidase (APX) e a catalase (CAT), são responsáveis por eliminar o excesso dessas espécies. A fitorremediação é um importante técnica recentemente criada com o objetivo de explorar a capacidade das plantas em descontaminar diferentes ecossistemas. Portanto, há a necessidade de investigar o potencial de diferentes plantas para serem utilizadas nessa técnica e entender os mecanismos que permeiam a capacidade das plantas de retirar, acumular e tolerar os efeitos nocivos que esses poluentes causam. Dessa forma, plantas que apresentam naturalmente alta atividade dessas enzimas antioxidantes apresentam uma das características necessárias para a aplicação na fitorremediação de metais pesados, como o chumbo. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de atividade e de transcrição das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), em raízes e folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cultivares Sempre Verde e Setentão, submetidos ao estresse por chumbo e avaliar a potencialidade desses cultivares para uso na fitorremediação. O cultivar SV apresentou maior concentração de chumbo em raízes, enquanto que o SET maior teor em folhas. Quando se compara os grupos tratamentos, SV foi o cultivar com a maior atividade antioxidante em raízes para as três enzimas avaliadas, enquanto SET tem a maior atividade nas folhas. Vale ressaltar que SV não apresentou nenhuma redução na expressão relativa das enzimas avaliadas em raízes e que SET teve redução de expressão em folhas para dois genes testados: *Vu-APX1* e *Vu-APX5*. Em ambos os cultivares nenhuma alteração morfológica foi observada em raízes, mas em folhas houve aumento da distribuição de ceras e redução da abertura estomática em SV, enquanto que em SET essas alterações foram menos acentuadas. Com base em todos esses resultados é sugerido que SV apresenta maior tolerância ao estresse causado por Pb e que ambos os cultivares não apresentaram potencial para a fitorremediação.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, chumbo, fitorremediação, enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

The contamination of different ecosystems with lead is a major global concern, since it has a cumulative effect on the environment and in living organisms, it is recalcitrant and that, even at low concentrations; it presents toxic effects to all living beings. One of the effects caused by lead in plants is to cause the excessive production and accumulation of reactive species of oxygen (ROS), which in turn causes cell damage. Phytoremediation is an important technique recently created with the objective of exploring the ability of plants to decontaminate different ecosystems. Therefore, there is need to investigate the potential of different plants to be used in this technique and to understand the mechanisms that underlie the ability of plants to remove, accumulate and tolerate the adverse effects that these pollutants cause. To avoid this accumulation, several antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT), are responsible for removing the excess of those species. Thus, plants that naturally exhibit high antioxidant activity of these enzymes have one of the necessary characteristics for application in phytoremediation of heavy metals as lead. The aim of this work was to evaluate the activity profile and transcription of antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) in roots and leaves of *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cultivars Sempre Verde (SV) and Setentão (SET), subjected to lead stress and to evaluate the potential of these cultivars for use in phytoremediation. The SV cultivar showed higher lead concentration in the roots, whereas SET showed higher concentration in leaves. When comparing the treatment groups, SV was the cultivar with the highest antioxidant activity in roots for the three enzymes evaluated, while SET had the highest activity in the leaves. It is noteworthy that SV showed no reduction in expression of the enzymes evaluated in roots and that SET had reduced expression in leaves for two genes tested *Vu-APX1* and *Vu-APX5*. In both cultivars, no morphological change was observed in roots, but there was an increase in the distribution of waxes in leaves and reduction in stomatal aperture for SV, whereas these changes in SET were less pronounced. Based on all results it is suggested that SV shows more tolerance to the stress caused by Pb and that both cultivars showed no potential for phytoremediation.

Keywords: *Vigna unguiculata*, lead, phytoremediation, antioxidant enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa dos Estados Unidos mostrando áreas contaminadas com metais pesados.....	24
Figura 2 - Mapas representativos da distribuição de solos contaminados com As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni e Zn no continente europeu e respectivas concentrações (mg.Kg ⁻¹).....	25
Figura 3 - Mapa representativo da distribuição de solos contaminados com Pb no continente europeu e respectivas concentrações (mg.Kg ⁻¹).....	26
Figura 4 - Estados brasileiros com áreas contaminadas por chumbo.....	27
Figura 5 - Etapas prévias a indução de estresse por EDTA-Pb 0,5mM nas plantas de Sempre Verde e Setentão.....	38
Figura 6 - Fotos dos cultivares Sempre Verde e Setentão com 14 dias em solução de Hoagland 50% com EDTA-Pb 0,5 mM.....	39
Figura 7 - Comparação entre grupos controles e tratamentos de Sempre Verde e Setentão.....	47
Figura 8 - Quantificação de chumbo em raízes, caules e folhas de SV e SET por ICP-OES.....	48
Figura 9 - Gel de RNA total 1% de raízes e folhas de Sempre Verde e Setentão.....	50
Figura 10 - Atividade da superóxido dismutase em raízes e folhas de plantas controle e tratamento de SV e SET.....	52
Figura 11 - Expressão relativa de SOD em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.....	53
Figura 12 - Atividade de APX em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.....	56
Figura 13 - Expressão relativa de APX em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.....	58
Figura 14 - Atividade de CAT em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.....	60
Figura 15 - Expressão relativa de CAT em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.....	61
Figura 16 – Micrografias de raízes de SV e SET.....	63
Figura 17 - Micrografias de folhas de SV.....	64
Figura 18 - Micrografias de folhas de SET.....	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estratégias para a remoção de metais pesados de áreas contaminadas.....	28
Quadro 2 – Vantagens da fitorremediação.....	30
Quadro 3 – Classificação taxonômica do feijão-caupi.....	34
Quadro 4 – Nomeação dos genes das enzimas antioxidantes SOD, APX e CAT segundo a relação filogenética entre <i>Arabidopsis</i> . e <i>V. unguiculata</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação de Pb por tecido vegetal e valores de TF para os cultivares SV e SET.....	49
Tabela 2 – Qualidade e teores do RNA total obtido de raízes e folhas de SV e SET.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag: Prata.

APX: Ascorbato peroxidase.

As: Arsênio.

ATP: Adenosina trifosfato.

ATSDR: Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças.

BSA: Albumina bovina sérica.

Ca⁺²: Íon de cálcio II.

CAT: Catalase.

Cd: Cádmio.

CMV: Vírus do mosaico do pepino.

Co: Cobalto.

CpSMV: Vírus do mosaico severo do caupi.

Cr: Cromo

Cu: Cobre

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

EPA: Agência de Proteção Ambiental.

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio.

EST: Etiquetas de sequências expressas

Fe: Ferro.

Hg: Mercúrio.

HCl: Ácido clorídrico.

HF: Ácido fluorídrico.

HNO₃: Ácido nítrico.

HO₂: Radical perhidroxila.

H₂O: Água.

ICP-OES: Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado.

IRGA: Analisador de gás infravermelho.

MEV: Microscopia eletrônica de varredura.

Mn: Manganês

Mo: Molibdênio.

MOPS: Ácido 3-N-morfolino propanosulfônico.

NaOH: Hidróxido de sódio.

NBT: Nitroazul de tetrazólio.

Ni: Níquel.

O₂: Oxigênio

O₂⁻: Radical superóxido.

OH⁻: Radical hidroxila.

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

Pb: Chumbo.

Pb⁺²: Íons de chumbo II.

Pb(NO₃)₂: Nitrato de chumbo II

PbS: Galena.

QI: Quociente de Inteligência.

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

RNA: Ácido ribonucleico.

RT-PCR: Transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase.

S: Enxofre

Se: Selênio.

SET: Cultivar Setentão.

SOD: Superóxido dismutase.

SV: Cultivar Sempre Verde.

TF: Fator de translocação.

U: Urânio.

Zn: Zinco.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Chumbo	19
1.2 Toxicidade do chumbo	20
<i>1.2.1 Chumbo, meio ambiente e os riscos à saúde humana</i>	<i>20</i>
<i>1.2.2 Fitotoxicidade do chumbo</i>	<i>21</i>
<i>1.2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio</i>	<i>22</i>
1.3 Enzimas antioxidantes.....	23
1.4 Áreas contaminadas com chumbo	24
1.5 Remediação de áreas contaminadas com chumbo	27
<i>1.5.1 Técnicas convencionais.....</i>	<i>27</i>
<i>1.5.2 Fitorremediação.....</i>	<i>29</i>
<i>1.5.2.1 Biodisponibilidade do chumbo</i>	<i>30</i>
<i>1.5.2.2 Classificação das plantas com capacidade fitorremediadora.</i>	<i>31</i>
<i>1.5.2.3 As técnicas da fitorremediação</i>	<i>32</i>
<i>1.5.2.3.1 Rizodegradação</i>	<i>32</i>
<i>1.5.2.3.2 Fitovolatilização</i>	<i>32</i>
<i>1.5.2.3.3 Fitodegradação</i>	<i>33</i>
<i>1.5.2.3.4 Fitodessalinização.....</i>	<i>33</i>
<i>1.5.2.3.5 Fitofiltração</i>	<i>33</i>
<i>1.5.2.3.6 Fitoestabilização</i>	<i>33</i>
<i>1.5.2.3.7 Fitoextração</i>	<i>34</i>
1.6 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	34
<i>1.6.1 Cultivares Sempre Verde e Setentão</i>	<i>35</i>

2 OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1 Material vegetal	37
3.2 Germinação das sementes de Sempre Verde e Setentão	37
3.3 Aplicação de chumbo	38
3.4 Coleta de material vegetal.....	39
3.5 Quantificação de chumbo	40
3.6 Fator de translocação.....	40
3.7 Fator de bioconcentração.....	41
3.8 Atividades enzimáticas de SOD, APX e CAT	41
3.8.1 Preparo de amostras	41
3.8.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD).....	41
3.8.3 Atividade da Catalase (CAT)	42
3.8.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)	42
3.9 Extração de RNA total	43
3.9.1 Quantificação e pureza do RNA total	43
3.9.2 Integridade do RNA total	43
3.10 Síntese de cDNA.....	43
3.11 Construção dos iniciadores.....	44

3.12 qPCR dos genes das enzimas antioxidantes	45
3.13 Análise de raízes e folhas por microscopia eletrônica de varredura	45
3.14 Cálculos estatísticos	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Efeitos do chumbo nas plantas de Sempre Verde e Setentão	47
4.2 Quantificação de chumbo, fator de translocação e fator de bioacumulação	48
4.3 Gel de RNA total de raízes e folhas de Sempre Verde e Setentão.....	50
4.4 Atividade e expressão gênica relativa das enzimas antioxidantes.....	51
4.4.1 <i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	51
4.4.2 <i>Ascorbato peroxidase (APX)</i>	55
4.4.3 <i>Catalase (CAT)</i>	59
4.3 Microscopia eletrônica de varredura.....	62
5 CONCLUSÃO.....	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Chumbo

O elemento químico chumbo (Pb), pertencente à família do Carbono, grupo 14, ao sexto período da tabela periódica, estado oxidativo + 4 ou +2 e que possui quatro isótopos naturais, sendo o mais abundante o ^{208}Pb (ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY, 2014). Do ponto de vista químico, metal pesado refere-se a metais de transição que possuem número atômico maior que 20 e densidade maior que 5 g/cm^3 (D C et al., 2005; TANGAHU et al., 2011). Do ponto de vista biológico, metal pesado refere-se a metais ou metaloides que podem ser tóxicos, mesmo quando em baixas concentrações, para animais e vegetais (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011). Os metais pesados podem ainda ser classificados como essenciais e não essenciais. Os essenciais são aqueles requeridos em pequenas quantidades como cofatores enzimáticos, conseqüentemente, são fundamentais para realização das reações metabólicas inerentes aos seres vivos, e os não essenciais não apresentam funções fisiológicas conhecidas. São considerados essenciais: cobalto (Co), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn). Diferentemente, são classificados como metais pesados não essenciais: chumbo (Pb), cádmio (Cd), arsênio (As), mercúrio (Hg), cromo (Cr) e selênio (Se) (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

O Pb está presente em 0,002% da crosta terrestre e está homogeneamente distribuído devido aos movimentos das placas tectônicas e erupções vulcânicas há bilhões de anos durante a formação da crosta terrestre. Esse metal encontra-se associado a outros minérios, como cobre (Cu), prata (Ag) ou zinco (Zn) e, raramente, apresenta-se na forma metálica. A principal fonte mineral para a exploração de Pb é a galena (PbS), que é constituída por 86,6% de chumbo e 13,4% de enxofre (S). Os íons de Pb podem estar associado a diversos elementos, como os sulfatos e os carbonatos de chumbo, que são os mais solúveis e estão na camada mais superficial do solo, os sulfitos e os óxidos de chumbo, que são menos solúveis em água, estão em uma camada mais profunda do solo. (JACKSON; FITCH, 2004; SILVA; TEIXEIRA, 2009).

As características físico-químicas do Pb, como maleabilidade, ductilidade, alta densidade, baixa condutividade elétrica e baixo ponto de fusão, comparados a outros metais; resistência a radiação ionizante, alta resistência a corrosão e a capacidade de formar ligas metálicas com outros elementos, justificam a fácil manuseabilidade do Pb e a grande capacidade de aplicação

em variadas áreas do setor produtivo e econômico (CAPITANI; PAOLIELLO; ALMEIDA, 2009; SILVA; TEIXEIRA, 2009).

Desde épocas remotas, como nas antigas civilizações, até os tempos modernos, as razões que desencadearam a exploração e a utilização do Pb foram, principalmente, o fato do Pb estar associado a outros minérios como no caso da argentita, que contém prata (Ag), a qual era explorada para fabricação de moedas. Os gregos deram início a utilização desses metais para a cunhagem de moedas e, posteriormente, essa atividade espalhou-se para outras civilizações, como os egípcios e romanos (FITCH, 2004a). Conseqüentemente, novas técnicas metalúrgicas foram desenvolvidas para separação da prata, do chumbo e de impurezas presentes na argentita e dessa forma foi favorecida a exploração e utilização de ambos os minérios na fabricação de moedas. Com a Revolução Industrial, o Pb passou a ser utilizado em outras atividades, como a fabricação de utensílios domésticos e ornamentais, canos, soldas, revestimentos, ligas metálicas, pesticidas, baterias e tintas (DONCHEVA et al., 2013; FITCH, 2004b; SHU et al., 2012).

Questionamentos com relação a utilização racional da exploração de Pb têm sido levantados por causa da grande quantidade de Pb que é utilizada na sociedade moderna e pelo fato desse recurso não ser renovável. Segundo o relatório do Painel Internacional para a Gestão Sustentável dos Recursos, países desenvolvidos têm estoques (metal ainda não minerado ou que está sendo utilizado em alguma atividade econômica) desse metal entre 20-150 Kg por habitante, enquanto que países menos desenvolvidos apresentam apenas 1-4 Kg de estoque (GRAEDEL; GERST, 2010). Esses valores refletem a grande utilização desse metal em países desenvolvidos, principalmente, para a utilização na fabricação de baterias, e a necessidade de repensar no modo de exploração desse metal, especialmente, porque as atividades econômicas ligadas ao Pb causam sérios problemas ambientais.

1.2 Toxicidade do chumbo

1.2.1 Chumbo, meio ambiente e os riscos à saúde humana

Apesar de existirem fontes naturais de contaminação do ambiente por Pb causado pelo intemperismo e atividade vulcânicas, as principais fontes de contaminação provêm de atividades antropogênicas, principalmente, indústria, mineração, queima de combustíveis fósseis e a disposição incorreta de matérias ou resíduos que contenham chumbo, por exemplo baterias (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010; SAIFULLAH et al., 2009).

Considerando que a presença do chumbo no ambiente é um fator de risco para os seres vivos em todos os ecossistemas devido a sua toxicidade, recalcitrância e da enorme quantidade de fontes poluidoras, é que há uma grande preocupação no tocante a poluição do ambiente com o Pb. Depois do arsênio (As), o Pb é considerado a substância mais perigosa pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR) com base na frequência de ocorrência, toxicidade e potencial de exposição humana (POURRUT et al., 2011).

A contaminação ambiental pelo Pb pode ser uma ameaça direta ou indireta, para a saúde humana, desde que partículas sejam aspiradas ou quando um solo contaminado é utilizado para plantação ou qualquer outra atividade cujo destino final seja a alimentação (*UNIVERSITY OF THE WEST OF ENGLAND*, 2013). Neste último caso, o fenômeno da magnificação trófica do Pb desempenhará um papel agravante com relação ao aumento do risco à saúde humana (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Além da absorção por inalação, o Pb também pode ser absorvido pela pele ou por ingestão. O depósito e acúmulo do chumbo ocorre, principalmente, nos ossos, devido à similaridade do tamanho e da carga dos íons Pb^{+2} e Ca^{+2} . Com o fim da exposição inicial, os ossos, que contêm Pb, tornam-se fontes de contaminação por Pb dentro do corpo (FITCH, 2004c).

O efeito tóxico do Pb depende de sua concentração no corpo. Em crianças, grupo de maior risco devido ao hábito mão boca, uma concentração de 10 $\mu\text{g/dL}$ no sangue já revela redução do quociente de inteligência (QI) e da coordenação motora. O agravamento dos problemas causados pelo Pb é dependente do aumento da concentração no corpo e, tanto em crianças como em adultos, os danos causados aos sistemas nervoso, endócrino e reprodutor, além de danos ao coração e rins, são prelúdios para a morte (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY ATSDR, 2012; RAMOS; COSTA, 2004).

1.2.2 Fitotoxicidade do chumbo

A extensão dos danos causados pelo Pb nas plantas é dependente de diversos fatores: tempo de exposição, concentração, tecido avaliado e espécie vegetal. Os valores de concentração mínima requeridos para revelar efeitos tóxicos do Pb variam de 0,3 μM , em condições de hidroponia, à 30 ppm para experimentos realizados no solo (HUANG et al., 2008; KOPITTKKE et al., 2010).

Alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas podem ser observadas em plantas quando há o acúmulo desse metal (SHAHID; PINELLI; DUMAT, 2012).

Um dos danos provocados pelo chumbo é a redução da biomassa, do alongamento de raízes e de caules e da expansão de folhas. Outro efeito causado pelo Pb é a redução da absorção de certos nutrientes, dentre eles, o magnésio (Mg) e o ferro (Fe) que são essenciais na síntese de clorofila levando a redução da capacidade fotossintética da planta. Ademais, a alteração da composição lipídica da membrana dos tilacoides e o aumento da atividade das clorofilases são consequências que geram também redução da taxa fotossintética. Convém salientar que o Pb pode inibir a germinação de sementes de certas plantas por inativar proteases e amilases que são enzimas importantes nesse processo. (SENGAR et al., 2008; SEREGIN; SHPIGUN; IVANOV, 2004).

Dentre as alterações bioquímicas causadas pelo Pb pouco se sabe sobre seu efeito na respiração. Contudo, em experimento realizado com planta (folhas), no escuro, detectou-se aumento da respiração e, conseqüentemente, aumento na produção de moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Tal resultado sugere que esse aumento do suprimento energético corresponda a um mecanismo de defesa da planta contra os efeitos tóxicos causados pelo Pb. Ainda, dentre o conjunto de alterações possíveis pode-se elencar a redução da mitose, a indução de aberrações cromossômicas, variação do conteúdo total de proteínas e aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (POURRUT et al., 2011).

1.2.2.1 Espécies Reativas de Oxigênio

As plantas quando submetidas a estresses bióticos e/ou abióticos induzem estresse oxidativo revelado pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies reativas de oxigênio são produzidas durante o desenvolvimento de reações metabólicas que se passam principalmente nos cloroplastos, nas mitocôndrias e nos peroxissomos. Contudo, o aumento da produção de EROs, decorrente do desequilíbrio entre tais espécies e a produção de antioxidantes, leva a danos celulares irreparáveis.

Os metais pesados induzem aumento na concentração de EROs e esse aumento é responsável pelos efeitos tóxicos provocados pelos mesmos. Sabe-se que ocorre o surgimento de efeitos adversos secundários como resultado do aumento da produção de EROs e da alta reatividade desses compostos com a matéria orgânica, e que, em última análise, o acúmulo dos danos causados a lipídios, carboidratos e proteínas podem levar a morte do vegetal (GILL; TUTEJA, 2010).

1.3 Enzimas antioxidantes

Para evitar os danos causados pelo excesso de EROs, as plantas desenvolveram mecanismos para balancear a concentração desses compostos nas células através da ação dos antioxidantes, que podem ser enzimas, aminoácidos ou vitaminas. A Superóxido Dismutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) são alguns exemplos de enzimas responsáveis pela eliminação de EROs.

A SOD é uma metaloenzima e considerada a primeira linha de defesa contra EROs. Diferentes isoformas de SOD atuam em diversos locais na célula, como cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e citoplasma. Essa enzima catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GILL; TUTEJA, 2010). O ânion superóxido é uma das espécies reativas de oxigênio mais danosas podendo ainda ser protonada e gerar outra espécie reativa de oxigênio: o radical perhidroxila (HO_2^{\bullet}). Ademais, a remoção do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) diminui o risco de formação da radical hidroxila (OH^{\bullet}). Portanto, a SOD previne a formação de espécies altamente reativas e o produto de sua reação mesmo sendo tóxico, na forma de H_2O_2 , servirá de substrato para outras enzimas antioxidantes como APX e CAT. Assim, APX e CAT são responsáveis pela eliminação do H_2O_2 e, portanto, evitam o surgimento da espécie mais reativa de todas, a radical hidroxila (OH^{\bullet}), produzido nas reações de Fenton e Haber-Weiss a partir do H_2O_2 e do $O_2^{\bullet-}$ (ANJUM et al., 2011; FENTONA; CHEMIZMU, 2009; KEHRER, 2000; MITTLER, 2002).

A catalase (CAT) é uma heme proteína que apresenta diferentes isoformas localizadas nas mitocôndrias, nos peroxissomos, nos glioxissomos e no citoplasma sendo a principal enzima antioxidante para a eliminação de H_2O_2 proveniente da fotorrespiração. Essa enzima catalisa a decomposição do H_2O_2 em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (PANCHUK; ZENTGRAF; VOLKOV, 2005).

Já a Ascorbato Peroxidase (APX) é uma heme proteína responsável por eliminar o peróxido de hidrogênio utilizando como doador de elétrons o ascorbato. Possui diferentes isoformas que atuam em mitocôndrias, peroxissomos, cloroplastos e, principalmente, no citoplasma em resposta a diversos tipos de estresses abióticos, como seca, excesso de luz e metais pesados (BONIFACIO et al., 2011; CAVERZAN et al., 2012).

1.4 Áreas contaminadas com chumbo

Apesar dos riscos a saúde e de contaminação do meio ambiente com Pb, diversas áreas estão, não somente contaminadas com Pb, mas com outros metais pesados e, além disso, sabe-se que ocorre um aumento da concentração de metais pesados dispersados no ambiente a cada ano (GOVINDASAMY et al., 2011). Há relatos de locais contaminados com concentrações até dez vezes maiores do que o permitido pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) em algumas regiões do Estados Unidos (YOUNG; EISLER, 2012).

A despeito da fiscalização rígida no que concerne ao meio ambiente, encontrou-se, recentemente, áreas contaminadas por Pb proveniente da atividade de fábricas de fundição desativadas e não regulamentadas, sendo 230 novas áreas contaminadas identificadas nos Estados Unidos (Figura 1).

Figura 1 – Mapa dos Estados Unidos mostrando áreas contaminadas com metais pesados.



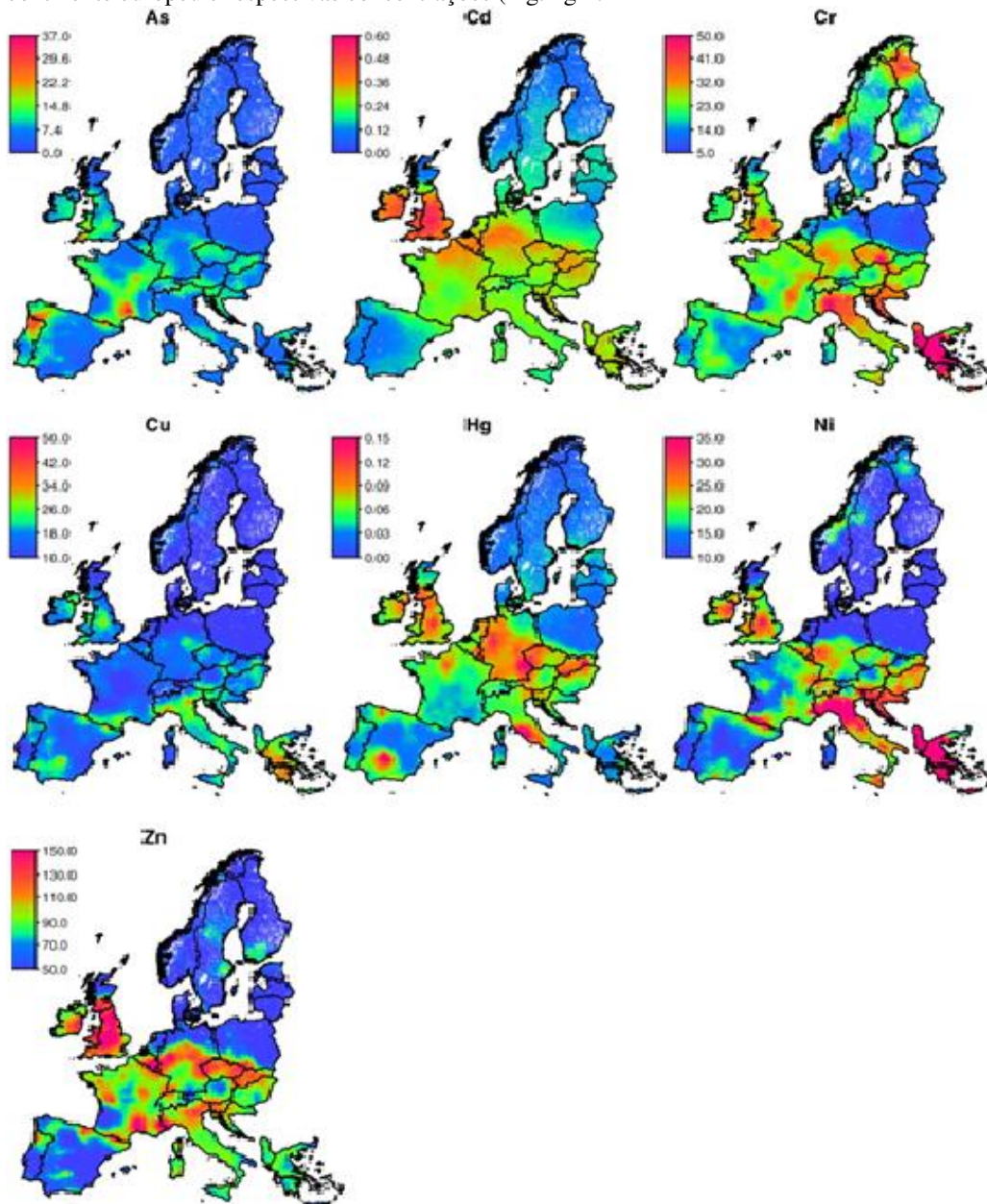
Fonte: *USA Today*. Legendas: Balões de cor vermelha e azul representam fábricas de fundição desativadas onde o solo apresenta altas e médias concentrações de metais pesados respectivamente. Balões de cor marrom representam áreas contaminadas ainda não avaliadas quanto a concentração de metais pesados.

Outros estudos apontam para áreas contaminadas em países da Europa, como exemplo Bélgica e Holanda (MEERS et al., 2010). Já no continente asiático, a China apresenta $2,88.10^6$ hectares de solo destruído como resultado da mineração de metais pesados (XIA, 2004).

A Figura 2 mostra a contaminação por As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni e Zn em diferentes países da Europa e respectivas concentrações (mg/Kg). Particularmente, a contaminação por Pb está representada na Figura 3. Vale ressaltar que os mapas criados foram baseados em predições de

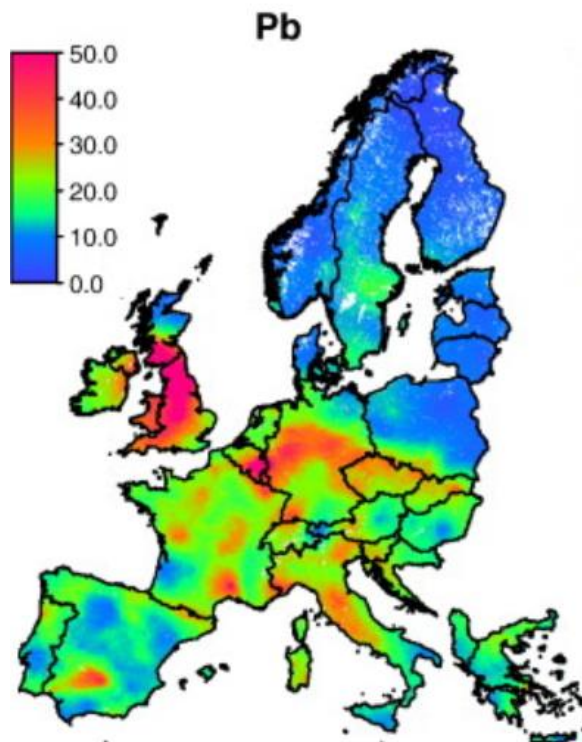
análises geoestatísticas utilizando 1588 amostras de 26 países da Europa (LADO; HENGL; REUTER, 2008).

Figura 2 – Mapas representativos da distribuição de solos contaminados com As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni e Zn no continente europeu e respectivas concentrações (mg.Kg^{-1}).



Fonte: Adaptado de Lado; Hengl e Reuter (2008).

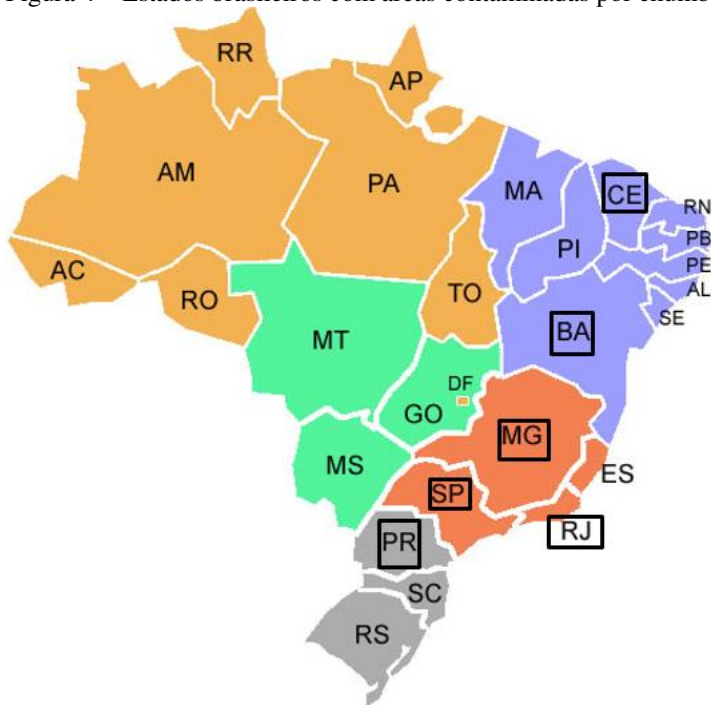
Figura 3 – Mapa representativo da distribuição de solos contaminados com Pb no continente europeu e respectivas concentrações (mg.Kg^{-1}).



Fonte: Adaptado de Lado; Hengl e Reuter (2008).

Na América do Sul, o Brasil sofre com danos provocados pelos metais pesado. Segundo o programa de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Solo Contaminado – Vigisolo existem 664 áreas contaminadas com diversos poluentes, dentre eles, os metais pesados correspondem a 11,3% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Essas áreas estão espalhadas em diferentes estados e a contaminação desses locais deve-se, sobretudo, as atividades ligadas a mineração, indústria ou ao despejo incorreto de materiais que contêm Pb. Esses estados são: Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Bahia e Ceará (Figura 4) (BOSSO; ENZWEILER, 2008; CAPITANI; PAOLIELLO; ALMEIDA, 2009; DE CARVALHO GOMES et al., 2009; DE FREITAS et al., 2007; JORDÃO et al., 1999; MONTEIRO-NETO et al., 2003; PAOLIELLO et al., 2002; SANTOS et al., 2013; ZENTNER et al., 2008).

Figura 4 – Estados brasileiros com áreas contaminadas por chumbo.



1.5 Remediação de áreas contaminadas com chumbo

1.5.1 Técnicas convencionais.

Existem diversas técnicas convencionais que são utilizadas para a remediação de áreas contaminadas com metais pesados. Normalmente, elas apresentam alto custo operacional, baixa eficiência em grandes áreas, necessidade de mão de obra especializada, além de, geralmente, produzirem resíduos secundários ainda tóxicos ao meio ambiente e causarem danos irreversíveis ao solo por limitar a capacidade de suportar o crescimento vegetal (VITHANAGE et al., 2011). Segundo Martin e Ruby (2004), as técnicas convencionais utilizadas *in situ* podem ser divididas em três estratégias quanto a forma de tratar o poluente : isolamento, remoção e estabilização (Quadro 1).

Quadro 1 – Estratégias para a remoção de metais pesados de áreas contaminadas. Continua.

<i>Estratégias</i>	<i>Técnicas convencionais</i>	<i>Modo de ação</i>	<i>Necessidades</i>	<i>Vantagem</i>	<i>Desvantagens</i>
<i>Isolamento</i>	Solidificação/estabilização	Utilização de agentes quelantes, para imobilizar o poluente e liga-lo à matriz do solo.	Utilização de equipamentos para mover e misturar o solo.	Pode ser utilizado a profundidade de até 31 metros.	Alteração drástica das características físico-químicas do solo. Não apropriada para grandes áreas.
	Vitrificação	Uso de correntes elétricas que elevam a temperatura do solo formando camada vítrea para imobilizar o poluente.	O solo deve conter materiais que viabilizem a formação de vidro.	Uso em solos com alta contaminação de variados componentes orgânicos e inorgânicos até 7 metros.	Alto custo para gerar a corrente elétrica.
<i>Remoção</i>	Remediação eletrocinética	Utilização de eletrodos com corrente de baixa intensidade para promover a dessorção dos metais do solo.	Utilização de escavadeiras para remover o solo uma vez que o contaminante é atraído pelo eletrodo.	Uso em solos independente da concentração do poluente e da profundidade do solo.	Dependente da composição do poluente e da composição e estrutura do solo.
	Lavagem do solo	Utilização de solução adequada para extrair o poluente do solo através da infiltração da mesma.	Utilização de quelantes para remover metais em solos homogêneos e permeáveis.	Específico na remoção de um único metal do solo.	Dependente da solubilidade do metal na solução utilizada, além do risco de contaminação de águas subterrâneas.

Quadro 1 – Estratégias para a remoção de metais pesados de áreas contaminadas. Conclusão.

<i>Estratégias</i>	<i>Técnicas convencionais</i>	<i>Modo de ação</i>	<i>Necessidades</i>	<i>Vantagem</i>	<i>Desvantagens</i>
<i>Estabilização</i>	Estabilização química	Redução da biodisponibilidade do contaminante tornando-o insolúvel no solo.	Aplicação periódica do composto estabilizante no solo.	Interfere menos nas propriedades do solo. Utilização de compostos menos agressivos ao solo.	A eficiência da técnica em experimentos em larga escala ainda em estudo.

Fonte: Adaptado de Martin e Ruby (2004).

1.5.2 Fitorremediação

A palavra fitorremediação tem origem no prefixo grego *phytón*, que significa planta, e da palavra em latim *remedium*, que significa corrigir ou remover um mal, e está relacionada ao um conjunto de técnicas que utilizam plantas para tratar um ambiente contaminado (NATIONAL RISK MANAGEMENT RESEARCH LABORATORY, 2000). A fitorremediação é uma tecnologia promissora que visa a imobilização, detoxificação, degradação, remoção ou a contenção de poluentes orgânicos e inorgânicos utilizando plantas para descontaminar ecossistemas aquáticos ou terrestres (AHMADPOUR et al., 2012; PAZ-ALBERTO; SIGUA, 2013). Além de ser considerada uma técnica com alta aceitação pública por ser ecologicamente correta, a fitorremediação apresenta diversas vantagens que estão resumidas no quadro 2, quando comparada as técnicas convencionais de remediação.

Quadro 2 – Vantagens da fitorremediação.

Econômicas	Ambientais	Sociais
Menor custo quando comparado as técnicas tradicionais.	Capacidade de limpar ambientes contaminados com diferentes tipos de poluentes.	Publicamente aceitável por ser ecologicamente correta.
Melhor relação custo-benefício em descontaminar grandes áreas.	Possibilidade de fazer o tratamento <i>in situ</i> e, assim, reduzir o impacto no solo e ambientes próximos.	Esteticamente agradável por criar áreas verdes.
Não necessita de mão de obra especializada ou equipamentos caros.	O tratamento <i>in situ</i> previne a escavação do solo e o transporte para outra área, reduzindo o risco de dispersão do poluente.	Reaproveitamento de metais acumulados nos tecidos vegetais.
Possibilidade de recuperar metais com valor de mercado (fitomineração)*.	Previne a erosão do solo.	Utilização da matéria orgânica para a geração de energia**.

Fonte: Adaptado de *Ali; Khan e Sajad (2013); **Meers et al. (2010); Moosavi e Seghatoleslami (2013).

1.5.2.1 Biodisponibilidade do chumbo

É importante considerar que, mesmo uma planta possuindo capacidade para fitorremediação, o desempenho dela pode ser afetado pela baixa biodisponibilidade do Pb em um determinado solo. Portanto, vale ressaltar que, não somente a capacidade da planta deve ser avaliada, como também, outros fatores que influenciam na biodisponibilidade desse metal devem ser levados em consideração. Apesar de estar majoritariamente concentrado nas camadas mais superficiais do solo, até 20 cm de profundidade, muitos fatores determinam a biodisponibilidade do Pb para a absorção pelas raízes (TANGAHU et al., 2011). Um desses fatores está ligado as

características do Pb em solução, que por se complexar fortemente a matéria orgânica e outros componentes do solo, possui baixa solubilidade e, assim, está pouco disponível para as plantas (PUNAMIYA et al., 2010; SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2010).

Outros fatores que controlam a biodisponibilidade do Pb estão relacionados com as características biogeoquímicas do solo, como o pH, o estado oxidativo (Pb^{+2} ou Pb^{+4}) em que o Pb se encontra no solo, a composição do solo (minerais e matéria orgânica), a presença de outros cátions competidores e a quantidade de Pb, são alguns desses fatores, que, conjuntamente ou separadamente, irão determinar o quanto de Pb pode estar disponível para ser absorvido pelas plantas (POURRUT et al., 2011).

Embora a biodisponibilidade do Pb seja reduzida, quando comparado a outros metais, as plantas desenvolveram mecanismos que aumenta essa disponibilidade, por exemplo, ao reduzir o pH ao redor da rizosfera e, assim, promover a dessorção do metal e aumentar a concentração dele em solução (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Além disso, compostos artificiais são utilizados para aumentar a solubilidade de Pb no meio e, portanto, aumentar a absorção pela planta. O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um composto quelante, normalmente, utilizado para tal finalidade e que ajuda a reduzir os efeitos tóxicos dos íons de Pb^{+2} tanto em experimentos de hidroponia quanto em solo (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; HUANG et al., 2008; SAIFULLAH et al., 2009; SHAHID et al., 2014).

1.5.2.2 Classificação das plantas com capacidade fitorremediadora.

Certas plantas, habitantes naturais de solos enriquecidos com metais, apresentam capacidade para extrair e tolerar altas concentrações desses metais. Essas plantas são conhecidas como metalófitas e, normalmente, são alvos interessantes para a aplicação na fitorremediação de metais pesados, pois naturalmente elas apresentam mecanismos de resistência a toxicidade causada pelo acúmulo de metais e a capacidade de extrai-los e transportá-los a diferentes órgãos mais eficientemente do que plantas não naturais a esses ambientes (ALFORD; PILON-SMITS; PASCHKE, 2010; GUPTA; HUANG; CORPAS, 2013). Segundo Ali; Khan e Sajad (2013), essas plantas podem ser classificadas em três categorias: excludoras de metais, indicadoras ou hiperacumuladoras.

Plantas excludoras de metais são aqueles que apresentam alta concentração do metal em suas raízes, limitando o transporte para a parte aérea. Já as plantas indicadoras de metais

acumulam os mesmos na parte aérea indicando a concentração de metais pesados no solo (MALIK; BISWAS, 2012). Por fim, as plantas hiperacumuladoras são aquelas nas quais as concentrações de metais pesados acumulados na parte aérea são de 100 a 1000 vezes superiores as concentrações encontradas nas plantas não hiperacumuladoras. Dentre todas as espécies de angiospermas apenas 450 são conhecidas como hiperacumuladoras de metais pesados (RASCIO; NAVARI-IZZO, 2011).

Para ser considerada hiperacumuladora, uma planta precisa acumular grandes concentrações de metais nas folhas, permanecendo saudável e mantendo a população autossustentável no seu ambiente natural. Além disso, precisa apresentar um fator de translocação do metal das raízes para parte aérea maior que 1. Esse fator indica a razão entre a concentração de metal presente na parte aérea e a concentração de metal na raiz (VAN DER ENT et al., 2012).

1.5.2.3 As técnicas da fitorremediação

A fitorremediação é dividida em sete técnicas: rizodegradação, fitovolatilização, fitodegradação, fitodessalinização, fitofiltração, fitoestabilização e fitoextração, sendo essas três últimas, normalmente, utilizadas para descontaminação de metais pesados, em especial o chumbo (MUKHOPADHYAY; MAITI, 2010; RABHI et al., 2010).

1.5.2.3.1 Rizodegradação

Os micro-organismos, presentes na rizosfera, aumentam em população e atividade metabólica quando estimulados por exsudatos ricos em compostos com carbono e nitrogênio liberados pelas raízes das plantas. Assim, em última instância, os micro-organismos degradam compostos orgânicos xenobióticos presentes no solo (KUIPER et al., 2004). Plantas com alta densidade de raízes, como gramíneas ou fixadoras de nitrogênio, são recomendadas para essa técnica.

1.5.2.3.2 Fitovolatilização

Determinadas plantas têm a capacidade de absorver poluentes e transformá-los em compostos voláteis, que serão posteriormente liberados para o meio ambiente através do processo de transpiração. Essa técnica é mais utilizada para tratar áreas contaminadas com compostos orgânicos. Contudo, os metais pesados, Hg e Se, podem ser absorvidos e sofrer volatilização. A

desvantagem dessa técnica consiste no fato de que o metal pesado volatilizado pode ser redepositado no solo ou, até mesmo, contaminar outros ambientes.

1.5.2.3.3 Fitodegradação

O metabolismo de determinadas plantas pode degradar compostos orgânicos previamente absorvidos caracterizando assim a fitodegradação. Tal técnica independe da presença de micro-organismos, diferentemente, da rizodegradação e pode ser aplicada em qualquer tipo de ecossistema.

1.5.2.3.4 Fitodessalinização

Plantas halófitas são capazes de remover sais presentes no solo e permitir que outras plantas não tolerantes à salinidade se desenvolvam nesse solo. Essa é uma técnica recente e promissora vez que grandes áreas cultiváveis estão se tornando salinizadas e impróprias para o cultivo. A utilização dessa técnica pode recuperar solos previamente salinizados (JLASSI et al., 2012; RABHI et al., 2010; ZORRIG et al., 2012).

1.5.2.3.5 Fitofiltração

A remoção de contaminantes presentes em águas residuais, superficiais ou subterrâneas ocorre através da absorção ou adsorção do poluente na rizosfera ou qualquer outra parte da planta que possa ser submersa e tenha a capacidade de absorver o contaminante. Compostos orgânicos hidrofóbicos, Pb, Cr⁺³, urânio (U) e As⁺⁵ são os contaminantes alvos dessa técnica.

1.5.2.3.6 Fitoestabilização

Também conhecida como fitoimobilização, essa técnica consiste na capacidade das plantas em reduzir a mobilidade e a biodisponibilidade do poluente no solo por meio da precipitação, complexação ou redução da valência dos metais contaminantes. Tal técnica evita a difusão de contaminantes para águas subterrâneas, por exemplo. Em última análise, essa técnica não é ainda uma solução definitiva, pois o metal pesado continua no solo.

1.5.2.3.7 Fitoextração

Certas plantas têm a capacidade de retirar e acumular grandes quantidades de metais pesados provenientes tanto do solo como da água e translocá-los para a parte aérea. É importante ressaltar que a translocação do metal para a parte aérea é uma característica de grande relevância por permitir que somente as folhas sejam colhidas e, dessa forma, possibilitar a extração contínua do metal do ambiente contaminado.

1.6 *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Vigna unguiculata (L.) Walp também conhecido como feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão macassar é uma planta nativa de regiões tropicais e subtropicais. Acredita-se que a domesticação dessa planta aconteceu na África (PANELLA; GEPTS, 1992). Esse feijão é cultivado em países da Ásia, da África e da América Sul para o consumo local. É uma importante fonte de nutrientes para alimentação da população desses continentes e contém 24% de proteína bruta, 53% de carboidratos e 2% de gordura (FAO, 2014). A classificação taxonômica está abaixo apresentada (Quadro3).

Quadro 3 – Classificação taxonômica do feijão-caupi.

Divisão	Classificação
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Rosidae
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae/Leguminosae
Subfamília	Faboideae
Gênero	<i>Vigna</i>
Espécie	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp

Fonte: Departamento de Agricultura dos Estados Unidos -USDA.

No Brasil, acredita-se que o feijão foi introduzido na Bahia no século XVI e, desde então, o feijão tornou-se uma cultura de grande importância econômica local, nutricional e social. De uma forma geral, o feijão-caupi é produzido em todas as regiões do Brasil. No período de 2005 a 2009, as regiões Nordeste (45,67%) e Norte (37,64%) foram as maiores produtoras de feijão destacando-se o Ceará, o Piauí e a Bahia. A região Nordeste apesar de ser a maior produtora do

feijão-caupi, apresenta baixa produtividade quando comparada à área plantada nessa região. Isso deve-se às condições climáticas desfavoráveis da região, a baixa mecanização do cultivo e a baixa quantidade de áreas irrigadas (FILHO et al., 2006, 2011; FREITAS, 2014).

1.6.1 Cultivares Sempre Verde e Setentão

Com a finalidade de obter-se um feijão mais apto para o cultivo em regiões submetidas às condições climáticas desfavoráveis e visando aumento de sua produção, buscou-se seu melhoramento genético, objeto de interesse principalmente em Centros de Pesquisa ou Universidades da região Nordeste. O objetivo era produzir cultivares que possuísem resistência a diversos vírus, maior produção e permitisse a mecanização da colheita por selecionar plantas de porte ereto (FILHO et al., 1997).

Em 1978, o Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará com o objetivo de obter um cultivar com maior produtividade e com resistência a viroses logrou o cultivar CE-596, posteriormente chamado Setentão (SET), através da hibridação de Sempre-Verde com TVu 59. Setentão herdou resistência ao vírus do mosaico severo do caupi (CpSMV) e alta resistência a uma estirpe de vírus do mosaico do pepino (CMV), além de boa produtividade (PAIVA et al., 1990)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de atividade e de transcrição das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT), em raízes e folhas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, cultivares Sempre Verde e Setentão, submetidos ao estresse por chumbo e avaliar a potencialidade desses cultivares para uso na fitorremediação.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o teor de chumbo nas raízes e nas folhas dos cultivares Sempre Verde e Setentão, bem como calcular os fatores de translocação desse metal;
- Determinar as atividades enzimáticas da superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase nos cultivares Sempre Verde e Setentão, em ausência e presença de chumbo;
- Analisar a expressão relativa dos genes da superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase por RT-qPCR, em raízes e folhas de Sempre Verde e Setentão, em ausência e presença de chumbo;
- Avaliar possíveis alterações morfológicas causadas pela presença de chumbo através de microscopia eletrônica de varredura, em raízes e folhas de Sempre Verde e Setentão;
- Avaliar a potencialidade de uso dos cultivares Sempre Verde e Setentão na fitorremediação do chumbo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

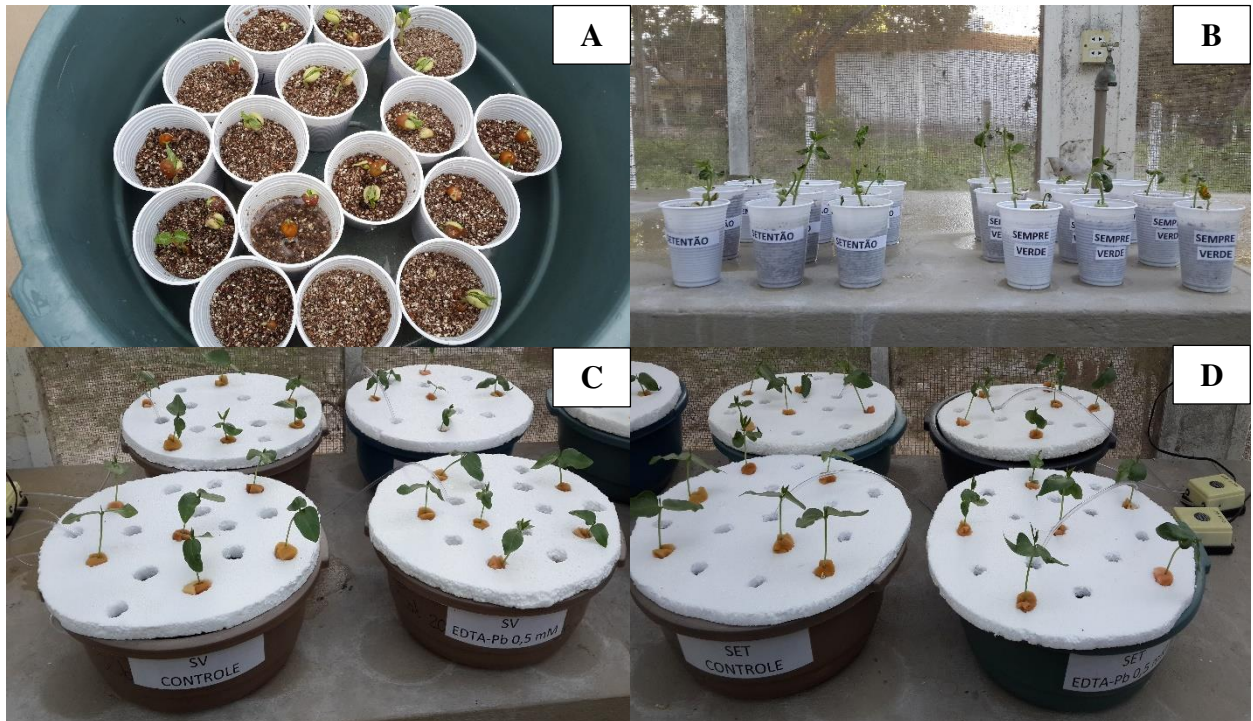
As sementes de Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp, foram cedidas pelo do Banco de Sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Germinação das sementes de Sempre Verde e Setentão

As sementes de SV e SET, 96 sementes para cada cultivar, foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 0,5% durante 5 minutos para desinfecção. Posteriormente, foram lavadas e embebidas em água destilada por duas horas. Duas sementes por recipiente foram semeadas em vermiculita em copos plásticos de 200 mL e mantidas em casa de vegetação a temperatura de 28.3 ± 0.62 °C, humidade de $75.0 \pm 1.9\%$ e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $1200 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ por sete dias, sendo diariamente irrigadas com 50 mL de água destilada.

No 7^o dia, 48 plântulas uniformes de cada cultivar foram selecionadas e transferidas para o sistema de hidroponia em bacia de 12 L contendo o meio nutritivo com 50% de força iônica adaptado de Hoagland e Arnon (1950). Essas plântulas foram divididas em dois grupos: controle e tratamento, que irá receber EDTA-Pb 0,5mM, possuindo cada grupo duas bacias com 6 plântulas (Figura 5). Assim, elas foram mantidas e aeradas continuamente em casa de vegetação por mais sete dias, sendo, diariamente, as soluções de Hoagland 50% completadas com água destilada.

Figura 5 – Etapas prévias a indução de estresse por EDTA-Pb 0,5mM nas plantas de Sempre Verde e Setentão.

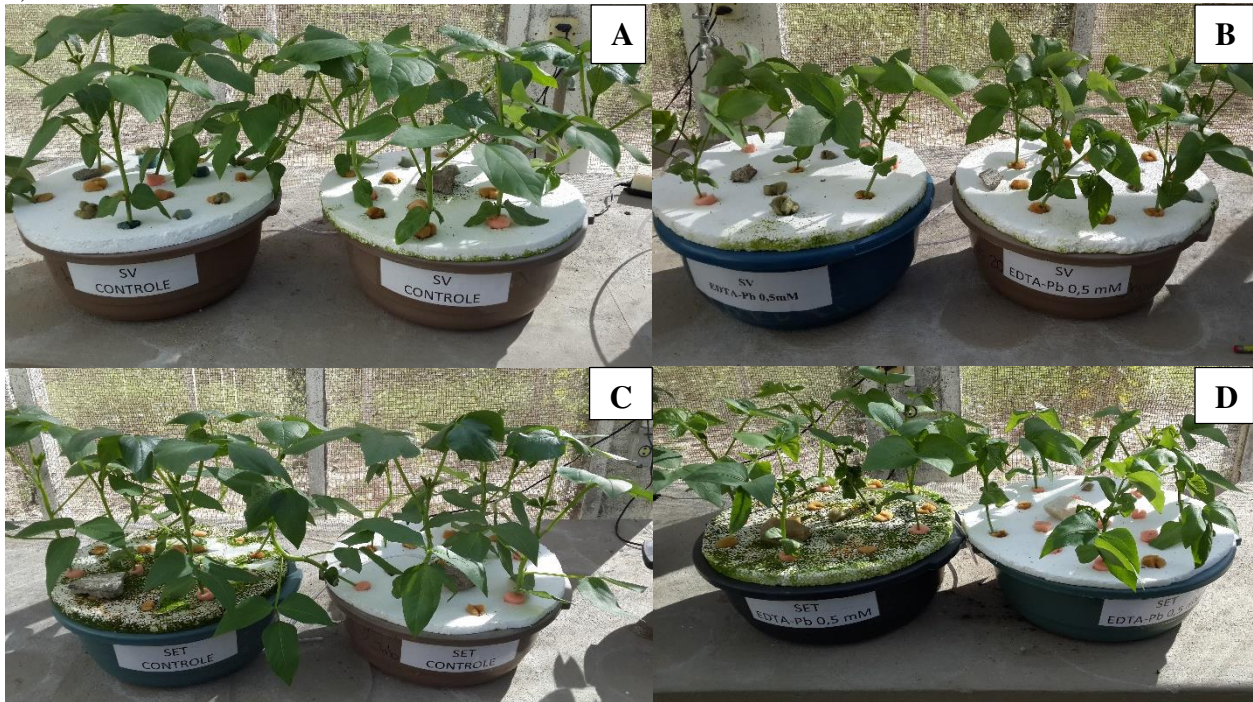


Legenda: (A) Germinação das sementes de SV e SET em vermiculita. (B) Plantas com 7 dias antes da transferência para a hidroponia. (C) Plantas de SV com 7 dias separadas em grupos para a hidroponia. (D) Plantas de SET com 7 dias separadas em grupos para a hidroponia.

3.3 Aplicação de chumbo

No 14º dia, soluções equimolares de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e nitrato de chumbo II ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) foram preparadas e misturadas para a complexação de EDTA-Pb. Uma nova solução de Hoagland 50% de pH 5 foi preparada e adicionado EDTA-Pb de concentração final de 0,5 mM em 12 L de meio nutritivo. Essas plantas foram mantidas por mais sete dias em hidroponia e em casa de vegetação. A figura 6 mostra as plantas organizadas em grupos: controle e tratamento. De cada grupo controle e estresse de cada cultivar, três plantas foram utilizadas para cada experimento: quantificação de chumbo, microscopia eletrônica de varredura, atividade das enzimas antioxidantes e expressões gênicas relativas dessas enzimas.

Figura 6 –Fotos dos cultivares Sempre Verde e Setentão com 14 dias em solução de Hoagland 50% com EDTA-Pb 0,5mM.



Legenda: (A) Plantas de SV com 14 dias pertencentes ao grupo controle. (B) Plantas de SV com 14 dias pertencentes ao grupo tratamento (EDTA-Pb 0,5mM). (C) Plantas de SET com 14 dias pertencentes ao grupo controle. (D) Plantas de SET com 14 dias pertencentes ao grupo tratamento (EDTA-Pb 0,5mM).

A escolha dessa concentração final e a utilização do EDTA foram determinadas por experimentos preliminares feitos com diferentes concentrações de Pb e utilizando o nitrato de chumbo II livre e complexado ao EDTA. Essa concentração foi considerada ideal para o trabalho, pois permitiu a visualização dos efeitos tóxicos no feijão, como a redução no crescimento da planta, sem que causasse a morte do vegetal. A escolha de complexar o Pb ao EDTA foi tomada devido à maior concentração de Pb presente nas raízes, quando utilizado EDTA-Pb, do que em relação a concentração do Pb em raízes quando foi utilizado o nitrato de chumbo II livre.

3.4 Coleta de material vegetal

Ao final do 21º (sete dias após o início do estresse com chumbo), raízes, caules e folhas dos grupos controle e estresse de SV e SET foram coletados, armazenados e guardados separadamente em papel alumínio e, imediatamente, colocados em nitrogênio líquido para congelamento. Para o experimento de quantificação de Pb, todas as folhas foram utilizadas, mas para a atividade das enzimas antioxidantes, somente o primeiro par de folhas completamente

expandidas foram coletadas e, para a extração do ácido ribonucleico (RNA) total, somente folhas jovens. Após esse procedimento, esses materiais foram mantidos a -20°C , para as análises de atividade enzimática, e -80°C para uso na extração de RNA total.

Para as amostras de raízes e folhas de SV e SET para os grupos controle e tratamento, que foram utilizadas para microscopia de varredura eletrônica, todos os cortes foram realizados a mão livre. Em folhas jovens evitou-se nervuras, e os cortes para as raízes foram 1 cm acima da zona pilífera. Após os cortes, essas amostras foram, imediatamente, congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas e guardadas em local seco.

Após a coleta de material vegetal, o chumbo presente nas soluções nutritivas foi precipitado com hidróxido de sódio (NaOH) de concentração final de 2 M. Um dia após a adição da solução de NaOH, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo chumbo, foi coletado em garrafas plásticas e armazenado.

3.5 Quantificação de chumbo

As raízes, caules e folhas dos dois cultivares foram secas em estufa com ar forçado a 60°C por cinco dias. Após a secagem, as amostras foram pulverizadas e separadas em duplicatas biológicas para cada grupo e cultivar com 200 mg de amostra. Cada duplicata foi imersa em 5 ml de água régia invertida de proporção 3:1, contendo 3,75 mL de ácido nítrico (HNO_3 65% v/v) e 1,25 mL de ácido clorídrico (HCl 37% v/v), por 12 horas a temperatura ambiente (25°C). Após esse período, as amostras foram colocadas em blocos digestores a 120°C por 3 horas. Após equilíbrio térmico com o ambiente, 4 ml de ácido fluorídrico (HF 40% v/v) concentrado foi adicionado a todas as amostras e digerido por 3 horas. Terminado a digestão, as amostras retornaram ao equilíbrio térmico e água deionizada foi adicionada as amostras até o volume final de 25 ml. Os teores de Pb^{2+} foram determinados em espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), sendo mensurados os valores dos grupos controles primeiro e, posteriormente, os grupos tratados.

3.6 Fator de translocação

O fator de translocação (TF) é um índice utilizado para medir a capacidade de transporte de metais das raízes para a parte aérea em plantas. Ele é calculado segundo a fórmula a seguir (ISLAM; WAHID; MOKHLESUR, 2013):

$$TF = \frac{\text{Concentração de Pb na parte aérea } \left(\frac{mg}{g}\right)}{\text{Concentração de Pb na raiz } \left(\frac{mg}{g}\right)} \quad (1)$$

3.7 Fator de bioconcentração

O fator de bioconcentração (BCF) refere-se a capacidade da planta em acumular um determinado metal em seus tecidos com relação a concentração inicial presente no substrato. O BCF é calculado de acordo com a fórmula (ISLAM; WAHID; MOKHLESUR, 2013):

$$BCF \text{ (L.g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentração de Pb na parte aérea } \left(\frac{mg}{g}\right)}{\text{Concentração de Pb inicial na solução de Hoagland } \left(\frac{mg}{L}\right)} \quad (2)$$

3.8 Atividades enzimáticas de SOD, APX e CAT

3.8.1 Preparo de amostras

Amostras de raízes e folhas de SV e SET de 150 mg cada foram maceradas em nitrogênio líquido até a formação de um pó fino. Posteriormente, foi utilizado 1,5ml de tampão de extração por cinco minutos para a extração das enzimas. O tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 com EDTA 0,1 mM para a obtenção da enzima SOD, adaptado de (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), e para a extração de CAT, adaptado de Havir e McHale, (1987). Para a extração de APX utilizou-se o tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 com EDTA 0,1 mM e com ascorbato 1 mM, adaptado de Nakano e Asada (1981). Os extratos foram centrifugados a 12.000 x g por 30 minutos a 4^oC e o sobrenadante utilizado para as atividades enzimáticas e determinação do teor de proteínas totais, utilizando a albumina bovina sérica (BSA) como padrão (BRADFORD, 1976). Todas as atividades foram realizadas em microplacas e as leituras realizadas em espectrofotômetro.

3.8.2 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

O protocolo seguido para a atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi adaptado de Giannopolitis e Ries, (1977). A mistura da reação de claro (controle positivo), reação de escuro (controle negativo) e a solução com extrato enzimático consistiram de volumes totais de 150 µL. A solução de claro contém 105 µL de tampão fosfato de potássio 50 mM com EDTA 0,1 mM e metionina 19,5 mM pH 7,8; 15 µL de nitroazul de tetrazólio (NBT) 0,075 mM e 30 µL de

riboflavina 15 μM . Já a solução com extrato enzimático possui os mesmos reagentes, mas com 100 μL de tampão e 5 μL de extrato enzimático. As soluções foram agitadas e iluminadas com lâmpada de 40 W por quinze minutos e, somente após esse tempo, a solução de escuro (controle negativo), que possui os mesmos reagentes da solução de claro, foi adicionada a microplaca e as absorbâncias medidas. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro à 560 nm. Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima requerida para causar uma inibição de 50% da taxa de fotorredução do NBT e os resultados foram expressos em UAmg^{-1} proteína.

3.8.3 Atividade da Catalase (CAT)

O protocolo seguido para a realização da atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi adaptado de Havir e McHale, (1987). O volume total da solução utilizada é de 150 μL , sendo composta com as concentrações finais de tampão fosfato de potássio 82,6 mM com EDTA 86 μM pH 7.0, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20 mM e 20 μL de extrato enzimático. A decomposição do (H_2O_2) foi monitorada a 240 nm a cada minuto por dez minutos e a atividade enzimática foi quantificada usando o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 de $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para medir o decaimento da concentração desse composto no meio de reação. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2. \text{ mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.8.4 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

O protocolo seguido para a atividade da ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) foi adaptado de Nakano e Asada (1981). O volume total da solução utilizado é de 150 μL , sendo composta por 120 μL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6.0 com EDTA 0,05 mM, 10 μL de ascorbato 15 mM, 10 μL de H_2O_2 0,03M e 10 μL de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 30 mM e a oxidação do ascorbato foi medida a 290 nm. A atividade da enzima foi quantificada usando o coeficiente de extinção molar do ascorbato ($2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol.mg proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

3.9 Extração de RNA total

3.9.1 Quantificação e pureza do RNA total

Para a extração do RNA total de raízes e folhas de SV e SET foi utilizado o *RNeasy plant mini kit* e seguidas as recomendações do fabricante segundo o manual *Rneasy Mini Handbook*, (QIAGEN, 2012). A quantificação do RNA total foi realizada através de leitura espectrofotométrica a 260 nm e a pureza das amostras avaliadas pela relação A260/A280, que deve variar entre 1,8 e 2 para indicar a ausência de contaminação por proteínas, e pela relação A260/A230, que variando de 2 a 2,2 indica ausência de contaminação por fenóis ou por carboidratos (KIM et al., 2014).

3.9.2 Integridade do RNA total

As integridades dos RNAs foram avaliadas através de eletroforese horizontal de gel de agarose 1%. Devido à variação da concentração das amostras de RNA total obtidas na extração, preparou-se as amostras da eletroforese com concentração final de RNA de 0,5µg/µL, sendo obtido essa concentração variando-se o volume de água ultrapura livre de RNAses necessária para formar um volume final de 5 µL. A essas amostras foi adicionado 1 µL de tampão de corrida 6X concentrado com corante *GelRed*. Após o preparo das amostras, elas foram pipetadas aos poços e a corrida eletroforética realizada nas condições de voltagem de 70V, amperagem e potência de 20 mA e 10 W, respectivamente. Após a corrida eletroforética, as bandas foram visualizadas em transiluminador com UV. A verificação da presença das bandas correspondentes as subunidades do RNA ribossômicos são indicativas da integridade dos RNAs totais extraídos (SALZMAN; FUJITA; HASEGAWA, 1999).

3.10 Síntese de cDNA

A transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) foi realizada com 1 µg de RNA total utilizando o *kit Improm-IITM* e seguidas as recomendações do fabricante segundo o manual *ImProm-IITM Reverse Transcription System Protocol*, (PROMEGA, 2012).

A RT foi realizada nas condições de 25 °C por 5 minutos para o anelamento do oligo(dT), 42 °C por 1 hora para a fase de alongamento e a 75 °C por 15 minutos para a inativação térmica da transcriptase reversa.

Os cDNAs obtidos após as reações de RT foram diluídos para uma concentração final de 25 ng/μL e 100ng/ μL considerando-se que a concentração inicial era de aproximadamente 1000 ng/μL para todas as amostras e armazenados - 20 °C para as posteriores reações de qPCR.

3.11 Construção dos iniciadores

Para a avaliação da expressão relativa das enzimas antioxidantes foi necessário primeiro criar iniciadores específicos que permitissem a realização da qPCR. Portanto, etiquetas de sequências expressas EST (*expressed sequence tags*) do *GenBank* localizado no *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) e do Banco de Dados Genômicos do Feijão (CHEN et al., 2007) foram utilizadas como isca para a anotação gênica dos genes das enzimas antioxidantes e desenho dos iniciadores. Os genes da SOD, APX e CAT foram nomeados de acordo com a relação filogenética existente com os genes de *Arabidopsis thaliana* e *Vigna unguiculata*. O quadro 4 mostra os nomes dados aos genes das enzimas antioxidantes.

Quadro 4 – Nomeação dos genes das enzimas antioxidantes SOD, APX e CAT segundo a relação filogenética entre *Arabidopsis*. e *V. unguiculata*.

Genes de SOD	Genes de APX	Genes de CAT
<i>Vu-Cu/ZnSOD1</i>	<i>Vu-APX1</i>	<i>Vu-CAT1</i>
<i>Vu-Cu/ZnSOD2</i>	<i>Vu-APX2</i>	<i>Vu-CAT2</i>
<i>Vu-Cu/ZnSOD3</i>	<i>Vu-APX3</i>	
<i>Vu-FeSOD1</i>	<i>Vu-APX4*</i>	
<i>Vu-FeSOD2</i>	<i>Vu-APX4'*</i>	
<i>Vu-FeSOD3</i>	<i>Vu-APX5**</i>	
<i>Vu-Cu/ChaperonaSOD1</i>	<i>Vu-APX6</i>	
<i>Vu-MnSOD1</i>		

Legenda: * *Splicing* alternativo que gera duas isoformas encontradas em diferentes locais no cloroplasto: estroma e tilacoide. ** Gene expresso somente em folhas.

Os iniciadores desenhados foram testados quanto a porcentagem de conteúdo CG, temperatura de anelamento, formação de grampos e autocomplementariedade utilizando o programa PerlPrime V1.1.20 (MARSHALL, 2004). Para testar a temperatura ótima de anelamento, os iniciadores foram previamente testados com a reação em tempo real da cadeia da polimerase (qPCR) para cada par de *primer* e as temperaturas usadas foram 52,6; 55,1; 57,1; 59,2; 61,4; 63,5; 65,3 e 68 °C, sendo escolhida a temperatura ótima de anelamento de acordo com a melhor curva sigmoide obtida para cada par de *primer*. Os genes constitutivos *Insulinase*, *EF-1α1*, *EF-1α2*, *EF-1α3*, *EF-1β* e *f-BOX* foram testados como controle interno usando o programa GeNorm

(qBase^{PLUS} Versão 2.4), que revelou *EF-1 β* e *f-BOX* como genes constitutivos mais adequados (HELLEMANS et al., 2007).

3.12 qPCR dos genes das enzimas antioxidantes

As reações da cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) foram realizadas em placa de 96 poços com volume final de 20 μ L, contendo 4 μ L de cDNA de 100 η g/ μ L, 10 μ L de *Power SYBR Green Master Mix*, 2 μ L dos iniciadores específicos com 300 η M/ μ L e 4 μ L de água ultrapura. Para o controle negativo foram adicionados os mesmos compostos a solução de reação, mas sem o cDNA e com 8 μ L de água ultrapura para completar o volume final de 20 μ L. Todas as amostras de cDNAs de raízes e folhas controle e de tratamento de SET e SV foram avaliados em qPCR em triplicata. A qPCR foi realizada em 40 ciclos, sendo a desnaturação realizada a 95⁰C por 10 minutos, o anelamento a 60⁰C por 20 segundos e, por fim, a fase de alongamento a 95⁰C por 15 segundos. As condições para a obtenção da curva de *melting* foram avaliadas pela relação da temperatura e fluorescência. Esse parâmetro é utilizado para detectar se o *amplicon* desejado foi identificado, ou seja, determinar se houve a contaminação com DNA genômico ou com dímeros de iniciadores, que seriam identificados pela presença de mais de um pico na derivada da curva de *melting*, como demonstrado no manual de qPCR: *Real Time PCR Handbook: Melting Curve* (UNIVERSITY OF ILLINOIS, 2003).

Após a realização das reações de PCR em tempo real, os níveis de expressão gênica foram determinados pelo número de ciclos de amplificação necessários para a fluorescência (emitida pelo SYBR Green) ultrapassar um limiar durante a fase exponencial da reação de qPCR, determinado pelo C_t (*Cycle threshold*). Os C_t s utilizados para as análises foram obtidos através da média aritmética entre as triplicatas de reações para cada condição e gene. Os valores brutos de C_t serão importados para o programa qbase^{plus} (versão 2.4) e convertidos em dados de expressão relativa utilizando o método do fator de normalização (HELLEMANS et al., 2007).

3.13 Análise de raízes e folhas por microscopia eletrônica de varredura

As amostras liofilizadas de raízes e folhas foram colocadas em suportes com fita adesiva de carbono onde foram aderidas para permitir a metalização conforme manual do fabricante disponibilizado no site da Central Analítica da UFC. Após a metalização com ouro, as

amostras foram analisadas pelo microscópio eletrônico de varredura conforme manual do fabricante disponibilizado no site da Central Analítica da UFC.

3.14 Cálculos estatísticos

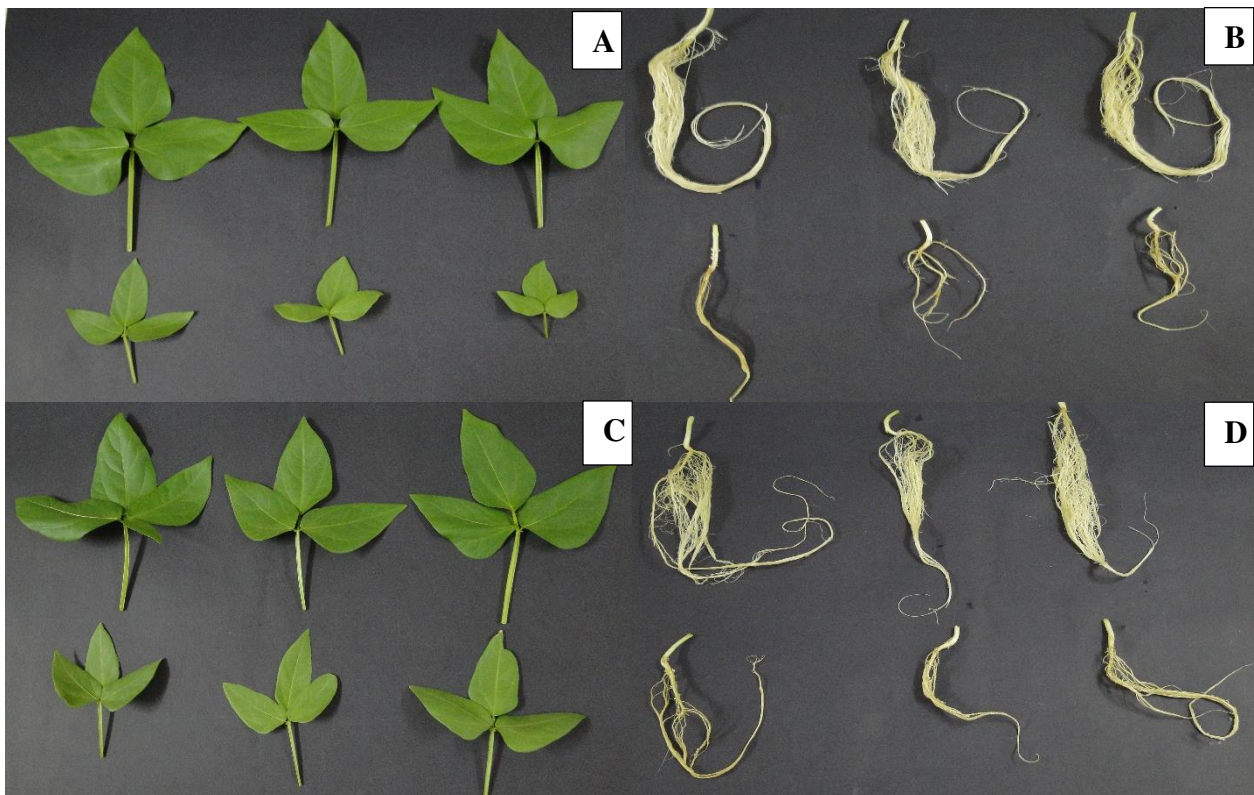
O desenho experimental foi randomizado em análise de arranjo fatorial de 2 (controle e EDTA-Pb) por 2 (SV e SET). Os testes estatísticos de análise de variância de dois sentidos (*two-way ANOVA*) seguido pelo teste de Tukey foram realizados afim de determinar as diferenças estatisticamente significantes com o valor de $P \leq 0,05$ e os resultados foram expressos como o desvio padrão das médias (SEM). Para os cálculos estatísticos e criação das imagens foi utilizado o programa SigmaPlot 11.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeitos do chumbo nas plantas de Sempre Verde e Setentão

Ao final de 21 dias e após 7 dias da aplicação do estresse por EDTA-Pb 0,5mM nos cultivares Sempre Verde e Setentão, o material vegetal foi retirado da hidroponia para a coleta das raízes, caules e folhas dos grupos controle e tratamento. A figura 7 mostra o efeito de EDTA-Pb 0,5mM nas plantas, revelando uma inibição do crescimento das folhas e das raízes, bem como, redução na emissão de raízes secundárias quando comparada as plantas controle. Além desses efeitos observados em feijão-caupi, sabe-se que o Pb também é responsável por causar outros problemas, como a redução da massa seca e do crescimento em plantas (SHU et al., 2012). A redução no crescimento das plantas pode ser justificada pela necessidade do desvio de energia útil, que estaria disponível para crescimento e desenvolvimento das plantas, para minimizar os efeitos tóxicos do chumbo, como, por exemplo, aumentar a produção de enzimas antioxidantes (HU et al., 2012).

Figura 7 – Comparação entre grupos controles e tratamentos de Sempre Verde e Setentão.

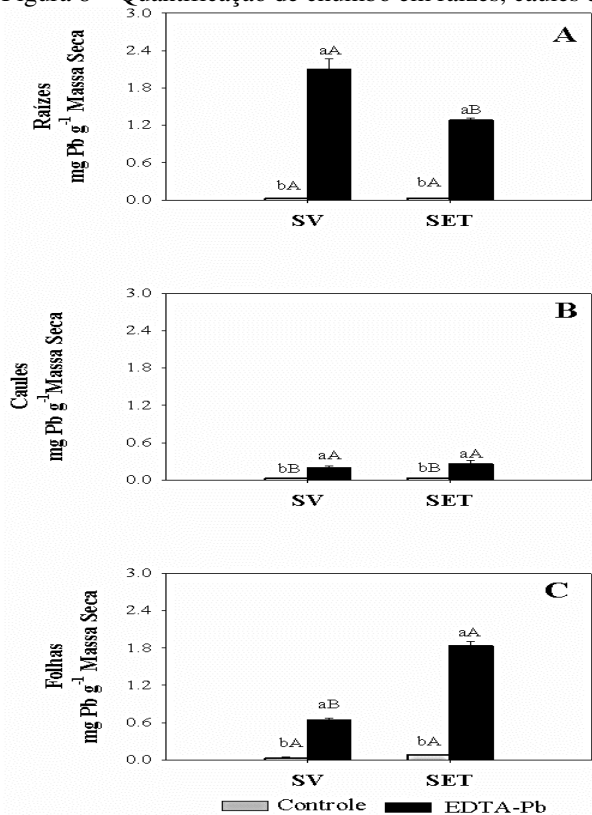


Legenda: (A) Folhas de SV: grupo controle acima e folhas do grupo tratamento abaixo. (B) Raízes de SV: grupo controle acima e raízes do grupo tratamento abaixo. (C) Folhas de SET: grupo controle acima e folhas do grupo tratamento. (D) Raízes de SET: grupo controle acima e raízes do grupo tratamento.

4.2 Quantificação de chumbo, fator de translocação e fator de bioacumulação

O teor de chumbo obtido pelo ICP-OES revelou que os cultivares SV e SET tratados com EDTA-Pb 0,5 mM foram capazes de absorver o Pb presente no meio nutritivo de Hoagland 50%, mostrando diferentes padrões de acumulação e distribuição do Pb nos tecidos. O cultivar SV apresentou um acúmulo de Pb 38,9% maior em raiz do que SET (Figura 8 A), enquanto que em folha (Figura 8 C), SET apresentou 184,3% mais chumbo do que SV. Já para o caule (Figura 8 B) não houve uma diferença significativa entre os grupos tratamentos dos cultivares. É importante ressaltar que a avaliação dos teores de Pb em cada órgão faz-se necessário, pois nem todas as plantas apresentam a capacidade de absorver esse metal pesado, mesmo aquelas que estão em áreas contaminadas (SALAZAR; PIGNATA, 2014). Assim como observado em feijão-caupi, outras plantas também foram capazes de absorver o Pb em experimentos de hidroponia e, assim, permitindo uma avaliação a capacidade fitorremediadora dessas plantas (LONE et al., 2008).

Figura 8 – Quantificação de chumbo em raízes, caules e folhas de SV e SET por ICP-OES.



Legenda: (A) Teor de chumbo nas raízes de SV e SET. (B) Teor de chumbo nos caules de SV e SET. (C) Teor de chumbo nas folhas de SV e SET. O teor de chumbo está expresso em mg Pb. g⁻¹ de massa seca e as medidas foram realizadas em ICP-OES com plantas de 21 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb

0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

Os valores de TF calculados para os cultivares (Tabela 1) corroboram com as diferenças na acumulação de Pb observadas entre os cultivares. Valores acima de 1 são indicativos da translocação do Pb das raízes para a parte aérea, como observado em SET, que apresenta um valor de TF de 1,687, e apresenta maior concentração de Pb nas folhas do que em relação a raiz. Diferentemente, SV apresenta valor de TF de 0,401, que indica a pouca translocação do Pb para a parte aérea (CHINMAYEE et al., 2012; ISLAM et al., 2013).

Tabela 1 – Quantificação de Pb por tecido vegetal e valores de TF para os cultivares SV e SET.

TEORES DE CHUMBO					
(mg Pb / g massa seca)					
CULTIVAR	RAIZ	CAULE	FOLHA	TF	BCF (L.g⁻¹)
SV	2,093	0,195	0,645	0,401	0,008
SET	1,279	0,254	1,834	1,687	0,020

Outra informação importante que é retirada do cálculo do TF diz respeito a indicação da habilidade de uma planta em ser utilizada para a fitorremediação de metais pesados. Plantas com valores de TF maior do que 1 são interessantes para a aplicação na fitoextração, pois elas translocam o metal que é extraído do solo para a parte aérea com eficiência, portanto, essas folhas, que contêm o metal pesado, podem ser colhidas continuamente e concomitantemente com a limpeza de uma área contaminada (TANGAHU et al., 2011). Já plantas que apresentam valor de TF menor do que 1 são consideradas metal excludoras, portanto, úteis na fitoestabilização ou fitofiltração. Vale ressaltar que o cálculo de TF não pode ser o único fator a ser considerado para classificar uma planta com capacidade de utilização na fitorremediação, mas como um dos indicativos para revelar esse potencial (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; VAN DER ENT et al., 2012).

Um fator importante também deve ser levado em consideração com relação as plantas que limitam a translocação do metal pesado para a parte aérea e, portanto, apresentam TF menor do que 1. Essa redução do transporte pode estar envolvida em uma estratégia de resistência desenvolvida pela planta para reduzir os efeitos tóxicos do metal pesado. Além dessa possibilidade, o sequestro do metal pesado por compostos orgânicos, como as fitoquelatinas, a

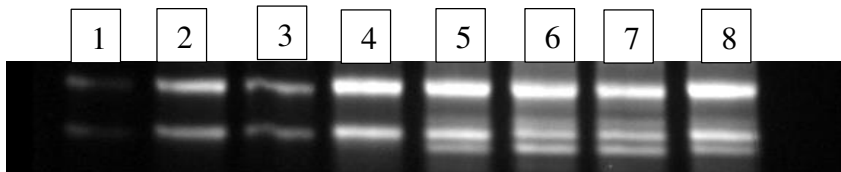
compartimentalização em vacúolos ou a imobilização em tecidos da raiz constituem algumas das principais estratégias utilizadas para o acúmulo e resistência aos efeitos dos metais pesados (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

Outro importante fator utilizado para a determinação do potencial de fitorremediação de uma planta é o BCF (Tabela 1), pois em experimentos de hidroponia esse fator é utilizado para comparar as plantas testadas e avaliar o potencial para a fitoextração. Valores de BCF e TF maiores que 1 são utilizados para classificar as plantas como hiperacumuladoras (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Portanto, comparando SV e SET é possível dizer que SET apresenta maior predisposição a ser considerada fitoextratora por apresentar um BCF maior do que SV, mas, pelo fato de ambos os cultivares apresentarem BCF menor que 1, elas não podem ser classificadas como fitoextratoras (BU-OLAYAN; THOMAS, 2009).

4.3 Gel de RNA total de raízes e folhas de Sempre Verde e Setentão

A figura 9 representa o gel de agarose 1% de RNA total de raízes e folhas dos grupos controles e tratamentos de SV e SET obtidos por eletroforese. É possível notar que todas as amostras possuem alta integridade por apresentarem as duas bandas correspondentes as subunidades do RNA ribossômico.

Figura 9 – Gel de RNA total 1% de raízes e folhas de Sempre Verde e Setentão.



Legenda: Coluna 1- raiz controle SV. Coluna 2- raiz tratamento SV. Coluna 3- raiz controle SET. Coluna 4- raiz tratamento SET. Coluna 5- folha controle SV. Coluna 6- folha tratamento SV. Coluna 7- folha controle SET. Coluna 8- folha tratamento SET.

A tabela 2 mostra as quantificações obtidas em espectrofotômetro para o RNA total. A qualidade do RNA foi considerada boa visto que as relações 260/280 e 260/230 obtidas revelaram valores que variaram de 2,08 a 2,14 e de 1,58 a 2,41 respectivamente. A média de concentração do RNA total extraído foi de 501,4 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$.

Tabela 2 – Qualidade e teores do RNA total obtido de raízes e folhas de SV e SET.

TRATAMENTO	(ng/ μ L)	A260/A280	A260/A230
SET controle raiz	163,2	2,08	1,63
SET EDTA-Pb raiz	397,5	2,11	2,15
SV controle raiz	96,7	2,08	1,58
SV EDTA-Pb raiz	426,2	2,12	1,79
SET controle folha	623,7	2,1	1,97
SET EDTA-Pb folha	796,7	2,14	1,96
SV controle folha	779,7	2,13	2,41
SV EDTA-Pb folha	749,1	2,11	2,39

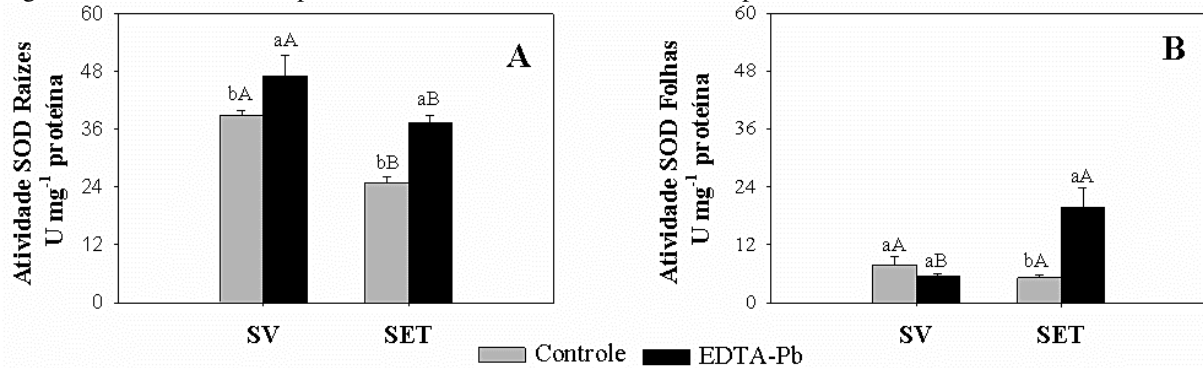
4.4 Atividade e expressão gênica relativa das enzimas antioxidantes

4.4.1 Superóxido dismutase (SOD)

O resultado da atividade da SOD em raízes e folhas de SV e SET estão mostrados na figura 10. Nas raízes de SV e SET houve aumento de atividade de 20,9% e 50%, respectivamente, quando comparada aos controles. Já para as folhas de SV, a redução na atividade da SOD não é estatisticamente significativa quando comparada a atividade do controle. Em folhas de SET houve um aumento de 284,6% em relação ao controle. Quando a comparação é feita entre os grupos tratamento entre os cultivares percebe-se que o aumento da atividade de SOD foi 20,9% maior para SV em raiz e, em folha, 270,3% maior para SET.

Observando de uma forma geral, as atividades nas raízes de SV foram maiores do que em SET, os grupos controle e tratamento dos dois cultivares em raízes apresentam maior atividade de SOD do que esses respectivos grupos em folhas para os dois cultivares, assim como observado em um experimento de estresse por Pb em alho e milho (GUPTA et al., 2009; LIU et al., 2009). Embora isso ocorra, é interessante observar que os tecidos em que há maior concentração de Pb, raízes para SV e folhas para SET, são justamente aqueles que apresentam maior acréscimo de atividade da SOD. Isso prova que a presença de Pb nos tecidos vegetais é capaz de induzir a formação em excesso de EROs e, portanto, é necessário um aumento na atividade de SOD proporcional a concentração do Pb em cada tecido para combater os efeitos adversos da presença excessiva de EROs, uma vez que a SOD é considerada a primeira linha de defesa (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; GONÇALVES et al., 2009).

Figura 10 – Atividade da superóxido dismutase em raízes e folhas de plantas controle e tratamento de SV e SET.

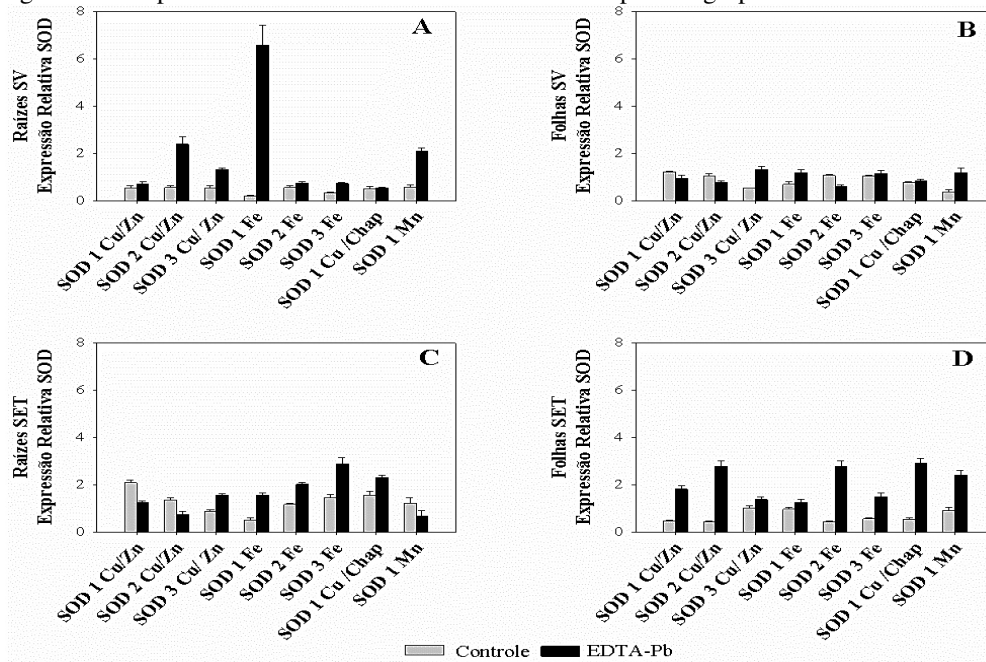


Legenda: (A) Atividade da SOD em raízes de SV e SET. (B) Atividade da SOD em folhas de SV e SET. A atividade da SOD está expressa em U mg⁻¹ proteína e as medidas foram realizadas em espectrofotômetro com extratos enzimáticos de plantas com 21 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

A expressão relativa dos genes das isoformas de SOD estão apresentados na figura 11. Nas raízes de SV (Figura 11 A) vale ressaltar que nenhum gene apresentou redução da expressão e que os genes *Vu-FeSOD1*, *Vu-Cu/ZnSOD2* e *Vu-MnSOD1* apresentaram maiores níveis de expressão em relação aos seus respectivos grupos controle. Além disso, o gene *Vu-FeSOD1* foi 33,8 vezes mais expresso no tratamento.

Para as raízes de SET (Figura 11 C), *Vu-FeSOD1*, *Vu-FeSOD3* e *Vu-Cu/ZnSOD3* foram os que apresentaram maior aumento, no entanto, *Vu-MnSOD1*, *Vu-Cu/ZnSOD1* e *Vu-Cu/ZnSOD2* reduziram a expressão quando comparados aos controles. *Vu-FeSOD1* aumentou em 3,1 vezes e *Vu-MnSOD1* decaiu 0,5 vezes.

Figura 11 – Expressão relativa de SOD em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.



Legenda: (A) Expressão relativa de SOD em raízes de SV. (B) Expressão relativa de SOD em folhas de SV. (C) Expressão relativa de SOD em raízes de SET. (D). Expressão relativa de SOD em folhas de SET. A expressão relativa de cada gene de SOD foi avaliada com relação à expressão dos genes constitutivos *EF-1 β* e *f-BOX* utilizando o programa GeNorm. Foram utilizados cDNAs de plantas com 21 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM.

Em folhas de SV (Figura 11 B), os genes *Vu-Cu/Zn SOD3*, *Vu-MnSOD1* e *Vu-FeSOD1* apresentaram aumento de expressão, enquanto que os genes *Vu-Cu/ZnSOD1*, *Vu-Cu/ZnSOD2* e *Vu-FeSOD2* tiveram redução na expressão relativa. O gene *Vu-Cu/ZnSOD3* teve aumento de 2,5 vezes em relação ao controle e o gene *Vu-Cu/ZnSOD1* reduziu em 0,6 vezes.

Para as folhas de SET (Figura 11 D), *Vu-Cu/ZnSOD2*, *Vu-FeSOD2* e *Vu-Cu/ChapSOD1* apresentaram maior aumento e nenhum gene apresentou redução de expressão relativa. *Vu-Cu/ZnSOD2* e *Vu-FeSOD2* ambos demonstraram aumento de 6,3% em relação aos seus respectivos controles.

As figuras 10 e 11 mostram que os resultados obtidos de atividade enzimática na figura 6 são corroborados pelos dados de expressão relativa dos genes de SOD. Portanto, o fato de ter havido decréscimo da atividade de SOD em raízes de SET em relação as raízes de SV, quando se compara os grupos tratamentos, está relacionado com a redução da expressão relativa de alguns genes (*Vu-MnSOD1*, *Vu-Cu/ZnSOD1* e *Vu-Cu/ZnSOD2*) nas raízes de SET. O mesmo fato também pode ser observado em folhas, pois em SV houve a redução da expressão relativa de alguns genes

(*Vu-Cu/ZnSOD1*, *Vu-Cu/ZnSOD2* e *Vu-FeSOD2*) e, portanto, menor atividade da SOD em SV em relação a SET, quando se compara as folhas dos grupos tratamento.

Sabe-se que o Pb é responsável por causar alterações no perfil de expressão das enzimas antioxidantes por aumentar ou, até mesmo, inibir a síntese delas. Em *Arabidopsis thaliana* há três genes responsáveis pela produção das isoformas de FeSOD, três pela produção de Cu/ZnSOD, um gene responsável pela produção de Cu/ChaperonaSOD e um pela MnSOD (GILL; TUTEJA, 2010).

As isoformas FeSOD2 e FeSOD3 estão localizadas no cloroplasto, enquanto que a isoforma FeSOD1 está localizada no citoplasma, sendo essa isoforma a mais expressa em plantas assim como observado, principalmente, em raízes de SV e SET. Embora a *Vu-FeSOD2* apresente redução da expressão em folhas de SV, talvez isso não seja um fator preocupante com relação a integridade dos cloroplastos, pois a *Vu-FeSOD3* é o quarto gene com maior expressão, o que pode ser suficiente para suprir a redução da presença de FeSOD2 no combate aos EROs criados em cloroplastos (PILON; RAVET; TAPKEN, 2011; RIBERA-FONSECA et al., 2013). Outro motivo que pode explicar a grande expressão de *FeSOD* está relacionado com a inibição de isoformas *Cu/ZnSOD* que, por consequência, acaba por estimular a produção de *FeSOD* (ALVAREZ et al., 2009).

A MnSOD1 está localizada em mitocôndria, sendo considerada uma das mais importantes isoformas de SOD por estar presente em todo ser vivo aeróbico e por proteger a mitocôndria contra as EROs (FERNÁNDEZ-OCAÑA et al., 2011; HOLLEY et al., 2012). Um dos efeitos causados por Pb em plantas é o aumento da demanda de ATP para tentar suprir a alta demanda energética exigida para combater os efeitos tóxicos desse metal (POURRUT et al., 2011). Como consequência dessa necessidade em aumentar a produção de ATP, há também o aumento da produção de EROs, portanto, o aumento da expressão de *Vu-MnSOD1* é importante para que se reduza os efeitos das EROs dentro da mitocôndria. Um estudo com ervilha mostra que há um grande aumento da atividade da isoforma MnSOD1 em estresse causado por Pb (MALECKA; JARMUSZKIEWICZ; TOMASZEWSKA, 2001). Esse aumento de expressão é observado em raízes e folhas de SV, estando a *Vu-MnSOD1* entre os três genes mais expressos nesses tecidos. Já para as raízes de SET, a redução na expressão relativa da *Vu-MnSOD1* pode ser um fator preocupante, pois o acúmulo de EROs podem levar a danos na mitocôndria de raízes e, assim, levar

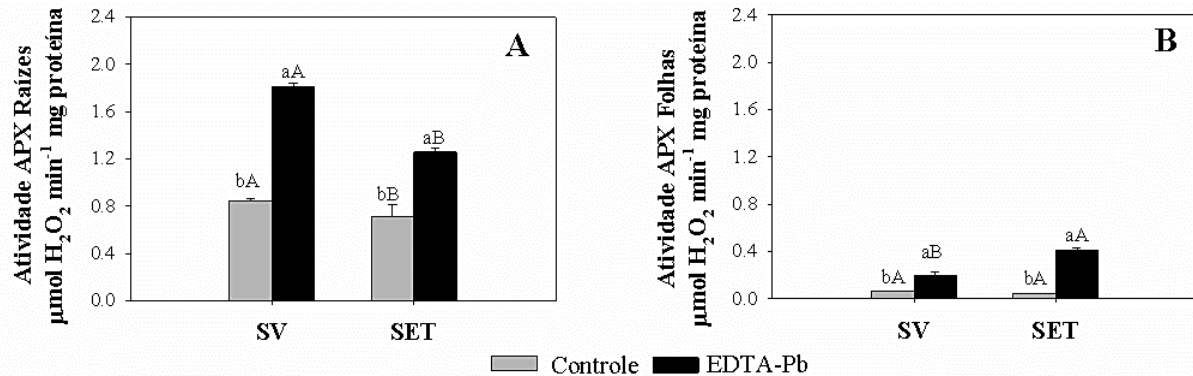
a problemas na produção de ATP que, por consequência, poderia causar a redução de atividades vitais nesse órgão, como a absorção de nutrientes.

Acredita-se que a isoforma Cu/ZnSOD1 está presente no citosol, Cu/ZnSOD2 em cloroplastos, *Cu/ZnSOD3* em peroxissomos e a Cu/ChapSOD presente tanto no citosol como em cloroplastos. Essas isoformas de Cu/ZnSOD desempenham suas atividades tanto em raízes como em folhas. A Cu/ChapSOD é responsável pela ativação das demais isoformas e, embora não haja a inibição dela em nenhum tecido, há a redução da expressão relativa de *Vu-Cu/ZnSOD1* e *Vu-Cu/ZnSOD2* nas folhas de SV e raízes de SET (CHU et al., 2005; HUANG et al., 2012; LEITCH; YICK; CULOTTA, 2009). Isso pode ser resultado de uma maior necessidade na expressão da *Cu/ZnSOD3* para a geração de sinais e induzir a transcrição de outros fatores importantes para combater os efeitos do Pb ou pelo fato de que, por estar presente em peroxissomos, ele pode contribuir com a eliminação de EROs provenientes tanto de mitocôndrias como cloroplastos ou citosol, além de que o peróxido de hidrogênio formado pela ação dessa isoforma pode ser prontamente eliminado pela ação de catalases também presentes nessa organela (CORPAS; BARROSO; DEL RÍO, 2001; DEL RÍO et al., 2006). Um estudo utilizando o cádmio (Cd), metal pesado com efeitos semelhantes ao Pb (KOVALCHUK et al., 2005), mostra que um dos efeitos causados pela presença desse metal pesado é reduzir a absorção de Cu e Zn e, dessa forma, limitar a produção de Cu/ZnSOD (ALVAREZ et al., 2009).

4.4.2 *Ascorbato peroxidase (APX)*

Nas raízes e folhas de ambos os cultivares, a atividade da APX apresentou grandes aumentos (Figura 12). O acréscimo da atividade de APX em raízes de SV foi de 114,4% e para SET de 75,9%, respectivamente. Em folhas, os valores encontrados foram de 227,9% e 840,9% para SV e SET, respectivamente. Todos os valores mostrados anteriormente foram calculados com relação aos referentes controles de cada tecido e cultivar. Já o valor de 30,7% representa o decréscimo sofrido na atividade de APX de SET em raízes em relação ao SV quando se compara somente os grupos tratamentos. Essa comparação em folhas demonstra que houve um aumento de 107% na atividade em SET com relação a SV.

Figura 12 – Atividade de APX em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET



Legenda: (A) Atividade da APX em raízes de SV e SET. (B) Atividade da APX em folhas de SV e SET. A atividade da APX está expressa em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ por mg de proteína e as medidas foram realizadas em espectrofotômetro com extratos enzimáticos de plantas com 21 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

Da mesma forma como observado na atividade de SOD, em APX as raízes de SV apresentam maior atividade do que em SET, as raízes dos dois cultivares apresentam maiores atividades do que nas folhas, tanto para os grupos controle como para os tratamentos. Diferentemente do que o observado para SOD, SV não apresenta maior aumento de atividade no tecido com maior concentração de Pb, mas em folhas onde a concentração é menor. Para SET o maior aumento de atividade de APX (840,9%) coincide com a maior concentração de Pb em folhas e para o tratamento SET apresenta maior atividade em folhas do SV.

Ao possuir alta afinidade por H_2O_2 , a APX é considerada uma das mais importantes enzimas antioxidantes, pois desempenha um papel central e fundamental ao dar continuidade no processo de eliminação de EROs e degradar o H_2O_2 em água e oxigênio com maior eficiência do que outras enzimas, como a CAT. Portanto o aumento da atividade de APX é um importante fator a ser considerado para resistência ao acúmulo de EROs causados por efeitos abióticos (GILL; TUTEJA, 2010). Como observado em plantas estressadas com Pb, ocorre o aumento da atividade de APX em resposta ao aumento da concentração de Pb e consequente aumento da produção de EROs assim como apresentado por raízes e folhas de SV e SET (MALAR et al., 2014; SHARMA; DUBEY, 2005; WANG et al., 2010).

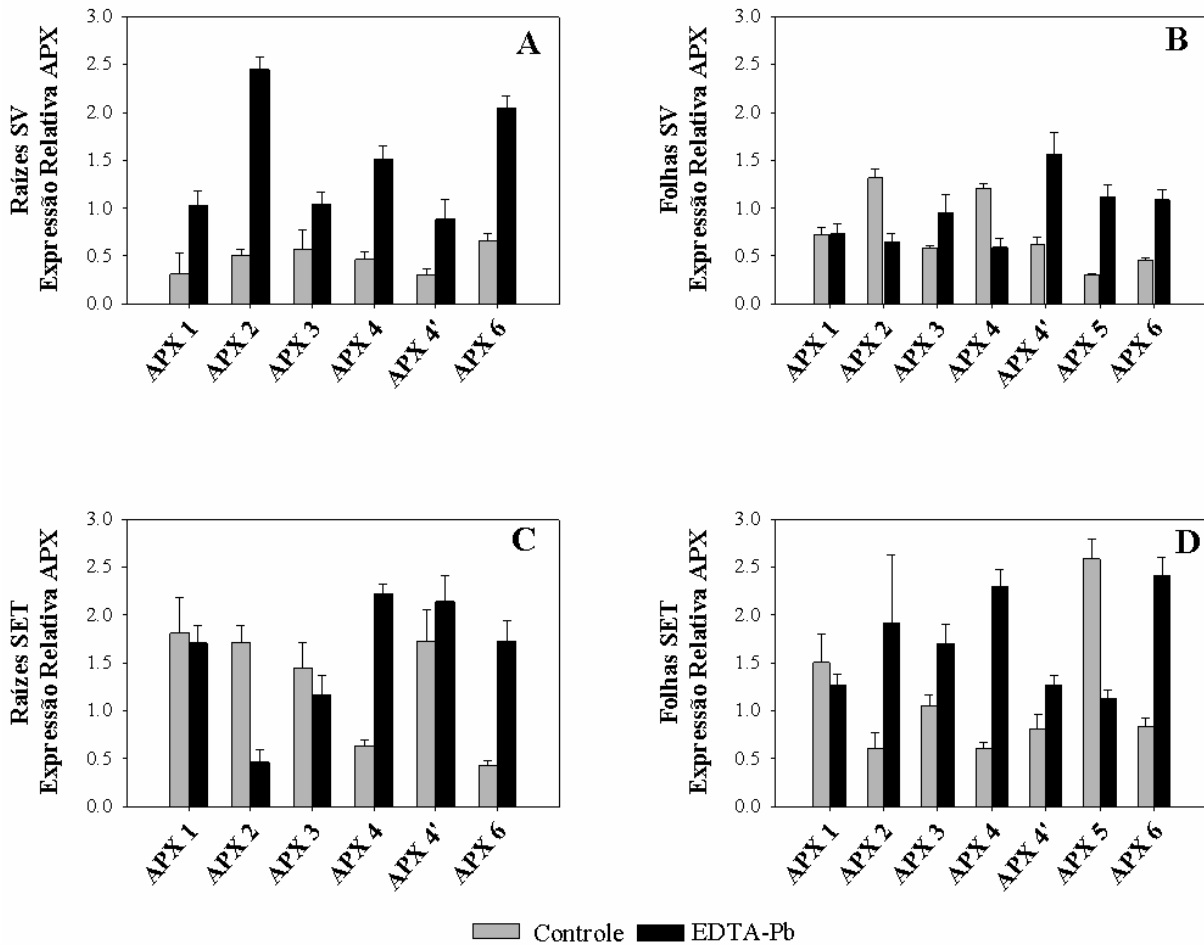
Nas raízes de SV (Figura 13 A), nenhum gene de APX sofreu redução de expressão. Os genes *Vu-APX2* (4,8 vezes), *Vu-APX1* (3,3 vezes) e *Vu-APX4* (3,2 vezes) foram os que apresentaram maior aumento em relação aos controles.

Em raízes de SET (Figura 13 C), os genes *Vu-APX6* com aumento de 4 vezes, *Vu-APX4* com 3,5 vezes e *Vu-APX4'* com aumento de 1,2 vezes foram os que apresentaram maiores acréscimos em suas expressões relativas comparadas aos respectivos controles. Já os genes *Vu-APX2*, *Vu-APX3* e *Vu-APX1* foram os que tiveram redução na expressão relativa.

Em folhas de SV (Figura 13 B), os genes *Vu-APX4* e *Vu-APX2* apresentaram reduções de 0,5 vezes ambos, enquanto *Vu-APX5* com 3,7 vezes, *Vu-APX4'* com 2,5 vezes e *Vu-APX6* com 2,4 vezes maiores expressões relativas em relação aos respectivos controles.

Em folhas de SET (Figura 13 D), os genes *Vu-APX5* e *Vu-APX1* demonstraram reduções de 0,8 e 0,4, respectivamente. Já os genes *Vu-APX4* com 4 vezes, *Vu-APX2* com 3,5 vezes e *Vu-APX6* com 1,2 vezes maiores do que os controles.

Figura 13 – Expressão relativa de APX em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.



Legenda: (A) Expressão relativa de APX em raízes de SV. (B) Expressão relativa de APX em folhas de SV. (C) Expressão relativa de APX em raízes de SET. (D). Expressão relativa de APX em folhas de SET. A expressão relativa de cada gene de APX foi avaliada com relação à expressão dos genes constitutivos *EF-1 β* e *f-BOX* utilizando o programa GeNorm. Foram utilizados cDNAs de plantas com 21 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM

A análise das figuras 12 e 13 permite inferir que a expressão dos genes *Vu-APX2*, *Vu-APX4* e *Vu-APX6* parecem determinar uma melhor atividade de APX, pois, quando apresentam aumento de expressão conjunta, eles proporcionam um incremento na atividade como demonstrado nestes exemplos. Mesmo SET apresentando redução da expressão de *Vu-APX2* em raízes, os outros dois genes são capazes de proporcionar aumento de atividade de APX, embora esse acréscimo seja menor do que em raízes de SV, que possui aumento de expressão desses três genes de APX. Para folhas, esses mesmos genes apresentam um grande aumento de expressão em SET, que garante uma alta atividade dessa enzima nesse órgão. Diferentemente, em SV, os genes *Vu-APX2* e *Vu-*

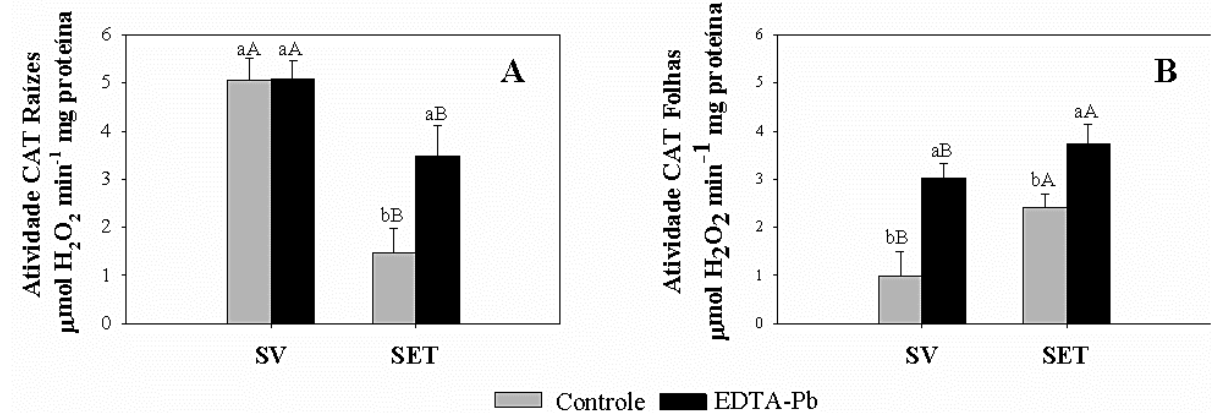
APX4 têm redução de expressão nas folhas, portanto, apresenta uma atividade de APX bem menor do que comparado ao SET, mesmo tendo apresentado bom aumento de expressão de *Vu-APX4'* e *Vu-APX5*. Mesmo possuindo maior concentração de Pb nas raízes, mais uma vez é importante notar que em SV tanto a atividade da enzima avaliada é maior como nenhum gene sofre redução de expressão nesse órgão, portanto é possível dizer que SV tem uma melhor capacidade de responder aos efeitos tóxicos de Pb nas raízes do que em relação a SET por apresentar maior atividade de APX e SOD.

Em *Arabidopsis thaliana*, acredita-se que oito isoformas de APX estão localizados em diferentes compartimentos na célula. As proteínas produzidas por esses genes estão localizadas em citoplasmas APX1, APX2 e APX6, em microssomo APX3, APX4, e APX5 e em cloroplasto com duas isoformas, que são geradas por *splicing* alternativo, localizadas uma no tilacoide e outra no estroma (PANCHUK; ZENTGRAF; VOLKOV, 2005; WANG; HECKER; HAUSER, 2014). Apesar das isoformas codificadas pelos genes nomeados de *Vu-APX4* (estroma) e *Vu-APX4'* (tilacoide) estarem, em teoria, somente presentes em cloroplastos e, portanto, em folhas, em SV e SET, elas são expressas em raízes e apresentam aumento de expressão relativa. É factível hipotetizar que a expressão desses genes nesse órgão seja possível devido ao fato de que há a presença deles em plastídios, que são precursores dos cloroplastos, e, dessa forma, esse aumento de expressão estaria direcionado aos plastídios.

4.4.3 Catalase (CAT)

A atividade de CAT em raízes e folhas de ambos os cultivares é mostrada na figura 14. Estatisticamente, o aumento de 0,7% na atividade de raízes de SV não é significativa comparada ao controle, entretanto, em SET, há um incremento de 138% com relação ao controle. Para as folhas de SV ocorre um acréscimo de 203,7% na atividade, enquanto que em SET o valor é apenas de 55,2% em relação aos respectivos controles. Quando a comparação é feita somente entre os grupos tratamentos dos cultivares, as raízes de SET apresentam um decréscimo de 31,5% e as folhas um acréscimo de 23,8% de atividade em relação a SV.

Figura 14 - Atividade de CAT em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.



Legenda: (A) Atividade da CAT em ra\u00edzes de SV e SET. (B) Atividade da CAT em folhas de SV e SET. A atividade da CAT est\u00e1 expressa em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}$ por mg de prote\u00edna e as medidas foram realizadas em espectrofot\u00f4metro com extratos enzim\u00e1ticos de plantas com 21 dias submetidas ou n\u00e3o a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A an\u00e1lise de vari\u00e2ncia de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determina\u00e7\u00e3o de diferen\u00e7as estat\u00edsticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padr\u00e3o das m\u00e9dias (SEM). Letras min\u00fasculas diferentes representam signific\u00e2ncia estat\u00edstica quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras mai\u00fasculas diferentes representam signific\u00e2ncia estat\u00edstica quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras min\u00fasculas ou mai\u00fasculas iguais significam que n\u00e3o h\u00e1 diferen\u00e7a entre as compara\u00e7\u00f5es, portanto, n\u00e3o h\u00e1 signific\u00e2ncia estat\u00edstica.

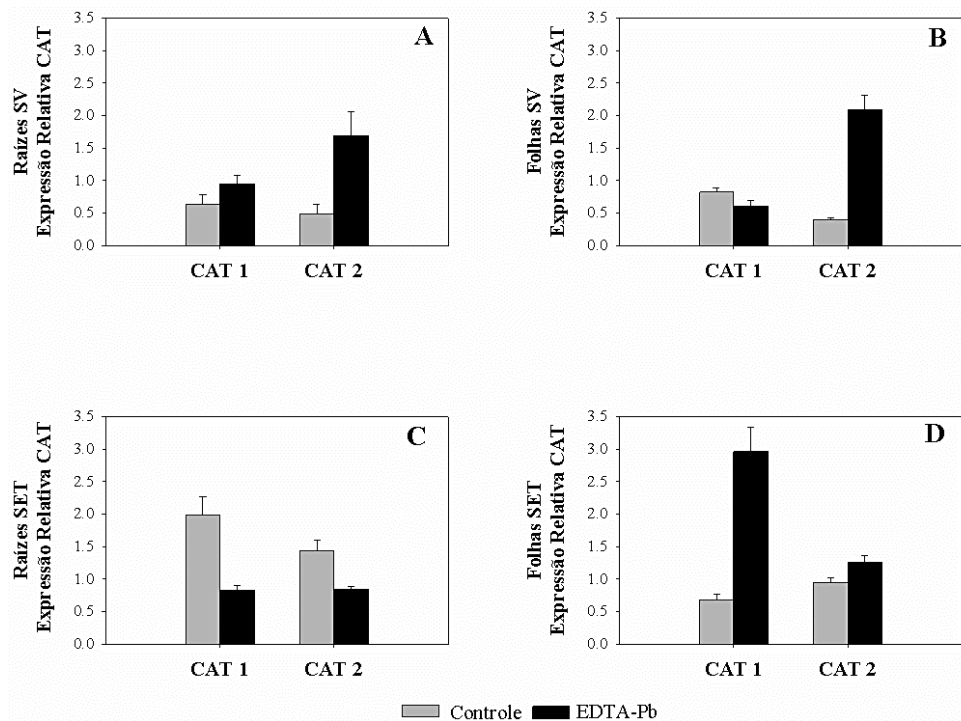
De uma forma geral, em *Arabidopsis* a atividade da CAT em folhas \u00e9 maior do que em ra\u00edzes e sementes para situa\u00e7\u00f5es normais de produ\u00e7\u00e3o de EROs (MHAMDI; NOCTOR; BAKER, 2012). H\u00e1 relatos de diferentes respostas obtidas com rela\u00e7\u00e3o a atividade de CAT em plantas submetidas ao estresse com Pb e outros metais pesados. Dependendo da esp\u00e9cie avaliada, dois tipos de respostas podem ser obtidas: aumento ou decr\u00e9scimo de atividade da CAT em somente um dos \u00f3rg\u00e3os avaliados, como ra\u00edzes ou folhas; ou ambos os \u00f3rg\u00e3os apresentam aumento de atividade, mas um deles em menor propor\u00e7\u00e3o do que o outro (PALMA; GUPTA; CORPAS, 2013). No caso de *Vigna unguiculata*, os cultivares SV e SET apresentaram aumento da atividade de CAT em ra\u00edzes e folhas, mas com diferentes propor\u00e7\u00f5es de aumento entre os \u00f3rg\u00e3os avaliados. Em SV a atividade da CAT nas ra\u00edzes foi estatisticamente semelhante ao seu controle. J\u00e1 para SET o grupo tratamento apresentou atividade 138% maior com rela\u00e7\u00e3o ao controle (Figura 14). Ao comparar os grupos de SV e SET, percebe-se que as atividades de SV s\u00e3o maiores com rela\u00e7\u00e3o aos grupos controle e tratamento. Apesar de ter menor concentra\u00e7\u00e3o de Pb em folhas, a atividade de CAT sofre grande aumento em SV, diferentemente do que o observado em SET, que tem maior concentra\u00e7\u00e3o de Pb nas folhas, mas o acr\u00e9scimo na atividade de CAT \u00e9 menor do que nas ra\u00edzes (Figura 14). Como observado nas atividades de SOD e APX, as ra\u00edzes de SV apresentam maior atividade do

que as raízes SET, tanto com relação aos controles como tratamentos. As raízes de SV também apresentam maior atividade com relação as folhas do próprio SV e do SET.

A expressão relativa de CAT em raízes de SV (Figura 15 A) revelou que *Vu-CAT2* apresentou um aumento de 3,4 vezes e *Vu-CAT1* de 1,4 vezes maior em comparação aos seus controles. Já em SET (Figura 15 C), os dois genes de CAT tiveram redução em suas expressões relativas, sendo para o *Vu-CAT1* de 0,4 e *Vu-CAT2* 0,5 vezes em relação ao controle.

Diferentemente do que o observado nas raízes de SV, em folhas (Figura 15 B) o *Vu-CAT1* apresentou redução de 0,7 vezes, enquanto que *Vu-CAT2* apresentou aumento de 5,1 vezes em relação ao controle. Já para as folhas de SET (Figura 15 D), a situação foi inversa ao observado em raízes, pois *Vu-CAT1* apresentou aumento na expressão relativa de 4,4 vezes e *Vu-CAT2* de 1,3 vezes em relação aos respectivos controles.

Figura 15 – Expressão relativa de CAT em raízes e folhas para os grupos controle e tratamento de SV e SET.



Legenda: (A) Expressão relativa de CAT em raízes de SV. (B) Expressão relativa de CAT em folhas de SV. (C) Expressão relativa de CAT em raízes de SET. (D) Expressão relativa de CAT em folhas de SET. A expressão relativa de cada gene de CAT foi avaliada com relação à expressão dos genes constitutivos *EF-1 β* e *f-BOX* utilizando o programa GeNorm. Foram utilizados cDNAs de plantas com 21 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM

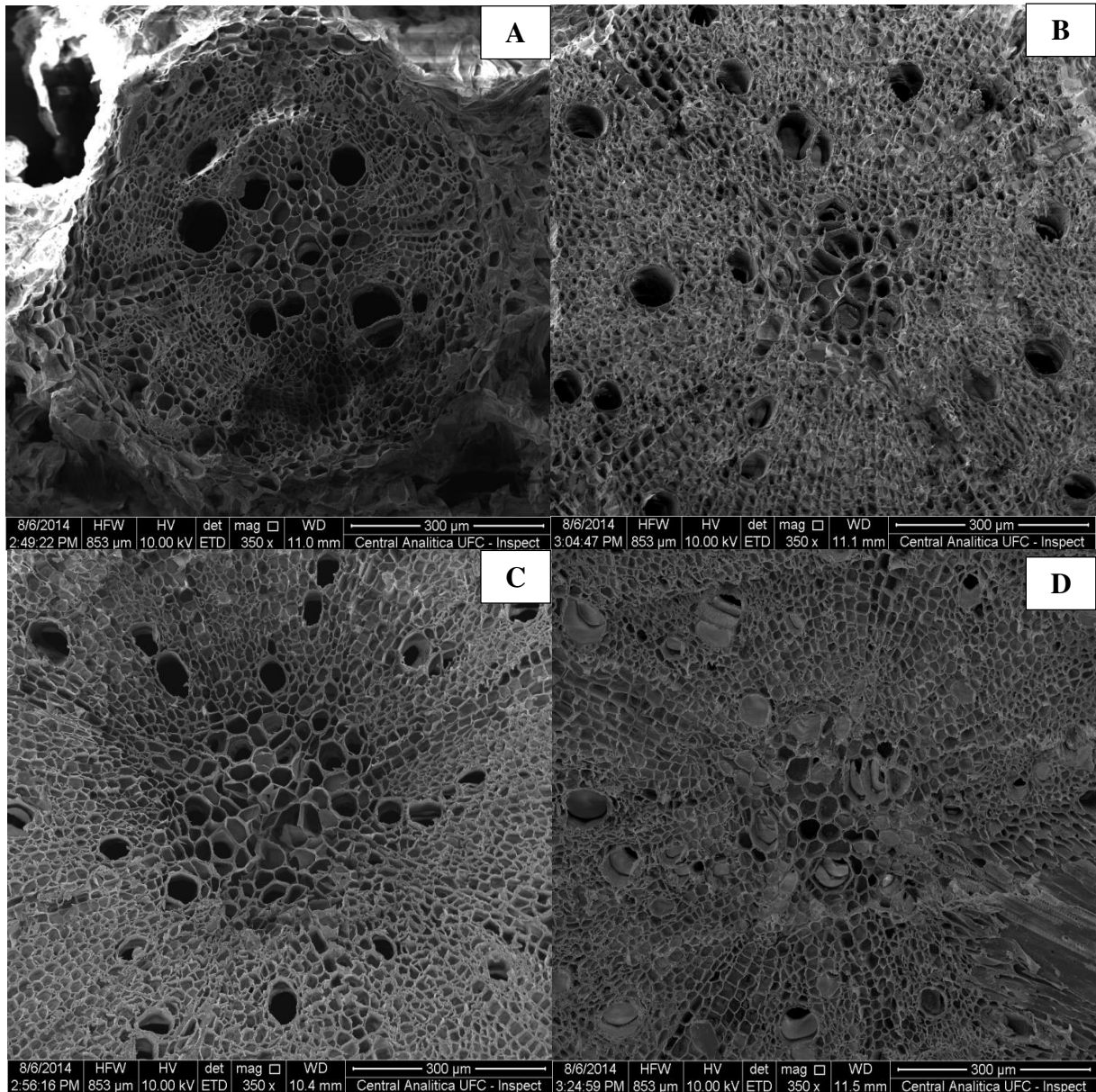
Analisando conjuntamente as figuras 14 e 15, informações interessantes podem ser retiradas. Assim como observado em um experimento com *Arabidopsis thaliana*, o gene *CAT2* possui maior expressão em folhas, sendo, assim, o mais determinante para uma maior atividade de CAT em folhas de SV (MHAMDI; NOCTOR; BAKER, 2012). Essa condição pode ser provada quando se observa o fato de que mesmo o gene *Vu-CAT1* tendo sofrido redução na expressão em folhas de SV, houve aumento da atividade de CAT em folhas somente com o aumento da expressão de *Vu-CAT2*. Embora em *Arabidopsis* o gene *CAT1* seja pouco expresso em folhas, em SET, houve um grande aumento da expressão de *Vu-CAT1* em folhas, no entanto, isso não implicou em um acréscimo significativo da atividade de CAT quando comparado ao aumento da atividade em folhas de SV, que teve um incremento maior na expressão de *Vu-CAT2* (MHAMDI et al., 2010). Como sugerido anteriormente, a atividade de CAT em raízes de SV parece estar acontecendo no limite máximo, pois, mesmo havendo aumento da expressão relativa dos dois genes de CAT nesse órgão, não ocorre aumento estatisticamente significativo da atividade, embora esse aumento de expressão, talvez, seja necessário para manter essa atividade elevada. O decréscimo na expressão de *Vu-CAT1* e *Vu-CAT2* em raízes de SET parece não ter efeito na atividade dessa enzima, pois ela apresenta aumento de atividade, mesmo tendo sofrido redução da expressão dos genes. Juntamente com SOD e APX, a CAT apresenta alta atividade e nenhuma redução de expressão em raízes de SV, portanto, isso comprova mais uma vez a capacidade desse órgão em responder com eficiência ao aumento de EROs.

4.3 Microscopia eletrônica de varredura

Apesar de nenhum efeito morfológico ter sido observado nas raízes de ambos os cultivares (Figura 16), mesmo SV apresentando maior concentração de Pb nesse órgão, sabe-se que o Pb é responsável por causar diversas alterações na morfologia de raízes, como alteração do tamanho das células do floema e xilema e deformação das células da zona cortical (KAUR et al., 2014). Acredita-se que esses efeitos são causados não diretamente pelo Pb, mas pela produção excessiva de EROs causado pela presença Pb (KAUR et al., 2014). Portanto, como as raízes de SV e SET apresentam boa atividade das enzimas antioxidantes é possível supor que a não alteração da morfologia pode ter sido causado por um efeito protetor dessas enzimas ao eliminar o excesso de EROs, embora outros efeitos tenham sido observados visualmente nas raízes de ambos os

cultivares, sendo mais acentuados em SET, como redução do tamanho, redução na emissão de raízes secundárias, aparência rígida e quebradiça. Um motivo que pode explicar a rigidez das raízes e que representa uma estratégia para reduzir os efeitos tóxicos do Pb é com relação à deposição desse metal na parede celular das raízes (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

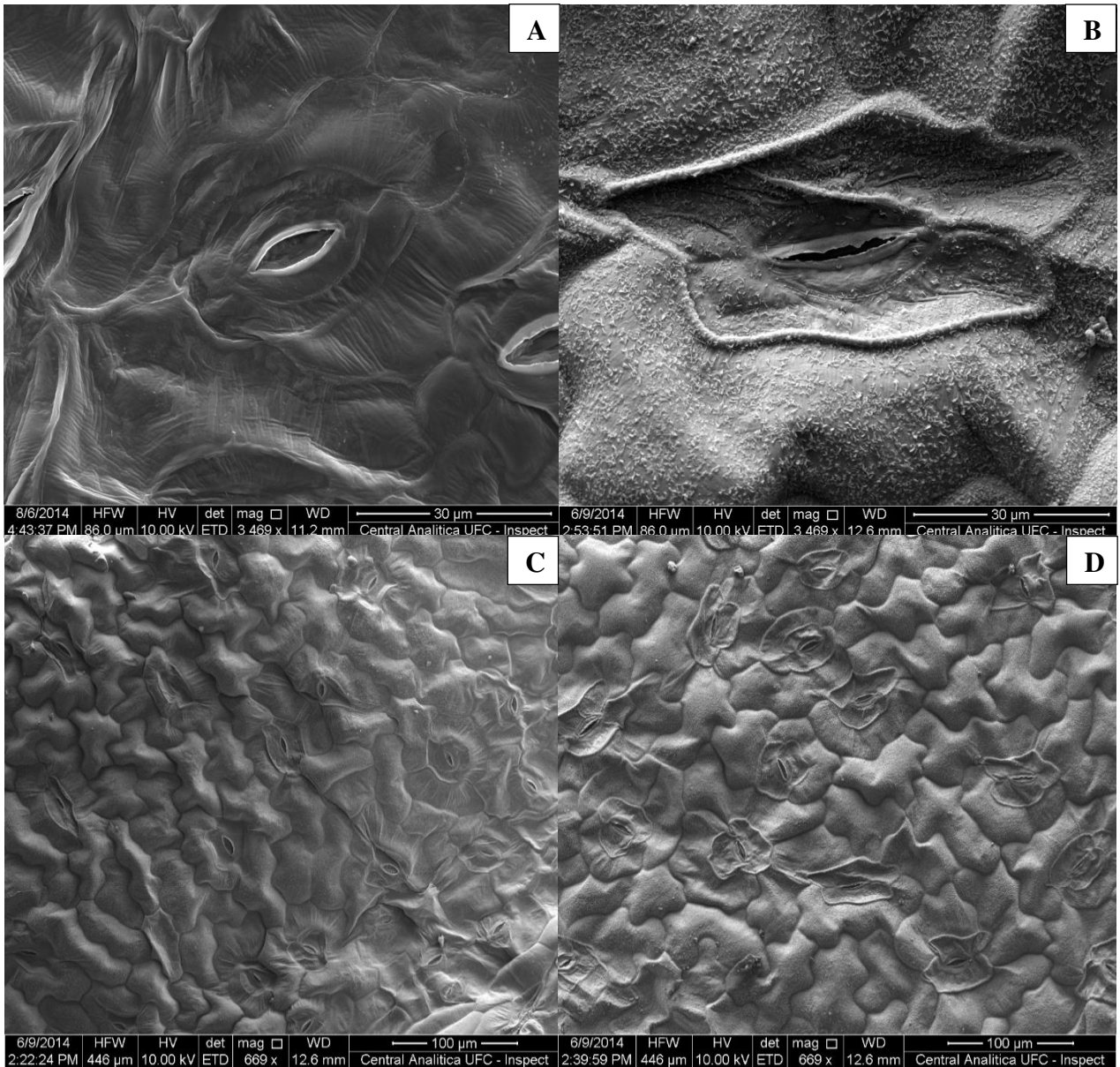
Figura 16 – Micrografias de raízes de SV e SET.



Legenda: (A) Raiz de SV controle. (B) Raiz de SV tratamento. (C) Raiz de SET controle. (D) Raiz de SET tratamento. Cortes realizados a mão livre 1 cm acima da zona pilífera e micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura.

Diferentemente do que o observado em raízes, em ambos os cultivares há diferenças aparentes nas superfícies das folhas entre os grupos controle e o grupo tratamento. Nas folhas do grupo tratamento de SV (Figura 17) é possível observar uma maior quantidade de distribuição de cera na superfície foliar e uma menor abertura estomática, enquanto nas folhas do grupo controle, a distribuição de cera é menor e a abertura dos estômatos maior.

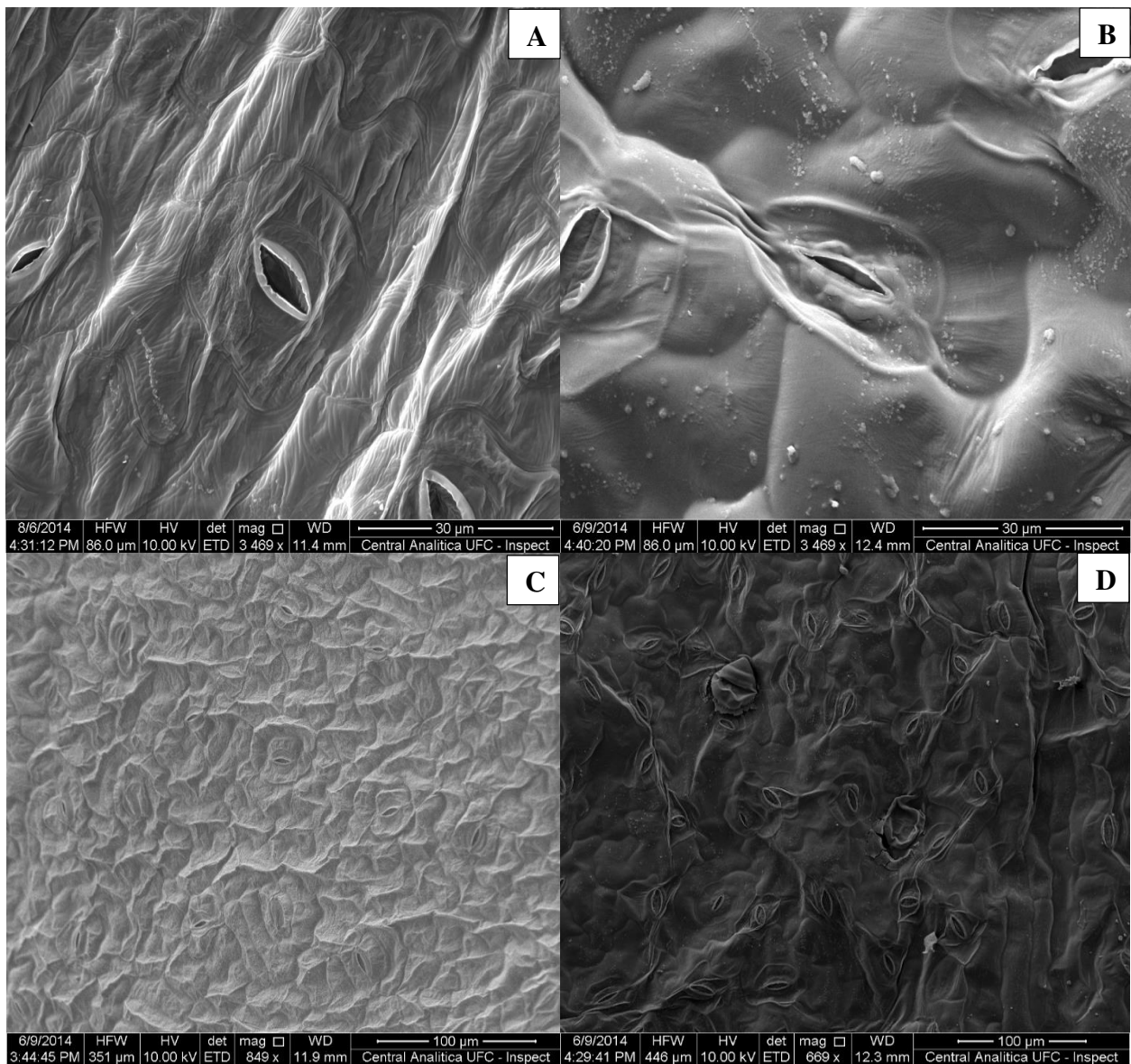
Figura 17 – Micrografias de folhas de SV.



Legenda: (A) Folha de SV controle com detalhe para a distribuição de cera. (B) Folha de SV tratamento com detalhe para a distribuição de cera. (C) Folha de SV controle com detalhe para a abertura dos estômatos. (D) Folha de SV tratamento com detalhe para a abertura dos estômatos. Cortes realizados a mão livre, evitando-se nervuras e micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura.

Já para as folhas de SET (Figura 18), o grupo tratamento, aparentemente, apresenta a mesma quantidade de cera distribuída na superfície foliar e a abertura estomática semelhante ao grupo controle. Quando a comparação é feita entre as folhas tratamento de SET e SV é possível dizer que SET apresenta menor quantidade de cera e maior abertura dos estômatos.

Figura 18 – Micrografias de folhas de SET.



Legenda: **(A)** Folha de SET controle com detalhe para a distribuição de cera. **(B)** Folha de SET tratamento com detalhe para a distribuição de cera. **(C)** Folha de SET controle com detalhe para a abertura dos estômatos. **(D)** Folha de SET tratamento com detalhe para a abertura dos estômatos. Cortes realizados a mão livre, evitando-se nervuras e micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura.

Resultados semelhantes são obtidos nas folhas de outras plantas estressadas com diferentes concentrações de Pb (ALKHATIB et al., 2012; GHELICH; ZARINKAMAR, 2013). O aumento da distribuição de ceras na superfície foliar, o fechamento dos estômatos, alteração da plasticidade celular e alteração da pressão de turgor são consequências causadas pela presença de íons de Pb na planta. Ocorre o acúmulo do hormônio vegetal ácido abscísico (ABA) em raízes e em folhas causa o fechamento dos estômatos, portanto, interfere na transpiração foliar e na troca gasosa. Já a deposição de cutícula na folha reduz a respiração (POURRUT et al., 2011). Como em folhas de SET, aparentemente, esses efeitos não são observados com a mesma intensidade do que em SV, pode ser sugerido que esse órgão está melhor adaptado em SET do que em SV ao estresse por Pb em folhas, mesmo possuindo maior concentração desse metal pesado nesse tecido.

5 CONCLUSÃO

Os cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET) de *Vigna unguiculata* absorvem chumbo e acumulam esse metal pesado nas raízes e nas folhas, respectivamente. O perfil de atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT e APX nas raízes e nas folhas de ambos cultivares aumentaram em presença de chumbo. Com relação a expressão gênica, SV revelou aumento de expressão para todas as enzimas avaliadas em raízes, enquanto em SET mostrou redução da expressão de *Vu-APX1* e *Vu-APX5* nas folhas. A avaliação microscópica revelou distribuição diferencial das ceras nas folhas desses cultivares sendo encontrada maior produção nas folhas de SV. Tais resultados sugerem uma regulação diferencial concernente a proteção contra espécies reativas de oxigênio geradas pelo estresse provocado pelo chumbo e, aparentemente, uma maior tolerância do cultivar SV. Contudo, nenhum dos cultivares revelou potencial para a fitorremediação.

REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY ATSDR. **Lead Toxicity What Are the Physiologic Effects of Lead Exposure?** Agency for Toxic Substances and Disease Registry Center for Diseases Control, , 2012.
- AHMADPOUR, P. et al. Phytoremediation of heavy metals: A green technology. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 76, p. 14036–14043, 20 set. 2012.
- ALFORD, É. R.; PILON-SMITS, E. A. H.; PASCHKE, M. W. Metallophytes—a view from the rhizosphere. **Plant and Soil**, v. 337, n. 1-2, p. 33–50, 18 jul. 2010.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals-Concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–81, maio 2013.
- ALKHATIB, R. et al. Physiological and ultrastructural effects of lead on tobacco. **Biologia Plantarum**, v. 56, n. 4, p. 711–716, 18 fev. 2012.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331–1341, 2002.
- ALVAREZ, S. et al. Comprehensive analysis of the Brassica juncea root proteome in response to cadmium exposure by complementary proteomic approaches. **Proteomics**, v. 9, n. 9, p. 2419–31, maio 2009.
- ANJUM, S. A. et al. Morphological , physiological and biochemical responses of plants to drought stress. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 9, p. 2026–2032, 2011.
- BONIFACIO, A. et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, cell & environment**, v. 34, n. 10, p. 1705–22, out. 2011.
- BOSSO, S. T.; ENZWEILER, J. Bioaccessible lead in soils, slag, and mine wastes from an abandoned mining district in Brazil. **Environmental geochemistry and health**, v. 30, n. 3, p. 219–29, jun. 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.
- BU-OLAYAN, A. H.; THOMAS, B. V. Translocation and Bioaccumulation of Trace Metals in Desert Plants of Kuwait Governorates. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 3, n. 5, p. 581–587, 2009.

CAPITANI, E. M. DE; PAOLIELLO, M. M. B.; ALMEIDA, G. R. C. DE. Fontes de exposição humana ao chumbo no Brasil. **Revista do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP - Brasil**, v. 42, n. 3, p. 311–318, 2009.

CAVERZAN, A. et al. Plant responses to stresses: Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 4 (suppl), p. 1011–9, dez. 2012.

Central Analítica -UFC. Disponível em:

<<http://www.centralanalitica.ufc.br/index.php/gest%C3%A3o/manuais-de-operacao>>. Acesso em: 27 set. 2014.

CHEN, X. et al. CGKB: an annotation knowledge base for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) methylation filtered genomic genespace sequences. **BMC bioinformatics**, v. 8, p. 129, jan. 2007.

CHINMAYEE, M. D. et al. The assessment of phytoremediation potential of invasive weed *Amaranthus spinosus* L. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 167, n. 6, p. 1550–9, jul. 2012.

CHU, C. et al. A Copper Chaperone for Superoxide Dismutase That Confers Three Types of Copper / Zinc Superoxide Dismutase Activity in *Arabidopsis* 1. **Plant physiology**, v. 139, n. September, p. 425–436, 2005.

CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B.; DEL RÍO, L. A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 4, p. 145–150, abr. 2001.

D C, A. et al. Heavy metals. In: HILLEL, D. (Ed.). . **Encyclopedia of Soils in the Environment**. Four- Volu ed. [s.l.] Elsevier, 2005. p. 175–182.

DE CARVALHO GOMES, F. et al. Heavy metals in sediment profiles from Sepetiba and Ribeira Bays: A comparative study. **Radioprotection**, v. 44, n. 5, p. 243–250, 6 jun. 2009.

DE FREITAS, C. U. et al. Lead exposure in an urban community: investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures. **Environmental research**, v. 103, n. 3, p. 338–44, mar. 2007.

DEL RÍO, L. A et al. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 330–5, jun. 2006.

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS-USDA. **Vigna unguiculata (L.) Walp.** Disponível em: <<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=VIUN>>. Acesso em: 15 out. 2014.

DONCHEVA, S. et al. Plant response to lead in the presence or absence EDTA in two sunflower genotypes (cultivated *H. annuus* cv. 1114 and interspecific line *H. annuus* × *H. argophyllus*). **Environmental science and pollution research international**, v. 20, n. 2, p. 823–33, fev. 2013.

FAO. **Grassland species index- *Vigna unguiculata***. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agp/AGPC/doc/gbase/data/Pf000090.HTM>>. Acesso em: 15 out. 2014.

FENTONA, R.; CHEMIZMU, D. K. FENTON REACTION - CONTROVERSY CONCERNING THE CHEMISTRY Fenton chemistry - the controversies. **Ecological Chemistry and Engineering**, v. 16, n. 3, p. 347–358, 2009.

FERNÁNDEZ-OCAÑA, A. et al. Functional analysis of superoxide dismutases (SODs) in sunflower under biotic and abiotic stress conditions. Identification of two new genes of mitochondrial Mn-SOD. **Journal of plant physiology**, v. 168, n. 11, p. 1303–8, 15 jul. 2011.

FILHO, F. R. F. et al. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) na região do Nordeste. In: **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**. [s.l.] Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa, 1997. p. 1–30.

FILHO, F. R. F. et al. **Panorama da cultura do feijão-caupi no Brasil** 12 Workshop sobre Cultura do Feijão-caupi em Roraima. **Anais...**2006

FILHO, F. R. F. et al. **Feijão-Caupi no Brasil- Produção, Melhoramento Genético, Avanços e Desafios**. Teresina -Pi: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária -Embrapa Meio-Norte, 2011. p. 1–80

FITCH, A. The Introduction: Man Asks Lead out Mines and Mining. In: FITCH, A. (Ed.). . **Sublime Lead: The Biography of a 5000 Year Toxic Love Affair**. Chicago: Loyola University, 2004a. p. 31–95.

FITCH, A. Man Courts Lead Metallurgy and Alloys. In: FITCH, A. (Ed.). . **Sublime Lead: The Biography of a 5000 Year Toxic Love Affair**. Chicago: Loyola University, 2004b. p. 97–149.

FITCH, A. The Marriage Bed (The Physiological Relationship Between Lead and Humanity). In: FITCH, A. (Ed.). . **Sublime Lead: The Biography of a 5000 Year Toxic Love Affair**. Chicago: Loyola University, 2004c. p. 359–412.

FREITAS, A. C. R. DE. **Importância econômica do feijão-caupi**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/feijao-caupi/arvore/CONTAG01_14_510200683536.html>. Acesso em: 15 out. 2014.

GHELICH, S.; ZARINKAMAR, F. Histological and ultrastructure changes in *Medicago sativa* in. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 2, n. 2, p. 20–29, 2013.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309–314, 1977.

- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 48, n. 12, p. 909–30, dez. 2010.
- GONÇALVES, J. F. et al. Response of *Cucumis sativus* L. seedlings to Pb exposure. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 21, n. 3, p. 175–186, 2009.
- GOVINDASAMY, C. et al. Concentration of heavy metals in Seagrasses tissue of the Palk Strait, Bay of Bengal. **International Journal of Environmental Sciences**, v. 2, n. 1, p. 145–153, 2011.
- GRAEDEL, T. E.; GERST, M. D. **Metal Stocks in Society- Scientific Synthesis**. [s.l.: s.n.].
- GUPTA, D. K. et al. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown *Zea mays* seedlings under moderate lead stress. **Journal of hazardous materials**, v. 172, n. 1, p. 479–84, 15 dez. 2009.
- GUPTA, D. K.; HUANG, H. G.; CORPAS, F. J. Lead tolerance in plants: strategies for phytoremediation. **Environmental science and pollution research international**, v. 20, n. 4, p. 2150–61, abr. 2013.
- HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant physiology**, v. 84, n. 2, p. 450–5, jun. 1987.
- HELLEMANS, J. et al. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome biology**, v. 8, n. 2, p. R19, jan. 2007.
- HOAGLAND, D. .; ARNON, D. . The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil THE COLLEGE OF AGRICULTURE. **California Agricultural Experiment Station**, 1950.
- HOLLEY, A. K. et al. Manganese superoxide dismutase: beyond life and death. **Amino acids**, v. 42, n. 1, p. 139–58, jan. 2012.
- HU, R. et al. Physiological responses and tolerance mechanisms to Pb in two xerophils: *Salsola passerina* Bunge and *Chenopodium album* L. **Journal of hazardous materials**, v. 205-206, p. 131–8, 29 fev. 2012.
- HUANG, C.-H. et al. Copper chaperone-dependent and -independent activation of three copper-zinc superoxide dismutase homologs localized in different cellular compartments in *Arabidopsis*. **Plant physiology**, v. 158, n. 2, p. 737–46, fev. 2012.
- HUANG, H. et al. Role of EDTA in alleviating lead toxicity in accumulator species of *Sedum alfredii* H. **Bioresource technology**, v. 99, n. 14, p. 6088–96, set. 2008.

ISLAM, S.; WAHID, U.-Z.; MOKHLESUR, R. Phytoaccumulation of Arsenic from Arsenic Contaminated Soils by *Eichhornia Crassipes* L., *Echinochloa Crusgalli* L. and *Monochoria Hastata* L. in Bangladesh. **International Journal of Environmental Protection**, v. 3, n. 4, p. 17–27, 2013.

JACKSON, A.; FITCH, A. Setting the Stage. In: FITCH, A. (Ed.). **Sublime Lead: The Biography of a 5000 Year Toxic Love Affair**. Chicago: Loyola University, 2004. p. 1–29.

JLASSI, A. et al. PHYTODESALINATION OF A MODERATELY-SALT-AFFECTED SOIL BY *SULLA CARNOSA*. **International Journal of Phytoremediation**, v. 15, n. 4, p. 398–404, 10 set. 2012.

JORDÃO, C. P. et al. Distribution of Heavy Metals in Environmental Samples Near Smelters and Mining Areas in Brazil. **Environmental Technology**, v. 20, n. 5, p. 489–498, 1 maio 1999.

KAUR, G. et al. Morphological, anatomical, and ultrastructural changes (visualized through scanning electron microscopy) induced in *Triticum aestivum* by Pb(2+) treatment. **Protoplasma**, v. 251, p. 1407–1416, 9 maio 2014.

KEHRER, J. P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43–50, ago. 2000.

KIM, J.-H. et al. Comparison of three different kits for extraction of high-quality RNA from frozen blood. **SpringerPlus**, v. 3, p. 76, jan. 2014.

KOPITTKE, P. M. et al. Trace metal phytotoxicity in solution culture: a review. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 4, p. 945–54, fev. 2010.

KOVALCHUK, I. et al. Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. **Mutation research**, v. 570, n. 2, p. 149–61, 1 mar. 2005.

KUIPER, I. et al. Rhizoremediation : A Beneficial Plant-Microbe Interaction Bioremediation : A natural method. **The American Phytopathological Society**, v. 17, n. 1, p. 6–15, 2004.

LADO, L. R.; HENGL, T.; REUTER, H. I. Heavy metals in European soils: A geostatistical analysis of the FOREGS Geochemical database. **Geoderma**, v. 148, n. 2, p. 189–199, dez. 2008.

LEITCH, J. M.; YICK, P. J.; CULOTTA, V. C. The right to choose: multiple pathways for activating copper,zinc superoxide dismutase. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 37, p. 24679–83, 11 set. 2009.

LIU, D. et al. Uptake and accumulation and oxidative stress in garlic (*Allium sativum* L.) under lead phytotoxicity. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 18, n. 1, p. 134–43, jan. 2009.

LONE, M. I. et al. Phytoremediation of heavy metal polluted soils and water: progresses and perspectives. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 9, n. 3, p. 210–20, mar. 2008.

- MALAR, S. et al. Lead heavy metal toxicity induced changes on growth and antioxidative enzymes level in water hyacinths [*Eichhornia crassipes* (Mart.)]. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, p. 54, 2014.
- MALECKA, A; JARMUSZKIEWICZ, W.; TOMASZEWSKA, B. Antioxidative defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. **Acta biochimica Polonica**, v. 48, n. 3, p. 687–98, jan. 2001.
- MALIK, N.; BISWAS, A. K. ROLE OF HIGHER PLANTS IN REMEDIATION OF METAL CONTAMINATED SITES. **Scientific Reviews & Chemical Communications.**, v. 2, n. 2, p. 141–146, 2012.
- MARSHALL, O. J. PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 20, n. 15, p. 2471–2, 12 out. 2004.
- MARTIN, T. A.; RUBY, M. V. Review of in situ remediation technologies for lead, zinc, and cadmium in soil. **Remediation Journal**, v. 14, n. 3, p. 35–53, jan. 2004.
- MEERS, E. et al. The use of bio-energy crops (*Zea mays*) for “phytoattenuation” of heavy metals on moderately contaminated soils: a field experiment. **Chemosphere**, v. 78, n. 1, p. 35–41, jan. 2010.
- MHAMDI, A. et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 15, p. 4197–220, out. 2010.
- MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 181–94, 15 set. 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Saúde Brasil 2007: uma análise da situação de saúde.** [s.l: s.n.].
- MITTLER, R. Oxidative stress , antioxidants and stress tolerance. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.
- MONTEIRO-NETO, C. et al. Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea : ‘ , northeast Brazil Delphinidae) off the coast of Ceara. **Environmental Pollution**, v. 123, p. 319–324, 2003.
- MOOSAVI, S. G.; SEGHATOLESLAMI, M. J. Phytoremediation : A review. **Advance in Agriculture and Biology**, v. 1, n. 1, p. 5–11, 2013.
- MUKHOPADHYAY, S.; MAITI, S. K. phytoremediation of metal enriched mine waste a review.pdf. **Global Journal of Environmental Research**, v. 4, n. 3, p. 135–150, 2010.
- NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 199–216, 28 jul. 2010.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. **Plant & cell physiology**, v. 22, n. 5, p. 867–880, 1981.

National Center for Biotechnology Information. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 19 set. 2014.

NATIONAL RISK MANAGEMENT RESEARCH LABORATORY. **Introduction to Phytoremediation**. Cincinnati: [s.n.].

PAIVA, J. B. et al. “ SETENTÃO ” UMA NOVA CULTIVAR DE FEIJÃO-DE-CORDA PARA O ESTADO DO CEARÁ. **Acta bot. bras.**, v. 4, n. 2, p. 165–169, 1990.

PALMA, J.; GUPTA, D.; CORPAS, F. Metalloenzymes Involved in the Metabolism of Reactive Oxygen Species and Heavy Metal Stress. In: GUPTA, D. K.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M. (Eds.). . **Heavy Metal Stress in Plants SE - 1**. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 1–17.

PANCHUK, I. I.; ZENTGRAF, U.; VOLKOV, R. A. Expression of the Apx gene family during leaf senescence of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 222, n. 5, p. 926–32, nov. 2005.

PANELLA, L.; GEPTS, P. Genetic relationships within *Vigna unguiculata* (L) Walp based on isozyme analyses. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 39, p. 71–88, 1992.

PAOLIELLO, M. M. B. et al. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. **Environmental research**, v. 88, n. 2, p. 120–8, fev. 2002.

PAZ-ALBERTO, A. M.; SIGUA, G. C. Phytoremediation : A Green Technology to Remove Environmental Pollutants. **American Journal of Climate Change**, v. 2, p. 71–86, 2013.

PILON, M.; RAVET, K.; TAPKEN, W. The biogenesis and physiological function of chloroplast superoxide dismutases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1807, n. 8, p. 989–98, ago. 2011.

POURRUT, B. et al. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. In: WHITACRE, D. M. (Ed.). . **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Volume 213 ed. [s.l.] Springer, 2011. p. 113–136.

PROMEGA. **ImProm-II™ Reverse Transcription System Protocol**. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/0/impromii-reverse-transcription-system-protocol/>>. Acesso em: 14 set. 2014.

PUNAMIYA, P. et al. Symbiotic role of *Glomus mosseae* in phytoextraction of lead in vetiver grass [*Chrysopogon zizanioides* (L.)]. **Journal of hazardous materials**, v. 177, n. 1-3, p. 465–74, 15 maio 2010.

QIAGEN. **Rneasy Mini Handbook**. Disponível em: <<http://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=14e7cf6e-521a-4cf7-8cbc-bf9f6fa33e24&lang=en>>. Acesso em: 14 set. 2014.

RABHI, M. et al. Phytodesalination of a salt-affected soil with the halophyte *Sesuvium portulacastrum* L. to arrange in advance the requirements for the successful growth of a glycophytic crop. **Bioresource technology**, v. 101, n. 17, p. 6822–8, set. 2010.

RAMOS, F.; COSTA, J. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 15, n. 2, p. 119–129, 2004.

RASCIO, N.; NAVARI-IZZO, F. Heavy metal hyperaccumulating plants: how and why do they do it? And what makes them so interesting? **Plant science : an international journal of experimental plant biology**, v. 180, n. 2, p. 169–81, fev. 2011.

RIBERA-FONSECA, A. et al. Early induction of Fe-SOD gene expression is involved in tolerance to Mn toxicity in perennial ryegrass. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 73, p. 77–82, dez. 2013.

ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY. **Lead - Element information, properties and uses | Periodic Table**. Disponível em: <<http://www.rsc.org/periodic-table/element/82/lead>>. Acesso em: 7 out. 2014.

SAIFULLAH et al. EDTA-assisted Pb phytoextraction. **Chemosphere**, v. 74, n. 10, p. 1279–91, mar. 2009.

SALAZAR, M. J.; PIGNATA, M. L. Lead accumulation in plants grown in polluted soils. Screening of native species for phytoremediation. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 137, p. 29–36, fev. 2014.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; HASEGAWA, P. M. An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. **Plant molecular biology**, v. 17, n. 765, p. 11–17, 1999.

SANTOS, L. F. P. et al. Assessment of cadmium and lead in commercially important seafood from São Francisco do Conde, Bahia, Brazil. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 193–199, set. 2013.

SENGAR, R. S. et al. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 196. In: WHITACRE, D. M. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York, NY: Springer US, 2008. v. 196p. 73–87.

SEREGIN, I. V.; SHPIGUN, L. K.; IVANOV, V. B. Distribution and Toxic Effects of Cadmium and Lead on Maize Roots. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 4, p. 525–533, jul. 2004.

SHAHID, M. et al. Assessing the effect of metal speciation on lead toxicity to *Vicia faba* pigment contents. **Journal of Geochemical Exploration**, p. 1–8, jan. 2014.

SHAHID, M.; PINELLI, E.; DUMAT, C. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation; role of synthetic and natural organic ligands. **Journal of hazardous materials**, v. 219-220, p. 1–12, 15 jun. 2012.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead Toxicity in plants. **Toxic Metals in Plants**, v. 17, n. 1, p. 35–52, 2005.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A. S.; POONIA, P. Role of Hyperaccumulators in Phytoextraction of Metals From Contaminated Mining Sites: A Review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 168–214, 30 dez. 2010.

SHU, X. et al. Effect of Pb toxicity on leaf growth, antioxidant enzyme activities, and photosynthesis in cuttings and seedlings of *Jatropha curcas* L. **Environmental science and pollution research international**, v. 19, n. 3, p. 893–902, mar. 2012.

SILVA, B. C. E.; TEIXEIRA, J. A. DE A. B. Mineração de metais não-ferrosos: Chumbo. In: **Economia Mineral do Brasil**. Brasília: DEPARTAMENTO NACIONAL DE PRODUÇÃO MINERAL – DNPM, 2009. p. 198–215.

TANGAHU, B. V. et al. A Review on Heavy Metals (As, Pb, and Hg) Uptake by Plants through Phytoremediation. **International Journal of Chemical Engineering**, v. 2011, p. 1–31, 2011.

UNIVERSITY OF ILLINOIS. **Real Time PCR Handbook- Melting Curve**. Disponível em: <<http://www.uic.edu/depts/rrc/cgf/realtime/melt.html>>. Acesso em: 23 set. 2014.

UNIVERSITY OF THE WEST OF ENGLAND. In-depth Report: Soil Contamination : Impacts on Human Health. **Science for Environmental Policy**, n. 5, p. 1–29, 2013.

VAN DER ENT, A. et al. Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction. **Plant and Soil**, v. 362, n. 1-2, p. 319–334, 22 maio 2012.

VITHANAGE, M. et al. Arsenic uptake by plants and possible phytoremediation applications: a brief overview. **Environmental Chemistry Letters**, v. 10, n. 3, p. 217–224, 28 dez. 2011.

WANG, C. et al. Lead-contaminated soil induced oxidative stress, defense response and its indicative biomarkers in roots of *Vicia faba* seedlings. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 19, n. 6, p. 1130–9, ago. 2010.

WANG, Y.-Y.; HECKER, A. G.; HAUSER, B. A. The APX4 locus regulates seed vigor and seedling growth in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v. 239, n. 4, p. 909–19, abr. 2014.

XIA, H. P. Ecological rehabilitation and phytoremediation with four grasses in oil shale mined land. **Chemosphere**, v. 54, n. 3, p. 345–53, jan. 2004.

YOUNG, A.; EISLER, P. **Some neighborhoods dangerously contaminated by lead fallout.** Disponível em: <<http://usatoday30.usatoday.com/news/nation/story/2012-04-20/smelting-lead-contamination-soil-testing/54420418/1>>. Acesso em: 8 out. 2014.

ZENTNER, L. E. A et al. Relationships of blood lead to calcium, iron, and vitamin C intakes in Brazilian pregnant women. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 27, n. 1, p. 100–4, fev. 2008.

ZORRIG, W. et al. Phytodesalination : a Solution for Salt-affected Soils in Arid and Semi-arid Regions. **Journal of Arid Land Studies**, v. 22, n. 1, p. 299–302, 2012.