



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

NILA MARIA BEZERRIL FONTENELE

**EFEITOS DO CHUMBO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP:
ABORDAGEM BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

FORTALEZA

2015

NILA MARIA BEZERRIL FONTENELE

**EFEITOS DO CHUMBO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* L. WALP:
ABORDAGEM BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

**Orientadora: Prof^a Dirce
Fernandes de Melo**

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- F763e Fontenele, Nila Maria Bezerril.
Efeitos do chumbo em cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp: abordagem bioquímica, fisiológica e molecular / Nila Maria Bezerril Fontenele. – 2015.
146 f. : il., color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Biotecnologia Ambiental.
Orientação: Prof. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
1. *Vigna unguiculata*. 2. Chumbo. 3. Enzimas antioxidantes. I. Título.

CDD 574.192

NILA MARIA BEZERRIL FONTENELE

**EFEITOS DO CHUMBO EM CULTIVARES DE *Vigna unguiculata* (L.) WALP:
ABORDAGEM BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E MOLECULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em 22 / 05 / 2015.

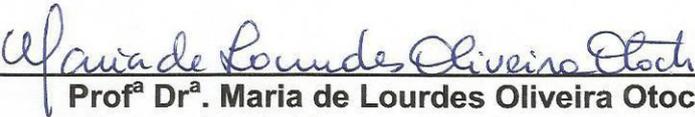
BANCA EXAMINADORA



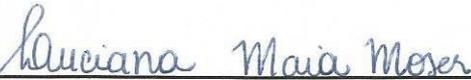
Profª Drª. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Profª Drª. Elena Graciela Orellano
Universidade Nacional de Rosario - Argentina



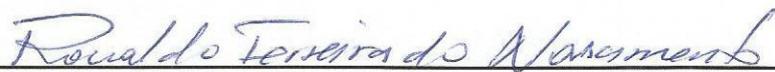
Profª Drª. Maria de Lourdes Oliveira Otoch
Universidade Estadual do Ceará (UECE)



Profª Drª. Luciana Maia Moser
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)



Profª Drª. Simone de Sá Borges
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof. Dr. Ronaldo Ferreira do Nascimento
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À Deus,

À minha família,

Aos estudantes de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a todas as pessoas que sonham e desejam um mundo melhor e mais saudável.

AGRADECIMENTOS

Gratidão é o que preenche o meu coração nesse momento.

Agradeço em primeiro lugar a Deus pela vida, por ter me dado a ideia de realizar esse trabalho, por ter sido meu grande mestre em todos os momentos, por ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho e por ter providenciado com todo carinho e amor, como um Pai que ama seus filhos, tudo o que foi necessário para a realização desse trabalho. Obrigado meu Deus!

À Prof^a Dr^a Dirce Fernandes de Melo por me acolher em seu laboratório, por ter criado o curso de Biotecnologia da UFC, curso este que incentivou meu ingresso no Doutorado. Agradeço ainda pelo seu enorme carinho, pela paciência, pela confiança, pelos ensinamentos e sabedoria na condução desse trabalho o qual resultou nessa produção e em meu crescimento pessoal e profissional. Agradeço também por sempre buscar a excelência em tudo que faz e pelo seu exemplo de competência e profissionalismo.

À Profa. Simone de Sá Borges pela sua didática, pelo seu apoio e incentivo durante o início e também ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Ronaldo Ferreira do Nascimento pela sua fundamental orientação no tocante aos seus conhecimentos de Química.

À Profa. Maria de Lourdes Otoch por sua experiência e valiosas sugestões ao longo do desenvolvimento deste trabalho

À Profa. Elena Orellano por ter aceito o convite de fazer parte da banca examinadora.

À Profa. Luciana Maia por ter aceito o convite de fazer parte da banca examinadora.

À Profa. Gisele Lopes por ter aberto as portas de seu laboratório para a realização de parte desse trabalho e ainda pelas análises quimiométricas.

Ao Prof. José Hélio Costa pelo desenho dos “primers” e pelos valiosos questionamentos ao longo do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Enéas Gomes que me permitiu usar livremente sua casa de vegetação e seu laboratório.

A Profa. Raquel Miranda (grande amiga) por ceder às instalações de seu laboratório me permitindo realizar todas as atividades enzimáticas, quantas vezes eu precisasse. Também quero agradecer a agradável companhia de todas as suas estudantes em especial a Marcela, Mônica, Quélina e Raíra. Muito obrigado pelo apoio, pela música ambiente, pelas risadas e principalmente pelo carinho e amizade de vocês.

À Profa. Maria da Guia Silva Lima, por fazer parte dos meus primeiros passos na vida acadêmica ainda na iniciação científica, por seus exemplos, conselhos e palavras que jamais esquecerei.

Agradeço ainda a todos os professores da pós-graduação em Bioquímica, cada um deixou marcas de conhecimento que ficarão pelo resto da minha carreira. Em especial aos professores Enéas Gomes Filho, Joaquim Enéas, José Tadeu e Ilka Vasconcelos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC. Agradeço ainda ao meu Professor de Francês da casa de cultura francesa da Universidade Federal do Ceará, Prof. Ruy Ferreira Lima, sua didática e seus ensinamentos garantiram minha leitura em Francês.

À minha família meu porto seguro, sempre me apoiando em todas as decisões que tomo na vida. Em especial a minha filha Giovanna, presente de Deus na minha vida, pela sua grande compreensão principalmente durante os momentos de escrita em que foi minha grande companheira, permanecendo resignada dentro de casa por muitos dias. Ao Luís, meu amado companheiro, por sempre acreditar e desejar meu sucesso profissional e com incentivo constante me permitiu chegar até aqui.

Aos bolsistas de iniciação científica Adolph Anderson Barreto e Dalton Barreto de Oliveira, pessoas com quem pude dividir meus questionamentos e, com seu apoio, buscar respostas. Agradeço ainda a Adolph, pela agradável convivência, pelas conversas e pela valiosa contribuição durante os experimentos e escrita do artigo e a Dalton por ter sido meu grande companheiro desde os primeiros experimentos até a conclusão desse trabalho.

À Dra. Neuza Félix por partilhar comigo seus conhecimentos sobre antioxidantes, pelo apoio constante e grandes sugestões para a escrita do artigo.

Ao Dr. Yuri Maia pelas valiosas contribuições, nos momentos mais críticos me salvando e ajudando.

Aos amigos do LEQA Rouse, Talita e Luan pela ajuda nos experimentos de química e também pelos lanches, fofocas, risadas e alegria contagiante. Agradeço também aos colegas Alan, Lu e Wellington pelos cálculos de química, ideias e sugestões.

À amiga Cristina Paiva pela acolhida durante meu ingresso no Doutorado e por incentivar com as primeiras ideias “fitorremediação”.

As amigas Camila Nobre e Sâmia Fernandes pelo apoio durante as primeiras disciplinas no curso de Doutorado e pela companhia durante o almoço no RU.

A amiga de sempre Ana Cláudia Gondim por dividir comigo as vitórias e frustrações do fazer Doutorado, durante esses quatro anos e, sobretudo pela amizade sincera.

A Kátia Daniella Saraiva pelo companheirismo sua marca registrada e pelos primeiros ensinamentos sobre biologia molecular no laboratório e por seu apoio e incentivo constante.

Aos meus “irmãos” do laboratório do Prof. Enéas, em especial a Elton, por sua didática, paciência e generosidade. A Ciane, Val, Rafael, Daniel, Elaine, Estelinha, Natália, Linek, Cibele pelos imprescindíveis ensinamentos no

laboratório, sempre me socorrendo e me ajudando, meu sincero muito obrigado.

Aos bolsistas de Iniciação Científica do laboratório 2090 em especial Isabel Ribeiro minha companheira durante as coletas de biologia molecular. A Karollyny Roger por ser ter sido muitas vezes os meus neurônios durante os atribulados dias de experimento. Ao Albert pelo apoio e tranquilidade, a Joana pela destreza com as mãos, ao Léo francês, Matheus, Janaína, Jamiley, Karine, Louhana e Daniel Lucena meus sinceros agradecimentos.

Aos demais colegas do laboratório 2090 Alethéia, Bia, Edson, Camila, Deborah, Garantizado, Georgia, Michele e Pedro Torquato, vocês permitiram me tornar um ser humano melhor.

Aos funcionários da secretaria em especial a Gil pelas cópias, a Fátima pelas teses e dissertações, Daniel pela simpatia e solicitude. As funcionárias da limpeza, Teca e Nêga, pelo cafezinho quentinho depois do almoço.

Aos meus alunos e colegas de trabalho da Faculdade Ateneu pelo apoio e torcida durante a finalização desse trabalho.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

A Central Analítica da UFC pelas análises de microscopia, em especial ao Prof. Gomes, ao Flavinho e ao Emílio.

Não há palavras suficientes que expressem o que está se passando em minha mente e coração. Minha sincera gratidão a todos.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros.
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes”

(Cora Coralina)

RESUMO

O chumbo (Pb) é um dos poluentes antropogênicos mais tóxicos de ocorrência generalizada em ambos os ecossistemas terrestres e aquáticos. A fitotoxicidade do chumbo é um fenômeno complexo que envolve mudanças no desenvolvimento, bem como nos mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, de acordo com as diferentes estratégias de sobrevivência das plantas. É bem conhecido que os metais pesados aceleram a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e que podem provocar mudanças na concentração das enzimas antioxidantes. O objetivo desse trabalho foi investigar o efeito do Pb no crescimento, fisiologia, absorção e translocação de Pb, a atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes em "Sempre Verde" (SV) e "Setentão" (SET), cultivares de *Vigna unguiculata*. As sementes foram germinadas em vermiculita e, após sete dias, as plântulas foram transferidas para solução de Hoagland. Depois de sete dias em um sistema hidropônico as plantas foram suplementadas ou não com EDTA-Pb 0,5 mM. Os parâmetros fisiológicos foram medidos através de um analisador de gás infravermelho. O conteúdo de Pb nas raízes e na parte aérea foi medido por ICP OES. As atividades das enzimas catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) e superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foram determinadas. A expressão dos genes da CAT (*VuCAT 1* e *2*), da APX (*VuAPX 1* a *6*) e da SOD (*VuSOD Cu/Zn 1* a *3*, *VuSODMn1*, *VuSODCu/Chap1*, *VuSODFe 1* a *3*), foi avaliada por RTqPCR utilizando iniciadores específicos. O RNA total foi extraído a partir das raízes e das folhas nas plantas controle e tratadas. Os resultados revelaram que as áreas foliares diminuíram 60 (SV) e 88% (SET). A inibição da fotossíntese líquida foi 40 (SV) e 72% (SET). Os cultivares apresentaram diferenças na acumulação e distribuição de Pb, bem como nas atividades enzimáticas. SV apresentou mais Pb nas raízes do que nas folhas ao contrário de SET que acumula mais Pb nas folhas do que nas raízes. A atividade das enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD foram estimuladas no cultivar SET independentemente do tecido. No entanto, a atividade da CAT em raízes do cultivar SV não sofreu modificação e a atividade da SOD em folhas, do mesmo cultivar, foi inibida, sendo as demais atividades em SV estimuladas. O aumento das atividades das enzimas em raízes e folhas de SV e SET estão de acordo com suas expressões gênicas. Os genes CAT 1 e 2 foram diferentemente expressos nas folhas e nas raízes de SV e SET. A expressão relativa da família multigênica da APX em raízes e folhas nesses cultivares foi parcialmente distinta. Da mesma forma os genes da SOD em folhas apresentaram um perfil parcialmente distinto nos dois cultivares. Ao contrário, a expressão relativa dos genes da SOD nas raízes de SV e de SET foi completamente diferente. Analisados em conjunto, os dois cultivares de *Vigna unguiculata* apresentaram um comportamento diferente em relação a tolerância, acumulação, e desintoxicação do Pb. Estes resultados sugerem que o Pb induz estresse oxidativo nos cultivares SV e SET e que a elevada atividade das enzimas antioxidantes poderia servir como um importante componente de defesa contra os danos provocados pelo Pb, sendo SV mais tolerante a esse estresse do que SET.

Palavras chave: Chumbo. *Vigna unguiculata*. Enzimas antioxidantes.

ABSTRACT

Lead (Pb) is one of the most toxic anthropogenic pollutants of widespread occurrence in both terrestrial and aquatic ecosystems. The phytotoxicity of lead is a complex phenomenon that involves changes in development as well as in physiological, biochemical and molecular mechanisms according to different plant survival strategies. It is well known that heavy metals accelerate the production of reactive oxygen species (ROS) which can lead to changes in the concentration of antioxidant enzymes. The aim of this study was to investigate the effect of Pb on growth, physiology, absorption and translocation of Pb, activity and gene expression of antioxidant enzymes in "Sempre Verde" (SV) and "Setentão" (SET), *Vigna unguiculata* cultivars. The seeds were germinated in vermiculite and, after seven days, the seedlings were transferred to Hoagland solution. After seven days in a hydroponic system the plants were supplemented with EDTA-Pb 0.5 mM. Physiological parameters were measured using an infrared gas analyzer. The Pb content in roots and shoots was measured by ICP OES. The activities of catalase (CAT, EC 1.11.1.6), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.1) and superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) was determined. The expression of the CAT gene (VuCAT 1 and 2), the APX (VuAPX 1 to 6) and SOD (VuSOD Cu / Zn 1 to 3, VuSODMn1, VuSODCu / chap1, VuSODFe 1 to 3) was evaluated by RT- qPCR using specific primers. Total RNA was extracted from the roots and leaves of control plants and treated. The results showed that the leaf areas were reduced by 60 (SV) and 88% (SET). The inhibition of net photosynthesis was 40 (SV) and 72% (SET). The cultivars showed differences in the accumulation and distribution of Pb, as well as in enzyme activity. SV had more Pb in roots than in leaves unlike SET that accumulates more Pb in leaves than in roots. The activity of the antioxidant enzymes CAT, APX and SOD was enhanced in SET, regardless of the tissue. In SV roots, on the other hand, the CAT activity was not modified whereas in SV leaves the SOD activity underwent an inhibition. All the remaining antioxidant activities in SV were stimulated. The CAT 1 and 2 genes were differently expressed in leaves and roots of SV and SET. The relative expression of the APX multigene family in leaves and roots in these cultivars was partially distinct. Likewise genes SOD in leaves showed a partially distinct profile in the two cultivars. Rather, the relative expression of SOD genes in the roots and SV SET is completely different. Taken together, the two *Vigna unguiculata* cultivars showed a different behavior towards tolerance, accumulation and detoxification of Pb. These results suggest that Pb induces oxidative stress in SV and SET cultivars and that the high activity of antioxidant enzymes could serve as an important component of defense against the damage caused by Pb, and SV more tolerant to stress than SET

Keywords: Lead. *Vigna unguiculata*. antioxidants enzymes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resposta das plantas superiores aos metais tóxicos..	32
Figura 2 - Formação de EROs por transferência de energia	37
Figura 3 - Reação catalisada pela CAT.....	38
Figura 4 - Reação catalisada pela APX.....	39
Figura 5 - Reação Catalisada pela SOD.....	40
Figura 6 – EROs e mecanismos de defesa antioxidantes.....	41
Figura 7 - Mecanismos envolvidos na hipertolerância e distribuição dos metais pesados em plantas hiperacumuladoras	45
Figura 8 – Desenho experimental realizado para coleta do material vegetal.....	49
Figura 9 – Teor de Pb^{2+} em plântulas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET). , após 72 horas da semeadura em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb ou $Pb(NO_3)_2$, em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM.....	62
Figura 10 - Comprimento de plântulas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 72 horas da semeadura em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb ou $Pb(NO_3)_2$, em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM.....	62
Figura 11 - Plântulas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivar Sempre Verde, após 72 horas da semeadura em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM.....	63
Figura 12 - Plântulas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivar Sempre Verde, após 72 horas da semeadura em ausência (controle) ou presença de $Pb(NO_3)_2$ em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM	64
Figura 13 - Plântulas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivar Setentão, após 72 horas da semeadura em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM.....	65
Figura 14 - Plântulas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivar Setentão, após 72 horas da semeadura em ausência (controle) ou presença de $Pb(NO_3)_2$ em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM	66
Figura 15 – Teor de Pb^{2+} em raízes, caules e folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão	

(SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	68
Figura 16 – Teores de Ca ²⁺ e Zn ²⁺ em raízes, caules e folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM	71
Figura 17 – Distribuição e correlação dos íons Ca ²⁺ , Pb ²⁺ e Zn ²⁺ . nas raízes, caules e folhas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.	72
Figura 18 – Raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	73
Figura 19 – Massa seca das raízes, da parte aérea e da área foliar de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	74
Figura 20 – Condutância estomática, transpiração, eficiência do fotossistema II, taxa de transporte de elétrons no fotossistema II, taxa fotossintética líquida e concentração intracelular de CO ₂ de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	77
Figura 21 – Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.	81
Figura 22 - Gel de agarose (1%), evidenciando as subunidades ribossomais 18 e 28S, dos RNAs totais extraídos de raízes e de folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	83

Figura 23 - Curvas de melting obtidas por qPCR usando <i>primers</i> específicos para os genes da catalase(CAT) e ascorbato peroxidase (APX.....	86
Figura 24 - Curvas de melting obtidas por qPCR usando <i>primers</i> específicos para os genes da Superóxido dismutase (SOD) e para os genes de referência f-Box e EF-1 β	87
Figura 25 - Expressão relativa dos genes <i>VuCAT1</i> e <i>2</i> em raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	90
Figura 26 - Expressão relativa dos genes <i>VuAPX 1</i> a <i>6</i> em raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	92
Figura 27 - Expressão relativa dos genes <i>SOD Cu/Zn 1</i> a <i>3</i> , <i>SOD Fe 1</i> a <i>3</i> , <i>SOD Cu/Chap1</i> , <i>SOD Mn1</i> , em raízes e folhas das plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	96
Figura 28 – Cortes radiculares de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	98
Figura 29 – Raízes de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.	99
Figura 30 – Epiderme foliar de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	100
Figura 31 – Estômatos na epiderme foliar de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e concentração de sais usados no preparo da solução nutritiva.....	48
Tabela 2 - Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa.	57
Tabela 3 – Teor de Pb²⁺ e fatores de translocação (TF) e de bioconcentração (BCF) em plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	69
Tabela 4 - Valores médios das concentrações e relações de absorvância dos RNAs extraídos de raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.....	82
Tabela 5 - Temperaturas de anelamento e sequências dos genes das famílias multigênica das enzimas Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD).....	84
Tabela 6 - Temperaturas de anelamento e sequências dos genes da família multigênica da enzima superóxido dismutase (SOD).....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APX: Ascorbato peroxidase.

BCF: Fator de bioconcentração.

CAT: Catalase.

cDNA: sequência de DNA complementar.

CDF: Facilitadores de difusão de cátions.

CMV: Vírus do mosaico do pepino.

CpSMV: Vírus do mosaico severo do caupi.

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético.

EROs: Espécies reativas de oxigênio.

EST: Etiquetas de sequências expressas.

FWD: Sequência forward

ICP OES: Espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado.

IRGA: Analisador de gás infravermelho.

MEV: Microscopia eletrônica de varredura.

MOPS: Ácido 3-N-morfolino propanosulfônico.

NRAMPs: Proteínas de resistência natural associadas a macrófagos.

PCR: Reação em cadeia da polimerase.

qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real.

PCA: Análise de componentes principais.

PSI: fotossistema I

PSII: fotossistema II

RNA: Ácido ribonucleico.

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

REV: Sequência reversa

SET: Cultivar Setentão.

SOD: Superóxido dismutase.

SV: Cultivar Sempre Verde.

TF: fator de translocação.

WOC: Complexo oxidante da água.

LISTA DE SÍMBOLOS

Ca^{2+} : Íon cálcio.

Cd^{2+} : Íon cádmio.

Co^{2+} : Íon cobalto (II).

Cu^{2+} : Íon cobre (II).

Fe^{2+} : Íon ferro (II)

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio.

HO_2^- : Radical perhidroxila.

HF: Ácido fluorídrico.

HNO_3 : Ácido nítrico.

NaOH: Hidróxido de sódio.

Ni^{2+} : Íon Níquel (II).

Mn^{2+} : Íon Manganês (II).

O_2 : Oxigênio.

O_2^- : Radical superóxido.

OH^- : Radical hidroxila

Pb^{2+} : Chumbo.

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$: Nitrato de chumbo.

Zn^{2+} : íon zinco.

ZIP: Proteínas transportadoras de zinco e ferro.

ZnSO_4 : Sulfato de zinco.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1 <i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp	23
2.1.1 <i>Cultivares Sempre Verde e Setentão</i>	24
2.2 Contaminação do solo por metais tóxicos	24
2.2.1 <i>Contaminação ambiental por chumbo (Pb)</i>	25
2.3 Toxicidade do chumbo, meio ambiente e riscos à saúde humana	27
2.4 Biodisponibilidade do chumbo (Pb²⁺)	28
2.5 Mecanismos de detoxificação e tolerância ao chumbo	30
2.6 Efeitos fisiológicos e bioquímicos do chumbo nas plantas	33
2.7 Espécies Reativas de Oxigênio e Sistema Antioxidante nas plantas 36	
2.7.1 <i>Catalase (CAT)</i>	38
2.7.2 <i>Ascorbato peroxidase (APX)</i>	39
2.7.3 <i>Superóxido dismutase</i>	40
2.8 Fitorremediação	42
2.8.1 <i>Eficiência da Fitoextração</i>	44
3 OBJETIVOS	46
4 METODOLOGIA	47
4.1 Material Vegetal	47
4.2 Germinação das Sementes	47
4.3 Aplicação do Chumbo	48
4.4 Coleta do material vegetal e parâmetros analisados	49
4.5 Parâmetros fisiológicos	50
4.6 Determinação do teor de íons nas plantas	50
4.7 Avaliação Quimiométrica dos íons Ca²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺ nas plantas submetidas ao estresse com EDTA-Pb.	51
4.8 Quantificação da Eficiência da Fitoextração	51
4.8.1 <i>Fator de Translocação</i>	51
4.8.2 <i>Fator de Bioconcentração</i>	52
4.9 Determinação da atividade enzimática	52
4.9.1 <i>Preparo das amostras</i>	52
4.9.2 <i>Atividade da catalase (CAT)</i>	52

4. 9. 3 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)	53
4. 9. 4 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	53
4.10 Determinação da expressão gênica pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase quantitativa em tempo real (RT- qPCR).....	54
4.10.1 Extração de RNA total.....	54
4.10.2 Quantificação e pureza do RNA total	55
4.10.3 Integridade do RNA total	55
4.10.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)	56
4. 10. 5 Desenho dos iniciadores específicos (“Primers”)	57
4.10.6 Quantificação dos iniciadores específicos (“Primers”).....	58
4.10.7 Gradiente de temperatura	58
4.10.8 Determinação dos transcritos através de qPCR (PCR em Tempo Real).....	58
4.11 Análise ultra estrutural das raízes e folhas de <i>Vigna unguiculata</i>..	59
4.11.1 Preparo das amostras para microscopia	59
4.11.2 Análise em microscópio eletrônico de varredura.....	59
4.12 Análise Estatística.....	60
5 RESULTADOS.....	61
5.1 Teor de Pb²⁺ e seu efeito no tamanho das plântulas de <i>Vigna unguiculata</i>	61
5.2 Teor de Pb²⁺ nas plantas de <i>Vigna unguiculata</i>.....	67
5.3 Eficiência de fitoextração nas plantas de <i>Vigna unguiculata</i> (TF e BCF).....	67
5.4 Efeito do Pb no teor de Ca²⁺ e Zn²⁺ nas plantas de <i>Vigna unguiculata</i>.....	69
5.5 Avaliação quimiométrica dos íons Ca²⁺, Pb²⁺ e Zn²⁺ nas plantas submetidas ou não ao estresse com EDTA-Pb 0,5 mM.	71
5.6 Efeito do Pb nos parâmetros fisiológicos das plantas de <i>Vigna unguiculata</i>	72
5.6.1 Massa seca das raízes e da parte aérea e área foliar.....	72
5.6.2 Condutância Estomática (Gs).....	75
5.6.3 Transpiração (E).....	75
5.6.4 Eficiência quântica do PSII (Φ PSII).....	75
5.6.5 Taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR)	76
5.6.6 Taxa fotossintética líquida (Pn)	76
5.6.7 Concentração Intercelular de CO ₂ (Ci).....	76

5.7 Efeito do Pb na atividade das enzimas antioxidantes nas plantas de <i>Vigna unguiculata</i>: Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD)	78
5.7.1 <i>Catalase</i>	78
5.7.2 <i>Ascorbato Peroxidase</i>	79
5.7.3 <i>Superóxido Dismutase</i>	79
5.8 Efeito do Pb na expressão de transcritos das enzimas antioxidantes nas plantas de <i>Vigna unguiculata</i>: Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD)	82
5.8.1 <i>Qualidade do RNA</i>	82
5.8.2 <i>Temperatura de anelamento dos iniciadores específicos (“primers”)</i>	83
5.8.3 <i>Especificidade dos iniciadores específicos (primers)</i>	83
5.8.4 <i>Análise do efeito do chumbo na expressão relativa dos genes das enzimas CAT, APX e SOD</i>	88
5.8.4.1 <i>Expressão relativa dos genes da Catalase (VuCAT 1 e 2)</i>	88
5.8.4.2 <i>Expressão relativa dos genes da Ascorbato Peroxidase (VuAPX1 a 6)</i>	89
5.8.4.3 <i>Expressão relativa dos genes da Superóxido Dismutase (VuSOD Cu/Zn1 a 3, VuSOD Mn1, VuSOD Cu/Chap1, VuSOD Fe1 a 3)</i>	92
5.8.5. Análise morfológica e ultraestrutural das raízes e folhas de <i>Vigna unguiculata</i>	97
6 DISCUSSÃO	102
7 CONCLUSÃO	129
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas ambientais é a contaminação da atmosfera, da água e do solo por elementos tóxicos (BRUNET et al., 2009). Os íons metálicos, dentre as substâncias inorgânicas, são os poluentes mais nocivos sendo responsáveis pela contaminação de vastas áreas devido ao uso de pesticidas e fertilizantes além da disposição inadequada de resíduos sólidos (PAL; RAI, 2010). Dentre os metais tóxicos destaca-se o chumbo (Pb) amplamente utilizado na indústria para confecção de baterias, especialmente na área automobilística (FORTES, 2003). É largamente sabido que a exposição ambiental ao chumbo provoca efeitos adversos em diferentes sistemas do organismo humano, como neurológico, hematológico, metabólico e cardiovascular (FORTES, 2003). Entretanto, os danos conferidos aos sistemas vegetais ainda não estão completamente elucidados. Contudo, as plantas podem ser classificadas como menos ou mais tolerantes aos efeitos deletérios provocados por tal metal (MEMON; SCHRÖDER, 2009).

Sabe-se que embora esse conhecimento seja incipiente um ponto comum entre diversos autores no tocante ao excesso de metais tóxicos é que estes são responsáveis pelo acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS), induzindo estresse oxidativo (GUPTA et al., 2009; KAUR et al., 2011; MITTLER et al., 2004). O excesso da produção de EROS provoca danos a biomoléculas tais como lipídeos de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, dentre outras. Particularmente, nosso interesse está centrado na avaliação da absorção e translocação do Pb nas plantas de *Vigna unguiculata* e nos efeitos desse metal no desenvolvimento desses vegetais bem como no estresse oxidativo provocado por tal íon, o qual pode ser neutralizado pelas enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD). O ânion superóxido, espécie reativa de oxigênio mais danosa, é eliminado nos vegetais pela SOD, a qual o converte em peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Este por sua vez é convertido pela enzima catalase em H₂O e oxigênio molecular. A ascorbato peroxidase também é conhecida por eliminar H₂O₂ pela combinação com um agente antioxidante como o ascorbato (RULEY; SHARMA; SAHI, 2004). Muitas pesquisas sobre a atividade das enzimas antioxidantes tem revelado que estas podem neutralizar os danos oxidativos induzidos pelo

chumbo exercendo assim um papel significativo na adaptação das plantas ao estresse provocado por íons metálicos (GILL; TUTEJA, 2010; REDDY et al., 2005). Contudo, os mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares envolvidos na contaminação por metais tóxicos e os danos oxidativos induzidos pelo Pb continuam ainda não conclusivos. A grande variedade das espécies vegetais e a flexibilidade metabólica inerente a esses organismos sésseis justificam as divergências nos dados acumulados nesse tema (SHARMA; DUBEY, 2005). A utilização de dois cultivares de feijão-de-corda, dotados de diferentes graus de tolerância a estresses abióticos, como modelo experimental, será útil na compreensão do efeito do chumbo no metabolismo das plantas, através de uma abordagem bioquímica, fisiológica e molecular, tendo como foco principal o estresse oxidativo mediado por enzimas.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Vigna unguiculata* (L.) Walp

Vigna unguiculata (L.) Walp também conhecido como feijão-caupi ou feijão de corda 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).

No Brasil, acredita-se que o feijão foi introduzido na Bahia no século XVI e, desde então, tornou-se uma cultura de grande importância econômica local, nutricional e social, sendo produzido em todas as regiões brasileiras. 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 de feijão de corda, 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; FILHO et al., 2011; FREITAS, 2014).

A cultura do feijão-de-corda no nosso Estado é uma atividade econômica relevante vez que representa 20% da produção total do país. Ademais, tal cultura é responsável pelo suprimento alimentar de muitas famílias no Nordeste brasileiro. A produção agrícola do feijão no Estado está apresentando um declínio gradual que pode estar associado a estresses ambientais, relacionados com temperaturas elevadas, secas, aumento da salinidade e de íons metálicos tóxicos do solo, condições conhecidas por limitarem a produtividade das culturas (IBGE, 2003; LONG YANG; NI, 2002).

2.1.1 Cultivares Sempre Verde e Setentão

Em 1978, o Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará com a finalidade de obter um feijão adequado ao cultivo em regiões submetidas às condições climáticas desfavoráveis e visando aumento de sua produção, logrou o cultivar CE-596, posteriormente chamado Setentão (SET), através da hibridação de Sempre Verde com TVu 59. O objetivo foi produzir um cultivar com resistência a diversos vírus e maior produção (FILHO et al., 1997). Assim, 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).

2.2 Contaminação do solo por metais tóxicos

O excesso de metais pesados induz degradação da qualidade do solo, contribuindo para redução quantitativa e qualitativa da produção agrícola, comprometendo também a qualidade da saúde humana, animal e ambiental (LONG; YANG; NI, 2002). Desse modo, a poluição do solo por metais pesados representa uma grave ameaça ambiental (HE; YANG; STOFFELLA, 2005).

Os metais pesados são os contaminantes ambientais mais freqüentes. Em 2033, estima-se que o total de áreas contaminadas nos Estados Unidos possa chegar a 294.000. Em países membros da União

Européia supõe-se que em 2025, aproximadamente 360.000 áreas estejam contaminadas com metais. No Brasil, segundo diagnóstico do Ministério da Saúde Brasileiro, existem 703 áreas com populações expostas ou sob risco de exposição a solos contaminados (BRASIL, 2006; OLIVEIRA; MORITA, 2008).

Portanto, áreas contaminadas com metais pesados representam um problema mundial, deste modo o conhecimento dos mecanismos bioquímicos e moleculares do metabolismo dos metais pesados em plantas, além da identificação de espécies vegetais acumuladoras, são relevantes para recuperação de áreas degradadas.

2.2.1 Contaminação ambiental por chumbo (Pb)

O chumbo está naturalmente presente no solo como constituinte traço de rochas e em minerais intemperizáveis como K-feldspato, plagioclásio, mica e como um maior constituinte de minerais contendo sulfeto, sulfato, óxido, carbonato e silicato como, por exemplo, galena (PbS), anglesita (PbSO₄) e cerussita (PbCO₃). Entretanto, atividades industriais, agrícolas e de mineração têm contribuído para um acelerado aumento na liberação de vários metais no meio ambiente, incluindo o chumbo, gerando assim riscos potenciais para os ecossistemas bem como para saúde humana (LANTZY; MACKENZIE, 1979; NRIAGRU, 1979; MUSHAK, 1993).

São fontes primárias de contaminação por chumbo os despejos provenientes de indústrias de vidro, cerâmica, papel, tintas, reciclagem de baterias automobilísticas, dentre outras. Áreas próximas a pequenas indústrias de reciclagem de baterias de chumbo-ácidas podem ser enriquecidas com Pb pela eliminação de seus resíduos. Desse modo, a poluição do solo, lixiviação de metais e contaminação de animais e vegetais cultivados em regiões de reciclagem de baterias, podem ocorrer devido ao enriquecimento do solo com este metal (FORTES, 2003; FREITAS; DO NASCIMENTO, 2009; MIGNARDI; CORAMI; FERRINI, 2012).

A produção de chumbo remonta há pelo menos 2000 anos e a demanda/produção crescentes pela sociedade indica maior probabilidade de

dispersão de metais e contato dos mesmos com o ambiente. Um metal pode ser disperso desde o início da sua mineração até a obtenção do seu produto final. O crescimento da população mundial e a importância dos metais na economia de países em desenvolvimento asseguram maior produção e consequentemente maior dispersão desses metais (ADRIANO, 2005).

A contaminação por chumbo é encontrada em distintos continentes, dispersa em países desenvolvidos e em desenvolvimento, como países componentes do BRIC (Brasil, China e Índia), no continente africano, nos Estados Unidos e União Européia (JENNINGS, 2013; US EPA, 2013).

Golekar, Patil e Baride (2013) relataram a contaminação de águas subterrâneas, em duas regiões urbanas, por metais tóxicos, dentre eles o chumbo, decorrente do despejo inadequado de resíduos líquidos de atividades agrícolas e do uso de combustíveis fósseis. Chen et al (2014) avaliaram a concentração de metais (chumbo, cádmio e cromo) em plantas cultivadas em uma região da China onde há grande produção de baterias ácidas de chumbo e constataram acumulação de chumbo em vegetais folhosos, como *Brassica chinensis* L, espinafre e repolho.

No Brasil, 703 áreas apresentam população exposta a solos contaminados (BRASIL, 2004). Dentre os contaminantes mais frequentes os metais correspondem a 11,3% dessas áreas, destacando-se chumbo, cromo e mercúrio (BRASIL, 2007).

No Estado de São Paulo a Região dos Lagos de Santa Gertrudes é uma das áreas contaminadas por metais pesados, resultado do descarte indevido de resíduos líquidos e sólidos de indústrias de revestimentos cerâmicos, comprometendo a qualidade da água do manancial responsável pelo abastecimento de sete municípios do interior paulista e de mais de 650 mil habitantes (OLIVEIRA; MORITA, 2008). Na Lagoa Rodrigo de Freitas, ecossistema localizado dentro da grande área urbana da cidade do Rio de Janeiro, os níveis de poluição e as principais fontes de poluentes foram avaliadas através da análise do teor de metais pesados, incluindo o Pb (FONSECA et al., 2011)

Estudos sobre a geologia da região rural do estado de Pernambuco identificou 263 pontos com anomalias radioativas com urânio e tório, os quais

facilitam a absorção de chumbo pelas plantas (SILVA et al., 2011). Em Santo Amaro no Estado da Bahia pessoas que vivem próximas a uma fundição de chumbo, que processa principalmente galena (PbS), têm sido afetadas por elementos tóxicos como Pb e Cd (LIMA; BERNARDEZ, 2011).

Dentre os trabalhos que comprovam a contaminação por chumbo no Brasil, pode-se citar: Okada et al. (1997), Bosso; Enzweiler (2008), Minozzo et al. (2008), Freitas et al. (2009), Abreu et al. (2009), Munhoz (2010), Ferreira (2010), Fernandes et al. (2011), Ferron et al. (2012), Di Giulio et al. (2012), dentre outros.

No Nordeste, um programa implementado pelo Ministério da Saúde, denominado Contaminantes Ambientais e Substâncias Químicas – VIGIQUIM coloca o chumbo como substância prioritária, devido aos riscos potenciais à população, especialmente trabalhadores e comunidades que residem no entorno de áreas industriais. O VIGIQUIM é um programa que tem como objetivo central identificar, caracterizar e monitorar as populações expostas às substâncias químicas. Segundo o Sistema de Informação de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Solo Contaminado – SISOLO, existem 184 áreas de solos contaminados estando 18 inseridas no Estado do Ceará (BRASIL, 2007).

2.3 Toxicidade do chumbo, meio ambiente e riscos à saúde humana

O chumbo nos seres vivos costuma causar danos generalizados. No homem, os efeitos variam desde disfunções neuropsicológicas a renais (glicosúria e aminoacidúria) características do envenenamento por chumbo (saturnismo). Ademais, o chumbo reduz a produção de anticorpos e de globulinas formadoras de plaquetas (GIDLOW, 2004). Por inibir a enzima ácido-aminolevulínico-desidratase (ALA-D), responsável pela conversão do ácido aminolevulínico a porfobilinogênio (PBG), um precursor de grupamentos heme, o chumbo acarreta um decréscimo na produção de hemoglobina em hemácias (MOREIRA; MOREIRA, 2004; SHAIK; SULTANA; ALSAEED, 2014). Além disso, sabe-se que crianças são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos do

chumbo do que os adultos por razões neurológicas, metabólicas e comportamentais (JAROSIŃSKA; PEDDADA; ROGAN, 2004).

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 enorme quantidade de fontes poluidoras, nesse sentido existe uma grande preocupação no tocante a poluição do ambiente por chumbo. Depois do arsênio (As), o chumbo 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 por chumbo pode ser uma ameaça direta ou indireta à saúde humana, seja pela aspiração de partículas de chumbo, presentes no ar, ou quando um solo contaminado é utilizado para plantação ou para qualquer outra atividade onde o destino final é a alimentação (UNIVERSITY OF THE WEST OF ENGLAND, 2013). Neste último caso, o fenômeno da magnificação trófica do chumbo desempenhará um papel agravante com relação ao aumento do risco à saúde humana (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Além da absorção por inalação, o chumbo 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} . Ossos, que contêm chumbo, tornam-se fontes de contaminação dentro do corpo (FITCH, 2004).

2.4 Biodisponibilidade do chumbo (Pb^{2+})

A absorção de íons metálicos pelas plantas envolve uma série de processos, tais como a dessorção do íon metálico a partir das partículas do solo, transporte de metais solúveis para a superfície das raízes via difusão ou fluxo de massa, absorção e translocação do íon metálico das raízes para a parte aérea. Os agentes quelantes aumentam a dessorção de metais da matriz do solo tornando-o solúvel e permitindo sua translocação do córtex da raiz para o xilema, via simplasto (célula para célula) ou apoplasto, dependendo tanto da espécie vegetal quanto da concentração do ligante. Portanto, espécies

solúveis, trocáveis e quelatadas de metais tóxicos nos solos comandam sua fitodisponibilidade (KABATA-PENDIAS; PENDIAS, 1992).

O grau de contaminação dos diferentes tipos de solo com Pb é variável e em função do tipo de solo, desse modo o Pb poderá ser adsorvido ou não por suas partículas implicando em maior ou menor concentração na solução do solo e assim alterando sua disponibilidade para as plantas (ZEITOUNI, 2003). Assim, para aumentar a biodisponibilidade do metal agentes quelantes tem sido largamente utilizados para facilitar a fitoextração de metais tóxicos a partir dos sítios contaminados (NOWACK et al. 2006). Entretanto, o papel do EDTA na absorção do Pb e sua acumulação pelas plantas não está compreendida e resultados controversos são encontrados na literatura (TIAN et al., 2011). É possível que o complexo EDTA-Pb alcance os vasos do xilema e deste modo seja translocado para a parte aérea da planta (SAIFULLAH et al., 2009). Contudo, não se descarta a possibilidade do complexo EDTA-Pb ser diretamente adsorvido pelas raízes das plantas podendo ocorrer dissociação do complexo antes de sua absorção (SAIFULLAH et al., 2009). Tian et al. (2010) estudando a biodisponibilidade do Pb em *S. alfredi* revelaram uma baixa mobilidade do chumbo fora dos feixes vasculares e sua retenção nas paredes celulares. Resultados de Tian et al. (2010) mostraram que ambos Pb e EDTA podem ser absorvidos e acumulados pelas plantas. Entretanto, os possíveis mecanismos de absorção do EDTA-Pb, Pb^{2+} ou $EDTA^{4-}$ e seus transportes através das membranas ainda é desconhecido. No presente trabalho podemos sugerir a presença de íons $EDTA-Pb^{2-}$ ou $EDTA-Pb$ cujas espécies podem ser adsorvidas pelas paredes celulares através de forças eletrostáticas ou serem absorvidas.

A membrana celular constitui uma barreira viva, mas poderá facilitar a absorção de $EDTA-Pb^{2-}$ através de canais ou transportadores aniônicos bem como $EDTA-Pb$ sem carga resultante. Sabe-se que a forma do complexo formado depende do pH e dessa forma o complexo $EDTA-Pb$ poderia ser dissociado e o Pb^{2+} poderá exercer sua toxicidade.

Em solos alcalinos ou neutros a maioria dos metais têm sua solubilidade reduzida, pois quando se combinam com carbonatos e hidróxidos geram precipitados. O processo de calagem (técnica de adição de carbonato de cálcio ao solo para correção de pH) pode reduzir significativamente a

solubilidade de Pb^{2+} no solo, pelo aumento do pH e consequente interação do Pb^{2+} com bases, fosfatos e carbonatos, compostos geralmente insolúveis de chumbo (KABATA - PENDIAS, 2011).

Há uma intensa correlação entre a concentração de um metal nas plantas e o conteúdo de sua espécie móvel no solo. O chumbo é considerado um metal não biodisponível para a planta, o que significa que não é facilmente absorvido pela planta sem que haja combinação com agentes complexantes (ZEITOUNI, 2003).

Portanto, para facilitar a fitoextração de metais tóxicos à partir de locais contaminados agentes quelantes são utilizados (NOWACK et al., 2006).

Ao investigar a liberação de Pb^{2+} na solução do solo utilizando diferentes agentes quelantes como EDTA, DTPA e os ácidos oxálico, cítrico, vanílico e gálico, Nascimento, Amarasiriwardena e Xing (2006) mostraram que dentre os agentes quelantes testados o EDTA foi mais eficiente. Desse modo, o EDTA influencia a biodisponibilidade do Pb no solo, sendo de grande valia para os estudos com metais tóxicos, especialmente o chumbo (SAIFULLAH et al., 2009).

A forte afinidade do chumbo pelo EDTA ($K_{eq} = 10^{18}$) em soluções aquosas, de pH levemente ácido à moderadamente básico, leva a formação predominante do complexo EDTA- Pb^{2-} (VILLEN-GUZMAN et al., 2015). Entretanto, o papel do EDTA na absorção do chumbo bem como sua acumulação pelas plantas não é bem compreendido e resultados controversos são encontrados na literatura (LUO et al. 2005; RULEY et al., 2006; KOMAREK et al. 2007; TIAN et al. 2011). A predominância do complexo EDTA-Pb e/ou das formas iônicas EDTA- Pb^{2-} , Pb^{2+} ou $EDTA^{-4}$ depende do pH do meio e os possíveis mecanismos de absorção dessas espécies através da membrana ainda é desconhecido.

2.5 Mecanismos de detoxificação e tolerância ao chumbo

A absorção de Pb pelas plantas é feita principalmente pelas raízes e sua disponibilidade depende não somente das condições do solo mas também de fatores próprios da planta como área de superfície da raiz e composição da

rizosfera. Ademais, as raízes podem secretar exudatos ricos em ácidos urônicos que restringem a absorção do Pb pela raiz e estabelece uma importante barreira de proteção no sistema radicular (Figura 1). Assim, as propriedades químicas da parede celular poderão modular a absorção e tolerância ao Pb (SHARMA; DUBEY, 2005; MANARA, 2012). Por outro lado, a membrana plasmática através de transportadores de metais pode reduzir a absorção dos mesmos ou promover o efluxo desses metais através de mecanismos de bombeamento (Figura 1). Uma vez no citoplasma os metais podem ser quelados por peptídios como fitoquelatinas ou compartimentalizados nos vacúolos através também de transportadores (Hall 2002).

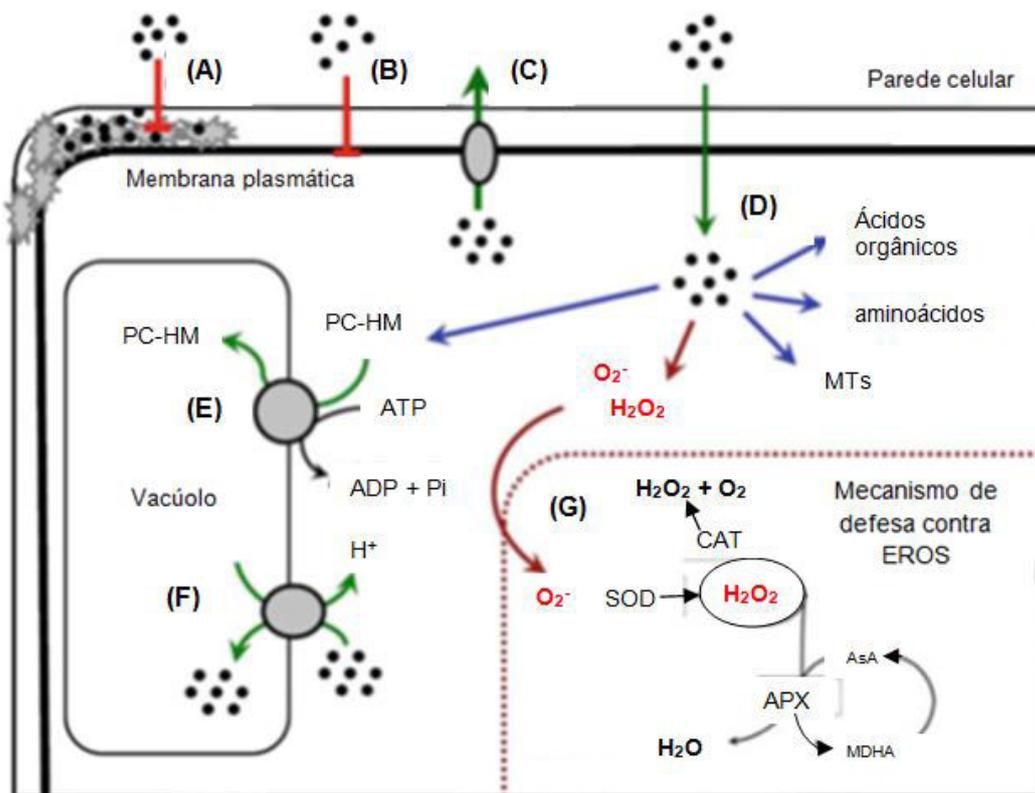
As plantas possuem várias famílias de transportadores de membrana envolvidos na homeostase e na captação de metais, tais como proteínas ZIP (proteínas transportadoras de zinco e ferro), facilitadores de difusão de cátions (CDF), proteínas P1B-ATPase e transportadores NRAMP (conhecidos por transportar metais como Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} e Co^{2+}).

A absorção de íons metálicos e particularmente o Pb^{2+} pode ocorrer passivamente nas células das raízes através do fluxo de água, contudo a absorção iônica é feita principalmente por canais e transportadores (TUNG, TEMPLE, 1996; SEREGIN; SHPIGUN; IVANOV, 2004)

A via principal de absorção de Pb^{2+} pelas raízes é através dos canais de Cálcio (WANG et al., 2007; POURRUT et al., 2008). O uso de plantas transgênicas mostrou que o Pb^{2+} pode penetrar nas raízes através de vias alternativas não seletivas como a dos canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos (cyclic nucleotides gated ion channels) (ARAZI; SUNKAR; KAPLAN, 1999; KOHLER; MERKLE; NEUHAUS, 1999) ou via transportadores de cátions de baixa afinidade (POURRUT et al., 2011). Apesar dessa absorção não ser seletiva, ela depende do funcionamento da bomba H^+ ATPase que mantém um forte potencial de membrana negativo (HIRSCH et al., 1998; WANG et al., 2007). A membrana plasmática parece exercer papel importante na tolerância das plantas a metais tóxicos evitando sua absorção ou facilitando seu efluxo, existem poucas evidências de transportadores envolvidos nesse efluxo em plantas, salvo as famílias de transportadores P1B-ATPases e CDF. P1B-ATPases pertencem a superfamília tipo P e usam a energia liberada na

hidrólise de ATP para translocar diferentes cátions metálicos através das membranas (AXELSEN; PALMGREN, 2001). Esses transportadores bombeiam íons metálicos para fora do citoplasma, contra seu gradiente de concentração, para o apoplasto ou para o vacúolo. Essas ATPases foram renomeadas de HMAs (ATPases de metais pesados do inglês *heavy metal ATPases*) que são divididas em duas classes : uma envolvida com transporte de cátions monovalentes (Cu^+/Ag^+) e outra com cátions divalentes ($\text{Zn}^{2+}/\text{Co}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$). Igualmente, transportadores ABC estão envolvidos no efluxo de íons metálicos à partir de membrana plasmática.

Figura 1 - Resposta das plantas superiores aos metais tóxicos. Ligação dos metais a parede celular e aos exudatos da raiz (A), redução do influxo de metais através da membrana plasmática (B), Efluxo através da membrana (C), quelação dos metais no citosol por fitoquelatinas, metalotioninas, ácidos orgânicos e aminoácidos (D), transporte através do tonoplasto e armazenamento de metais fitoquelados no vacúolo (E), sequestro de metais para o interior do vacúolo por transportadores presentes no tonoplasto (F), mecanismos de indução e de defesa de EROs (G).



Fonte: Manara (2012)

2.6 Efeitos fisiológicos e bioquímicos do chumbo nas plantas

O chumbo ao ter acesso às plantas pode ser distribuído de diversas maneiras, o que possivelmente regula o grau do dano, decorrente de sua localização celular. A forma em que tal metal encontra-se, isto é, complexada ou não a agentes quelantes intracelulares repercutirá no seu papel, podendo assim ser, mais ou menos deletério (SHARMA; DUBEY, 2005).

Os efeitos da toxicidade do chumbo nas plantas, ainda que em pequenas quantidades, conduzem a múltiplas alterações envolvendo a permeabilidade da membrana plasmática, inibição da atividade de distintas enzimas localizadas no citoplasma e em diferentes organelas, distúrbios na nutrição mineral, desbalanço hídrico e mudanças hormonais (SHARMA; DUBEY, 2005). Conseqüentemente, estas desordens prejudicam as atividades fisiológicas da planta (ERNST, 1998; SEREGIN; IVANOV, 2001). Ademais, tanto a localização celular, quanto a forma com que o chumbo se encontra, são fatores preponderantes no tocante ao seu efeito nas plantas (MEMON; SCHRÖDER, 2009).

Vários estudos mostram que o chumbo acarreta disfunções na absorção de nutrientes pela planta (GOPAL; RIZVI, 2008; SHARMA; DUBEY, 2005). Embora os mecanismos de ação do chumbo ainda não estejam totalmente elucidados, sabe-se que esse metal afeta a obtenção de sais minerais nas plantas. Sabe-se também que a exposição ao chumbo reduz a concentração de cátions bivalentes como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} nas folhas de algumas plantas como milho (SEREGIN; SHPIGUN; IVANOV, 2004), *Brassica oleracea* (SINHA et al., 2006) e *Vigna unguiculata* (KOPITTKKE et al., 2007). Mesmo com esses dados, ainda não se descobriu a origem dessa diminuição: se proveniente do bloqueio da absorção de nutrientes pela raiz, se há um decréscimo da translocação dos nutrientes das raízes para as partes superiores ou uma modificação na distribuição desses elementos pela planta. O efeito do chumbo sobre a acumulação de sais minerais nas raízes é dependente da espécie e da magnitude do estresse aplicado (GOPAL; RIZVI, 2008; KOPITTKKE et al., 2007).

A redução na absorção de nutrientes provocada pelo chumbo pode ser consequência de uma competição entre íons que apresentam raios atômicos de tamanhos semelhantes ao do chumbo ou de modificações nos processos fisiológicos das plantas.

Os sintomas visuais da toxicidade do chumbo são rápida inibição do crescimento da raiz, atrofia do crescimento da planta e clorose (BURTON et al., 1984). Os efeitos do chumbo nas plantas variam desde a inibição da germinação, em determinadas espécies, à inibição de crescimento e processos vitais que podem levar à morte (GHANI, 2010; GOPAL; RIZVI, 2008; HUSSAIN et al., 2013; KOPITTKKE et al., 2007; MISHRA et al., 2006; SHARMA; DUBEY, 2005). Sabe-se que o chumbo pode acarretar disfunções no ciclo celular da planta na condensação da cromatina, na organização dos microtúbulos durante a Mitose, devido ao bloqueio da anáfase causado pela não despolimerização dos microtúbulos do fuso mitótico, um efeito similar ao observado pelo mecanismo da colchicina, e também na organização do citoesqueleto, que seria uma das causas da inibição do crescimento da planta (KAUR et al., 2014; SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005; YUCEL et al., 2008). Assim, o chumbo reduz o crescimento das raízes pela restrição da divisão celular e alongação celular, processo dependente tanto da divisão celular como de íons K^+ (MAŁKOWSKI et al., 2002). Rossato et al. (2012) mostraram que as plantas de *Pluchea sagittalis* cresceram em concentrações de até 1000 μM de chumbo, entretanto após 15 dias do tratamento, mostraram sintomas de toxicidade. As folhas se mostraram murchas, a massa fresca do caule e a área foliar diminuiu com o aumento da concentração de chumbo.

Entretanto algumas espécies de plantas não só suportam a presença do chumbo como também acumulam grandes quantidades deste elemento. Ha et al. (2011), coletaram e analisaram amostras de plantas crescidas em região sabidamente contaminada com metais tóxicos. Elevada concentração de Pb foi encontrada em caules de *Potamogeton oxyphyllus* Miq. e raízes de *Pteris vittata* L.

Estes estudos mostram a ampla diversidade das plantas que podem responder de modo diferenciado aos estresses especialmente aos metais tóxicos. Assim, no âmbito da fitorremediação as plantas que respondem bem ao estresse com metais, assumem importante papel no meio ambiente.

Convém salientar, que Gupta et al. (2007) quantificaram o chumbo acumulado nas raízes e nas folhas de *Phaseolus vulgaris* L., uma espécie de feijão comum cultivada em todo o território brasileiro.

A inibição da fotossíntese é outro sintoma característico da toxicidade do chumbo em plantas, podendo causar distorção da ultraestrutura do cloroplasto e inibição da síntese de pigmentos fotossintéticos e de enzimas integrantes da etapa clara e do Ciclo de Calvin (LIU et al., 2008). A fotossíntese é bem mais sensível aos metais tóxicos que quaisquer outros processos bioquímicos em plantas. Sabe-se que, na etapa clara da fotossíntese, o PSII é muito mais suscetível aos efeitos deletérios do chumbo que o PSI (ROMANOWSKA et al., 2012). Em adição, o chumbo inibe não só o complexo oxidante da água (WOC), como também bloqueia o transporte de elétrons da quinona A (Q_A) para a quinona B (Q_B) (BELATIK; HOTCHANDANI; CARPENTIER, 2013). Além disso, o chumbo acarreta a inibição da biossíntese da clorofila (CENKCI et al., 2010; HAMID et al., 2010; LIU et al., 2008) e de carotenóides (LIU et al., 2008) assim como, a inibição de proteínas associadas aos fotossistemas. Romanowska et al (2012) mostraram que, em presença de chumbo, os tilacóides de células da bainha e do mesofilo de milho ativavam a fosforilação das proteínas do PSII.

Além da fotossíntese, o chumbo acarreta efeitos indesejáveis nos processos associados à transpiração celular. Determina o fechamento dos estômatos o que limita as trocas gasosas com o ar atmosférico e a perda de água por transpiração (PARYS et al., 1998). Yang, Zhang e Wang (2004), relataram que o movimento estomatal era afetado pelo chumbo através de canais de água (aquaporinas) ou canais de íons nas células estomatais. Além disso, há relatos de que a RuBISCO também é inibida por chumbo, reduzindo assim sua capacidade carboxilativa (POURRUT et al., 2011) e dessa forma contribuindo para o aumento da concentração intercelular de CO_2 .

Dentre as alterações bioquímicas causadas pelo chumbo 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 chumbo. 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).

Ademais, o chumbo danifica atividades enzimáticas e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) conduzindo a estresse oxidativo (KAUR et al., 2011; VERMA; DUBEY, 2003).

2.7 Espécies Reativas de Oxigênio e Sistema Antioxidante nas plantas

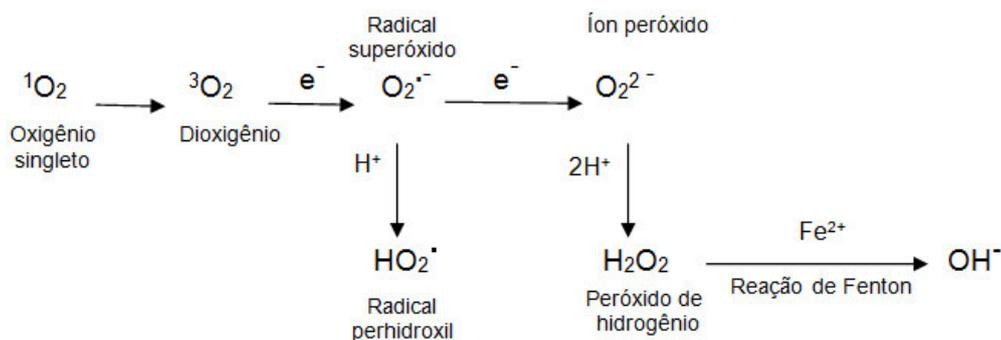
As plantas quando submetidas a estresses bióticos e/ou abióticos induzem estresse oxidativo revelado pela produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). As EROs são geradas incessantemente como subprodutos de vias metabólicas localizadas em diferentes organelas com elevada atividade oxidante ou com intensa taxa de fluxo de elétrons, como os cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (GILL; TUTEJA, 2010a). Dentre as EROs, pode-se citar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^-) e o oxigênio singlete (O_2^1) (PANDA; CHOUDHURY, 2004).

O equilíbrio entre a produção e o combate às EROs pode ser perturbado por diversos estresses abióticos e bióticos, como metais tóxicos, salinidade, seca e outros. Esse desequilíbrio leva a um súbito aumento no teor intracelular de EROs (Figura 1), danificando estruturas celulares. Sabe-se que vários efeitos adversos secundários podem ocorrer como resultado do aumento da produção de EROs e da alta reatividade desses compostos com a matéria orgânica, desse modo em última análise o acúmulo dos danos causados a lipídeos, carboidratos e proteínas podem levar a morte do vegetal (GILL; TUTEJA, 2010).

O superóxido é formado na etapa fotoquímica da fotossíntese, quando o O_2 produto da oxidação da molécula de água pode receber elétrons oriundos dos fotossistemas (FOYER; NOCTOR, 2005). Através de uma série de reações, o superóxido pode gerar peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e outras EROs (KHAN; SINGH, 2008; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). O oxigênio

singlete ($^1\text{O}_2$) é o primeiro estado eletrônico excitado do O_2 e é uma ERO incomum por não estar associado à transferência de elétrons para o O_2 (Figura 2). A formação do oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) na fotossíntese danifica severamente os fotossistemas I (PSI) e II (PSII) assim como todo o aparato fotossintético (GILL; TUTEJA, 2010a). Além de danificar o aparato fotossintético, outros efeitos nocivos das EROs são a peroxidação lipídica de membranas celulares ou de organelas, danos a ácidos nucléicos, oxidação de resíduos de aminoácidos, como arginina, histidina, lisina, prolina, cisteína e metionina, acarretando a inativação das proteínas (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL; TUTEJA, 2010).

Figura 2 - Formação de EROs por transferência de energia



Fonte: (GILL; TUTEJA, 2010)

As espécies reativas de oxigênio em células de organismos aeróbicos, que acarretarão o estresse oxidativo, são um dos principais produtos da toxicidade dos metais, como o chumbo (LIU et al., 2008; SINGH et al., 2010). A toxicidade induzida pelo chumbo pode reduzir a atividade de enzimas ou mesmo induzir suas sínteses. Entretanto, a inibição ou indução por chumbo das enzimas antioxidantes depende do tipo, da forma específica do metal e da duração ou magnitude do tratamento (GUPTA et al., 2009; ISLAM; UZ-ZAMAN; RAHMAN, 2013; SINGH et al., 2010). A inibição enzimática por chumbo é consequência da afinidade desse metal por grupos tióis (-SH) na estrutura da enzima (GUPTA et al., 2009; SHARMA; DUBEY, 2005). A inativação se dá por uma ligação no sítio catalítico ou em qualquer outro lugar da proteína, gerando uma estrutura terciária modificada. Em adição, o chumbo

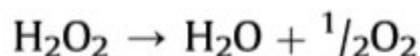
também interage com metaloenzimas, além de bloquear a absorção de minerais como zinco, ferro, manganês, etc., que são elementos essenciais para o funcionamento dessas enzimas. O chumbo e outros metais que também são cátions bivalentes (cádmio, mercúrio, etc.) podem inibir competitivamente essas enzimas por substituição dos cofatores metálicos, como ocorre com a ALA-D, uma enzima essencial para a biossíntese de grupos heme (GUPTA et al., 2009, 2010).

A fim de combater as EROs e o estresse gerado por elas, as células vegetais e suas organelas desenvolveram sistemas antioxidantes, compostos por elementos enzimáticos, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), etc., e também não-enzimáticos como glutathiona reduzida (GSH), ácido ascórbico (reduzido), carotenoides e tocoferóis (GILL; TUTEJA, 2010; SINGH et al., 2008).

2.7.1 Catalase (CAT)

As catalases (EC 1.11.1.6) são enzimas tetraméricas que têm como grupo prostético um grupamento heme (GILL; TUTEJA, 2010), com monômeros contendo aproximadamente massa molecular de 55 kDa catalisando, em plantas e animais, a dismutação do H_2O_2 a H_2O e O_2 (MHAMDI; NOCTOR; BAKER, 2012). A CAT possui uma das mais elevadas taxas de *turnover* dentre todas as enzimas, podendo uma molécula de CAT dismutar, em um minuto, aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 a H_2O e O_2 (Figura 3)(GILL; TUTEJA, 2010).

Figura 3 - Reação catalisada pela CAT.



Fonte: GILL;TUTEJA (2010).

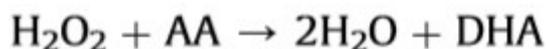
A CAT apresenta diferentes isoformas localizadas nas mitocôndrias, nos peroxissomos, nos glioxissomos e no citoplasma. As isozimas da CAT são espacial e temporalmente reguladas e podem responder diferencialmente à luz.

Três genes da catalase foram identificados nas angiospermas: arábida, abóbora, arroz, milho e tabaco (MHAMDI; NOCTOR; BAKER, 2012). O milho possui 3 genes que codificam a CAT (*CAT1*, *CAT2* e *CAT3*), localizados em diferentes cromossomos, diferencialmente expressos e independentemente regulados. As enzimas CAT1 e CAT2 são encontradas nos peroxissomos e no citosol, enquanto CAT3 está localizada na mitocôndria (GILL; TUTEJA, 2010).

2.7.2 Ascorbato peroxidase (APX)

Acredita-se que a ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11) seja a principal enzima guardiã contra as EROs, estando envolvida no consumo de H₂O₂ nos ciclos água – água, (em cloroplastos) e glutatona – ascorbato (diversos compartimentos celulares). A APX catalisa a reação que transforma peróxido de hidrogênio em água e desidroascorbato (Figura 4).

Figura 4 - Reação catalisada pela APX.



Fonte: GILL; TUTEJA (2010).

A APX é uma enzima que possui um grupamento heme como grupo prostético (KITAJIMA, 2008; SHIGEOKA et al., 2002). As APX são classificadas conforme sua localização subcelular e existem pelo menos 6 isoformas: APX estromal (sAPX) e APX de membrana de tilacóide (tAPX) em cloroplastos; APX de membrana de glioxissomos (gmAPX), APX de membrana de peroxissomos, APX citosólica (cAPX) e APX de membrana mitocondrial (mAPX) (GILL; TUTEJA, 2010a; LIENBEE; HEINZE; TRELEASE, 2003; SHIGEOKA et al., 2002). A APX apresenta maior afinidade para H₂O₂ do que a CAT, podendo possuir um papel crucial no combate às EROS durante estresse. Foi comprovado que, em *Brassica juncea*, e em trigo (*Triticum aestivum*), a APX em folhas teve sua atividade aumentada sob estresse com cádmio (Cd) (GILL; TUTEJA, 2010).

2.7.3 Superóxido dismutase

A superóxido dismutase (EC 1.15.1.1) representa a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos de EROs. Ela catalisa a eliminação do íon superóxido ($O_2^{\bullet -}$), dismutando dois íons superóxido a peróxido de hidrogênio e a oxigênio molecular (O_2) como mostra a equação da Figura 5.

Figura 5 - Reação Catalisada pela SOD.



Fonte: 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, o 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).

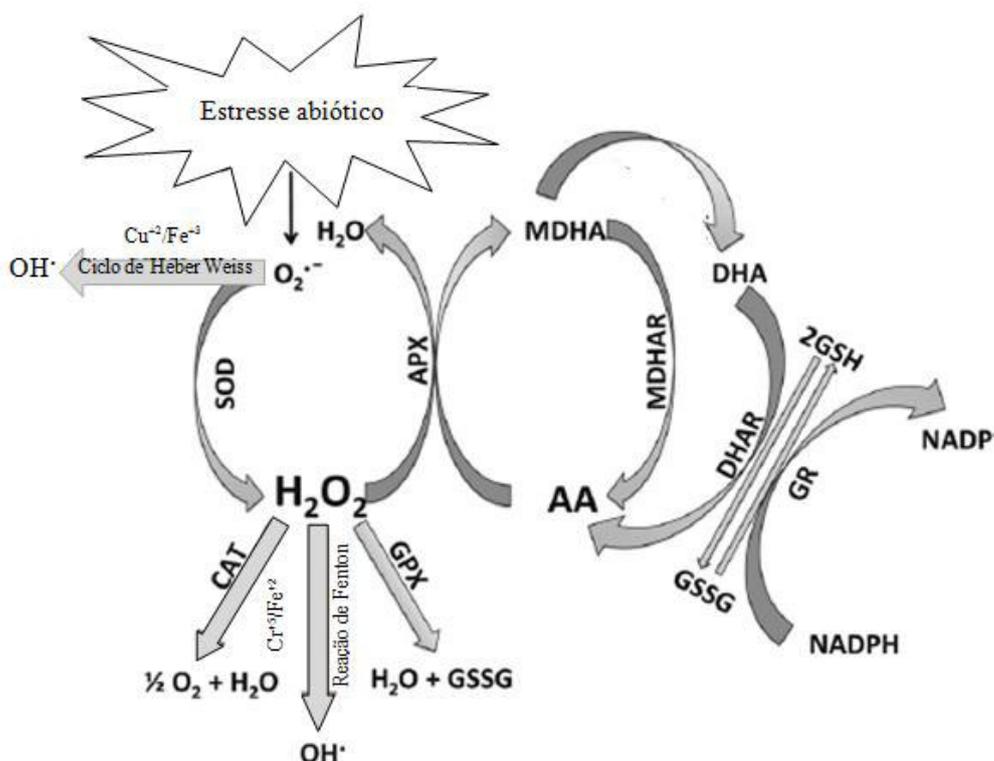
As SODs são classificadas em função dos íons que atuam como cofatores, em 3 classes : SOD Cu/Zn, SOD Mn e SOD Fe. Em plantas, as isoformas SOD Mn geralmente são encontradas nas mitocôndrias e nos peroxissomos; as SOD Cu/Zn são encontradas no citoplasma e nos cloroplastos. As isoformas de SOD Fe, frequentemente não são detectadas em plantas, quando presente, estão associadas ao cloroplasto (GILL; TUTEJA, 2010). Todas as isoformas da SOD são codificadas por DNA nuclear e sua

atividade geralmente é detectada com base na sua sensibilidade ao peróxido e ao cianeto de potássio (GILL; TUTEJA, 2010).

Além do sistema enzimático, vários compostos de baixo peso molecular atuam no combate as EROS tais como o aminoácido prolina, que além de osmólito, funciona como um potente removedor de 1O_2 e OH^\cdot , além de inibir a peroxidação lipídica. O α -tocoferol é uma forma de vitamina E que, com seus três grupos metila, possui elevada atividade antioxidante, podendo atacar até 120 moléculas de 1O_2 por transferência de energia de ressonância (GILL; TUTEJA, 2010).

Assim, a maquinaria celular antioxidante constitui uma proteção necessária contra as EROs e indiretamente contra os estresses que geram estresse oxidativo (Figura 6).

Figura 6 – EROs e mecanismos de defesa antioxidantes.



Fonte: GILL; TUTEJA (2010).

2.8 Fitorremediação

O fenômeno natural da tolerância a metais tóxicos tem despertado o interesse de pesquisadores de plantas nas mais distintas áreas (Ecologia, Fisiologia, Biologia e Bioquímica) com o intuito de investigar a fisiologia e a genética da tolerância a metais em plantas hiperacumuladoras como *Arabidopsis halleri* e *Thasspi caerulescens* (MEMON; SCHRODER, 2009).

Os métodos tradicionais de tratamento de solos contaminados com metais são excessivamente caros, porém, as plantas que ocorrem naturalmente em solos enriquecidos com metais são fontes biológicas para uso na remediação de solos degradados, constituindo a fitorremediação, uma técnica saudável e de baixo custo (GLASS, 2000; ZEITOUNI, 2003).

A fitorremediação consiste no uso de plantas e microrganismos do solo associados para diminuir a concentração ou toxicidade de contaminantes num ambiente (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Pode ser usada para a remoção de metais tóxicos, radioisótopos e poluentes orgânicos (compostos aromáticos polinucleares, etc.). É uma estratégia de baixo custo, eficiente, ecoamigável e de remediação movida por energia solar. O conceito de fitorremediação foi sugerido por Chaney, em 1983, onde *phyto* é um prefixo de origem grega que significa planta e *remedium* de origem latina, significando “remoção ou correção de um mal” (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). A metodologia é esteticamente agradável e possui grande aceitação, sendo apropriada para aplicação em amplos locais onde métodos convencionais de remediação não são rentáveis ou praticáveis (ALKORTA et al., 2003).

A tolerância a metais tem como base mecanismos múltiplos que variam desde uma fixação à parede celular através da formação de complexos com grupamentos carboxílicos, como ácido galacturônico e ácido glucurônico (RUDAKOVA et al., 1988), até o transporte ativo de íons para o vacúolo e formação de complexos com ácidos orgânicos ou peptídeos. Caso os sítios de fixação localizados no apoplasto não sejam suficientemente numerosos, o chumbo pode ter acesso ao simplasto e em seguida ser seqüestrado para o vacúolo tornando-se assim inativo. Assim estudos sobre tolerância, absorção e

distribuição de metais em plantas são extremamente relevantes para o sucesso em técnicas de fitorremediação.

A fitorremediação pode ser subdividida em 5 estratégias ou técnicas: fitoextração (também chamada de fitoabsorção ou fitoacumulação), fitofiltração, fitoestabilização, fitovolatilização e fitodegradação (ALKORTA et al., 2003). Dentre estas técnicas, a fitoextração é a mais utilizada para a remoção de metais do solo, sedimentos ou água (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

Para uma planta ser considerada fitoextratora, precisa possuir qualidades desejáveis como: alta taxa de crescimento, sistema radicular altamente ramificado e distribuído, translocação do metal pesado acumulado das raízes para a parte aérea, tolerância à toxicidade do metal, dentre outras. Cívém salientar 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. O potencial fitoextrator de uma planta é sobretudo determinado por 2 fatores-chave: a concentração do metal na parte aérea e sua biomassa.

Quando plantas conseguem sobreviver em solos ricos em metais, são chamadas metalófitas. As metalófitas são divididas em 3 categorias: metaloexcludentes, metaloindicadoras e hiperacumuladoras (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

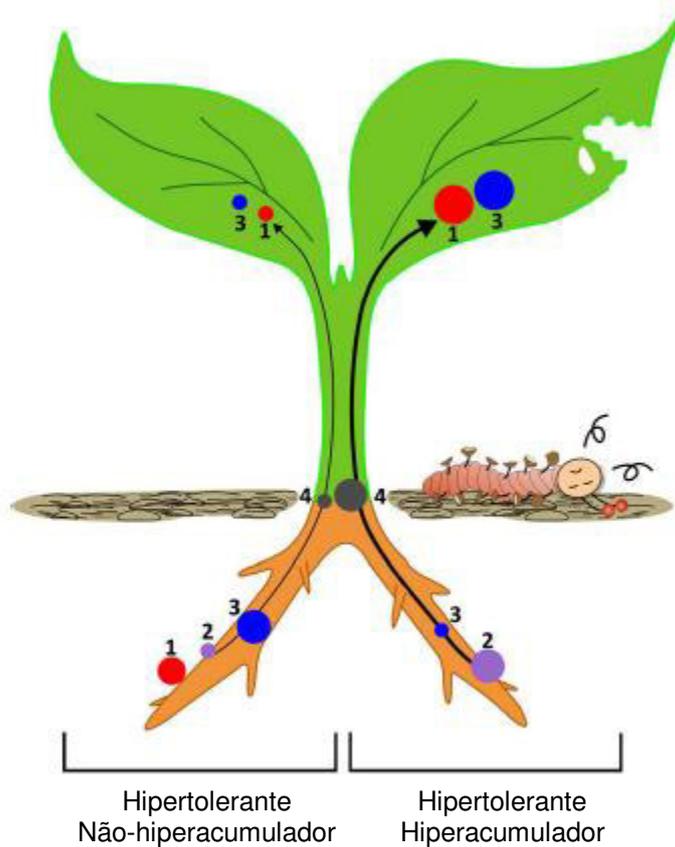
Metaloexcludoras acumulam metais na raiz e não permitem a translocação para as partes aéreas (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2011). Assim, essas plantas possuem baixo potencial fitoextrator, mas podem ser boas fitoestabilizadores (BARCELÓ; POSCHENRIEDER, 2003). Metaloindicadoras acumulam metais tóxicos na parte aérea. Conforme o nome (metalindicadora) essas plantas refletem as concentrações do metal no substrato (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2011). Hiperacumuladoras são plantas que absorvem quantidades elevadas de um ou mais metais tóxicos do solo. Em adição, os metais tóxicos não ficam retidos nas raízes, mas são translocados para o caule e acumulados em órgãos acima do solo, como as folhas (Figura 7), a concentrações de 100 a 1000 vezes maior que as encontradas em espécies não - acumuladoras, não exibindo nenhum sintoma de fitotoxicidade. Embora seja uma característica distinta, a hiperacumulação

também faz uso da hipertolerância, uma propriedade crucial que permite às plantas evitar a intoxicação por metais tóxicos (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Aproximadamente 25% das plantas hiperacumuladoras descobertas pertencem à família *Brassicaceae*, particularmente aos gêneros *Thlapsi* & *Alyssum* (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

2.8.1 Eficiência da Fitoextração

A eficiência da fitoextração pode ser avaliada através do cálculo dos fatores de bioconcentração (BCF) e de translocação (TF). O fator de translocação consiste na razão entre os valores de íons metálicos detectados na massa seca da parte aérea pelos valores de íons na massa seca das raízes enquanto que o fator de bioconcentração fornece a capacidade da planta em acumular o metal com relação à concentração do metal no substrato (ISLAM; UZ-ZAMAN; RAHMAN, 2013). Um hiperacumulador ideal deve possuir parte aérea com uma elevada capacidade de acumulação de metais, elevada biomassa, rápido crescimento e valores de BCF e TF superiores a 1 (DAS; GOSWAMI; TALUKDAR, 2014).

Figura 7 - Mecanismos envolvidos na hipertolerância aos metais pesados e distribuição dos metais pesados em plantas não-hiperacumuladoras (esquerda) e hiperacumuladoras (direita). Ligação dos metais pesados na parede celular (1) e/ou exudatos celulares, absorção pelas raízes (2), quelação no citosol e/ou sequestro para os vacúolos (3), translocação das raízes para a parte aérea (4). As circunferências representam os órgãos nos quais os diferentes mecanismos ocorrem e o tamanho das circunferências estão relacionados às concentrações dos metais. Altas concentrações de metais nas folhas torna os hiperacumuladores venenosos para os herbívoros.



Fonte: RASCIO; NAVARI-IZZO (2011)

3 OBJETIVOS

Geral: Avaliar os efeitos do chumbo bioquímica, fisiológica e molecularmente em cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp : Sempre Verde (SV) e Setentão (SET).

Específicos:

- Estabelecer as condições experimentais para o estudo dos efeitos do chumbo nos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Identificar os efeitos do chumbo nos parâmetros fisiológicos (massa seca, área foliar, concentração interna de CO₂, condutância estomática, transpiração, taxa fotossintética, taxa de transferência de elétrons/PSII, eficiência do PSII) em *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Determinar os efeitos do chumbo na germinação dos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Quantificar o Pb²⁺ em plântulas e plantas de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Determinar os fatores de translocação (TF) e de bioconcentração (BCF) do Pb nos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Quantificar Ca²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺, em presença de EDTA – Pb 0,5 mM nos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD), em presença de EDTA – Pb 0,5 mM, nos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Quantificar a expressão das famílias multigênicas CAT, APX e SOD, em raízes e em folhas na presença de EDTA – Pb 0,5 mM, dos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);
- Identificar alterações morfológicas em presença de EDTA – Pb 0,5 mM, em raízes e folhas, dos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp (SV e SET);

4 METODOLOGIA

4.1 Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de dois cultivares de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata* L. Walp), Sempre Verde (SV) e Setentão (SET) fornecidas pelo banco de sementes do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará.

4.2 Germinação das Sementes

Inicialmente as sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 5 minutos, para desinfecção. Após várias lavagens, foram embebidas em água destilada durante 2 horas. Em seguida as sementes foram semeadas em copos plástico (200 mL) contendo vermiculita, sendo diariamente irrigadas com água destilada (50mL), durante 7 dias. Posteriormente, as plântulas germinadas foram removidas e as raízes cuidadosamente lavadas com água destilada. Seis plântulas uniformes de cada cultivar foram transferidas para bacias de plástico contendo 12L de solução nutritiva diluída 1: 2, pH 5,0 segundo Hoagland e Arnon (1950) com pequenas modificações (Tabela 1). O sistema foi continuamente aerado e mantido em casa de vegetação por mais 7 dias com temperaturas médias de 28.3 ± 0.62 °C, umidade relativa do ar média de $75.0 \pm 1.9\%$ e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de $1200 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$.

Para o estudo dos efeitos do chumbo na germinação as sementes foram semeadas em folhas de papel de filtro, sendo regularmente distribuídas, e acondicionadas em depósitos contendo água suficiente para mantê-las umedecidas (200mL) durante 3 dias em câmara de vegetação tipo BOD, fotoperíodo de 12 horas, 30 °C/ 25 °C (EL 212, Eletrolab, Brasil).

Tabela 1 - Composição e concentração de sais usados no preparo da solução nutritiva (HOAGLAND; ARNON, 1950)

Solução Estoque	Volume (mL) para 1 Litro de solução
KNO ₃ 1 M	5,5 mL
NH ₄ H ₂ PO ₄ 1 M	2 mL
MgSO ₄ 1 M	1 mL
Ca(NO ₃) ₂ 1 M	4 mL
Fe-EDTA 10 µM	1 mL
Microelementos*	1 mL
KCl 1 M	0,5 mL

*Microelementos: H₃BO₃ (1 µM); MnSO₄ (0,08 µM); ZnSO₄ (0,08 µM); CuSO₄ (0,02 µM); H₂MoO₄ (0,02 µM).

4.3 Aplicação do Chumbo

Foram realizados dois experimentos preliminares com diferentes concentrações (0,2 e 0,5 mM) de nitrato de chumbo Pb(NO₃)₂ e EDTA-Pb afim de se determinar a melhor forma e concentração de chumbo a ser aplicada. Assim, após o período de aclimatação (7 dias após a semeadura), a solução de Hoagland foi trocada e o chumbo foi aplicado diretamente nessa solução, na concentração de 0,5 mM, em presença de EDTA, permanecendo por 7 dias. As plantas controle receberam apenas solução nutritiva. Diariamente, os níveis da solução nutritiva foram restituídos pela adição de água destilada e o pH monitorado, sendo mantido em aproximadamente 5,0.

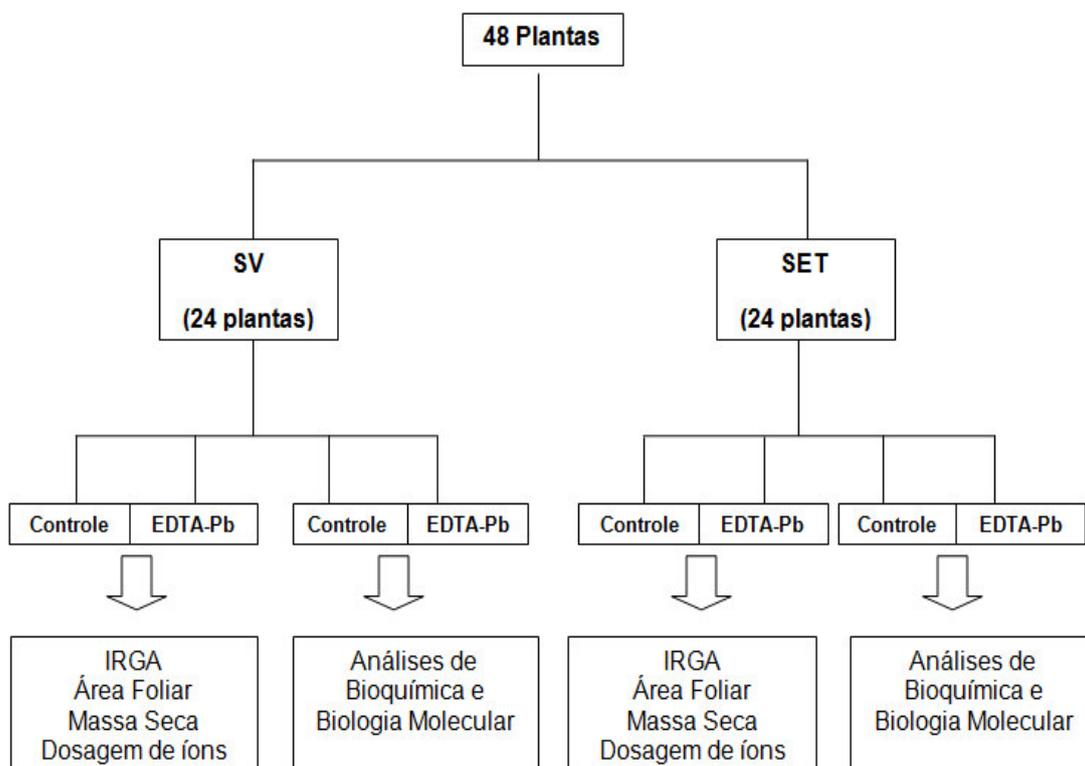
Para estudar os efeitos do chumbo durante o processo de germinação, nitrato de chumbo (Pb(NO₃)₂) na ausência e presença de EDTA, foi aplicado imediatamente após a semeadura, em diferentes concentrações (0,2, 0,5, 1, 2 e 2,5 mM), durante 3 dias.

4.4 Coleta do material vegetal e parâmetros analisados

O desenho experimental foi realizado levando em consideração a coleta de plantas dos dois cultivares (SV e SET). Para cada cultivar haviam 24 plantas divididas em dois grupos controle e dois grupos tratados com 6 plantas em cada grupo. Para a análise dos parâmetros fisiológicos e dosagem de íons em cada cultivar, utilizou-se um grupo controle e um grupo tratado, ambos contendo 6 plantas cada. Para as análises de Bioquímica e de Biologia Molecular outros dois grupos tratados ou não, por cultivar, foram utilizados com 6 plantas cada (Figura 8).

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

Figura 8 – Esquema do desenho experimental realizado para coleta do material vegetal



4.5 Parâmetros fisiológicos

O crescimento vegetal nas plantas foi avaliado pelas medidas de massa seca e área foliar. Para obtenção da massa seca as amostras foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C (Marconi Brasil) por cinco dias. Posteriormente, foram pesadas em balança digital (Tecnal Brasil). A área foliar foi determinada em integrador de área foliar Li – 3100 Li-cor Inc Lincoln, Nebraska EUA.

Os parâmetros de desenvolvimento analisados foram taxa fotossintética, condutância estomática, concentração intercelular de CO₂, transporte de elétrons e eficiência do PSII na presença e ausência de EDTA-Pb 0,5 mM usando um analisador de gás infravermelho portátil (IRGA, ADC System - Hoddesdon, UK).

Para as análises de Bioquímica foram coletadas a porção medial das raízes e o primeiro par de folhas completamente expandido e para as análises de Biologia Molecular coletou-se a porção final das raízes e a folha mais jovem. Seguidamente às coletas as raízes e folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer - 20 °C para as análises de Bioquímica e - 80 °C para as análises de Biologia Molecular.

Os íons dosados nas plantas foram Pb²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺.

4.6 Determinação do teor de íons nas plantas

As diferentes partes das plantas (raiz, caule e folha) e as plântulas (germinação) em cada condição (controle e presença de EDTA-Pb 0,5 mM) secas em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C (Marconi Brasil) por cinco dias, foram posteriormente trituradas em Mini Processador (Black & Decker Brasil). Em seguida 200 mg de cada amostra foram submersas em 3,75 mL de HNO₃ 65% e 1,25 mL de HCl 37% por 12 horas a temperatura ambiente (25°C). Posteriormente as amostras foram colocadas em bloco digestor (Tecnal TE 015, Brasil) a 120 °C por 3 h. Após esfriamento, foi adicionado 4 mL de Ácido Fluorídrico (HF) concentrado e a mistura foi digerida por mais 3 horas. Após digestão, as amostras permaneceram em temperatura ambiente e foram aferidas com água deionizada para o volume final de 25 mL. Terminada a

extração dos metais, os teores de Pb^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} foram determinados em espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Perkin Elmer 4300 DV).

4.7 Avaliação Quimiométrica dos íons Ca^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} nas plantas submetidas ao estresse com EDTA-Pb.

Os analitos Ca^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} foram avaliados utilizando o programa Pirouette 3.11 por Análise de Componentes Principais (PCA) aplicada a matriz de dados gerada pela determinação dos metais.

4.8 Quantificação da Eficiência da Fitoextração

A eficiência da fitoextração pode ser quantificada pelos cálculos dos fatores de translocação (TF) e de bioconcentração (BCF).

4.8.1 Fator de Translocação

Para avaliar a eficiência da planta em absorver e transportar metais das raízes para a parte aérea foi realizado o cálculo do fator de translocação (TF). O TF consiste na razão entre os valores de íons metálicos detectados na massa seca da parte aérea dividido pelos valores de íons determinados na massa seca das raízes, como descrito na fórmula a seguir (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; ISLAM; UZ-ZAMAN; RAHMAN, 2013).

$$TF = \frac{\text{Teor de metal na massa seca da parte aérea (mg g}^{-1}\text{)}}{\text{Teor de metal na massa seca das raízes (mg g}^{-1}\text{)}}$$

4.8.2 Fator de Bioconcentração

Para avaliar a eficiência da planta em absorver e acumular um metal dentro de seus tecidos, realizou-se o cálculo do fator de bioconcentração ou fator de acumulação. O BCF pode ser calculado de acordo com a fórmula descrita abaixo (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; ISLAM; UZ-ZAMAN; RAHMAN, 2013).

$$\text{BCF (L g}^{-1}\text{)} = \frac{\text{Concentração do metal na parte aérea seca (mg g}^{-1}\text{)}}{\text{Concentração inicial do metal no solo (ou solução nutritiva) (mg L}^{-1}\text{)}}.$$

4.9 Determinação da atividade enzimática

4.9.1 Preparo das amostras

Para obtenção do extrato enzimático 150 mg de raízes e folhas de *V. unguiculata* foram submersas em nitrogênio líquido e maceradas por 5 minutos, usando almofariz e pistilo. Seguidamente, as amostras controle e tratadas com chumbo foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão Fosfato de Potássio 100 mM (pH 7,0) em presença de EDTA 0,1 mM, para CAT e SOD ou contendo EDTA 0,1 mM com ascorbato 1,0 mM para a atividade da APX. Esse extrato foi centrifugado a 12 000 x g por 30 minutos a 4^oC, em centrífuga (Hettich Zentrifugen mikro 200R, Germany). Posteriormente utilizou-se o sobrenadante para determinação das atividades. O teor de proteínas solúveis totais no extrato foi determinado de acordo com Bradford (1976) usando Albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Todas as atividades enzimáticas foram realizadas em microplaca Synergy Mx, (BioTek, USA).

4.9.2 Atividade da catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi medida como descrito em (HAVIR; MCHALE, 1987), com pequenas modificações. A mistura de reação (150 µL) foi composta de tampão fosfato 86 mM (pH 7.0), EDTA 0, 086

mM, H₂O₂ 20 mM e 20 µL de extrato enzimático. O decaimento de H₂O₂ foi monitorado a 240 nm durante 10 minutos e a atividade enzimática foi quantificada usando o coeficiente de absorção do H₂O₂ (36 mM⁻¹ cm⁻¹). Os resultados foram expressos em µmol H₂O₂. mg proteína⁻¹ min⁻¹.

4. 9. 3 Atividade da ascorbato peroxidase (APX)

A atividade da APX (APX, EC 1.11.1.1) foi determinada de acordo com Nakano e Asada, (1981). A solução de reação consistiu de tampão fosfato de potássio 36 mM (pH 6.0), EDTA 0,036 mM, ascorbato 0,5 mM, H₂O₂ 1 mM e 30 µL de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de H₂O₂. A oxidação do ascorbato foi medida a 290 nm por 10 minutos. A atividade da enzima foi quantificada usando o coeficiente de extinção molar do ascorbato (2.8 mM⁻¹ cm⁻¹) e os resultados foram expressos em µmol.mg protein⁻¹ min⁻¹.

4. 9. 4 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi realizada como descrito por Giannopolitis e Ries (1977). A mistura de reação consistiu de 100 µL de tampão fosfato 33 mM (pH 7,8) contendo EDTA 0,06 mM e metionina 13 mM, 15 µL de “nitro blue tetrazolium” (NBT) 0,075 mM, 30 µL de riboflavina 0,002 mM e 5 µL de extrato enzimático. Seguidamente a mistura de reação foi iluminada com lâmpada de 20 W por 15 minutos, após esse tempo 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 UA mg⁻¹ proteína.

4.10 Determinação da expressão gênica pela Reação em Cadeia da DNA Polimerase quantitativa em tempo real (RT- qPCR)

4.10.1 Extração de RNA total

Para extração do RNA total 200 mg do material vegetal (raízes e folhas) foram macerados em nitrogênio líquido, utilizando-se almofariz e pistilo. Após a maceração o RNA total das plantas foi extraído usando “RNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante. Assim, adicionou-se 700 μ L do tampão RLT e 10 μ L de β – mercaptoetanol às amostras maceradas que seguidamente foram homogeneizadas em vórtex. A solução obtida foi, através de pipetagem, transferida para uma mini coluna do kit (QIAshredder spin column - lilás, acoplada a um tubo coletor de 2 mL) e centrifugada a 25 $^{\circ}$ C por 2 minutos a 18.626 x g. O sobrenadante obtido foi então transferido para um novo tubo eppendorf, ao qual foram adicionados 500 μ L de etanol 95%. Após adição de etanol a amostra foi homogeneizada por inversão. Seguidamente tal amostra (aproximadamente 700 μ L) foi transferida para uma nova coluna do kit (RNeasy mini spin column – rósea, acoplada a um tubo coletor de 2 ml) e centrifugada a temperatura ambiente (25 $^{\circ}$ C) por 15 segundos a 9 500 x g. O eluído foi descartado e à coluna rósea foi adicionado 350 μ L de tampão RW1, prosseguindo-se com uma nova centrifugação a temperatura ambiente por 15 segundos a 9 500 x g. Um passo adicional de digestão foi realizado durante a purificação do RNA, pois 80 μ L de desoxirribonucleases (DNase) (QIAGEN) foi adicionada na coluna, sendo esta deixada a temperatura ambiente durante 15 minutos. Esse tratamento é necessário para remover possíveis contaminações com DNA genômico. Posteriormente ao tratamento com DNase adicionou-se novamente 350 μ L do tampão RW1 e uma nova centrifugação a temperatura ambiente por 15 segundos a 9 500 x g foi realizada. Decorrida a centrifugação a coluna foi transferida para um novo tubo coletor e a ela foram adicionados 500 μ L do tampão RPE. Seguidamente uma nova centrifugação foi realizada (temperatura ambiente por 15 segundos a 9 500 x g). O eluído foi descartado e novamente 500 μ L do tampão RPE foi adicionado, realizando-se uma nova centrifugação a temperatura ambiente por 2 minutos a 9 500 x g, a fim de eliminar qualquer

resíduo de etanol que possa interferir em reações posteriores. Em sequência eluído e tubo coletor foram descartados e a coluna foi transferida para um novo tubo coletor de 1,5 mL. Posteriormente, à coluna rósea foram adicionadas 40 µL de água livre de RNases, submetendo-se uma nova centrifugação, por 1 minuto a 9 500 x g, com objetivo de eluir o RNA total. Deste modo, o RNA agora eluído foi armazenado em freezer a – 20 °C para posterior quantificação, reações de transcrição reversa (TR) e análises de PCR em tempo real (qPCR).

4.10.2 Quantificação e pureza do RNA total

Após extração o RNA total foi quantificado através de leitura espectrofotométrica a 260 nm (Nanodrop 2000/Thermo scientific) e a pureza das amostras foi determinada. Para estimar a pureza das amostras e identificar possíveis contaminações com proteínas, utilizou-se a razão de 260/280 nm de absorbância (que deve estar entre 1,8 a 2 nm) e para contaminação por polissacarídeos utilizou-se a razão de 260/230 nm de absorbância que deve estar acima de 2 nm.

4.10.3 Integridade do RNA total

A integridade do RNA e contaminação por DNA genômico foi verificada usando-se 0,5 µg de RNA total. Para tanto se realizou uma eletroforese em gel de agarose 1,5%. A agarose (ainda líquida) foi colocada em uma bandeja apropriada para inserção de pentes, o que possibilita a formação de poços. Após solidificação, o gel de agarose foi colocado em uma cuba eletroforética, e esta foi preenchida com tampão MOPs 10X e ligada a um gerador que polariza a cuba com amperagem constante de 35 mA. Nos poços foram aplicados um volume X de amostra, volume este determinado de acordo com a concentração do RNA total extraído, 1,5 µL do tampão Azul de bromo fenol e água DEPC (livre de RNases) para completar o volume final de 5 µL. A corrida eletroforética teve duração de aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). O RNA possui carga elétrica negativa em pH neutro o que determina sua migração nos poros do gel em direção ao polo

positivo da cuba, o que permite a formação de bandas separadas de acordo com o tamanho molecular de seu fragmento. Após a corrida eletrofóretica o gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) durante 10 minutos. O brometo de etídeo é um agente intercalante de RNA/DNA, que permite a visualização das bandas de DNA/RNA, quando exposto à luz ultravioleta.

Para visualização do RNA ribossomal (18S e 28S) no gel de agarose foi utilizado o transiluminador de luz UV, sendo o RNA fotodocumentado por meio do sistema Mini BIS Pro (Bio-Imaging Systems) com auxílio do software GEICapture™.

4.10.4 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Após extração, quantificação, análise de pureza e integridade o RNA total foi utilizado para a síntese de DNA complementar (cDNA), utilizando-se o kit “Improm II” Transcriptase Reverse (Promega, Estados Unidos), segundo as instruções do fabricante.

A transcrição reversa foi realizada com aproximadamente 1 µg de RNA total, oligodT₁₈, MgCl₂ 25 mM, dNTPs 10 mM, tampão de reação 5X e água livre de RNases (Quiagen). A Tabela 2 mostra os reagentes utilizados para esta reação, bem como os seus respectivos volumes. A solução obtida (19 µl) após adição dos reagentes foi submetida a temperatura de 65 °C por 5 minutos para desnaturação do RNA, sendo transferida para o gelo. Seguidamente, 1 µL da enzima transcriptase reversa foi adicionada em cada tubo de reação, completando-se o volume para 20 µL.

A reação de síntese da fita complementar ocorreu a 42 °C por 1 hora, seguida de 75 °C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a - 20 °C para posteriores reações de qPCR.

Os cDNAs obtidos após as reações de RT foram diluídos para uma concentração final de 25 ng/µL considerando-se que a concentração inicial era de aproximadamente 1000 ng/µL para todas as amostras.

Tabela 2 - Componentes e volumes usados nas reações de transcrição reversa.

Reagentes	Volumes
RNA total	Variável em função da leitura espectrofotométrica para 1 µg de RNA total
Tampão 5X	4 µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µL
dNTPs (10 mM)	1,0 µL
OligodT ₁₈ (20 pmols/µL)	1,5 µL
H ₂ O livre de RNAses	Variável em função do volume de RNA total
Transcriptase reversa (160 µ/µL)	1,0 µL

4. 10. 5 Desenho dos iniciadores específicos (“Primers”)

Para a avaliação da expressão relativa das enzimas antioxidantes foi necessário criar iniciadores específicos (“Primers”) que permitissem a realização da reação em tempo real da cadeia da polimerase (qPCR). Assim, etiquetas de sequências expressas (ESTs) foram obtidas a partir de dados de EST (expressed sequence tag) do GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e/ou do Banco de Dados Genômicos do Feijão (CHEN et al. , 2007). Os genes da CAT, APX e SOD de *V. unguiculata* foram nomeados de acordo com a relação filogenética existente com os genes de *Arabidopsis thaliana*. Iniciadores específicos das famílias multigênicas da SOD (*VuSODCu/Zn 1 a 3*, *VuSODMn 1*, *VuSOD Cu/Chap 1*, *VuSODFe 1 a 3*), APX (*VuAPX1 a 6*) e CAT (*VuCAT1 e 2*) foram desenhados e testados quanto a porcentagem de conteúdo CG, temperatura de anelamento, formação de grampos e autocomplementariedade usando o programa Perl primer V1.1.20 (MARSHALL, 2004).

4.10.6 Quantificação dos iniciadores específicos (“Primers”)

Inicialmente os “primers” foram diluídos para a concentração de 500 μM , sendo posteriormente, quantificados em triplicata usando-se o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Da média das concentrações obtidas das leituras foi calculada a concentração real de cada *primer*, sendo estes, posteriormente diluídos para uma concentração de 6 μM , a fim de se obter uma concentração final de 300 nM/ μL , concentração esta que foi utilizada nas reações de qPCR.

4.10.7 Gradiente de temperatura

Todos os pares de iniciadores desenhados foram previamente testados através da reação em tempo real da cadeia da polimerase (qPCR) para determinação da temperatura ótima de anelamento de cada gene. Neste caso um “pool” das amostras de cDNA foi utilizado. O procedimento foi realizado em termociclador Mastercycler ep realplex 4S (Eppendorf®). As temperaturas usadas foram para as famílias multigênicas da CAT e APX (46,6; 49,9 ; 52,2 ; 54,9 ; 57,6 ; 60,2 ; 64,4 e 65,9 $^{\circ}\text{C}$) e para a família multigênica da SOD (52,6 ; 55,1 ; 57,1 ; 59,2 ; 61,4 ; 63,5 ; 65,3 e 68 $^{\circ}\text{C}$). Os genes Insulinase, EF-1 α 1, EF-1 α 2, , EF-1 α 3 , EF-1 β e f-BOX foram testados como controle endógeno usando o programa GeNorm (qBase^{PLUS} Version 2.4) (HELLEMANS et al., 2007).

4.10.8 Determinação dos transcritos através de qPCR (PCR em Tempo Real)

As reações de qPCR foram realizadas em Mastercycle ep realplex 4S (Eppendorf) em placa com 96 poços. Cada reação teve o volume final de 20 μl , contendo 4 μl cDNA (100 ng/ μL), 10 μl de Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems), 2 μl dos *primers* específicos com concentração de 300 nM e 4 μl de água ultrapura. Todas as reações foram realizadas em triplicata e com controle negativo (sem cDNA). Foram realizados 40 ciclos de desnaturação, anelamento e amplificação. A desnaturação inicial das amostras

foi de 95°C por 10min. A etapa de anelamento para cada par de *primer* foi de 60 °C por 20s seguida da amplificação dos cDNAs a 95°C durante 15s. Para verificar a especificidade dos *primers* após o término da amplificação utilizou-se a “curva de melting” na qual se avaliou a relação entre fluorescência e temperatura.

Após a realização das reações de PCR em tempo real, a expressão dos genes foi determinada 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 Ct (*Cycle treshold*). Os Cts utilizados para as análises foram obtidos através da média aritmética entre as triplicatas de reações para cada condição e gene. Os valores brutos de Ct foram 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).

4.11 Análise ultra estrutural das raízes e folhas de *Vigna unguiculata*

4.11.1 Preparo das amostras para microscopia

Cortes transversais de folhas jovens e de raízes primárias dos cultivares de *V. unguiculata* foram realizados a mão livre. Nas raízes esses cortes foram feitos 1mm acima da zona pilífera e nas folhas na parte mais central do limbo, evitando-se qualquer nervura. Em seguida os tecidos foram gentilmente colocados em microtubos de 1,5 mL, identificados, congelados e mantidos em nitrogênio líquido. Posteriormente o material foi liofilizado durante o período de 24h.

4.11.2 Análise em microscópio eletrônico de varredura

Amostras (cortes transversais) de folhas e raízes foram colocadas sobre fitas de carbono adesivas aderidas em “stumbs”. Seguidamente as amostras foram metalizadas, em pressão de argônio de 10 psi, com partículas de ouro até que atingissem a espessura de 10 nm (Quorum Q150T ES,

Systemex, Holanda). Após a metalização, as amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Inspect F50, FEI, Holanda) e as imagens geradas no programa xT Microscope Control.

4.12 Análise Estatística

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado em arranjo fatorial 2 x 2. Os tratamentos (controle e EDTA-Pb) e cultivares (SET, SV) foram usados como fatores independentes em uma série two-way ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com $P \leq 0,05$ e os resultados foram expressos como o erro padrão da média (SEM).

5 RESULTADOS

5.1 Teor de Pb^{2+} e seu efeito no tamanho das plântulas de *Vigna unguiculata*.

O teor de Pb^{2+} foi determinado nas plântulas dos cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), 72 horas após a semeadura das referidas sementes, na ausência e na presença de diferentes concentrações de EDTA-Pb e $Pb(NO_3)_2$ (0,2 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5 mM) (Figura 9).

A Figura 9A mostra o valor do teor de Pb^{2+} presente nas plântulas de SV nas concentrações 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5 mM de EDTA-Pb, que foi respectivamente 0,145, 0,151, 0,139, 0,126 e 0,125 mg.Pb.g⁻¹ MS. Já nas plântulas germinadas em presença de $Pb(NO_3)_2$, o teor detectado foi 0,067, 0,049, 0,039, 0,083 e 0,074 mg.Pb.g⁻¹ MS nas concentrações 0,2 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5 mM respectivamente. Comparando-se o acúmulo de chumbo nas plântulas germinadas na ausência e na presença do agente quelante (EDTA) constatou-se que os valores de Pb^{2+} , na presença de EDTA, foram em média 2,4 vezes maiores que em sua ausência.

A Figura 9B, apresenta o valor do teor de Pb^{2+} nas plântulas de SET germinadas em presença de 0,2 0,5, 1,0 2,0 e 2,5 mM de EDTA-Pb, que foram respectivamente 0,078, 0,097, 0,140, 0,164 e 0,213 mg.Pb.g⁻¹ MS. Já nas plântulas submetidas a $Pb(NO_3)_2$, o teor detectado foi 0,057, 0,045, 0,053, 0,075 e 0,127 mg.Pb.g⁻¹ MS nas concentrações de 0,2 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5 mM respectivamente.

Após 72h de exposição ao Pb constatou-se que as plântulas de SV apresentavam a mesma quantidade de Pb^{2+} , independente das concentrações de EDTA-Pb, ao passo que em SET o teor de Pb^{2+} foi proporcional a concentração de EDTA-Pb, alcançando-se um valor 2,7 vezes maior na concentração 2,5 mM quando comparada à concentração 0,2 mM (Figura 9).

O efeito de diferentes concentrações (0,2, 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5 mM) de EDTA-Pb e de $Pb(NO_3)_2$ nos cultivares SV e SET foi avaliado através do comprimento das plântulas após 72h (Figura 10)

As plântulas (raízes e hipocótilos) de SV independente do tratamento, isto é, ausência ou presença de EDTA-Pb, apresentaram um perfil de crescimento semelhante entre si (Figuras 11 e 12). Igualmente, as plântulas

de SET apresentaram perfil de crescimento semelhante entre si nas mesmas condições (Figuras 13 e 14). Também não se verificou diferença significativa entre os comprimentos das plântulas de ambos cultivares nas duas condições (Figura 10).

Figura 9 – Teor de Pb^{2+} em plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV; A) e Setentão (SET; B), após 72 horas da sementeira em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb ou $Pb(NO_3)_2$, em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM. Letras minúsculas diferentes, em uma mesma forma de chumbo, ou letras maiúsculas diferentes, em uma mesma concentração de chumbo, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$)

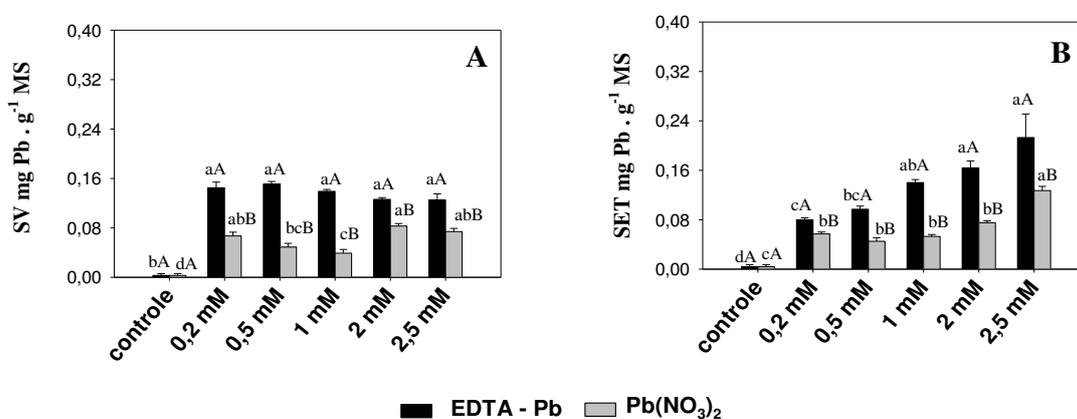


Figura 10 - Comprimento de plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV; A) e Setentão (SET; B), após 72 horas da sementeira em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb ou $Pb(NO_3)_2$, em concentrações variando de 0,2 a 2,5 mM. Letras minúsculas diferentes, em uma mesma forma de chumbo, ou letras maiúsculas diferentes, em uma mesma concentração de chumbo, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$)

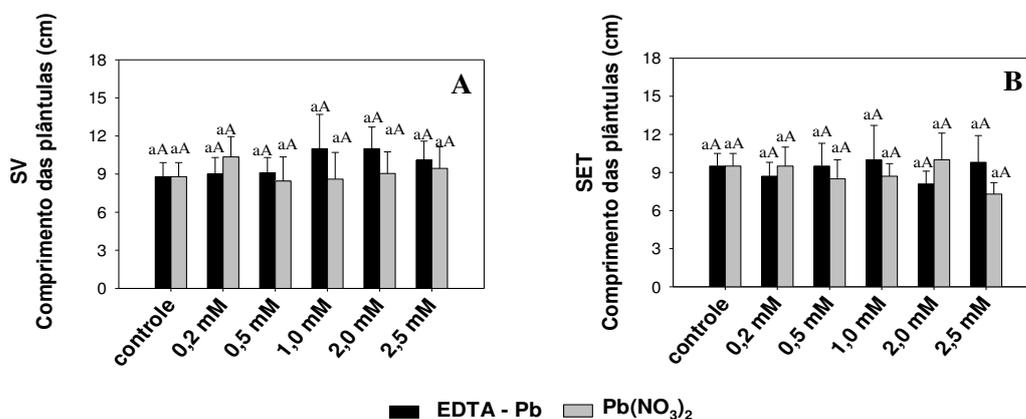


Figura 11 - Plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivar Sempre Verde, após 72 horas da sementeira em ausência (controle; A) ou presença de EDTA-Pb nas concentrações 0,2 (B), 0,5 (C), 1,0 (D), 2,0 (E) e 2,5 mM (F).



Figura 12 - Plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivar Sempre Verde, após 72 horas da semente em ausência (controle; A) ou presença de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ nas concentrações 0,2 (B), 0,5 (C), 1,0 (D), 2,0 (E) e 2,5 mM (F).

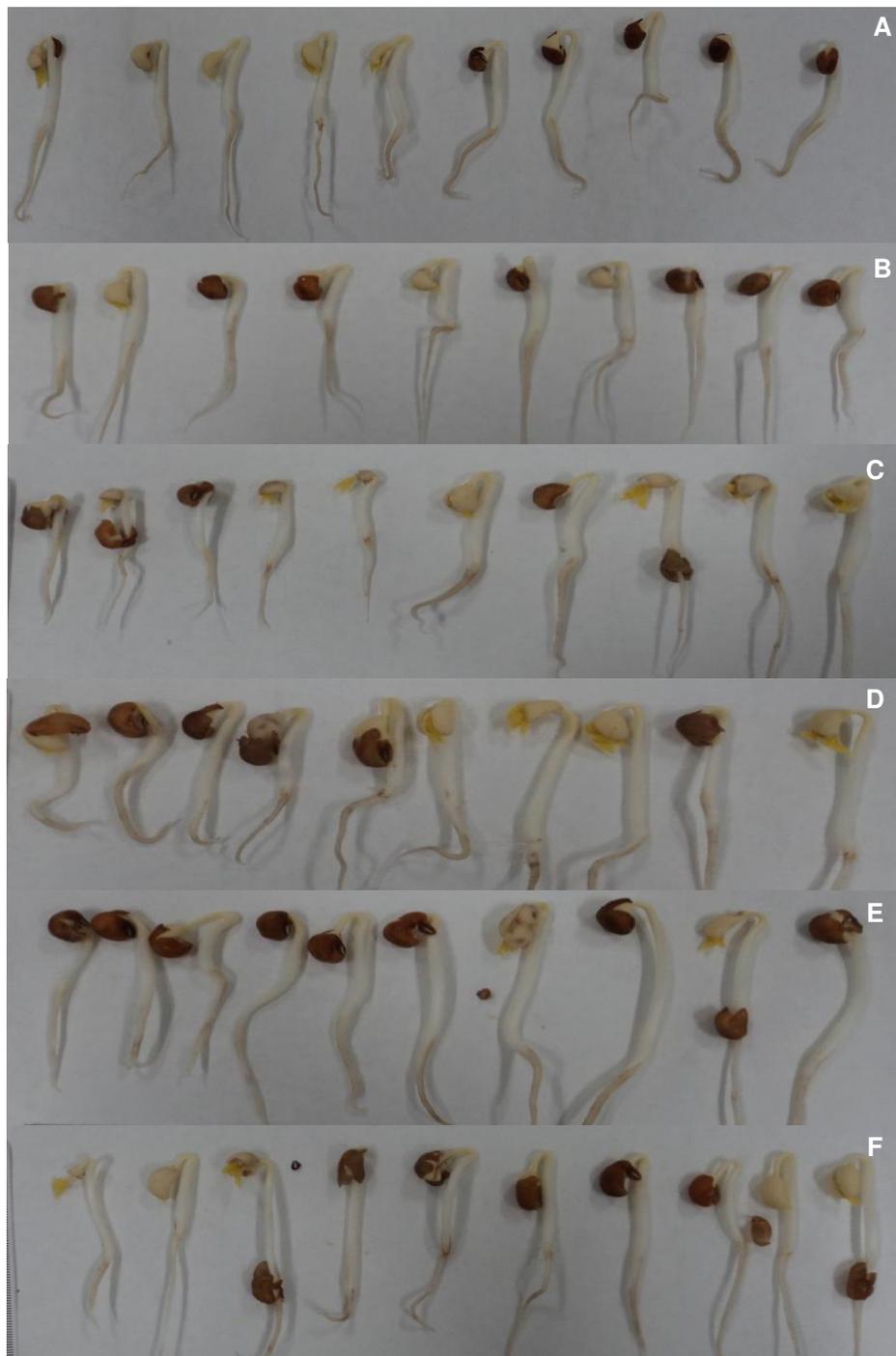


Figura 13 - Plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivar Setentão, após 72 horas da semeadura em ausência (controle; A) ou presença de EDTA-Pb nas concentrações 0,2 (B), 0,5 (C), 1,0 (D), 2,0 (E) e 2,5 mM (F).

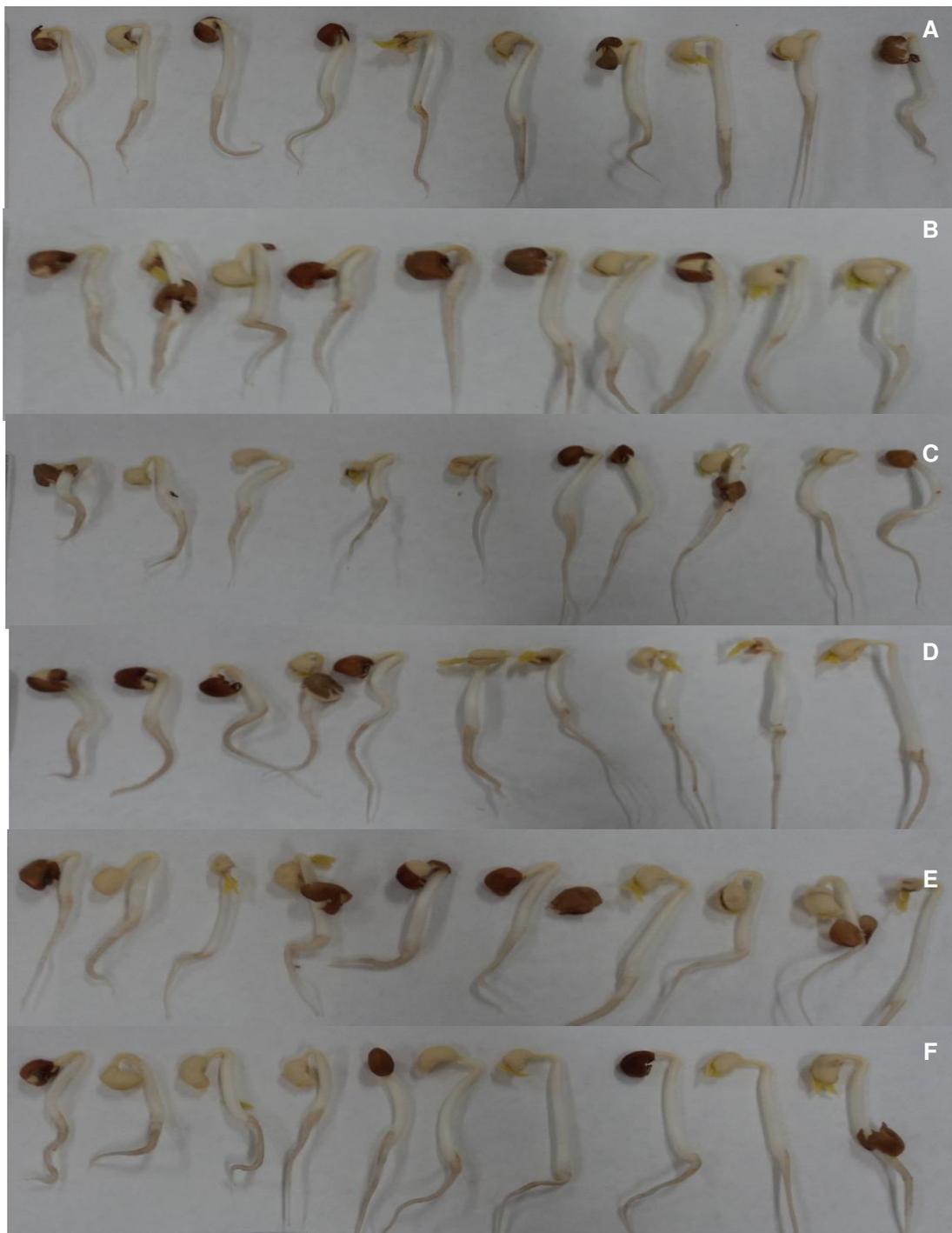


Figura 14 - Plântulas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivar Setentão, após 72 horas da semeadura em ausência (controle; A) ou presença de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ nas concentrações 0,2 (B), 0,5 (C), 1,0 (D), 2,0 (E) e 2,5 mM (F).



5.2 Teor de Pb²⁺ nas plantas de *Vigna unguiculata*.

O teor de Pb²⁺ foi determinado nas raízes, nos caules e nas folhas das plantas de SV e SET (Figura 15). As plantas foram tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM, no 14^o dia após a germinação, durante 7 dias quando foram coletadas. O valor dos teores de Pb²⁺ determinados nas raízes de SV e SET foram 2,0 e 1,2 mg.Pb.g⁻¹ MS respectivamente, revelando que SV acumulou o dobro de Pb²⁺ comparado a SET (Figura 15A). Não foi detectado teor de Pb²⁺ significativo nos valores das amostras controle.

Já o valor do teor de Pb²⁺ nos caules desses cultivares foi 0,20 e 0,25 mg Pb g⁻¹ MS para SV e SET respectivamente, mostrando valores semelhantes (Figura 15B).

Nas folhas de SV e SET os valores do teor de Pb²⁺ foram 0,65 e 1,83 mg Pb g⁻¹ MS, respectivamente, isto é, SET acumulou aproximadamente 3 vezes mais que SV (Figura 15C).

5.3 Eficiência de fitoextração nas plantas de *Vigna unguiculata* (TF e BCF)

A Tabela 3 mostra os valores de TF e BCF obtidos para os cultivares SV e SET. O valor de TF no cultivar SV foi 0,4 revelando nesse cultivar baixa habilidade de translocação do Pb para a parte aérea, mas indicando a capacidade desse cultivar em estocar Pb preferencialmente em suas raízes. No cultivar SET o valor de TF foi 1,7 revelando nesse cultivar maior capacidade de translocação e estocagem de Pb nas folhas. Comparando-se SV e SET observou-se que o valor de TF em SET foi 4,25 vezes superior ao valor de TF encontrado em SV. No tocante ao BCF em ambos cultivares foi inferior a 1.

Figura 15 – Teor de Pb^{2+} em raízes (A), caules (B) e folhas (C) de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM. Letras minúsculas diferentes, em um mesmo cultivar, ou letras maiúsculas diferentes, em um mesmo tratamento, diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$)

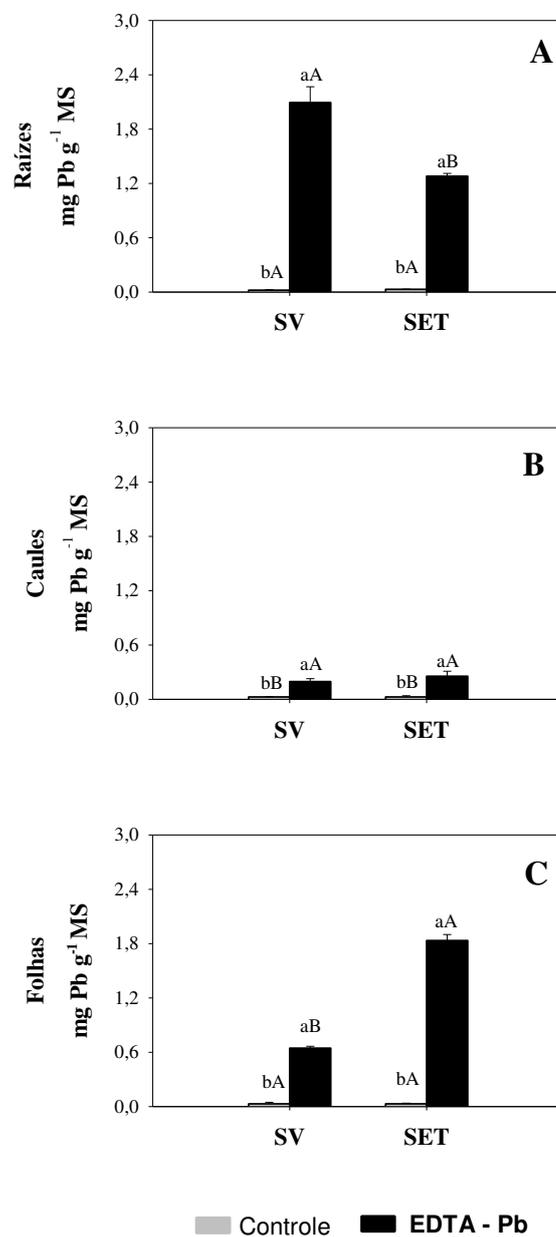


Tabela 3 – Teor de Pb²⁺ e fatores de translocação (TF) e de bioconcentração (BCF) em plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM.

	Teores de Pb (mg Pb/g de MS)			TF	BCF (L g ⁻¹)
	Raiz	Caule	Folha		
SV	2,093	0,195	0,645	0,4	0,01
SET	1,279	0,254	1,834	1,7	0,02

5.4 Efeito do Pb no teor de Ca²⁺ e Zn²⁺ nas plantas de *Vigna unguiculata*

O teor de Ca²⁺, Zn²⁺ e Cu²⁺ foi determinado nas raízes, caules e folhas de SV e SET em presença e ausência de EDTA-Pb 0,5 mM (Figura 16).

Nas raízes de SV o teor de Ca²⁺ nas plantas controle e tratadas foi 2,06 e 0,80 mg.Ca.g⁻¹ MS respectivamente. Em SET o teor de Ca²⁺ nas raízes das plantas controle e tratadas foi 1,74 e 2,54 mg.Ca.g⁻¹ MS respectivamente (Figura 16A). Comparando-se o teor de Ca²⁺ nas raízes dos dois cultivares tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, o valor encontrado para SV foi 70 % menor que o obtido para SET (p≤0,05).

Nos caules de SV o teor de Ca²⁺ nas plantas controle foi 3,33 mg.Ca.g⁻¹ MS, enquanto que nas plantas tratadas foi 4,31 mg.Ca.g⁻¹ MS (Figura 16B). O teor de Ca²⁺ nos caules nas plantas controle de SET foi 4,31 mg.Ca.g⁻¹ MS, enquanto que nas plantas tratadas foi 5,40 mg.Ca.g⁻¹ MS (Figura 16B). Comparando-se o teor de Ca²⁺ nos caules dos dois cultivares tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, o valor encontrado para SV foi inferior ao de SET (23%) embora estatisticamente não tenha representado uma alteração com significância (p≥0,05).

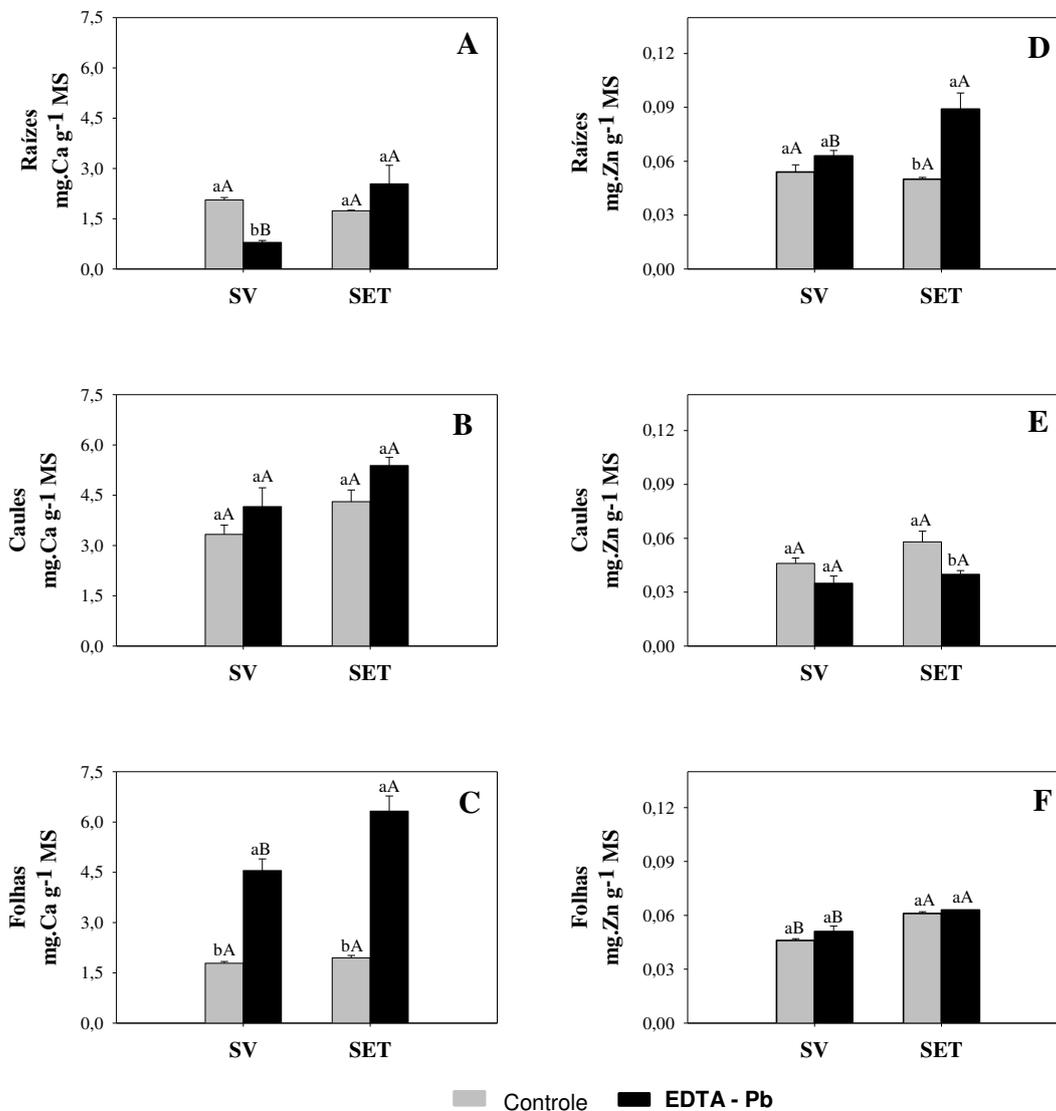
Nas folhas, o teor de Ca²⁺ aumentou nas plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM, tanto em SV (4,55 mg.Ca.g⁻¹ MS) quanto em SET (6,32 mg.Ca.g⁻¹ MS), quando comparadas aos respectivos controles nos valores de 1,78 e 1,94 mg.Ca.g⁻¹ MS sendo tais diferenças estatisticamente significativas (p≤0,05) (Figura 16C). Comparando-se os dois cultivares quanto aos teores de cálcio nas folhas, o valor encontrado para SV foi 39 % menor que o obtido em SET (p≤0,05).

O teor de Zn^{2+} nas raízes das plantas de SV, controle e tratadas, foi 0,05 e 0,06 $mg.Zn.g^{-1}$ MS respectivamente e em SET foi 0,04 e 0,09 $mg.Zn.g^{-1}$ MS igualmente nas raízes das plantas controle e tratadas (Figura 16D). Comparando-se o teor de Zn^{2+} nas raízes dos dois cultivares tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, o valor encontrado para SV foi 48,3 % menor que o obtido para SET ($p \leq 0,05$).

. Nos caules, o teor de Zn^{2+} foi similar em ambos cultivares. Em SV o teor de Zn^{2+} nas plantas controle foi 0,05 $mg.Zn.g^{-1}$ MS, enquanto que nas plantas tratadas o valor obtido foi 0,04 $mg.Zn.g^{-1}$ MS (Figura 16E). Já em SET o teor de Zn^{2+} nas plantas controle foi 0,06 $mg.Zn.g^{-1}$ MS, enquanto que nas plantas tratadas o valor obtido foi 0,04 $mg.Zn.g^{-1}$ MS. Comparando-se o teor de Zn^{2+} nos caules dos dois cultivares tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, o valor encontrado para SV foi similar ao encontrado para SET. Por outro lado, nas folhas dos cultivares os valores de Zn^{2+} obtidos na presença de EDTA-Pb 0,5 mM (Figura 16F) para SV foi 19 % menor que o obtido para SET ($p \leq 0,05$).

O teor de Cu nas raízes, nos caules e nas folhas de SV e de SET em plantas controle e tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM não foi detectado.

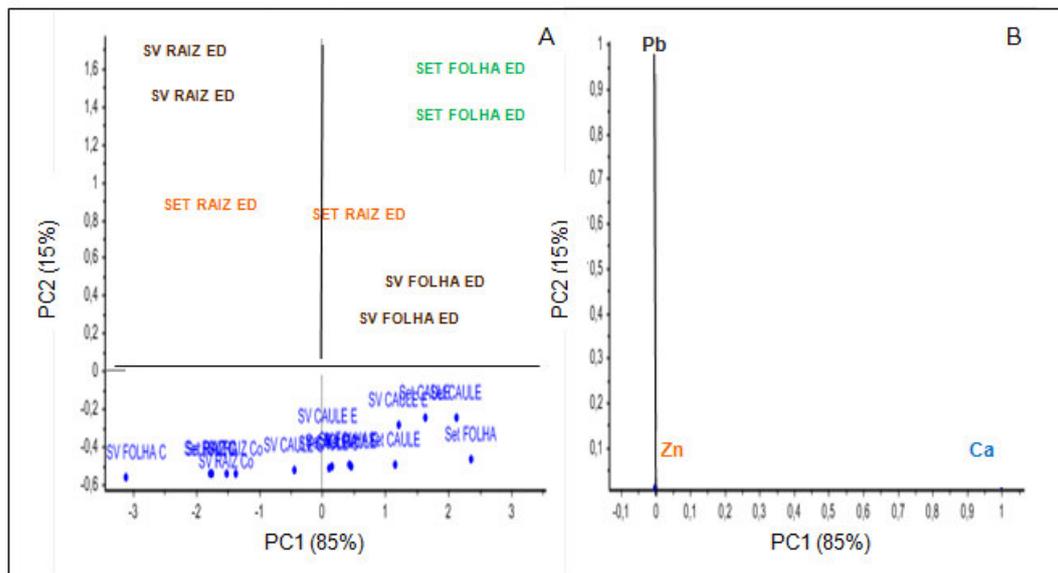
Figura 16 – Teores de Ca^{2+} e Zn^{2+} em raízes (A, D), caules (B, E) e folhas (C, F) de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM. Letras minúsculas diferentes, em um mesmo cultivar, ou letras maiúsculas diferentes, em um mesmo tratamento, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$)



5.5 Avaliação quimiométrica dos íons Ca^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} nas plantas submetidas ou não ao estresse com EDTA-Pb 0,5 mM.

A Figura 17 mostra a análise dos Componentes Principais (PCA) revelando que o metal Pb^{2+} concentra-se principalmente nas raízes de SV e nas folhas de SET (Figura 17A). A análise por PCA também revelou correlação direta entre os íons Pb^{2+} , Ca^{2+} e Zn^{2+} (Figura 17B).

Figura 17 - Distribuição (A) e correlação (B) dos íons Ca^{2+} , Pb^{2+} e Zn^{2+} nas raízes, caules e folhas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.



5.6 Efeito do Pb nos parâmetros fisiológicos das plantas de *Vigna unguiculata*

As raízes e folhas de SV e de SET foram visualmente afetadas pelo Pb quando comparadas às plantas controle (Figura 18).

Os parâmetros fisiológicos: massa seca (MS), área foliar (AF), condutância estomática (Gs), transpiração (E), eficiência quântica do PSII (ΦPSII), transporte de elétrons no PSII (ETR), taxa fotossintética líquida (Pn) e concentração intercelular de CO_2 (Ci) foram determinados nos referidos cultivares em ausência e presença de EDTA-Pb 0,5 mM (Figuras 19 e 20).

5.6.1 Massa seca das raízes e da parte aérea e área foliar

O efeito do EDTA-Pb 0,5 mM na massa seca das raízes e da parte aérea, bem como, na área foliar dos cultivares SV e SET induziu diminuição de ambos parâmetros (Figura 19). Nas raízes de SV os valores de massa seca nas plantas controle e nas tratadas com Pb foram 0,33 e 0,17 g respectivamente, o que corresponde a uma inibição c.a. 50%. Já nas raízes de

SET os respectivos valores nas plantas controle e tratadas foram 0,38 e 0,07 g revelando uma inibição de 80% (Figura 19A).

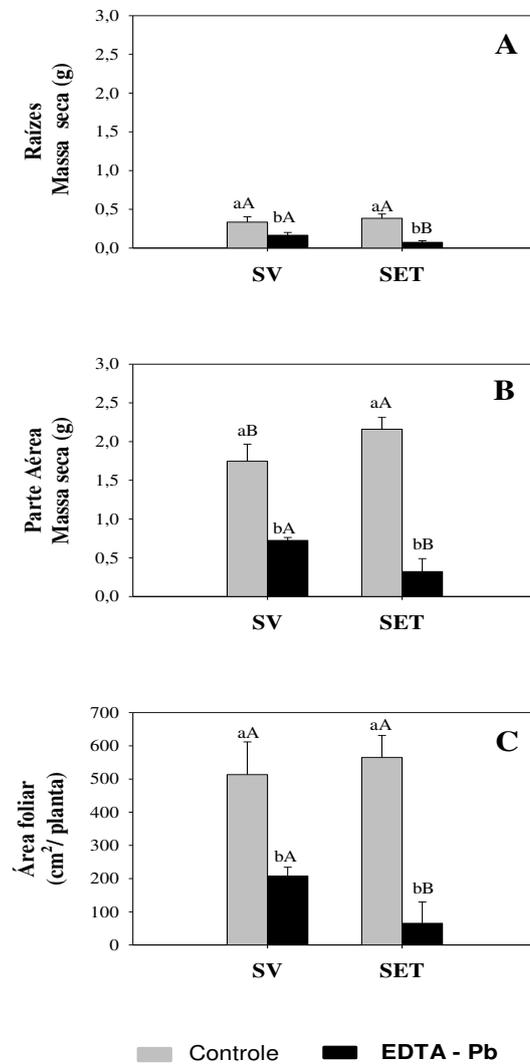
A Figura 19B mostra a inibição da massa seca da parte aérea (caules e folhas) de SV e de SET em presença de Pb. O valor da massa seca das plantas controle de SV foi 1,75 g e das tratadas foi 0,72 g, mostrando uma inibição de 58% ao passo que nas plantas de SET os respectivos valores foram 2,16 e 0,32 g correspondendo a uma inibição 85%.

A Figura 19C mostra a redução da área foliar de SV e de SET na presença de Pb. O valor da área foliar nas plantas de SV foi 513,15 no controle e 207,31 cm²/planta na presença de Pb, correspondendo a uma inibição de 60%, enquanto que em SET os respectivos valores foram 564,86 e 65,04 cm²/planta, correspondendo a uma inibição de 89%.

Figura 18 – Raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (A, B) e Setentão (C, D), após 7 dias em ausência (controle; linha superior) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM (linha inferior).



Figura 19 – Massa seca das raízes (A) e da parte aérea (B) e da área foliar (C) de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM. Letras minúsculas diferentes, em um mesmo cultivar, ou letras maiúsculas diferentes, em um mesmo tratamento, diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$)



5.6.2 Condutância Estomática (Gs).

A condutância estomática em SV e SET sofreu decaimento em resposta à EDTA-Pb 0,5 mM quando comparada aos seus respectivos controles que foram 1,47 e 1,87 mol H₂O m⁻² s⁻¹ (Figura 20A). Em presença de Pb os valores dessa condutância foram 0,21 e 0,11 mol H₂O m⁻² s⁻¹, revelando uma inibição de 86% em SV e de 94% em SET. Comparando-se os valores de condutância em presença de Pb verificou-se que a condutância estomática em SV foi o dobro de SET (Figura 20A).

5.6.3 Transpiração (E)

A Figura 20B mostra a taxa de transpiração nas plantas de SV e de SET em ausência e presença de EDTA-Pb 0,5 mM. Os valores das plantas controle foram 6,3 mmol de H₂O m⁻² s⁻¹ para SV e 8,4 mmol de H₂O m⁻² s⁻¹ para SET e em presença de Pb 2,75 e 2,3 mmol de H₂O m⁻² s⁻¹ respectivamente, correspondendo a uma inibição da transpiração de 55% em SV e de 73% em SET. Comparando-se os valores da transpiração em presença de Pb verificou-se que SV foi aproximadamente 20% superior a SET (Figura 20B).

5.6.4 Eficiência quântica do PSII (Φ PSII)

A eficiência quântica do fotossistema II (PSII) em SV e SET foi determinada em ausência e presença de EDTA – Pb 0,5 mM (Figura 20C). Os valores obtidos para as plantas de SV, em ausência e em presença de EDTA – Pb 0,5 mM, foram 0,28 e 0,26 respectivamente, não apresentando diferença significativa entre si. Já em SET, em ausência e em presença de EDTA – Pb 0,5 mM os valores encontrados foram 0,35 e 0,16 respectivamente, o que corresponde a uma inibição de 55%. A eficiência quântica do PSII em presença de chumbo foi 40% superior em SV em relação à SET (Figura 20C).

5.6.5 Taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR)

A taxa de transporte de elétrons através do PSII (ETR) foi determinada nos cultivares SV e SET, em ausência e presença de EDTA-Pb 0,5 mM (Figura 20D). Os valores encontrados na condição controle foram 120,97 e 151,93 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para SV e SET, respectivamente. Já na presença de EDTA-Pb 0,5 mM os valores obtidos foram 113,32 e 69,31 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ para SV e SET, respectivamente, revelando uma diminuição na taxa de transporte de elétrons através do PSII de 6% em SV e 54% em SET em relação aos seus controles. A taxa de transporte de elétrons no PSII em presença de EDTA-Pb 0,5 mM foi 40% superior em SV em relação à SET (Figura 20D).

5.6.6 Taxa fotossintética líquida (Pn)

A taxa fotossintética líquida foi determinada nos cultivares SV e SET em ausência e presença de EDTA-Pb 0,5 mM (Figura 20E). Os valores encontrados na condição controle foram 25,05 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em SV e 31,27 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ em SET. Já na presença de EDTA-Pb 0,5 mM os valores obtidos foram 15,29 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para SV e 8,89 $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para SET revelando uma diminuição na taxa fotossintética líquida de 40% em SV e 72% em SET em relação aos seus controles. A taxa fotossintética líquida em presença de EDTA-Pb 0,5 mM foi 42% superior em SV em relação à SET (Figura 20E).

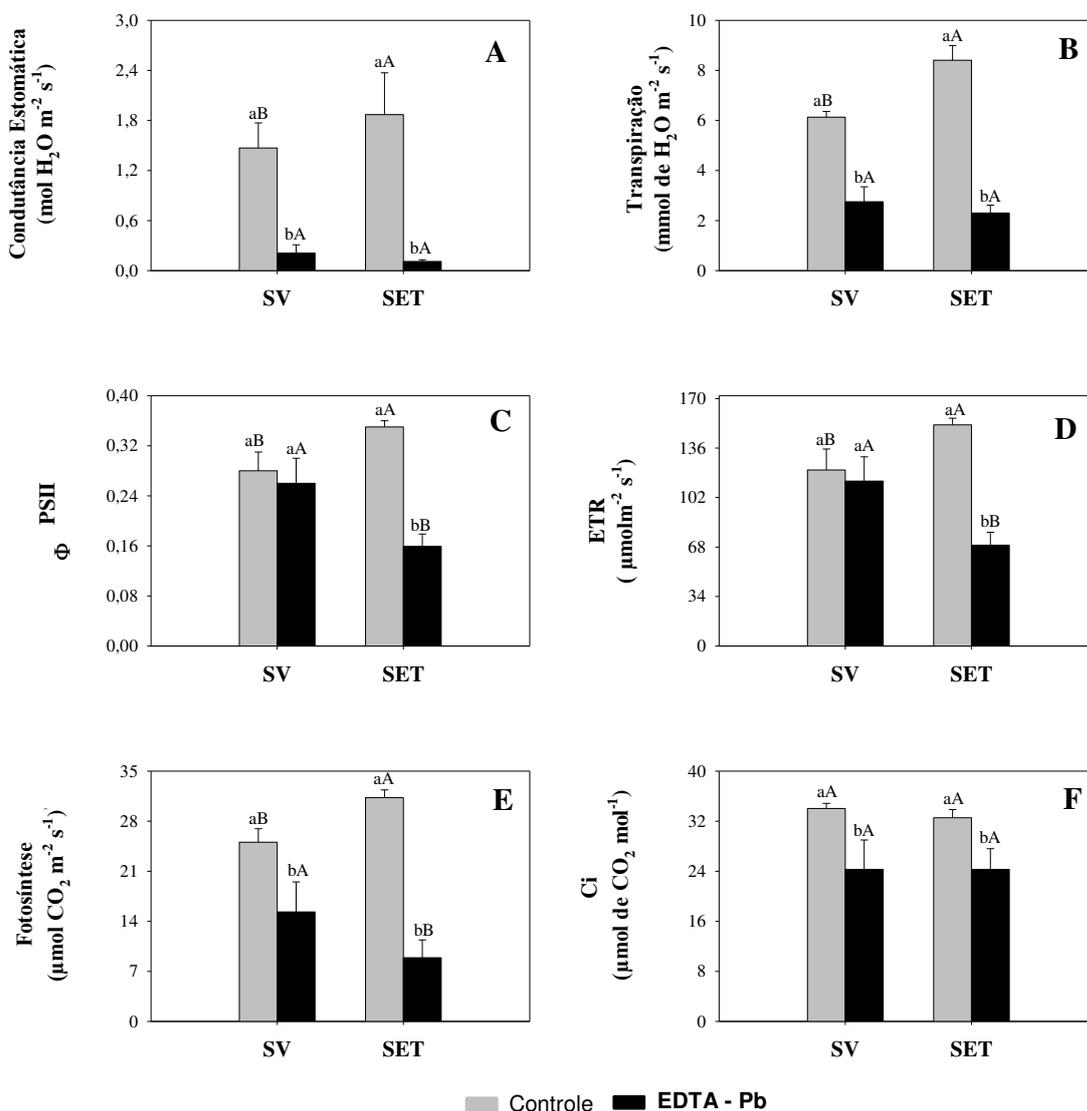
5.6.7 Concentração Intercelular de CO₂ (Ci)

A concentração intercelular de CO₂ (Ci) foi determinada nos cultivares SV e SET em ausência e presença de EDTA-Pb 0,5 mM (Figura 20F).

Os valores encontrados na condição controle foram 34,02 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ em SV e de 32,55 $\mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ em SET. Já na presença de EDTA-Pb 0,5 mM os valores obtidos foram os mesmos para SV e SET, 24,30 μmol de

$\text{CO}_2 \text{ mol}^{-1}$. Comparando-se os respectivos controles com esse valor constatou-se uma diminuição de 30 e de 25% (Figura 20F).

Figura 20 – Condutância estomática (A), transpiração (B), eficiência do fotossistema II (ΦPSII ; C), taxa de transporte de elétrons no fotossistema II (ETR; D), taxa fotossintética líquida (E) e concentração intracelular de CO_2 (C_i ; F) de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM. Letras minúsculas diferentes, em um mesmo cultivar, ou letras ‘



5.7 Efeito do Pb na atividade das enzimas antioxidantes nas plantas de *Vigna unguiculata*: Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade das enzimas antioxidantes Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada nas raízes e nas folhas dos cultivares SV e SET em ausência e presença de EDTA-Pb 0,5 mM (Figura 21).

5.7.1 Catalase

A Figura 21A mostra os valores da atividade da Catalase (CAT) nas raízes de SV e de SET, em presença e em ausência de EDTA-Pb 0,5 mM. A atividade da CAT em raízes de plantas de SV controle foi $5,06 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}$ e em raízes de plantas tratadas com EDTA- Pb 0,5 mM foi $5,09 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}$ revelando que o Pb não afetou a atividade da CAT. Já no cultivar SET as respectivas atividades foram 1,46 e $3,49 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}$, o que mostra um aumento da atividade da CAT nas raízes de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM de 138% em relação as raízes de plantas controle.

A Figura 21B mostra os valores da atividade da Catalase (CAT) nas folhas de SV e de SET, em presença e em ausência de EDTA-Pb 0,5 mM. A atividade da CAT em folhas de plantas de SV controle foi $0,99 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}$ e em folhas de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM foi $3,02 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}$ revelando que o Pb aumentou a atividade da CAT de 204% em relação às folhas de plantas controle.

Já no cultivar SET as respectivas atividades foram 2,41 e $3,74 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{mg prote\acute{a}na}$, o que mostra um aumento da atividade da CAT nas folhas de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM de 55% em relação as folhas de plantas controle.

5.7.2 Ascorbato Peroxidase

A Figura 21C mostra os valores da atividade da Ascorbato Peroxidase (APX) nas raízes de SV e de SET, em presença e em ausência de EDTA-Pb 0,5 mM. A atividade da APX em raízes de plantas de SV controle foi $0,845 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg proteína}$ e em raízes de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM foi $1,812 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg proteína}$ revelando que o Pb aumentou a atividade da APX de 114% em relação às raízes de plantas controle.

Já no cultivar SET as respectivas atividades foram 0,714 e 1,256 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg proteína}$, o que mostra um aumento da atividade da APX nas raízes de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM de 76% em relação as raízes de plantas controle.

A Figura 21D mostra os valores da atividade da Ascorbato Peroxidase (APX) nas folhas de SV e de SET, em presença e em ausência de EDTA-Pb 0,5 mM. A atividade da APX em folhas de plantas de SV controle foi $0,061 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg proteína}$ e em folhas de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM foi $0,2 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg proteína}$ revelando que o Pb aumentou a atividade da APX de 228% em relação às folhas de plantas controle.

Já no cultivar SET as respectivas atividades foram 0,044 e 0,414 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1}\text{mg proteína}$, o que mostra um aumento da atividade da APX nas folhas de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM de 840% em relação as folhas de plantas controle.

5.7.3 Superóxido Dismutase

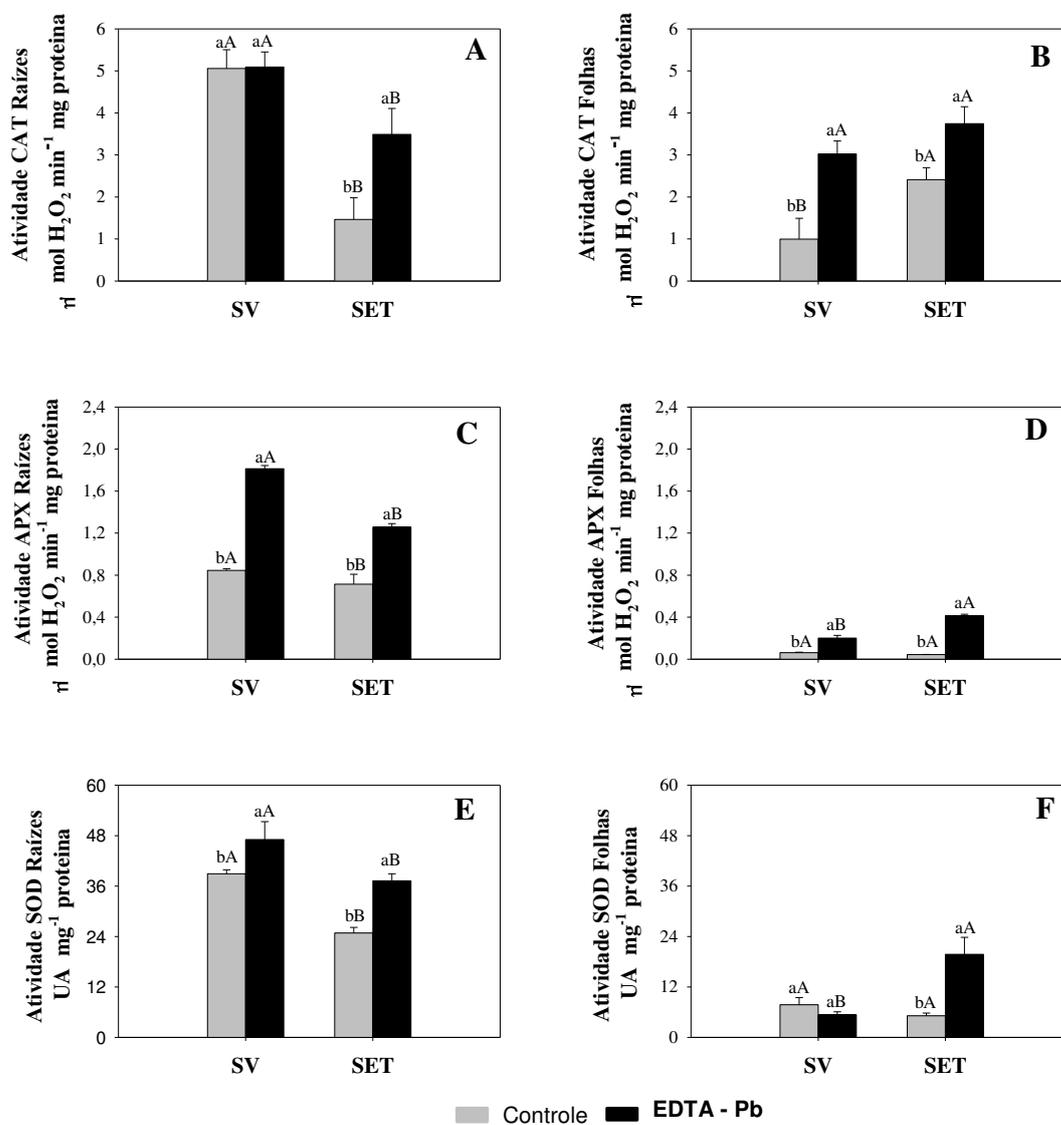
A Figura 21E mostra os valores da atividade da superóxido dismutase (SOD) nas raízes de SV e de SET, em presença e em ausência de EDTA-Pb 0,5 mM. A atividade da SOD em raízes de plantas de SV controle foi $39,92 \text{ UA mg}^{-1} \text{ proteína}$ e em raízes de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM foi $47,06 \text{ UA mg}^{-1} \text{ proteína}$ revelando que o Pb aumentou a atividade da SOD de 18% em relação às raízes de plantas controle.

Já no cultivar SET as respectivas atividades foram 24,83 e 37,24 UA mg⁻¹ proteína, o que mostra um aumento da atividade da APX nas raízes de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM c.a. de 50% em relação as raízes de plantas controle.

A Figura 21F mostra os valores da atividade da Superóxido Dismutase (SOD) nas folhas de SV e de SET, em presença e em ausência de EDTA-Pb 0,5 mM. A atividade da SOD em folhas de plantas de SV controle foi 7,74 UA mg⁻¹ proteína, e em folhas de plantas tratadas com EDTA- Pb 0,5 mM foi 5,34 UA mg⁻¹ proteína revelando que o Pb diminuiu a atividade da SOD de 28% em relação às folhas de plantas controle. Embora as diferenças entre os valores das atividades da SOD no controle e em presença de EDTA-Pb 0,5 mM não tenham revelado diferença estatística significativa ($p \geq 0,05$), verifica-se uma tendência de diminuição dessa atividade em presença do Pb.

Já no cultivar SET as respectivas atividades foram 5,14 e 19,76 UA mg⁻¹ proteína, o que mostra um aumento da atividade da APX nas folhas de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM de 285% em relação as folhas de plantas controle.

Figura 21 – Atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) em raízes (A, C e E) e folhas (B, D e F) de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM. Letras minúsculas diferentes, em um mesmo cultivar, ou letras maiúsculas diferentes, em um mesmo tratamento, diferem significativamente entre si ($P \leq 0,05$)



5.8 Efeito do Pb na expressão de transcritos das enzimas antioxidantes nas plantas de *Vigna unguiculata*: Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD) .

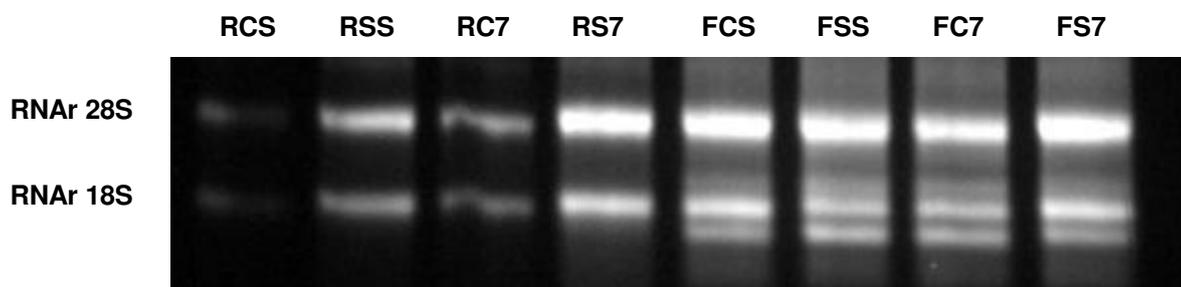
5.8.1 Qualidade do RNA

O RNA total foi extraído da porção final das raízes e da folha mais jovem dos cultivares de *Vigna unguiculata*, SV e SET, sete dias após a aplicação do estresse. A Tabela 4 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 ng/μ. No tocante a integridade dos RNAs, os perfis observados em gel de agarose revelaram sua integridade, vez que foram visualizadas às subunidades 18S e 28S do RNA ribossomal (Figura 22).

Tabela 4 - Valores médios das concentrações e relações de absorvância dos RNAs extraídos de raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM

Tratamentos	Média das concentrações (ng/μL)	Relação 260/280	Relação 260/230
Raiz Controle SV	96,7	2,08	1,58
Raiz EDTA-Pb 0,5 mM SV	426,2	2,12	1,79
Raiz Controle SET	163,2	2,08	1,63
Raiz EDTA-Pb 0,5 mM SET	397,5	2,11	2,15
Folha Controle SV	779,7	2,13	2,41
Folha EDTA-Pb 0,5 mM SV	749,1	2,11	2,39
Folha Controle SET	623,7	2,1	1,97
Folha EDTA-Pb 0,5 mM	796,7	2,14	1,96

Figura 22 - Gel de agarose (1%), evidenciando as subunidades ribossomais 18 e 28S, dos RNAs totais extraídos de raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM



Raiz controle SV(RCS), Raiz estresse SV (RSS), Raiz controle SET (RC7), Raiz estresse SET (RS7), Folha controle SV (FCS), folha estresse SV (FSS), folha controle SET (FC7) e folha estresse SET (FS7).

5.8.2 Temperatura de anelamento dos iniciadores específicos (“primers”)

A escolha da melhor temperatura de anelamento, para cada par de iniciadores específicos, foi realizada com base em um gradiente de temperatura que variou de 46,6 a 68^oC. A Tabela 5 mostra as temperaturas de anelamento selecionadas para a realização dos ensaios de qPCR. As temperaturas de menor Ct com curvas sigmóides típicas foram selecionadas.

Para verificação da expressão relativa dos genes das famílias multigênicas das enzimas antioxidantes CAT (*VuCAT1* e *2*), APX (*VuAPX1* a *6*) e SOD (*VuSODCu/Zn 1* a *3*, *VuSODMn 1*, *VuSODCu/Chap 1*, *VuSOD Fe 1* a *3*) foram testados os genes constitutivos (EF-1 α 1, EF-1 α 2, EF-1 α 3, EF-1 β e f-BOX). Os genes EF-1 β e f-BOX foram selecionados pelo programa GeNorm (qBase^{PLUS} Version 2.4) como os genes de referência mais adequados (Tabelas 5 e 6).

5.8.3 Especificidade dos iniciadores específicos (primers)

A Tabela 5 mostra as sequências dos iniciadores específicos dos genes da SOD (*VuSODCu/Zn 1* a *3*, *VuSODMn 1*, *VuSODCu/Chap 1*, *VuSOD Fe 1* a *3*), APX (*VuAPX1* a *6*) e CAT (*VuCAT1* e *2*), juntamente com os genes f-BOX e EF-1 β . A especificidade dos iniciadores específicos foi avaliada por qPCR utilizando como parâmetro a curva de “melting”. As Figuras 23 e 24 mostram as curvas de “melting” dos genes analisados e revelam a presença de

um único pico, evidenciando, desta forma, que apenas um produto foi amplificado e que não houve formação de dímeros de “primers”.

Tabela 5 - Temperaturas de anelamento e sequências dos genes das famílias multigênica das enzimas Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido Dismutase (SOD)

Gene	Produto gênico	Temperatura de anelamento Selecionada	Sequência dos iniciadores específicos (5'- 3')
VuCAT 1	Catalase	57,6	Fwd 5'CCTGAAACCCAATCCCAAGTC3' Rev 5'CCATCCATGTGCCTGTAATCC3'
VuCAT 2	Catalase	57,6	Fwd 5' GTTCCACAAGATTACAGGCAT3' Rev 5'TCTTCTCCAATAGACACTTCA3'
VuCitAPX 1	Ascorbato Peroxidase citoplasmática	60,2	Fwd 5'CTACGCAGATTTCTACCAGT3' Rev 5'CATAGCCTTGCCGAACAC3'
VumiAPX 2	Ascorbato Peroxidase mitocondrial	57,6	Fwd 5' GAATCACGCAGCAAACAAG 3' Rev 5' TCCAATGAATCCTTTCTTCCT 3'
VuPeriAPX 3	Ascorbato Peroxidase perioxossomal	60,2	Fwd 5'GTCAAACAGATTCCGTTATCCC3' Rev 5' CAGTTCCTGTTAGCGATGAGT 3'
VustAPX 4*	Ascorbato Peroxidase estromal	64,4	Fwd 5'AGGGCATTGTGATAGATGAATC3' Rev 5' CACTTGTTTTTATTCTTTCCAG3'
VutilaAPX 4 ' *	Ascorbato Peroxidase tilacoidal	60,2	Fwd 5' GGGCATTGTGATAGATGAATC3' Rev 5' TGACAGCTCTCTTTCCAG 3'
VuciAPX 5**	Ascorbato Peroxidase citoplasmática	64,4	Fwd 5' CAGATACCACCCTCGTTCAG 3' Rev 5'CTTCCAATTATTTCCAAGCCAAC3'
VuciAPX 6	Ascorbato Peroxidase citoplasmática	64,4	Fwd 5'GATGTTTCTTCAGATTCAGCGG 3' Rev 5'CTGGGAGACAACCTATGAGAG 3'

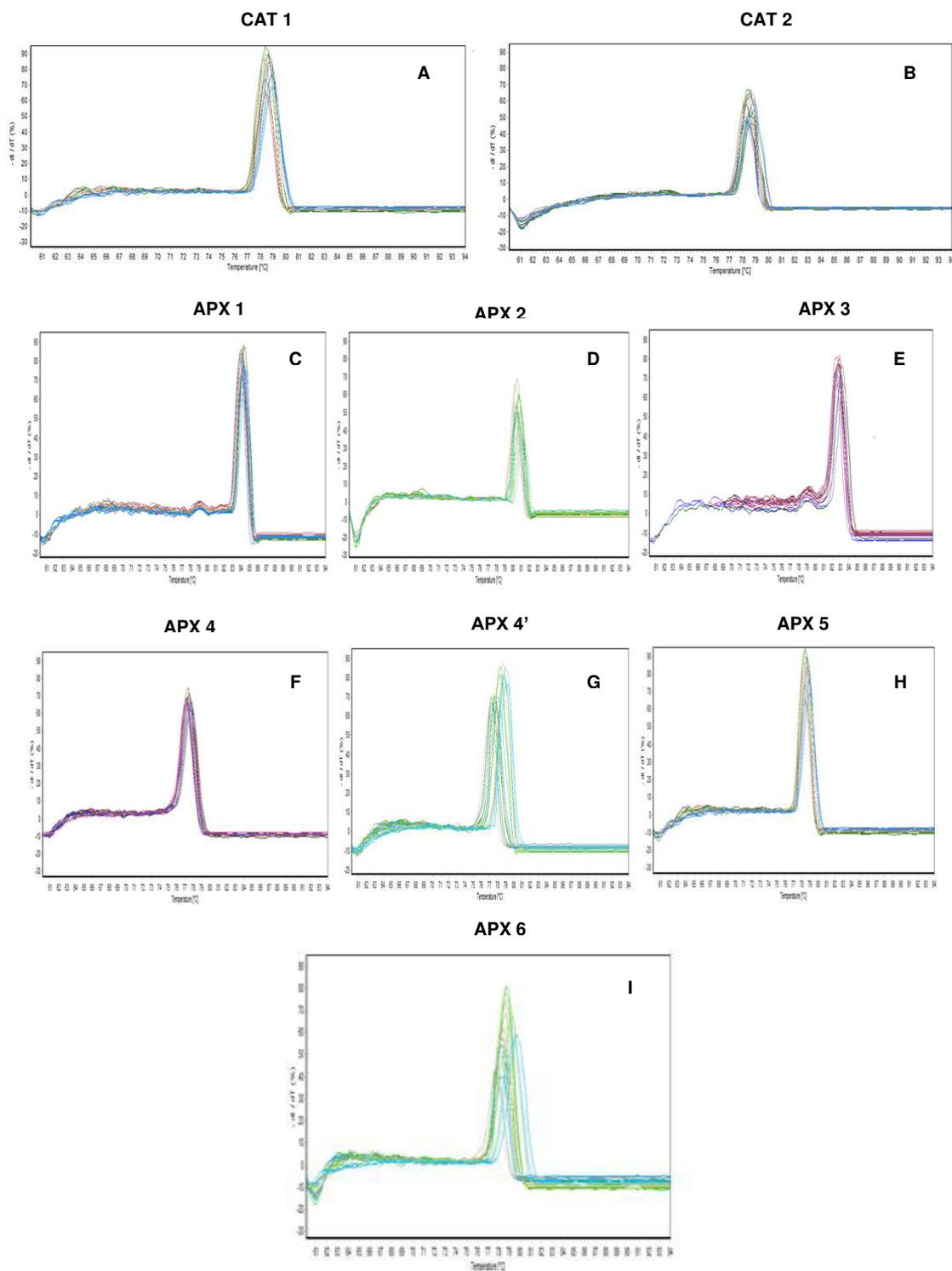
Sequência foward (Fwd), sequência reversa (Rev). * *Splicing* alternativo que gera duas isoformas encontradas em diferentes locais do cloroplasto: estroma e tilacoide. ** Gene expresso somente em folhas.

Tabela 6 - Temperaturas de anelamento e sequências dos genes da família multigênica da enzima superóxido dismutase (SOD)

Gene	Produto gênico	Temperatura de anelamento selecionada	Sequência dos iniciadores específicos (5'- 3')
<i>VuSODCu/Zn 1</i>	Superóxido Dismutase Cu/Zn	59,2	Fwd 5' GGTGCCCTGAGATCACATT 3' Rev 5' ACCATTTCCGTCCTGACTG 3'
<i>VuSODCu/Zn 2</i>	Superóxido Dismutase Cu/Zn	63,5	Fwd 5' GTCTCCGTTAGGCTCACTC 3' Rev 5' ATCGTCTTCTTGTTAGGGT 3'
<i>VuSODCu/Zn 3</i>	Superóxido Dismutase Cu/Zn	65,3	Fwd 5' GGCCTCATTTC AATCCGTT 3' Rev 5' AAATCTCAGCAACTCCATCC 3'
<i>VuSODFe 1</i>	Superóxido Dismutase Fe	52,6	Fwd 5' GATGTTGACTTGGATGGTGTG 3' Rev 5' GGCTGAAGAGATTTAACCCCTG 3'
<i>VuSODFe 2</i>	Superóxido Dismutase Fe	59,2	Fwd 5' GAATTGTGGAGCGGGAGAAAG 3' Rev 5' CACCCAAGTCAGCATCACTATC 3'
<i>VuSODFe 3</i>	Superóxido Dismutase Fe	61,4	Fwd 5' GTGATATGCCCAA AACTAGGTC 3' Rev 5' AA ACTAGCCAAACCCAACCA 3'
<i>VuSOD Cu/Chap1</i>	Superóxido Dismutase Cu/Chaperona	65,3	Fwd 5' GCAGCATTGCGCTTCTCTTC 3' Rev 5' TGTGGAGAACAGAGGGAGGG 3'
<i>Vu SODMn 1</i>	Superóxido Dismutase Manganês	52,6	Fwd 5' CGTCTCCATATCTTTCCCGA 3' Rev 5' CCATAGTCGTATTCCAGATCAG 3'
<i>f – BOX</i>	Proteína da família F-Box	57,5	Fwd 5' GCTTATTCAATCCGCTTGTC 3' Rev 5' GTCCTATAACAGCTTCTCCA 3'
<i>EF – 1 β</i>	Fator de alongação	59,8	Fwd 5' GAGGATAAGAAGGCAGCA 3' Rev 5' AGGCTTAACATCGAGTAGG 3'

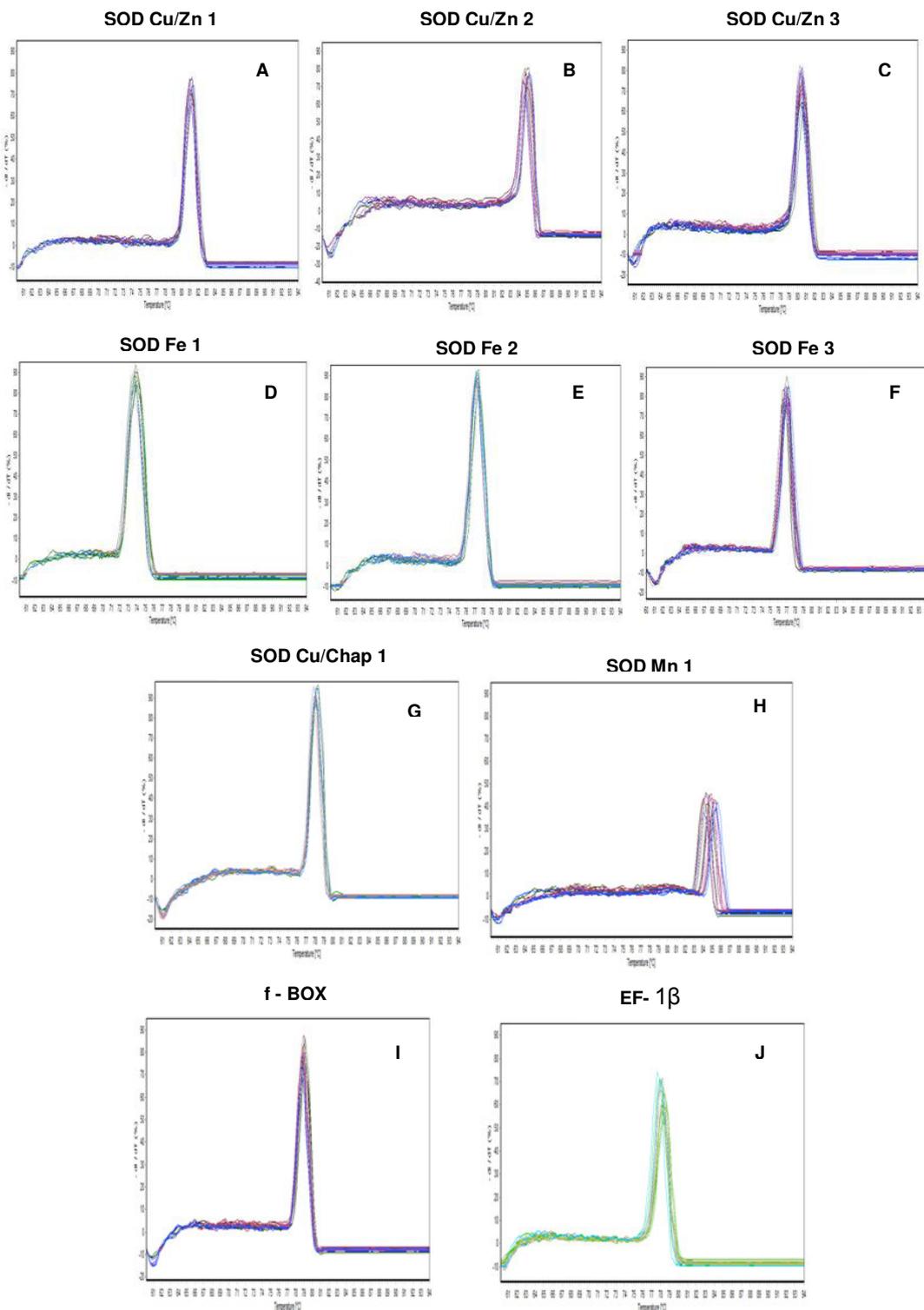
Sequência foward (Fwd), sequência reversa (Rev)

Figura 23 - Curvas de melting obtidas por qPCR usando *primers* específicos para os genes da Catalase(CAT) e Ascorbato peroxidase



VuCAT1: Catalase de *Vigna unguiculata* (A), *VuCAT 2*: Catalase *Vigna unguiculata* (B), *VuCitAPX 1*: Ascorbato Peroxidase citoplasmática de *Vigna unguiculata* (C), *VumiAPX 2*: Ascorbato Peroxidase mitocondrial de *Vigna unguiculata* (D), *VuPeriAPX 3*:Ascorbato Peroxidase perioxossomal de *Vigna unguiculata* (E), *VustAPX 4*: Ascorbato Peroxidase estromal de *Vigna unguiculata* (F), *VutilaAPX 4'* : Ascorbato Peroxidase tilacoidal de *Vigna unguiculata* (G), *VuciAPX 5* : Ascorbato Peroxidase citoplasmática de *Vigna unguiculata* (H) e *VuciAPX 6*: Ascorbato Peroxidase citoplasmática de *Vigna unguiculata* (I).

Figura 24 - Curvas de melting obtidas por qPCR usando *primers* específicos para os genes da Superóxido dismutase (SOD) e para os genes de referência f-Box e EF-1 β



VuSODCu/Zn 1: Superóxido dismutase Cu/Zn (A), *VuSODCu/Zn 2*: Superóxido dismutase Cu/Zn (B), *VuSODCu/Zn 3*: Superóxido dismutase Cu/Zn (C), *VuSODFe 1*: Superóxido dismutase Fe (D), *VuFeSOD 2*: Superóxido dismutase Fe (E), *VuSODFe 3*: Superóxido dismutase Fe (F), *VuCu/ChapSOD 1*: Superóxido dismutase Cu/Chaperona (G), *VuSODMn 1*: Superóxido dismutase Mn (H), *f - BOX*: Proteína da família F-Box (I) e *EF - 1 β* : Fator de alongação (J).

5.8.4 Análise do efeito do chumbo na expressão relativa dos genes das enzimas CAT, APX e SOD.

5.8.4.1 Expressão relativa dos genes da Catalase (*VuCAT 1 e 2*)

Os genes membros da família multigênica da catalase foram analisados nas raízes e folhas dos cultivares de *Vigna unguiculata*, SV e SET. A análise de expressão por qPCR revelou que tanto *VuCAT1* como *VuCAT2* foram bem expressos nos dois tecidos.

Em SV a análise da expressão relativa dos genes da enzima catalase (CAT) na presença de EDTA-Pb 0,5 mM mostrou que os genes *VuCAT1* e *2* aumentaram sua expressão nas raízes. O gene *VuCAT1* apresentou aumento de expressão relativa 1,4 vezes superior ao controle, ao passo que *VuCAT2* revelou-se 3,4 vezes superior ao seu controle (Figura 25A). Comparando-se a expressão relativa de *VuCAT1* e *2* nas raízes de SV observou-se que *VuCAT2* apresentou o dobro da expressão relativa de *VuCAT1*.

Nas folhas de SV ao contrário do que foi observado para as raízes na presença de EDTA-Pb a expressão gênica de *VuCAT1* foi reduzida (1,3 vezes inferior ao controle, aproximadamente) enquanto que a expressão de *VuCAT2*, assim como foi observado nas raízes aumentou, sendo 5 vezes superior ao seu controle (Figura 25B). A análise comparativa de *VuCAT1* e *2* nas folhas de SV na presença de EDTA-Pb mostrou que a expressão gênica de *VuCAT2* foi aproximadamente 4 vezes superior a de *VuCAT1*. Comparando-se os dois tecidos estudados (raízes e folhas) os resultados obtidos revelaram que o gene *VuCAT1* foi mais expresso nas raízes, apresentando nesse tecido o dobro da expressão verificada nas folhas. Ao contrário o gene *VuCAT2* foi 1,5 vezes mais expresso nas folhas do que nas raízes (Figuras 25A e B).

A Figura 25C mostra a expressão gênica de *VuCAT1* e *VuCAT2* nas raízes de SET. Ao contrário de SV nas raízes de SET *VuCAT1* e *VuCAT2* foram inibidos, 58 e 41% em relação aos seus controles, respectivamente (Figura 25C). Contudo *VuCAT1* foi 25% mais inibido do que *VuCAT2*. Já nas folhas de SET na presença de EDTA-Pb esses genes mostraram sua expressão aumentada, *VuCAT1* e *VuCAT2* foram 2,4 e 1,7 vezes maiores que seus controles, respectivamente. Por outro lado nas folhas de SET na presença

de chumbo a expressão gênica de *VuCAT1* foi 14% superior a *VuCAT2* (Figuras 25C e D).

Comparando-se o perfil de expressão dos genes *VuCAT1* e *VuCAT2* nas raízes e folhas de SET na presença de EDTA-Pb 0,5 mM, observou-se que enquanto *VuCAT1* nas raízes teve sua expressão inibida nas folhas foi o gene de maior expressão sendo aproximadamente 3 vezes mais expresso nas folhas do que nas raízes. O mesmo perfil de expressão foi observado para *VuCAT2*, contudo nas folhas a expressão de tal gene foi o dobro do observado para as raízes.

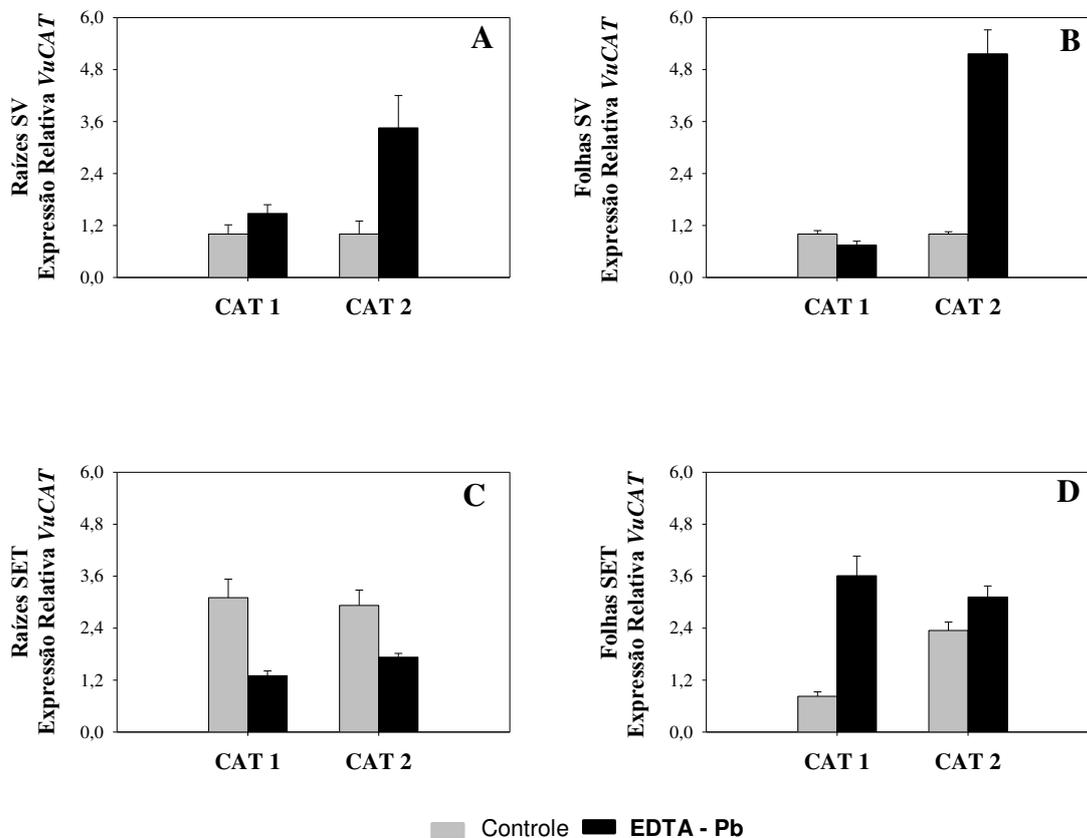
Comparando-se os cultivares estudados pode-se afirmar que o padrão de expressão dos genes *VuCAT1* e *2*, foi distinto nas raízes dos cultivares, enquanto que *VuCAT1* e *2* aumentaram sua expressão nas raízes de SV em SET ambos foram inibidos. Nas folhas dos cultivares o gene *VuCAT1* foi inibido em SV, ao passo que em SET sua expressão foi induzida. Já o gene *VuCAT2* apresentou o mesmo perfil de expressão em SV e SET, em ambos cultivares os transcritos aumentaram.

5.8.4.2 Expressão relativa dos genes da Ascorbato Peroxidase (*VuAPX 1 a 6*)

No tocante a peroxidase do ascorbato (APX) a Figura 26A mostra o perfil de transcritos nas raízes de SV revelando aumento de expressão na presença de EDTA-Pb 0,5 mM de todos os genes. Contudo o gene *VuAPX2* apresentou maior expressão sendo aproximadamente 5 vezes mais expresso que seu controle. Já os genes *VuAPX1*, *VuAPX4*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* apresentaram um padrão de expressão semelhante, com expressão relativa de aproximadamente 3 vezes superior aos seus respectivos controles. O gene *VuAPX3* revelou a menor expressão gênica contudo sua expressão foi o dobro da expressão de seu controle.

Nas folhas na presença de EDTA-Pb 0,5 mM o gene *VuAPX5* revelou maior expressão sendo 3,7 vezes superior ao seu controle. Já os genes *VuAPX3*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* apresentaram expressão gênica de aproximadamente o dobro de seus respectivos controles.

Figura 25 - Expressão relativa dos genes *VuCAT1* e *2* em raízes (A, C) e folhas (B, D) de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM



A expressão relativa dos genes *VuCAT1* e *2* foi avaliada com base na expressão dos genes constitutivos *EF-1 β* e *f-BOX* em raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), utilizando o programa GeNorm. Os valores de expressão relativa foram obtidos utilizando o método do fator de normalização (HELLEMANS et al., 2007).

Por outro lado o gene *VuAPX1* na presença de chumbo apresentou o mesmo perfil de expressão detectado nas plantas controle. Ao contrário os genes *VuAPX2* e *VuAPX4* mostraram redução de sua expressão apresentando ambos aproximadamente 50% de inibição em relação aos seus respectivos controles (Figura 26B).

Em SV comparando-se a expressão dos genes da APX nos tecidos estudados (raízes e folhas) constatou-se que o chumbo induziu a expressão dos genes *VuAPX2* e *VuAPX4* nas raízes, ao passo que nas folhas sua expressão foi inibida. Já os genes *VuAPX3*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* apresentaram o mesmo padrão de expressão, tanto nas raízes como nas folhas. Por outro lado o gene *VuAPX1* teve sua expressão aumentada nas raízes, mas nas folhas sua expressão foi semelhante ao controle (Figuras 26A e B)

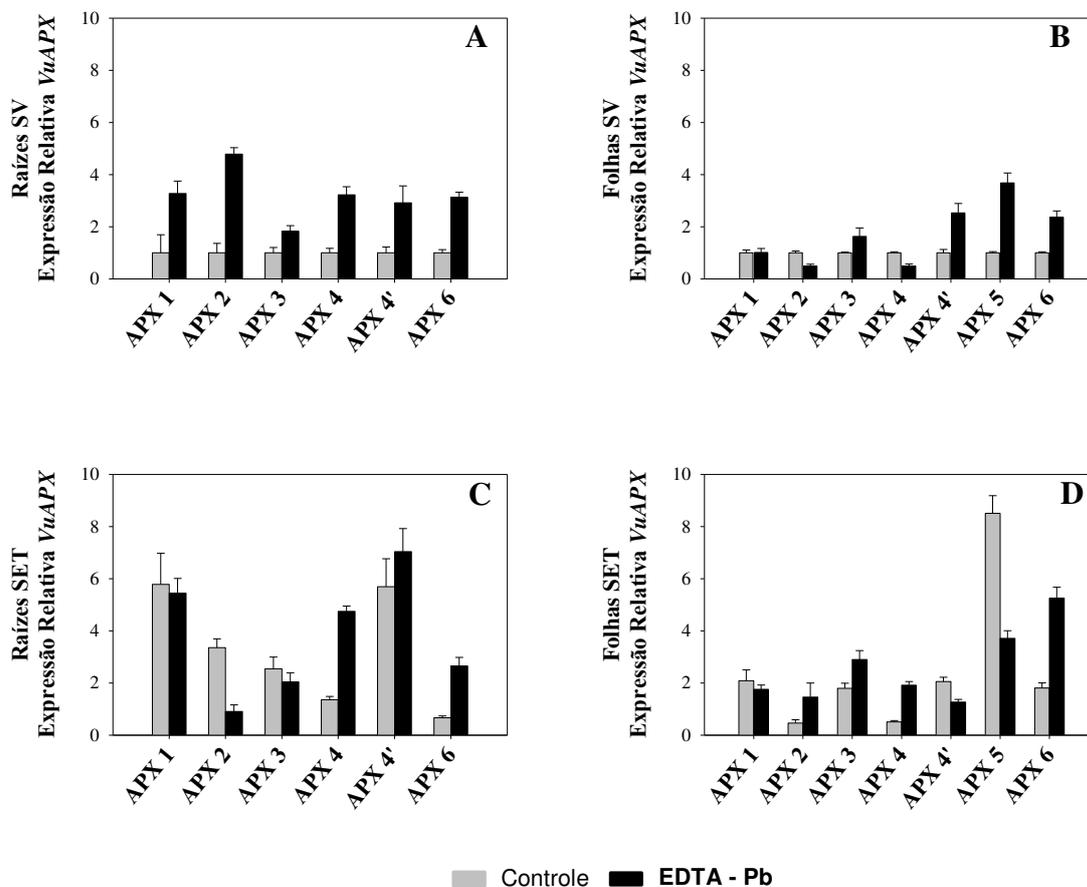
A Figura 26C mostra o perfil de expressão da família multigênica da APX nas raízes de SET. Os genes *VuAPX4*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* mostraram aumento de expressão, sendo 3,5, 1 e 4 vezes maiores que seus controles. Já os genes *VuAPX1* e *VuAPX3* apresentaram sua expressão gênica reduzida respectivamente em 6 e 20% aproximadamente, com relação aos seus controle. O gene *VuAPX2* teve sua expressão inibida em 73% pelo chumbo quando comparado ao controle, contrastando com o perfil de expressão observado nas raízes do cultivar SV (Figuras 26A e C).

Nas folhas de SET os genes *VuAPX2*, *VuAPX3*, *VuAPX4*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* apresentaram aumento de sua expressão, sendo respectivamente 3,2, 1,6, 3,7, 1,6 e 3 vezes superiores aos seus controles. Já os genes *VuAPX1* e *VuAPX5* foram inibidos em aproximadamente 16 e 56% respectivamente (Figura 26D).

Em SET na presença de EDTA-Pb 0,5 mM, a expressão gênica de *VuAPX2* e 3 foi diferente em raízes e folhas, enquanto que nas raízes esses genes apresentaram expressão diminuída nas folhas sua expressão foi aumentada. Já os genes *VuAPX1*, *VuAPX4*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* apresentaram o mesmo perfil de expressão tanto nas raízes como nas folhas.

Comparando-se os cultivares estudados pode-se afirmar que o padrão de expressão dos genes *VuAPX1* a 3, foi distinto nas raízes dos cultivares, enquanto que *VuAPX1*, *VuAPX2* e *VuAPX3* aumentaram sua expressão nas raízes de SV e em SET ambos foram inibidos. Já a expressão gênica de *VuAPX4*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* aumentou nas raízes de ambos cultivares. Nas folhas dos cultivares o gene *VuAPX1* foi igual ao seu controle em SV, ao passo que em SET sua expressão foi inibida. Já em SV a expressão gênica de *VuAPX2* e *VuAPX4* foi inibida e induzida em SET, ao passo que os genes *VuAPX3*, *VuAPX4'* e *VuAPX6* revelaram ter o mesmo padrão de expressão em SV e SET, em ambos cultivares os transcritos aumentaram.

Figura 26 - Expressão relativa dos genes *VuAPX 1 a 6* em raízes (A e C) e folhas (B e C) de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.



A expressão relativa dos genes *VuAPX 1 a 6* foi avaliada com base na expressão dos genes constitutivos *EF-1 β* e *f-BOX* em raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), utilizando o programa GeNorm. Os valores de expressão relativa foram obtidos utilizando o método do fator de normalização (HELLEMANS et al., 2007).

5.8.4.3 Expressão relativa dos genes da Superóxido Dismutase (*VuSOD Cu/Zn1 a 3*, *VuSOD Mn1*, *VuSOD Cu/Chap1*, *VuSOD Fe1 a 3*)

A Figura 27 mostra a expressão relativa da família multigênica de SOD nas raízes e folhas de SV e SET, em presença e ausência de EDTA-Pb 0,5 mM.

Nas raízes de SV o gene *VuSOD Cu/Zn2* apresentou maior expressão (aproximadamente 9 vezes maior que o controle) na família multigênica da *VuSOD Cu/Zn*, seguido pelos genes *VuSOD Cu/Zn3* e *VuSOD Cu/Zn1*, 2,4 e 1,3 vezes superior aos seus respectivos controles (Figura 27A). Já na família multigênica da *VuSODFe* a expressão do gene *VuSODFe1*, nas

raízes de SV na presença de EDTA-Pb, mostrou-se aproximadamente 34 vezes maior que seu controle, revelando maior expressão dentre todos os genes analisados. Os genes *VuSODFe2* e *VuSODFe3* apresentaram respectivamente expressão 1,3 e 2,2 vezes maiores que seus controles. Por outro lado a expressão gênica de *VuSOD Cu/Chap1* foi similar ao seu controle, enquanto que em *VuSOD Mn1* foi aproximadamente 4 vezes superior ao controle (Figura 27A).

Nas folhas do cultivar SV, na presença de EDTA-Pb 0,5 mM, o gene *VuSOD Cu/Zn3* apresentou maior expressão gênica, sendo 2,5 vezes maior que seu controle, enquanto que os genes *VuSOD Cu/Zn1* e *2* foram inibidos 22 e 94% respectivamente (Figura 27B). Para a família multigênica *VuSOD Fe* nas folhas de SV a expressão gênica de *VuSOD Fe1* foi aproximadamente o dobro do controle, ao passo que em *VuFeSOD3* foi igual ao controle. Já o gene *VuSOD Fe2* foi inibido pela presença chumbo, 44% em relação ao controle (Figura 27B). A expressão de *VuSOD Cu/Chap1* não apresentou diferenças significativas da condição controle, ao passo que *VuSOD Mn1* foi aproximadamente 3 vezes superior ao controle (Figura 27B).

A análise comparativa da expressão gênica em SV nos dois tecidos (raízes e folhas) na presença de EDTA-Pb 0,5 mM, revelou que os genes *VuSOD Cu/Zn 1* e *2* apresentaram perfil de expressão distinto, aumentando nas raízes e diminuindo nas folhas. Já a expressão gênica obtida para *VuSODCu/Zn3* na presença do chumbo foi a mesma tanto nas raízes como nas folhas. Comparando-se o perfil de expressão do gene *VuSODFe1* nas raízes e folhas de SV na presença de EDTA-Pb 0,5 mM, observou-se que tanto em raízes como em folhas sua expressão foi aumentada, contudo *VuSODFe1* apresentou expressão 17 vezes maior nas raízes do que nas folhas. Já o gene *VuSODFe2* teve sua expressão induzida nas raízes e inibida nas folhas na presença de EDTA-Pb. Por outro lado a expressão gênica de *VuSODFe3* nas raízes foi induzida pelo chumbo, enquanto que nas folhas o perfil de expressão não apresentou diferenças do controle (Figuras 27A e B).

No cultivar SET a análise da expressão relativa dos genes da SOD nas raízes revelou que chumbo inibiu a expressão gênica de *VuSOD Cu/Zn 1* e *2* em aproximadamente 41 e 28% respectivamente. Já a expressão gênica de

VuSODCu/Zn3 aumentou na presença do chumbo sendo o dobro do controle (Figura 27C).

Já na família multigênica *VuSODFe* a expressão dos genes *VuSODFe1* e *3*, nas raízes de SET foi induzida pela presença de EDTA-Pb, sendo respectivamente 8 e 9 vezes maiores que seus controles. O gene *VuSODFe2* apresentou expressão 3,6 vezes maior que seu controle. Por outro lado a expressão gênica de *VuSODCu/Chap1* foi 5 vezes superior ao seu controle, enquanto que *VuSODMn1* foi aproximadamente 46% inferior ao controle (Figura 27C).

Nas folhas de SET a presença do chumbo revelou aumento de expressão de todos os genes (Figura 27D). Os genes *VuSOD Cu/Zn 1 a 3* apresentaram respectivamente expressão 4, 2 e 1,4 vezes superior ao controle. Já a expressão gênica de *VuSODFe1 a 3* foi respectiva e aproximadamente 1, 4 e 3 vezes maiores que seus controles. Já *VuSODCu/Chap1* e *VuSODMn1* foram 3 e 5 vezes superiores aos controles (Figura 27D).

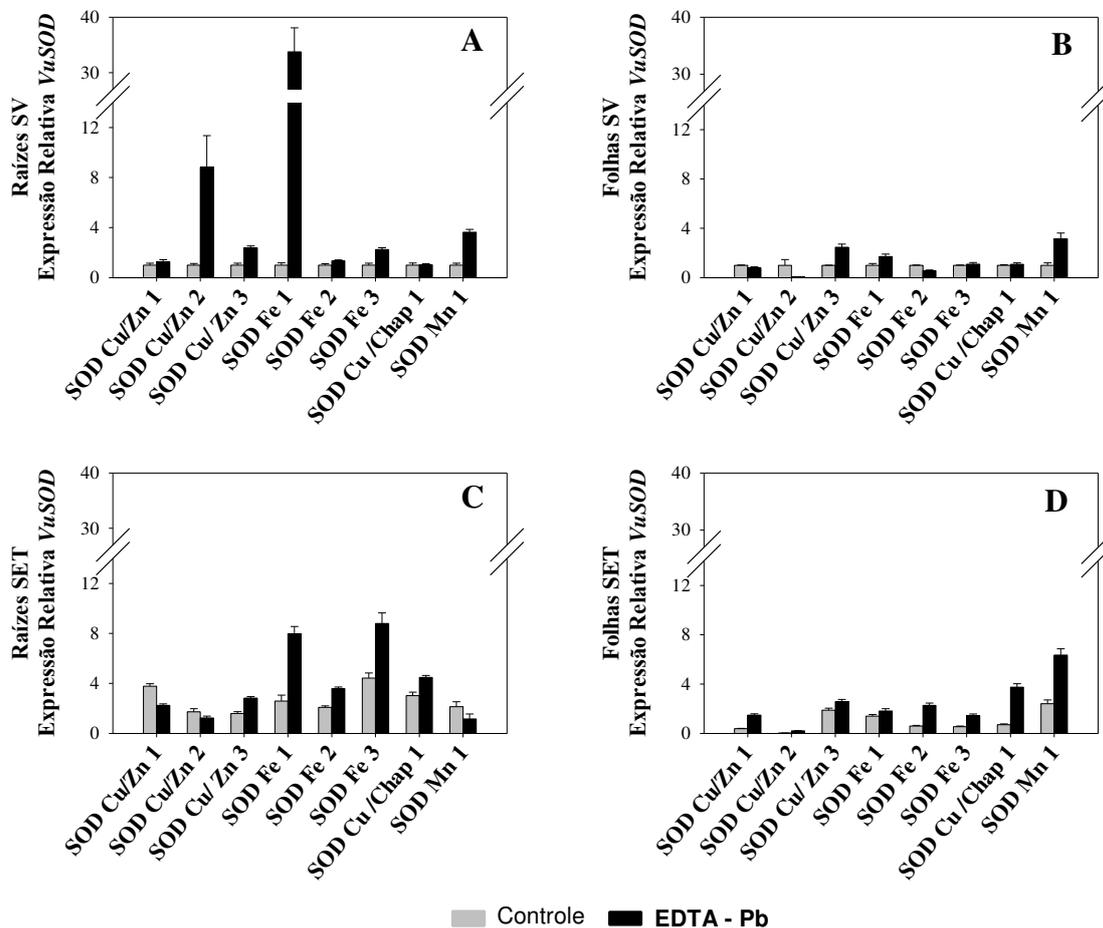
Comparando-se o perfil de expressão dos genes *VuSOD Cu/Zn 1 e 2* nas raízes e folhas de SET na presença de EDTA-Pb 0,5 mM, observou-se que ambos foram inibidos e induzidos pelo chumbo nas raízes e folhas respectivamente, enquanto *VuSODCu/Zn 3* teve sua expressão induzida nos dois tecidos estudados. Do mesmo modo os genes *VuSODFe1 a 3* apresentaram aumento de expressão nas raízes e folhas, contudo os genes *VuSODFe1 e 3* revelaram respectivamente expressão 4 e 6 vezes maiores nas raízes. O mesmo perfil de expressão foi observado para *VuSODCu/Chap1* contudo nas folhas a expressão de tal gene foi maior. Por outro lado a expressão gênica de *VuSODMn1* foi nas raízes inibida e nas folhas induzida pelo chumbo.

Convém salientar que ao contrário de SV nas raízes de SET os genes *VuSOD Cu/Zn 1 e 2* foram inibidos. Já o gene *VuSODCu/Zn3* apresentou perfil similar nas raízes de SV e SET. A família multigênica *VuSODFe1 a 3* apresentou o mesmo padrão de expressão nas raízes de SV e SET, contudo em SV o gene *VuSODFe1* e *VuSODFe3* em SET foram 4 vezes mais expressos. Por outro lado, *VuSODCu/Chap1* com expressão similar ao controle nas raízes de SV em SET teve sua expressão induzida pelo chumbo (Figuras 27A e C). Já a expressão de *VuSODMn1* apresentou perfil distinto

nas raízes dos cultivares, em SV o chumbo induziu seu aumento ao passo que em SET sua expressão foi inibida.

Nas folhas dos cultivares, SV e SET, a expressão gênica de *VuSODCu/Zn 1* e *2* apresentou perfil distinto, em SV o chumbo inibiu sua expressão, enquanto que em SET estimulou. Contudo o gene *VuSODCu/Zn3* na presença do chumbo aumentou sua expressão em ambos cultivares. Já a expressão gênica de *VuSODFe1* apresentou o mesmo perfil nos cultivares estudados, enquanto que *VuSODFe2* e *3* revelaram ter perfil distinto, em SV o estresse inibiu sua *VuFeSOD2* enquanto que estimulou em SET. Já em *VuSODFe3* nas folhas de SV o estresse não provocou modificações na sua expressão gênica, ao contrário induziu sua expressão em SET (Figuras 27B e D). O gene *VuSODCu/Chap1* apresentou padrão diferente nas folhas de SV e SET, enquanto que em SV sua expressão foi igual ao controle em SET a presença de chumbo induziu seu aumento. Por outro lado, *VuSODMn1* revelou ter o mesmo perfil nas folhas dos cultivares (Figuras 27B e D).

Figura 27 - Expressão relativa dos genes *SOD Cu/Zn 1 a 3*, *SOD Fe 1 a 3*, *SOD Cu/Chap1*, *SOD Mn1*, em raízes (A e C) e folhas (B e D) das plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET), após 7 dias em ausência (controle) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM.



A expressão relativa dos genes *VuSOD* foi avaliada com base na expressão dos genes constitutivos *EF-1 β* e *f-BOX* em raízes e folhas de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) utilizando o programa GeNorm. Os valores de expressão relativa foram obtidos utilizando o método do fator de normalização (HELLEMANS et al., 2007).

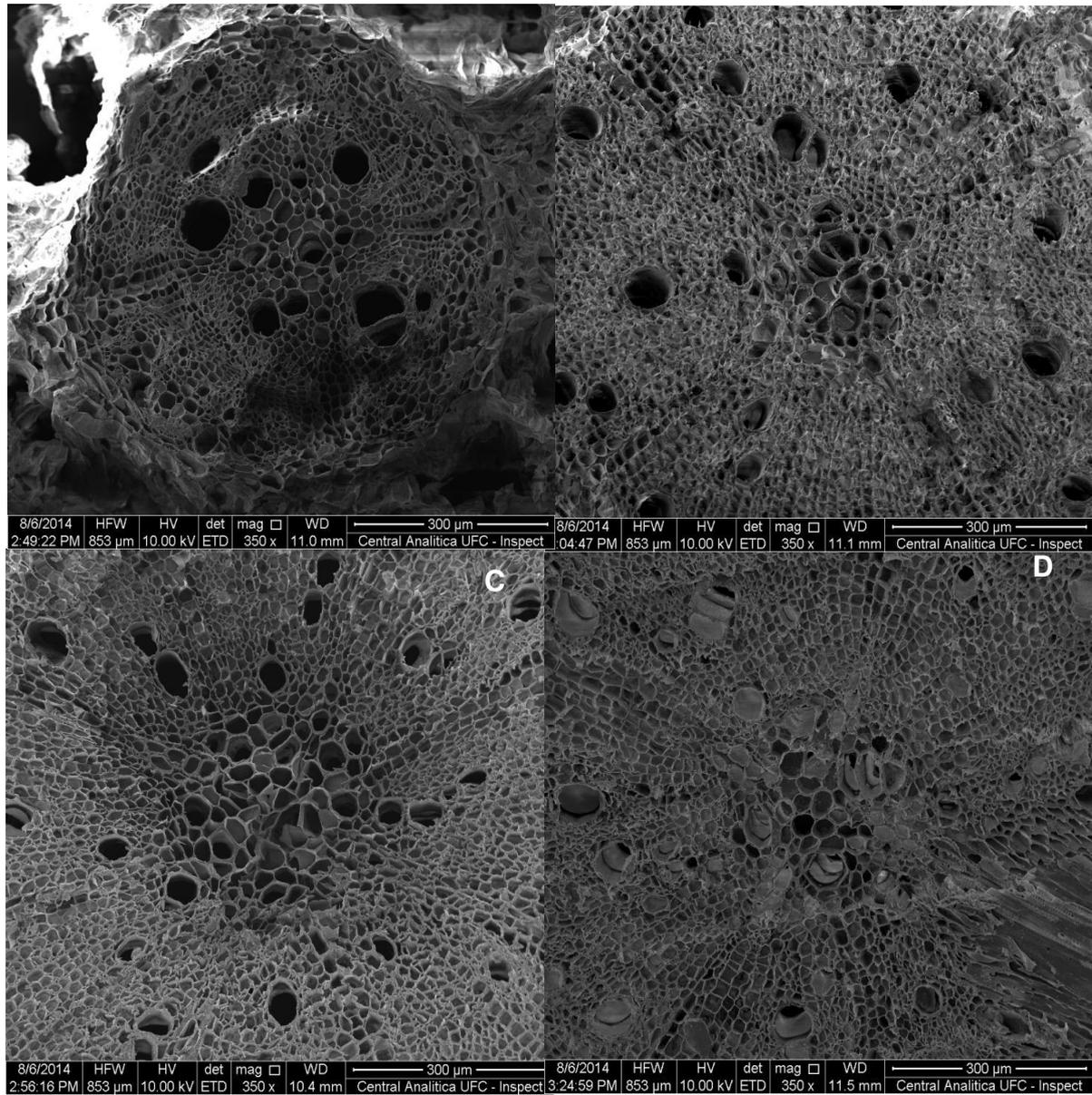
5.8.5. Análise morfológica e ultraestrutural das raízes e folhas de *Vigna unguiculata*

A análise ultraestrutural através de microscopia eletrônica de varredura de cortes transversais de raízes de SV revelou que aparentemente o chumbo não provocou alterações na estrutura das raízes desse cultivar, vez que as imagens realizadas nas plantas crescidas na ausência de EDTA-Pb 0,5 mM mostraram-se semelhantes às imagens realizadas nas raízes de plantas submetidas ao estresse com chumbo (Figuras 28A e B). Da mesma forma que as plantas de SV às de SET submetidas ao estresse com chumbo não revelaram modificações estruturais em suas raízes quando comparadas às plantas controle (Figuras 28C e D). Contudo, a análise morfológica mostrou em ambos cultivares sintomas de toxicidade nas raízes tais como escurecimento, aspecto rígido, quebradiço e diminuição da emissão de raízes secundárias (Figuras 29).

Por outro lado à avaliação ultraestrutural das folhas de SV revelou nas plantas controle uma superfície foliar lisa, contrastando com as plantas submetidas ao estresse com EDTA-Pb 0,5 mM que apresentaram maior acúmulo de ceras (Figuras 30A e B). Já no cultivar SET tal diferença não foi observada entre as plantas controle e as plantas submetidas ao estresse (Figuras 30C e D). Contudo a análise comparativa das superfícies foliares das plantas de SV e SET submetidas ao estresse com chumbo mostrou em SV maior acúmulo de ceras, sugerindo diferenças adaptativas entre os cultivares.

No tocante ao número de estômatos as Figuras 31A e B mostram que a superfície foliar das plantas de SV na ausência de EDTA-Pb 0,5 mM apresentou maior número de estômatos do que as folhas das plantas submetidas ao estresse. Ao contrário em SET a análise da epiderme foliar revelou um número de estômatos menor nas plantas controle e maior na presença do chumbo (Figura 31C).

Figura 28 – Cortes radiculares de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (A, B) e Setentão (C, D), após 7 dias em ausência (controle; fotos da esquerda) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM (fotos da direita).



Cortes realizados a mão livre 1 cm acima da zona pilífera e micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura.

Figura 29 – Raízes de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (A, C) e Setentão (B, D), após 7 dias em ausência (controle; à esquerda) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM (à direita).

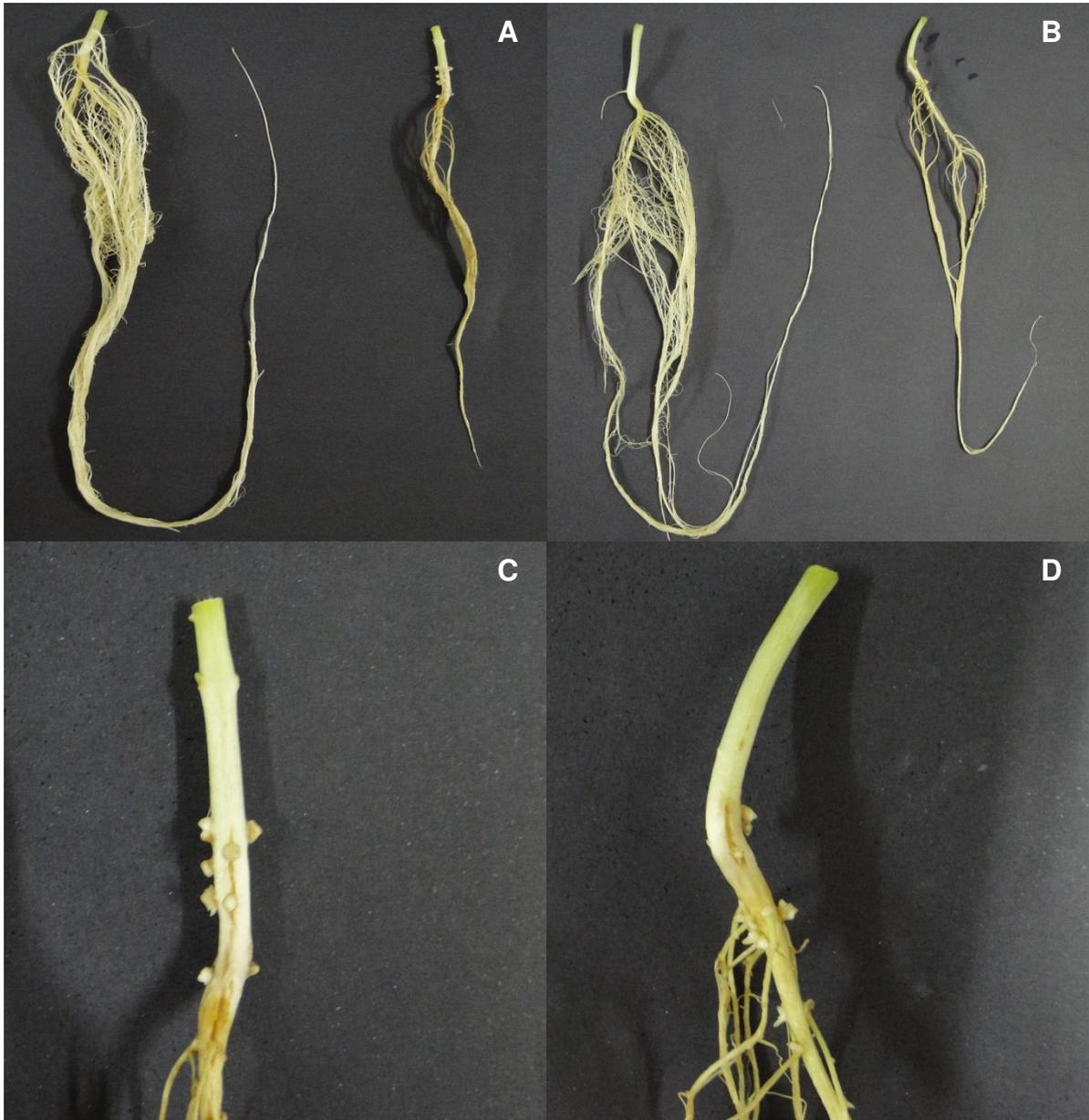
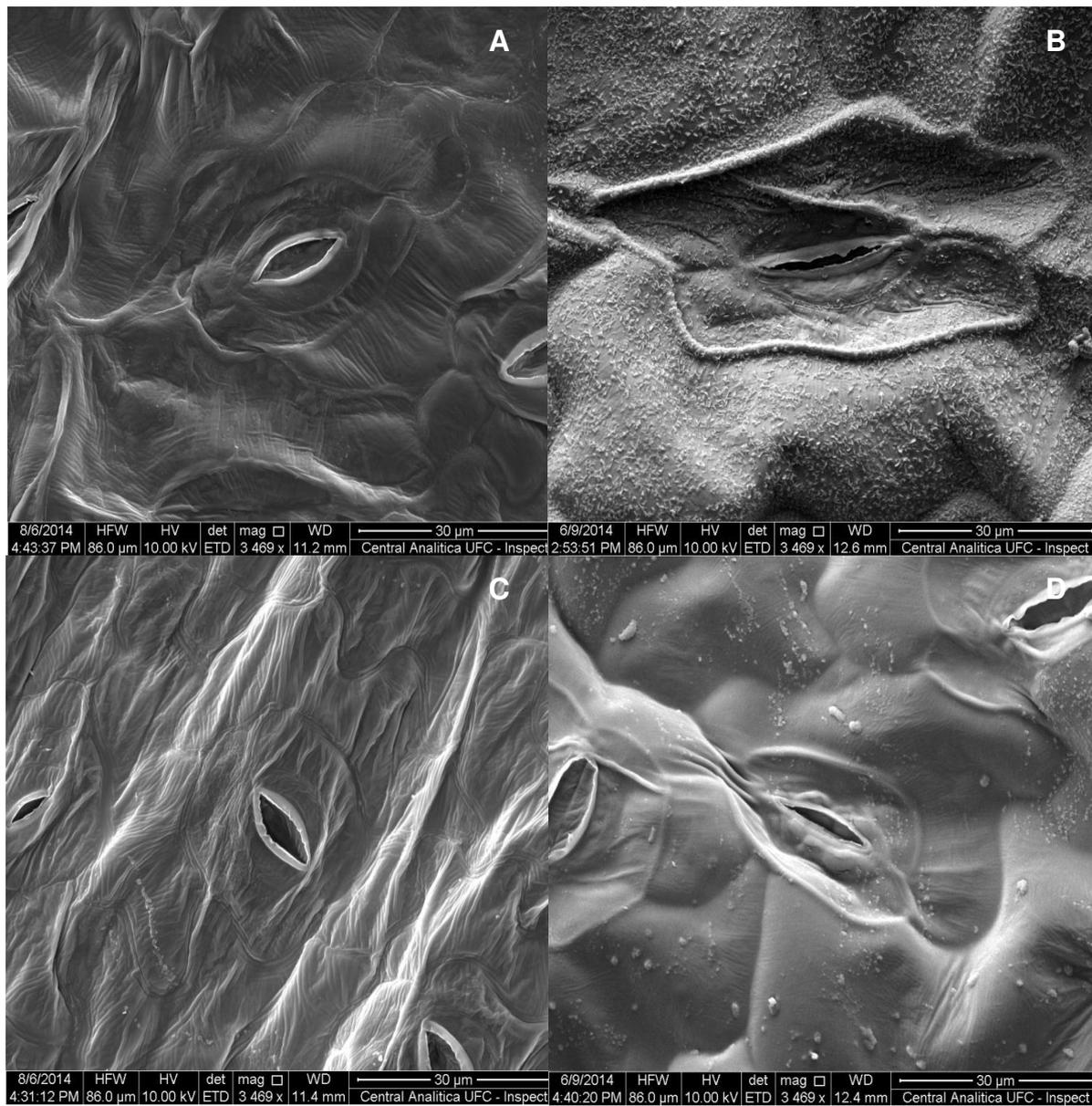
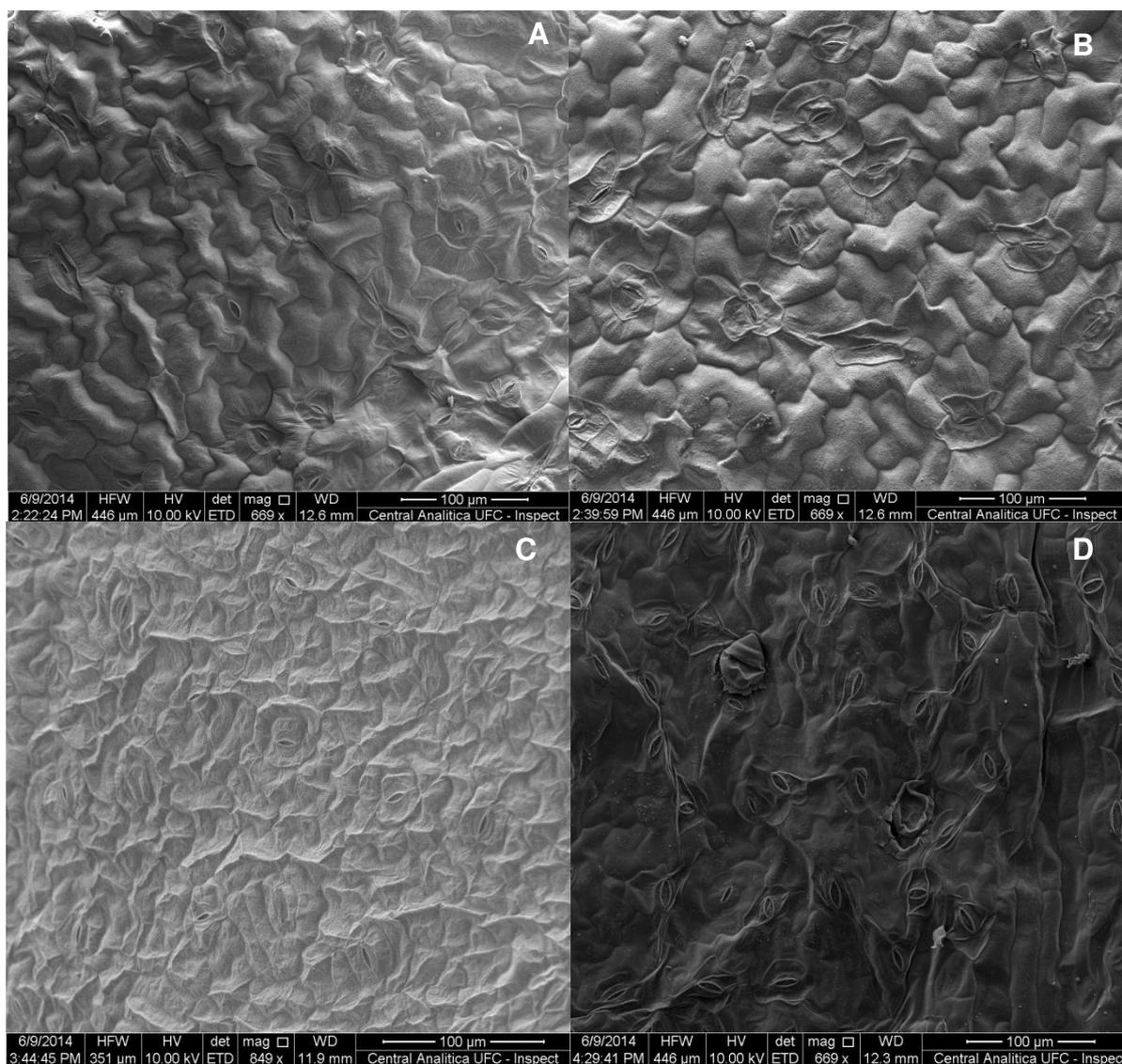


Figura 30 – Epiderme foliar de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (A, B) e Setentão (C, D), após 7 dias em ausência (controle; fotos da esquerda) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM (fotos da direita).



Cortes realizados a mão livre, evitando-se nervuras e micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura.

Figura 31 – Estômatos na epiderme foliar de plantas de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), cultivares Sempre Verde (A, B) e Setentão (C, D), após 7 dias em ausência (controle; fotos da esquerda) ou presença de EDTA-Pb 0,5 mM (fotos da direita).



Cortes realizados a mão livre, evitando-se nervuras e micrografias obtidas por microscópio eletrônico de varredura

6 DISCUSSÃO

A poluição por metais tóxicos, em especial o chumbo é um dos mais agravantes problemas ecológicos (REDDY et al., 2005; SHU et al., 2012). Uma vez presente na cadeia alimentar o Pb exerce efeito acumulativo normalmente desencadeando o fenômeno denominado de biomagnificação (aumento da concentração de um contaminante a cada nível da cadeia alimentar). Contudo, as plantas têm desenvolvido uma variedade de mecanismos de proteção para lidar com a poluição por metais pesados. Na natureza os vegetais apresentam diferentes graus de tolerância ao chumbo, mesmo quando pertencem a uma mesma espécie (WÓJCIK; TUKIENDORF, 2014). Nesse cenário, o presente trabalho visou estudar o efeito de diferentes concentrações de Pb (EDTA-Pb e $Pb(NO_3)_2$) na germinação e no crescimento e desenvolvimento de plantas de dois cultivares de *Vigna unguiculata*, Setentão (SET) e Sempre Verde (SV). SV é reconhecido como um cultivar altamente produtivo e SET é o produto da hibridização de SV com o cultivar TVU 59 reconhecido como resistente ao vírus do mosaico severo do caupi (CpSMV) e a uma estirpe de vírus do mosaico do pepino (CMV) (PAIVA et al., 1990). Embora SV e SET tenham características comuns, a divergência quanto a resistência ao CpSMV e ao CMV poderia revelar diferentes graus de tolerância em relação a outros estresses e daí a razão da escolha desses cultivares.

Vários trabalhos têm evidenciado que o chumbo inibe a germinação. Lamhamdi et al., 2011 mostraram que a germinação de sementes de trigo na presença de $Pb(NO_3)_2$ 3 mM, após 3 dias, era inibida pelo menos 30%. Yang et al., 2010 mostraram notável inibição da germinação de sementes de trigo, após 4 dias, com base no comprimento da raiz minimamente estabelecido como 1 mm. Os autores observaram que na presença de $Pb(NO_3)_2$ 1 mM a germinação era levemente estimulada ao passo que nas concentrações de 2 e 4 mM de $Pb(NO_3)_2$, era inibida. Igualmente, Kaur et al (2011) constataram inibição do crescimento da raiz proporcional ao tempo de exposição e também à concentração de $Pb(NO_3)_2$ que decaiu de 44, 59 e 64% em relação ao controle nos tempos 24, 72 e 120 h na presença de 8 mg L⁻¹ de Pb. Esses resultados também foram confirmados para alho (LIU et al. 2009), e tabaco (AL-KHATIB et al., 2008). Ao contrário, nossos resultados revelaram que o Pb

quer em presença ou ausência de um agente quelante (EDTA) em distintas concentrações (0,2, 0,5, 1,0, 2,0 e 2,5 mM) não inibiu a germinação (Figuras 9 a 14). Comparando-se os cultivares SV e SET na presença de EDTA-Pb²⁻ observou-se que a absorção desse íon metálico em SV independe da concentração de EDTA-Pb²⁻, na faixa de 0,2 à 2,5 mM, ao passo que em SET a absorção de Pb parece ser dependente da dose que aumenta 2,7 vezes na concentração 2,5 mM comparada à 0,2 mM. A quantidade de Pb²⁺ em ambos cultivares foi menor em ausência do agente quelante mostrando um perfil semelhante entre os cultivares (Figura 9). Convém salientar que, em ambos cultivares, o acúmulo de Pb²⁺ em ausência de EDTA foi em média duas vezes inferior aos respectivos valores em presença do agente quelante. Assim, o agente quelante EDTA aumentou a biodisponibilidade do metal para a planta. Contudo, a despeito dessa biodisponibilidade tais resultados retratam um mecanismo distinto desses cultivares em relação a contaminação com chumbo. Sabe-se também que o tegumento previne a entrada de Pb e assim podemos propor que há diferenças nos tegumentos dos cultivares tornando SV um cultivar menos afetado pelo Pb, isto é, mais resistente devido a peculiaridades de seu aparato tegumentar (SHARMA; DUBEY, 2005). Essas conjecturas foram ratificadas pela revisão de Seregin e Ivanov (2001) que aponta que a germinação é mais tolerante ao estresse provocado por metais pesados em virtude da baixa permeabilidade do tegumento das sementes. Portanto, nossos resultados parecem revelar uma nítida diferença na permeabilidade dos tegumentos de SV e SET. Em SV a permeabilidade ao Pb já é máxima na concentração 0,2 mM de EDTA-Pb²⁻, daí não se verificar uma proporcionalidade do teor de Pb²⁺ em relação ao aumento da concentração da solução EDTA-Pb²⁻. Já em SET tal permeabilidade parece menor que a de SV e detecta-se aumento do teor de Pb em relação ao aumento da concentração de EDTA-Pb que foi determinada até 2,5 mM.

Obroucheva et al. (1998) mostraram que a emergência da radícula de sementes de milho não era inibida na presença de Pb(NO₃)₂ 10⁻² M o que pode ser explicado pela impermeabilidade do tegumento (testa) da semente aos sais de Pb. Contudo, na referida concentração o Pb exerceu efeito tóxico na alongação da raiz após a emergência da radícula. Já nas plântulas de *Vigna unguiculata* com 72 horas esse efeito não foi observado. Não se verificou

diferença no comprimento das plântulas submetidas a EDTA-Pb ou $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ em relação às plântulas controle, numa faixa de concentração que variou de 0,2 à 2,5 mM (Figuras 10 a 14), embora o grau de permeabilidade nos tegumentos dos referidos cultivares tenha sido diferente. Independente da diferença de permeabilidade do tegumento entre os cultivares como sugerido observou-se que o teor de Pb detectado nas plântulas de ambos cultivares até 2,0 mM era aproximadamente $0,16 \text{ mg Pb.g}^{-1} \text{ MS}$ o que pode justificar a uniformidade do crescimento das plântulas. Em baixas concentrações de EDTA-Pb as plântulas de SV macroscopicamente revelaram-se mais robustas pois estavam com os hipocótilos mais entumecidos. De forma menos evidenciada ocorreu o mesmo em presença de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (Figuras 11 e 12). Já o efeito em SET do EDTA-Pb foi similar ao efeito do $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ em SV e o $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ foi o que se revelou menos eficaz no tocante ao entumescimento dos hipocótilos (Figuras 13 e 14). Convém salientar que Yang et al. (2010) mostraram inibição da germinação das sementes de trigo na presença de 2 e 4 mM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ mas observaram que na presença de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 1 mM a germinação era levemente estimulada. Nossos resultados parecem concordar com os achados de Yang et al. (2010) revelando que os cultivares apresentaram peculiaridades face aos efeitos do EDTA-Pb e $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ nas plântulas.

Sharma e Dubey (2005), no tocante a captação de Pb pelas as plantas mostraram que as raízes têm capacidade para absorver quantidades significativas desse metal, restringindo sua translocação para a parte aérea. A retenção de Pb nas raízes está baseada na ligação desse metal em sítios de troca iônica nas paredes celulares e precipitação extracelular principalmente na forma de íon carbonato.

Nossos resultados revelaram padrões distintos de absorção de Pb nos cultivares estudados. O cultivar SV acumulou 2 vezes mais Pb em suas raízes, denotando maior habilidade para tolerar o Pb. Segundo Verkleij e Schat (1990) a restrição do movimento ascendente do íon das raízes para a parte aérea pode ser considerada como um dos mecanismos de tolerância. Quando a planta está sob estresse em presença de metais pesados, a raiz é o primeiro ponto de contato e ela possui abundantes sítios de troca iônica na parede celular onde os íons metálicos podem se fixar, impedindo, dessa forma, que

esses íons entrem em contato com outros tecidos (ALLAN; JARRELL, 1989; BRANQUINHO; BROWN; CATARINO, 1997). Portanto, a redução do transporte de um íon metálico consiste em uma estratégia de resistência desenvolvida pela planta para minimizar os efeitos tóxicos do metal pesado. Ademais, o sequestro do metal tóxico por compostos orgânicos, como as fitoquelatinas, a compartimentalização em vacúolos ou a imobilização em tecidos da raiz são outras estratégias utilizadas para minimizar os efeitos danosos dos metais tóxicos (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

Já o cultivar SET, translocou mais Pb para a parte aérea, apresentando aproximadamente 3 vezes mais Pb nas folhas quando comparado a SV (Figura 15). É importante comentar que mesmo acumulando maior teor de Pb nas folhas, estas não apresentaram sintomas de toxicidade como clorose (Figura 18D). Ouzounidou et al. (1994) observaram que plantas sensíveis a metais pesados acumulavam os mesmos na parte aérea diferentemente das plantas tolerantes. Já Lasat et al. (2000) mostraram que as plantas de *Thlaspi arvense* acumularam Zn preferencialmente nas suas raízes e a pequena quantidade de Zn^{2+} detectada nas folhas resultou em dramática clorose foliar o que evidencia sensibilidade ao metal. Ao contrário, as de *Thlaspi caerulescens* (resistente) acumularam o mesmo metal principalmente nas folhas quando foram tratadas com Zn^{2+} durante 10 dias, condições idênticas às das plantas de *Thlaspi arvense*. Esses resultados mostram que não se pode generalizar estratégias de resistência ou tolerância das plantas em função de características específicas como distribuição dos metais absorvidos nas plantas o que deve revelar o grau de diversidade e de complexidade face a agentes estressores.

Kopittke et al. (2007) verificaram que o cultivar de *Vigna unguiculata*, Caloona, acumulou mais Pb em suas raízes do que na parte aérea e não apresentou sintomas de intoxicação com Pb. Estes autores mostraram através de análises de microscopia, que o Pb se acumulou principalmente na parede celular e nos espaços intercelulares do córtex e da rizoderme, muito embora certa quantidade de Pb tenha atravessado a membrana plasmática alcançando o simplasto. Resultados similares foram obtidos por Doncheva et al. (2013) em plantas de girassol (*H. Annuus* cv 1114 e *H. Argophyllus* x *H. Annuus*) onde os maiores teores de Pb foram determinados nas raízes de ambos genótipos.

Contudo, o cultivar *H. annuus* cv 1114 foi mais sensível aos efeitos deletérios do Pb.

Liu et al. (2003) mostraram diferentes perfis de acumulação e de translocação de Pb em 20 cultivares de arroz, reiterando que as plantas, mesmo dentro de uma mesma espécie podem apresentar modos distintos de captação e distribuição do Pb. Contudo, Salazar e Pignata (2014) afirmaram que o Pb é um elemento dificilmente acumulado na parte aérea. Nesse contexto, os resultados antagônicos em relação a localização do acúmulo de Pb, encontrado em SV e SET, podem representar um modelo experimental interessante no presente estudo.

A eficiência de fitoextração dos cultivares de *Vigna unguiculata* foi avaliada pelos cálculos dos fatores de translocação (TF) e de bioconcentração (BCF). Ambos TF e BCF são importantes medidas quando se quer avaliar a capacidade de fitoextração de um vegetal (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Um valor de TF maior que 1 é indicativo de acumulação e transporte de metal para diferentes partes da planta, enquanto que um valor de TF menor que 1 sugere estocagem do metal nas raízes. Plantas com fatores de translocação e de bioconcentração maiores que 1 (BCF e TF > 1) tem potencial para serem usadas em estratégias de fitoextração (CHINMAYEE et al., 2012). Por outro lado, plantas com BCF maior que 1 e TF menor que 1 tem potencial para serem usadas na fitoestabilização (NOURI et al., 2010).

O valor de TF no cultivar SV foi menor que 1, revelando baixa habilidade de translocação do Pb para a parte aérea, mas indicando a capacidade desse cultivar em estocar Pb preferencialmente em suas raízes (Tabela 3). Convém salientar a possibilidade do complexo EDTA-Pb²⁺ se dissociar liberando Pb²⁺ (SAIFULLAH et al., 2009) o qual poderia se ligar a cargas negativas resultantes da dissociação de grupos carboxílicos de ácidos galacturônicos e glucurônicos da parede celular dos tecidos radiculares (rizoderme e córtex). Ademais, as estrias de Caspary presentes na endoderme restringem o acesso do Pb ao xilema reduzindo sua translocação para a parte aérea e estabelecendo uma importante barreira de proteção ao sistema (ALVES et al, 2008; SEREGIN et al., 2004; SHARMA; DUBEY, 2005).

Já em SET o valor de TF foi 1,7 , isto é, duas vezes maior que o valor encontrado em SV, revelando um perfil distinto de SV, quanto à

acumulação do Pb, denotando maior capacidade de translocação e estocagem do Pb nas folhas (Tabela 3). De acordo com Saifullah et al. (2009) o complexo EDTA metal poderia entrar nos vasos do xilema e ser translocado para a parte aérea das plantas, aumentando a mobilidade do Pb dentro das mesmas (WENZEL et al., 2003).

Convém salientar que os valores de TF obtidos nos cultivares de *Vigna unguiculata* (Tabela 3), reiteram o distinto perfil de acumulação de Pb observado nos cultivares SV e SET (Figura 15).

Os dados indicam que tanto SV como SET têm potencial para retirar o Pb do meio. Tal situação é favorável no sentido em que o Pb está sendo retirado do meio, "fitorremediação".

Os valores de TF e BCF podem revelar a habilidade de um vegetal para uso na técnica de fitorremediação. Valores de TF maior que 1 sugerem potencial uso dessas plantas na fitoextração, vez que as mesmas translocam metais de modo eficiente para a parte aérea, que posteriormente poderá ser colhida e o metal reciclado. Já um valor de TF menor que 1 pode ser indicativo de uma espécie com uso potencial em fitoestabilização ou fitofiltração (CHINMAYEE et al., 2012). Por outro lado, o BCF é a medida mais importante quando se avalia a concentração de metais na planta e seu potencial uso como espécie adequada para fitoextração. Em espécies hiperacumuladoras o valor de BCF pode variar entre 50 e 100, contudo valor maior que 1 já é indicativo de acumulação (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Contudo, além dos valores de TF e BCF, para se classificar um vegetal como adequado à fitoextração ou fitoestabilização é necessário que esse tenha biomassa significativa, alta taxa de crescimento, suporte os efeitos tóxicos do metal, resista a patógenos, seja de fácil cultivo, tenha boa adaptação às variações ambientais e não seja consumido por herbívoros, o que evita o acúmulo do metal na cadeia alimentar (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Desse modo, os valores de TF e BCF não podem ser os únicos fatores a serem considerados quando se pretende classificar uma planta como apta à fitorremediação, mas podem servir como um dos indicativos para revelar esse potencial (VAN DER ENT et al., 2012). Os valores de BCF encontrados nas plantas estudadas foram 0,01 em SV e 0,02 em SET (Tabela 3) revelando que os cultivares de *Vigna unguiculata* não podem ser classificados como fitoextratores nem como fitoestabilizadores.

No tocante a nutrição mineral, vários estudos têm mostrado que o Pb afeta a absorção de nutrientes pela planta (POURRUT et al., 2011; DONCHEVA et al., 2013; SHARMA; DUBEY, 2005; WÓJCIK; TUKIENDORF, 2014; ZAIER et al., 2014). Kopittke et al. (2007) mostraram que o Pb^{2+} provocou diminuição de cátions divalentes como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} nas folhas de *Vigna unguiculata*.

Nossos dados revelaram que o teor de Ca^{2+} nas raízes do cultivar SV, tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM, foi diminuído em 60% em relação as raízes das plantas controle (Figura 16A). Já o teor de Pb^{2+} detectado nessas raízes foi 2,5 vezes maior que o de Ca^{2+} (Figuras 15A e 16A) Resultados semelhantes foram encontrados nas plantas de *Lathyrus sativus* (L.) submetidas ao estresse com Pb, na ausência e na presença de EDTA (BRUNET et al., 2008). Além disso, Antosiewicz (2005) observou que o aumento no teor de Pb no meio induziu redução no teor de Ca nas raízes de monocotiledôneas (*Secale cereale* e *Zea mays*) e de dicotiledôneas (*Lycopersicon esculentum* e *Sinapis alba*). Dessa forma, fica claro que o Pb interfere na absorção de Ca. Tal processo pode ser direto quando o efeito tóxico do Pb é consequência da inibição dos canais de cálcio presentes nas raízes das plantas e indireto quando os íons Ca^{2+} presentes nos sítios de ligação de várias estruturas biológicas são substituídos por íons Pb^{2+} (WOJAS et al., 2007; ANTOSIEWICZ, 2005). Esses autores mostraram que devido à reduzida especificidade dos transportadores de cálcio, os mesmos podiam mediar a absorção de cátions metálicos homólogos, como o Pb^{2+} , através da membrana plasmática das células da raiz. White e Broadley (2003) afirmaram que todos os canais de cálcio são permeáveis a cátions mono e bivalentes contribuindo para a absorção de nutrientes essenciais ou de cátions tóxicos. Segundo Pourrut et al. (2012), a diminuição da absorção de um nutriente, na presença de Pb, pode ser o resultado da competição entre íons que possuem raio atômico similar ao do Pb ou de mudanças no estado fisiológico da planta. Nossos resultados foram corroborados com os da avaliação quimiométrica dos íons Ca^{2+} e Pb^{2+} que mostrou uma correlação indireta entre eles, nas raízes do cultivar SV, isto é, aumento da concentração de Pb^{2+} e decaimento da concentração de Ca^{2+} (Figura 17).

Por outro lado nossos dados também revelaram que o conteúdo de Ca^{2+} nos caules de SV não variou em relação as plantas controle a despeito da presença de EDTA-Pb 0,5 mM no meio (Figura 16B). Isso pode ser explicado pela possível capacidade da planta em conservar o funcionamento dos transportadores de cálcio sob contaminação com chumbo (ZAIER *et al.*, 2014). Esses autores verificaram na halófito *Sesuvium portulacastrum* que a presença de Pb não resultou em alterações significativas no teor de cálcio na parte aérea das plantas.

Já nas folhas de SV o teor de Ca^{2+} aumentou na presença de EDTA-Pb quando comparado a plantas controle. Convém salientar que o Pb fica mais retido nas raízes de SV e seu teor na folha é menor (Figura 15C) o que pode sugerir que a despeito da competição do Pb^{2+} com o Ca^{2+} nas raízes o Ca^{2+} que teve acesso às raízes foi transportado para parte aérea.

Segundo Pereira *et al.* (2010) o EDTA contribui para manter a concentração adequada de Ca na parte aérea das plantas mesmo em altas concentrações de Pb o que pode também ser verdadeiro para plantas de SET.

Resultados semelhantes aos dos caules e das folhas de SV foram observados em SET, onde os teores de Ca^{2+} mantiveram-se similares aos dos controles nos caules e aumentaram nas folhas (Figuras 16B e C). Já nas raízes de SV a presença de Pb causou queda no teor de Ca^{2+} ao passo que em SET não se verificou tal efeito (Figura 16A). Esses resultados são corroborados com aqueles que demonstraram que o teor de Pb nas raízes de SET é baixo quando comparado ao das folhas em contraposição aos achados em SV (Figura 15).

O Zn é um elemento químico de grande valia para os sistemas biológicos, visto que atua como cofator de várias enzimas como, por exemplo, superóxido dismutase e RNA polimerase. Tal elemento também tem grande relevância na manutenção da integridade dos ribossomos, além de possuir papel estrutural em alguns fatores de transcrição. Além disso, o zinco participa da formação dos carboidratos e de processos oxidativos nos vegetais (NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Nossos resultados mostraram que o teor de Zn^{2+} parece não sofrer interferência pela presença de Pb em raízes de SV diferentemente do que se passa com as raízes de SET que revelaram

aumento do teor de Zn^{2+} em presença de Pb. Convém lembrar que a quantidade de Pb nas raízes de SV é maior que nas raízes de SET, isto é, a relação Pb^{2+}/Zn^{2+} é 2,5 vezes maior em SV do que em SET. Considerando que os transportadores iônicos não apresentam especificidade absoluta, os ions bivalentes Pb^{2+} e Zn^{2+} podem competir pelas proteínas ZIP responsáveis pelo transporte de Zn^{2+} e de Fe^{2+} (POURRUT, 2012). Sabe-se também que existem transportadores tipo CDF (facilitadores de difusão de cátions) e HMAs em diferentes sistemas de membrana das células (membrana plasmática, tonoplasto, membrana do cloroplasto) que atuam no transporte de Zn. O Zn é requerido pelas plantas em pequenas quantidades e os transportadores funcionam na regulação do teor desse íon, para manutenção da sua concentração fisiológica, pois em elevadas concentrações apresenta toxicidade (MANARA, 2012). Igualmente, as NRAMPs (natural resistance – associated macrophage protein) estão envolvidas no transporte de cátions bivalentes (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+}) podendo também transportar Pb^{2+} .

Segundo Gussarsson (1994), o Pb pode alterar a absorção normal de nutrientes nas plantas por modificar a permeabilidade da membrana plasmática, vez que vários transportadores de cátions presentes na membrana plasmática das células vegetais são potenciais vias de entrada para metais fitotóxicos como Pb (GUPTA; HUANG; CORPAS, 2013). Contudo, o fato de SV acumular maior quantidade de Pb nas raízes comparado a SET pode justificar o diferente perfil de absorção de Zn apresentado por ambos cultivares, isto é, não alteração da absorção do Zn em SV e aumento em SET (Figura 16D).

Sendo as raízes o tecido alvo de absorção dos diferentes íons pode-se esperar tal distinta regulação. Brunet et al. (2008) verificaram que o acúmulo de Pb nas raízes de *Lathyrus sativus* L. provocava uma diminuição nos teores não somente de Zn^{2+} mas também de Ca^{2+} , Cu^{2+} e K^+ . Igualmente, ASHRAF et al., (2011) verificaram redução nos teores de Zn nas raízes de cultivares de canola em presença de Pb. Tais resultados mostram as peculiaridades de diferentes espécies vegetais. Os teores de Zn^{2+} nos caules de SV e de SET comparados aos respectivos valores controle revelaram diminuição no teor de Zn^{2+} o que indica uma regulação distinta comparada às suas raízes (Figura 16E). Resultados semelhantes foram também encontrados por ASHRAF et al., (2011) que constataram diminuição nos teores de Zn na parte aérea de quatro

distintos cultivares de canola em presença de Pb. Já nas folhas de ambos cultivares não se verificou diferença no teor de Zn entre plantas tratadas com Pb e plantas controle o que denota que o Pb não interferiu na absorção do Zn em folhas (Figura 16F).

No tocante ao Cu presume-se que os teores desse íon foram abaixo do limite de detecção do equipamento utilizado para dosagem dos metais (ICP OES), vez que tanto nas plantas controle quanto nas plantas tratadas com Pb os valores foram iguais à zero em raízes, caules e folhas de ambos cultivares.

Considerando o efeito do Pb na absorção dos diferentes cátions bivalentes (Ca^{2+} e Zn^{2+}) nos dois distintos cultivares (SV e SET) constatou-se diferentes efeitos em função não só dos cultivares mas também dos tecidos estudados.

Como já discutido anteriormente, a toxicidade do Pb pode alterar a absorção e a translocação iônica e conseqüentemente pode induzir alterações em parâmetros fisiológicos. No tocante a massa seca, nossos resultados mostraram inibição pelo Pb em SV e SET e tal inibição foi semelhante nas raízes e na parte aérea dos respectivos cultivares mas representou uma maior susceptibilidade do cultivar SET (valor médio de inibição 80%) comparado à SV (valor médio de inibição 54 %) (Figura 19). A literatura mostra que plantas submetidas ao tratamento com Pb apresentam redução da massa seca com conseqüente diminuição de biomassa (ALVES et al., 2008; BRUNET et al., 2008; GUPTA et al., 2009; HU et al., 2012; KAUR et al., 2011; ROSSATO et al., 2012; VERMA; DUBEY, 2003; YANG et al., 2010; YUAN et al., 2014). A despeito do grande número de trabalhos, com diferentes plantas, revelarem redução de suas massas secas em presença de Pb, Pereira et al. (2010) não observaram diferenças significativas da massa seca na parte aérea das plantas de feijão de porco (*Canavalia ensiformis* L.) em presença de diferentes concentrações de EDTA-Pb.

Samardakiewicz e Wozny (2005) constataram que raízes de *Lemna minor* L. tratadas com 15 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ apresentaram inibição completa das etapas da divisão celular nas células de suas raízes, após 24 horas. Yucel et al. (2008) também mostraram que o Pb provoca várias alterações no fuso mitótico e induz o surgimento de aberrações cromossômicas na gimnosperma *P. nigra ssp. pallasiana*. Os referidos autores sugerem que a redução da

biomassa na presença do Pb é decorrente do efeito inibitório desse metal no processo de divisão celular. Já com base em medidas de massa fresca, Kopittke et al. (2007) mostraram que plantas de *Vigna unguiculata* foram sensíveis ao Pb e que as raízes foram mais sensíveis que a parte aérea.

Kaur et al. (2012) trabalhando com plantas de trigo mostraram inibição do comprimento das raízes e da parte aérea revelando maior efeito inibitório do Pb nas raízes. Já Doncheva et al. (2013) através de medidas de crescimento relativo à massa fresca mostraram que as folhas de girassol, de plantas submetidas a tratamento com EDTA-Pb 0,1 mM, apresentavam maior inibição do que as raízes. Convém salientar, que massa seca é uma medida de crescimento que também pode ser aferida por massa fresca, comprimento e área foliar.

O Pb também afeta a área foliar provocando sua redução (KANWAL et al., 2014; ROSSATO, et al., 2012; SHAKOOR et al., 2014; SHU; ZHANG; WANG, 2014; ZHAO; YE; ZHENG, 2011). Tal fato parece ser resultante principalmente da ocorrência de aberrações cromossômicas e de divisões celulares anormais. Contudo, a redução da área foliar pode ainda estar relacionada com a inibição do processo fotossintético induzido pelo metal (ALDOOBIE; BELTAGI, 2013; OUZOUNIDOU et al., 1998). O grau de redução da área foliar em SV correspondeu a 2,5 vezes ao passo que em SET a redução foi 8,7 vezes em relação aos respectivos controles (Figura 19C). Tais resultados foram compatíveis com os registrados para a massa seca da parte aérea em ambos cultivares que revelou uma inibição c.a. 30% maior em SET.

Já em relação à condutância estomática nossos resultados mostraram que o estresse provocado pelo Pb afetou drasticamente ambos os cultivares revelando uma inibição de 86% para SV e 95% para SET. Contudo, SET mostrou-se mais sensível revelando um valor absoluto correspondente a metade de SV. Embora tais resultados não tenham revelado diferença estatística fica clara a tendência de maior susceptibilidade aos efeitos do Pb do cultivar SET como já detectado nos parâmetros massa seca e área foliar. Diversos trabalhos relatam que plantas submetidas ao estresse com Pb apresentam redução da condutância estomática em relação a plantas não tratadas (KOSOBROUKHOV; KNYAZEVA; MUDRIK, 2004; KANWAL, et al., 2014; PEREIRA et al., 2014; RODRIGUEZ et al., 2014).

Sabe-se que o estresse provocado por metais pesados pode afetar o movimento estomático pela inibição das aquaporinas, limitando o fluxo de água nas células-guarda dos estômatos. Yang, Zhang e Wang (2004) mostraram que o estresse provocado por Pb e Zn afetou o fluxo de água nas células-guarda dos estômatos levando conseqüentemente ao fechamento da abertura estomática na leguminosa *Vicia faba* L. pertencente à família das fabáceas a mesma de *Vigna unguiculata*, o que poderia justificar a baixa condutância estomática observada nos nossos cultivares. Sabe-se ainda que a diminuição da condutância estomática pode estar relacionada com alterações nos teores de K^+ e de Ca^{2+} nas células-guarda e que concentrações elevadas de Ca^{2+} inibem a abertura dos estômatos (ROELFSEMA; HEDRICH, 2005). Apesar da elevada inibição da condutância estomática em ambos cultivares, as folhas de SET apresentaram maior teor de Ca^{2+} que as de SV o que pode reiterar a hipótese de que SET é mais afetado pelo Pb.

A redução da condutância estomática nos cultivares de *Vigna unguiculata*, SV e SET, também determinou uma redução da transpiração de modo similar em ambos cultivares. De acordo com Sharma e Dubey (2005), o Pb induz a redução da taxa de transpiração uma vez que provoca o declínio de compostos que estão associados com a manutenção do turgor das células diminuindo assim o potencial de água dentro destas. Nossos resultados estão de acordo com os observados em diferentes espécies vegetais (ALKHATIB et al., 2011; PEREIRA, et al., 2014; RODRIGUEZ, et al., 2014; ROSSATO et al., 2012).

Os demais parâmetros fisiológicos determinados em SV e SET como eficiência quântica do PSII, taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR) e taxa fotossintética líquida também foram inibidos pelo Pb.

A eficiência quântica do PSII representa a eficiência da absorção de luz pelo PSII usada para redução da Quinona A (BAKER, 2008). Sabe-se que o Pb é capaz de provocar alterações nas proteínas integrantes do complexo enzimático do fotossistema II (PSII) modificando seu funcionamento (ROMANOSVSKA et al, 2012; WIOLETA et al., 2015). Além disso, o Pb^{2+} pode substituir o átomo de Mg^{2+} , componente central da molécula de clorofila ou ainda substituir o Ca^{2+} , no complexo liberador de oxigênio da fotossíntese, resultando em alterações estruturais do PSII bem como causando inibição da

transferência de energia nesse fotossistema (QUFEI; FASHUI, 2009). Nossos resultados revelaram que o Pb alterou de modo distinto a eficiência quântica do PSII nos cultivares de *Vigna unguiculata*. A maior inibição obtida em SET (55%) foi compatível com o maior teor de Pb^{2+} detectado nas folhas desse cultivar. Contudo, em SV, o Pb possivelmente não alterou o funcionamento do PSII o que está de acordo com o menor teor de Pb^{2+} encontrado nas folhas desse cultivar (Figuras 15A e C). Resultados semelhantes foram relatados em outros trabalhos. KAUR et al., (2012) mostraram que plantas de trigo (*Triticum aestivum*) submetidas a uma concentração de $Pb(NO_3)_2$ até 2,5 mM exibiram c.a. 36% de inibição do PSII quando comparadas ao controle. Wu et al. (2008) mostraram que diferentes concentrações de $PbCl_2$ (até 2,5 mM) inibiram a absorção da energia de excitação que seria captada pelas proteínas LHCII e transferida ao centro de reação do PSII, em plântulas de espinafre, revelando os efeitos do Pb nesse fotossistema. Para Hu et al. (2014), a eficiência quântica do PSII de plântulas de soja (*Glycine max*) submetidas ao estresse combinado, chuva ácida e Pb, foi intensamente inibida. Os autores destacaram que a presença da chuva ácida aumentou a biodisponibilidade do metal provocando a decomposição da clorofila e com isso comprometendo a absorção e a conversão da energia luminosa no PSII. Contudo, evidências contrárias foram observadas em folhas de milho tratadas com $Pb(NO_3)_2$ por Romanowska et al. (2012), onde a eficiência do PSII foi pouco afetada pelo Pb, apresentando inibição de apenas 8%, revelando que o Pb pode afetar o aparato fotossintético dos vegetais de modo variado.

No tocante ao transporte de elétrons através do PSII nosso estudo mostrou inibição semelhante à da eficiência do PSII. Para Mallick e Mohn (2003) a redução ou bloqueio parcial do transporte de elétrons do PSII para o PSI limita a re-oxidação da quinona A (primeiro acceptor de elétrons do fotossistema II), levando a uma redução da eficiência do PSII. A redução da taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR) pode ser resultante da inibição provocada pelo Pb no complexo oxidante da água (BELATIK; HOTCHANDANI; CARPENTIER, 2013). Em apoio a essa ideia, Romanowska et al. (2012) mostraram que em plantas de milho, nos tilacóides das células da bainha, o transporte de elétrons da água para um acceptor exógeno (DCPIP) foi inibido por Pb e que ao aplicar um doador de elétrons exógeno (DPC) o transporte de

elétrons era aumentado, revelando que possivelmente o Pb inibe o complexo oxidante da água (doador de elétrons) do PSII, bloqueando assim o fluxo de elétrons através desse sistema.

Além dos parâmetros acima citados relacionados à absorção da luz e ao transporte de elétrons através do PSII pode-se também avaliar o efeito da toxicidade do Pb na fotossíntese líquida. Como já foi discutido, o Pb^{2+} pode ocupar a posição do Mg^{2+} presente na estrutura policíclica das moléculas de clorofila a e b, bem como pode substituir o Fe^{2+} das estruturas dos citocromos (b e f) todos constituintes do aparato fotossintético. Sabe-se também que o complexo envolvido na quebra da molécula de água possui Mn^{2+} na sua estrutura e o Pb^{2+} poderia substituí-lo. Tais possíveis alterações justificam a inibição da fotossíntese pelo Pb. Ademais, o Pb pode inibir a síntese de plastoquinona, carotenoides e as enzimas do ciclo de Calvin (LIU et al., 2008; MISHRA et al., 2006; POURRUT et al., 2011). Assim, a inibição da fotossíntese provocada pelo Pb é um sintoma de toxicidade frequentemente relatado em trabalhos científicos (ALKHATIB et al., 2011; BELATIK; HOTCHANDANI; CARPENTIER, 2013; ROMANOWSKA et al., 2012; XIAO et al., 2008; WU et al., 2008). Nossos resultados confirmaram inibição na fotossíntese líquida (Pn), em ambos cultivares, sendo a inibição em SET (72%) mais severa que em SV (40%) (FIGURA 20E). Esses dados estão de acordo com os encontrados por Stanislawski-Glubiak, Korzeniowska e Kocon (2014) em plantas de milho crescidas em solo contaminado com chumbo, onde a fotossíntese foi 45% inibida em relação ao controle. Romanowska et al. (2006) também mostraram que plantas de ervilha tratadas com $Pb(NO_3)_2$ 5 mM apresentaram inibição da fotossíntese líquida de 60 e 80%, em alta e baixa luminosidade respectivamente. Por outro lado, Parys et al. (2014) relataram que folhas de *Armeria marítima*, em presença de diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$, mostraram uma inibição da fotossíntese líquida dependente da dose, isto é, em baixas doses de Pb maiores valores da fotossíntese líquida e em altas doses (20 mM) menores valores. Contudo, o decaimento era apenas em torno de 10% o que revelava se tratar de uma espécie resistente a toxicidade provocada pelo Pb.

No tocante a fixação de CO₂, esse é um processo também afetado pelos metais tóxicos em várias espécies vegetais (PARYS et al., 2014; PEREIRA et al., 2014;) A concentração intercelular de CO₂ medida em ambos cultivares foi semelhante e em presença de EDTA-Pb 0,5 mM o decaimento correspondeu a 30% em SV e 25% em SET refletindo pequena alteração na concentração intercelular de CO₂ (Figura 20F). Por outro lado, Pereira et al. (2014) observaram, em plantas de aguapé, que a concentração intercelular de CO₂ aumentava e se mantinha constante em concentrações elevadas de Pb (4.00 mg L⁻¹). Em todos os parâmetros fisiológicos avaliados até então ficou clara uma inibição pelo Pb mais acentuada em SET quando comparado à SV, o que permite sugerir um perfil diferencial entre os cultivares estudados. No que diz respeito à concentração intercelular de CO₂ não se verificou diferença significativa entre os mesmos mas a taxa fotossintética líquida em SET foi mais afetada (72%) que em SV (40%) (FIGURA 20E). Tais resultados revelam um possível comprometimento da reação de fixação de CO₂, através da RubisCO, enzima crucial para o processo de fixação do dióxido de carbono no Ciclo de Calvin. Kosobrukhov, Knyazeva e Mudrik (2004) já encontraram redução na eficiência da carboxilação da RubisCO (38%), em presença de Pb, em *Plantago major* como modelo experimental. Em apoio a essa ideia Xiao et al. (2008) mostraram uma redução significativa da atividade de carboxilação da RubisCO em plantas de espinafre submetidas ao tratamento com PbCl₂. Do mesmo modo, Rodriguez et al. (2014) mostraram que, plantas de ervilha submetidas a concentrações variadas de PbCl₂ apresentaram marcada redução na atividade da RubisCO mesmo nas menores doses aplicadas de chumbo e aumento de 10% na concentração intercelular de CO₂. Convém salientar, que embora a fotossíntese seja um dos processos mais sensíveis ao estresse provocado por chumbo, os efeitos desse metal sobre as transformações de energia que ocorrem nas plantas ainda não estão completamente elucidados (XIAO et al., 2008). Igualmente, deve-se chamar atenção, que a inibição exercida por metais (Pb e Cd) a várias enzimas resulta da interação dos íons metálicos com grupos sulfidríla (-SH) presentes na estrutura dessas moléculas (SEREGIN e IVANOV 2001). Nesse contexto, o bloqueio dos grupos -SH, inibe a atividade das enzimas além de afetar sua

estrutura terciária (SHARMA; DUBEY, 2005). Assim, enzimas poderiam ser afetadas e em particular as do Ciclo de Calvin.

No tocante ao estresse oxidativo, sabe-se que metais tóxicos promovem a geração de EROs, desencadeando o aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SHARMA; DUBEY, 2005). Contudo, tal efeito não pode ser generalizado e depende da enzima antioxidante, objeto de estudo, da planta, do tecido, do metal testado etc (PALMA; GUPTA; CORPAS, 2013). Sabe-se, que o Pb pode tanto aumentar como diminuir a atividade das enzimas antioxidantes. De um modo geral, nossos resultados revelaram um aumento das enzimas Catalase (CAT), Ascorbato Peroxidase (APX) e Superóxido dismutase (SOD) no cultivar SET, independente do tecido, isto é, raiz e folha, em relação aos seus respectivos controles. Já o cultivar SV mostrou a mesma tendência de aumento dessas atividades, em presença de EDTA-Pb 0,5 mM, com exceção da CAT, em raízes, e da SOD, em folhas, onde observou-se semelhança e diminuição nas respectivas atividades em relação aos seus controles (Figura 21).

A CAT é uma metaloenzima e constitui a principal enzima antioxidante responsável pela eliminação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisando sua decomposição em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (PANCHUK; ZENTGRAF; VOLKOV, 2005). Apesar das raízes de SV apresentarem maior teor de Pb^{2+} quando comparadas às folhas (Figura 15A e C) constatou-se que o Pb não afetou a atividade da CAT nas suas raízes. Dentre as enzimas antioxidantes estudadas a CAT aparentemente é a que apresenta maior atividade. Pode-se sugerir que a atividade da CAT nas raízes de SV apresentasse em um patamar de atividade suficiente para proteger a raiz contra o efeito do EDTA-Pb 0,5 mM, não induzindo um aumento da atividade da mesma. Shu et al. (2012) usando folhas de plântulas de pinhão-manso, como modelo experimental, mostraram aumento de atividade da CAT, em baixas concentrações de Pb, alcançando valor máximo numa concentração de 3,0 mM, seguida de inibição à 4 mM. Wang et al. (2010) observaram também que a atividade da CAT nas raízes decaiu drasticamente em plantas de *Vicia faba* quando tratadas com elevadas doses de Pb. Nesse contexto, Lamhamdi et al. (2011) observaram aumento da atividade da CAT nas raízes de plantas de

trigo tratadas com Pb até a concentração de 1,5 mM, e posterior inibição a 3mM.

Já em *Arabidopsis* a atividade da CAT em folhas é maior do que em raízes e sementes em resposta a produção de EROs basal (MHAMDI; NOCTOR; BAKER, 2012). Por outro lado, em presença de $Pb(NO_3)_2$, Redy et al. (2005) observaram que a atividade da CAT foi aumentada tanto nas raízes como nas folhas das leguminosas *Macrotyloma uniflorum* e *Cicer arietinum*, o que concorda também com os resultados encontrados em SET. Esses resultados foram também confirmados por Gupta et al. (2009) ao investigarem o efeito do Pb em plantas de milho. Igualmente, a parte aérea de *Hibiscus esculentus* apresentou incremento da atividade da CAT quando as plantas foram submetidas a diferentes concentrações de $Pb(NO_3)_2$ (YOUSSEF; AZOOZ, 2013). Entretanto evidências contrárias foram observadas em plantas de arroz sob estresse com chumbo onde a atividade da CAT decaiu nas raízes e na parte aérea foi marcadamente inibida a concentrações de 1 mM (VERMA; DUBEY, 2003).

A APX é também uma enzima com elevada afinidade para o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Desse modo, a APX é considerada uma das enzimas antioxidantes mais importantes, pois desempenha um papel central e fundamental ao dar continuidade ao processo de eliminação de EROs, vez que é capaz degradar o H_2O_2 , em água e oxigênio com maior eficiência que outras enzimas como a CAT. Portanto o aumento da atividade da APX é um importante fator a ser considerado para resistência ao acúmulo de EROs causados por estresses abióticos (GILL; TUTEJA, 2010). Alguns autores reportam que plantas submetidas ao estresse com Pb apresentam aumento da atividade da APX em resposta ao aumento da concentração desse metal, que conseqüentemente promove a produção de EROs (MALAR et al., 2014; SHARMA; DUBEY, 2005; WANG et al., 2010). No presente estudo a atividade da APX foi aumentada nas raízes e folhas dos cultivares de *Vigna unguiculata* (SV e SET) (Figura 21C e D). É importante comentar que os maiores valores de atividade da APX foram obtidos nos tecidos com maior teor de Pb, isto é nas raízes de SV e nas folhas de SET. Contudo, comparando-se a atividade da enzima nos diferentes tecidos (raiz e folha), constatou-se que a atividade da APX foi maior nas raízes de ambos cultivares. De modo semelhante, Kumar et

al. (2013) observaram que a atividade da APX aumentou nas raízes da herbácea *Talinum triangulare* após 7 dias de estresse $Pb(NO_3)_2$ em diferentes concentrações, alcançando seu maior valor na concentração de 0,5 mM. Em apoio a essa ideia, Mishra et al. (2006) verificaram, que a atividade da APX aumentou nas plantas de *Ceratophyllum demersum* submetidas a variadas concentrações de chumbo. Entretanto, nas concentrações mais elevadas (50 e 100 μM) a atividade da enzima declinou. Os autores concluíram que tal decaimento pode ser resultante do acúmulo do metal na planta. O aumento da atividade da APX geralmente pode ser considerado como um mecanismo adaptativo, sendo uma resposta da planta ao aumento de EROs proveniente da exposição ao chumbo. O aumento da atividade dessa enzima determina o consumo efetivo do peróxido de hidrogênio conferindo assim proteção para a planta contra o estresse oxidativo desencadeado pelo metal pesado (MALAR et al., 2014). Yang et al. (2011) observaram o aumento da atividade da APX em cultivares de trigo submetidos a diferentes tratamentos com chumbo, indicando que tal enzima exerce papel relevante no controle de EROs induzidas pela presença desse metal. Resultados similares foram observados nas folhas de *Vicia faba* submetidas a tempos variados de exposição ao chumbo na presença ou ausência de quelantes. Contudo, na presença de EDTA a atividade de tal enzima diminuiu (SHAHID et al., 2014).

Baseado nos resultados da presente pesquisa pode-se dizer que o chumbo induziu a atividade da APX, em SV e SET, indicando que tal enzima tem papel relevante em *Vigna unguiculata* no processo de detoxificação de EROs induzidas por esse metal. Os cultivares aqui estudados foram capazes de responder ao estresse provocado pelo Pb sem comprometer o funcionamento da enzima mesmo nos tecidos onde a concentração do metal foi mais elevada.

A ativação de enzimas antioxidantes é um dos mais eficientes mecanismos para proteger as células vegetais dos efeitos deletérios provocados pelo excesso de EROs. Dentre estas, a SOD é uma enzima chave integrante do sistema de defesa antioxidante dos vegetais contra as EROs induzidas pelo Pb (MISHRA et al., 2006). Diferentes isoformas de SOD atuam em diversos locais na célula, como cloroplastos, mitocôndrias, peroxissomos e

citoplasma. Essa enzima catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GILL; TUTEJA, 2010).

De acordo com Zhang et al. (2007) o aumento da atividade das enzimas antioxidantes está relacionado com a tolerância ao estresse provocado por metais pesados. Tem sido amplamente mostrado que concentrações variadas de Pb induzem a produção de EROs desencadeando o aumento da atividade da SOD. (GAO et al., 2015; GUPTA et al., 2009; HU et al., 2012; KAUR et al., 2011; LAMHAMDI, et al., 2011; LIU et al., 2009; MALECKA et al., 2014; ROSSATO et al., 2012; VERMA, DUBEY, 2003; WANG et al., 2010; WU et al., 2012).

Nossos resultados revelaram que o Pb induziu o aumento da atividade da SOD nos cultivares de *Vigna unguiculata*. O aumento de tal atividade é resultante do aumento da concentração do radical superóxido (MISHRA et al., 2006). A atividade da SOD nas raízes de SV foi maior do que a observada nas raízes de SET (Figura 21E). Tal resultado é pertinente vez que as raízes desse cultivar apresentaram maior teor de Pb^{2+} . Em contrapartida, nas folhas a atividade da SOD foi maior em SET que por sua vez apresentou nesse órgão maior teor de Pb^{2+} . Esses resultados, tal como observado para a APX revelaram que o estresse provocado pelo chumbo não comprometeu o funcionamento da SOD, considerada a primeira linha de defesa contra EROs. Semelhante ao observado nessa pesquisa plantas de *Vallisneria natans* apresentaram notáveis incrementos da atividade da SOD após 1 e 2 dias de exposição a 75 μ M de Pb. Por outro lado, após quatro dias de exposição ao metal a atividade da enzima foi reduzida (WANG et al., 2012). Já, em plantas de trigo sob estresse com $Pb(NO_3)_2$ a atividade da SOD elevou-se significativamente de modo proporcional ao acréscimo do teor de Pb (YANG et al., 2011). Do mesmo modo, em plantas de pepino submetidas a diferentes tratamentos de chumbo a atividade da SOD mostrou-se elevada em todas as concentrações (GONÇALVES et al., 2009). No presente estudo, a atividade da SOD foi mais elevada nos tecidos com maior teor de Pb^{2+} revelando que a presença do Pb determina a formação em excesso de EROs desse modo o aumento da atividade da SOD foi relevante no sentido de combater os efeitos adversos ocasionados pelas EROs. Para Alscher, Erturk e Heath (2002) é

crucial que a SOD remova o ânion superóxido, uma vez que as membranas fosfolipídicas são impermeáveis à passagem dessa molécula.

No presente estudo pode-se inferir, portanto que o aumento da atividade das enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD nos cultivares de *Vigna unguiculata* submetidas ao tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM têm um importante papel e representa um mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo gerado pelo metal Pb. O mecanismo de consumo de EROs provoca o decaimento dos danos oxidativos e aumenta a resistência a metais. A produção de EROs influencia a expressão de muitos genes responsáveis pela resposta genética ao estresse. Além disso, 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. (GILL; TUTEJA, 2010).

Para compreender melhor como o Pb interfere no funcionamento das enzimas CAT, APX e SOD o estudo da expressão relativa dos genes das respectivas enzimas também foi realizado.

Nas raízes de SV os genes *VuCAT 1* e *2* apresentaram expressão relativa aumentada. Contudo, a expressão relativa obtida para *VuCAT 2* foi o dobro da registrada para *VuCAT 1* (Figuras 25A e B). Entretanto o aumento da expressão gênica de *VuCAT 2* não foi acompanhado pelo aumento da atividade da enzima, vez que nas raízes, essa atividade foi semelhante ao controle. Isto reitera a hipótese de substituição do metal essencial do sítio ativo da enzima pelo íon Pb^{2+} , culminando na inativação da atividade da mesma. É importante salientar que o excesso de EROs pode também ter provocado a inibição da atividade enzimática. Outra suposição para que a atividade da CAT não tenha sido aumentada nas raízes de SV, mesmo quando a expressão de transcritos foi elevada, é que esse metal tenha provocado mudanças no arranjo estrutural das subunidades da CAT (SHU et al., 2012). Esses resultados estão de acordo com os obtidos para *Arabidopsis thaliana* onde o gene *CAT2* apresentou maior expressão nas folhas sendo o determinante para a maior atividade da CAT nesse órgão (MHAMDI; NOCTOR; BAKER, 2012). Esses autores explicam que *CAT 2* apresentou o mesmo perfil de expressão que genes envolvidos no processo fotossintético, sugerindo que *CAT 2* possivelmente esteja relacionado com o estresse oxidativo gerado pelo

processos de fotorespiração. Isto explica o aumento da atividade e da expressão gênica de *VuCAT 2* nas folhas de SV que apresentaram menores teores de Pb^{2+} . É importante salientar que *VuCAT 1* foi inibido nas folhas desse cultivar reiterando o relevante papel de *VuCAT 2* no controle do estresse oxidativo nesse tecido.

Ao contrário, em SET os genes *VuCAT 1* e *2* apresentaram sua expressão relativa diminuída nas raízes e aumentada nas folhas desse cultivar. Tal resultado está de acordo com o baixo teor de Pb^{2+} detectado nas raízes e com o maior teor de Pb^{2+} registrado nas folhas de SET, mostrando que nesse cultivar o estresse oxidativo desencadeado pelo metal nas folhas desse cultivar foi regulado pelo aumento da atividade da CAT e da expressão de *VuCAT 1* e *2*. Convém salientar que nas folhas de SET *VuCAT 1* apresentou maior expressão que *VuCAT 2*. Do mesmo modo, plantas de *Suaeda salsa* que submetidas ao tratamento com $Pb(NO_3)_2$ também apresentaram aumento da expressão dos genes da CAT (WU et al., 2013).

No tocante ao perfil de expressão da família multigênica da APX nossos resultados mostraram o aumento da expressão relativa de todos os genes da APX nas raízes de SV que também apresentaram maior atividade enzimática revelando o importante papel dessa enzima no combate ao excesso de H_2O_2 induzido pelo Pb nesse tecido. Desse modo, podemos dizer que SV tem maior capacidade para responder aos efeitos tóxicos do Pb nas raízes, vez que mesmo apresentando maior teor de Pb^{2+} nesse tecido, todos os genes da APX foram expressos o que determinou uma maior atividade enzimática. Nas raízes de SV o gene *VuAPX 2* apresentou expressão relativa 1,5 vezes superior aos demais, com exceção de *VuAPX 3* que foi 2,5 vezes menos expresso que *VuAPX 2* (Figura 26A).

Nas folhas de SV os valores de expressão relativa foram menores do que os obtidos nas raízes, corroborando com os baixos valores de atividade enzimática detectados nesse tecido. Contudo, enquanto nas raízes os genes *VuAPX 2* e *4* tiveram sua expressão induzida pelo chumbo nas folhas sua expressão foi inibida. Convém salientar que o gene *VuAPX 5* só foi expresso

nas folhas dos cultivares, representando o maior valor de expressão relativa nas folhas de SV.

Ao contrário de SV nas raízes de SET o Pb inibiu os genes *VuAPX 1, 2 e 3*, tal resultado reitera os menores valores de atividade enzimática da APX detectados nas raízes de SET quando comparado a SV. Contudo a atividade da enzima aumentou nas raízes de SET quando comparada ao controle, revelando que nesse cultivar a expressão gênica de *VuAPX 4, 4' e 6* foram responsáveis por esse aumento. Como mostrado na Figura 24D nas folhas de SET o Pb inibiu a expressão dos genes *VuAPX 1, 4' e 5*. É importante salientar que *VuAPX 1* teve sua expressão inibida pelo Pb tanto nas raízes quanto nas folhas de SET. Ao passo que *VuAPX 2 e 3* foram inibidos nas raízes mas não em folhas. Isso mostra que os genes responsáveis pela expressão da APX não são os mesmos das folhas.

Tanto em SV como em SET os genes *VuAPX 4, 4' e 6* foram responsáveis pela expressão da APX nas raízes. Ao passo que nas folhas dos cultivares o perfil de expressão gênica foi distinto. Enquanto que nas folhas de SV *VuAPX 5* foi bem expresso nas folhas de SET tal gene foi inibido. Contudo *VuAPX 3 e 6* foram expressos nas folhas de ambos cultivares, porém os valores de expressão relativa de tais genes em SET foram o dobro do obtido em SV o que possivelmente explica a maior atividade enzimática detectada nas folhas de SET.

Nossos dados de expressão gênica da APX em *Vigna unguiculata* mostraram resultados relacionados com os observados por Hu et al. (2014) em dois cultivares da monocotiledônea *Festuca arundinaceae* submetidas ao tratamento com chumbo. Do mesmo modo, Brunet et al. (2009) observaram o aumento da expressão relativa de *LsAPXc* e *LsAPXp* nas raízes e folhas de plantas de *Lhatyrus sativus* submetidas a 96h de tratamento com Pb. Li et al. (2012) constataram considerável aumento da expressão relativa de *pAPX* na gramínea *Lolium perenne* submetida a tratamento com $Pb(NO_3)_2$ 3,2 mM por 4h. Até o presente poucos estudos tratam da variação da expressão dos genes da APX em plantas sob estresse com chumbo.

Na presente pesquisa os dados de expressão relativa da família multigênica da SOD também foram analisados (Figura 27). Convém salientar que nas raízes de SV (Figura 15 A), tal como observado para as famílias multigênicas da CAT e APX, nenhum gene teve sua expressão inibida. Desse modo, é factível hipotetizar que o cultivar SV foi mais hábil em combater os danos oxidativos provocado pelo chumbo sendo mais resistente ao estresse provocado por esse metal (GILL; TUTEJA, 2010). Além disso, a atividade dessas enzimas com exceção da CAT, também foi maior nas raízes desse cultivar do que o observado para SET.

Os genes *VuFeSOD1*, *VuSODCu/Zn2* e *VuSODMn1* apresentaram maiores valores de expressão relativa nas raízes de SV sugerindo ter importante papel na regulação da expressão dessa enzima nesse tecido. É importante dizer que o gene *VuSODFe1* foi 34 vezes mais expresso no grupo tratamento, revelando maior valor expressão dentre todos os genes analisados.

Nas folhas de SV os genes *VuSODMn1*, *VuSODCu/Zn3* e *VuSODFe1* apresentaram aumento de expressão, enquanto que os genes *VuSODCu/Zn1* e *2* e *VuSODFe2* apresentaram redução na expressão relativa. Já os genes *VuSODFe3* e *VuSODCu/Chap1* permaneceram inalterados.

Em SET (Figura 27 C), com exceção dos genes *VuSOD Cu/Zn 1* e *2* e *VuSOD Mn 1* que foram inibidos pelo Pb todos os outros apresentaram expressão relativa aumentada. A SOD Mn presente nas mitocôndrias são consideradas uma das mais importantes isoformas de SOD por serem essenciais a sobrevivência dos organismos aeróbicos e proteger as mitocôndrias contra as EROs (FERNÁNDEZ-OCAÑA et al., 2011). Um dos efeitos causados pelo 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). Um estudo com ervilhas submetidas a tratamento com Pb revelou considerável aumento da atividade da SODMn nas raízes desse vegetal (MALECKA; JARMUSZKIEWICZ; TOMASZEWSKA, 2001). Esse aumento de expressão é observado em raízes e folhas de SV, estando a *VuSODMn1* entre os três genes mais expressos nesses tecidos. Já para as raízes de SET, a redução na expressão relativa da *VuSODMn1* poderá revelar maior vulnerabilidade desse cultivar ao estresse

causado pelo chumbo. Para Alscher, Erturk e Heath (2002) o aumento da expressão de SODs poderá levar a proteção contra estresses específicos.

Por outro lado, nas folhas de SET (Figura 15 D) todos os genes da SOD mostraram aumento de expressão, contudo os valores de expressão relativa foram inferiores aos detectados nas raízes.

Análise do perfil de expressão gênica nos cultivares de *Vigna unguiculata* está de acordo com os dados de atividade enzimática obtidos para a SOD. Portanto, o decréscimo observado na atividade da SOD nas raízes de SET quando comparado a SV está relacionado com a redução da expressão relativa de alguns genes (*VuSOD Cu/Zn 1 e 2* e *VuSOD Mn*) nas raízes desse cultivar. O mesmo fato também pode ser observado nas folhas dos cultivares estudados, onde SV mostrou redução da expressão relativa dos genes *VuSOD Cu/Zn 1 e 2* e *VuSODFe2* e também menor atividade enzimática da SOD nas folhas quando comparado a SET.

Convém salientar que os genes *VuSODFe1* e *VuSODCu/Zn3* foram expressos em ambos cultivares tanto em raízes com em folhas, revelando exercer importante papel no sistema de defesa antioxidante de *Vigna unguiculata*.

Nossos resultados estão de acordo com os observados por Liu et al. (2009) em plantas de *Arabidopsis thaliana* submetidas a diferentes concentrações de chumbo que apresentaram aumento da expressão relativa de quatro isoformas de SOD. Sugerindo que o Pb é capaz de ativar o sistema de defesa antioxidante dos vegetais (MALECKA; JARMUSZKIEWICZ; TOMASZEWSKA, 2001). Do mesmo modo Malecka et al. (2014) também observaram aumento da atividade enzimática da SOD e da expressão relativa das isoformas *SOD Cu/Zn* e *SOD Mn* em raízes de ervilha submetidas ao tratamento com diferentes metais incluindo o Pb. Para Sharma et al. (2012) plantas que expressam diferentes isoformas de SOD são frequentemente mais resistentes aos estresses abióticos, vez que esta enzima tem um papel central na defesa antioxidante dos vegetais. Em apoio a essa ideia, Li et al. (2012) evidenciaram o aumento da expressão gênica de três isoformas de SOD, *CytSOD Cu/Zn*, *ChISOD Cu/Zn* e *Mn SOD* na gramínea *Lolium perenne*

submetida a concentrações distintas de chumbo (3,2 e 0,5 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Hu et al. (2014) evidenciaram aumento da atividade da SOD e da expressão de *CytSOD Cu/Zn* no cultivar Silverado da gramínea *Festuca arundinaceae* o qual revelou elevada tolerância ao Pb.

Pode-se inferir, portanto que o Pb induziu estresse oxidativo que foi regulado pelo aumento da expressão gênica das enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD. Reiterando a hipótese de que o Pb induz a formação de EROs tóxicas (POURRUT et al., 2008). Sabe-se que a tolerância ao Pb depende da habilidade da planta em manter o equilíbrio entre a produção e o consumo de EROs, baseado na capacidade de defesa de seu sistema antioxidante (HU et al., 2014). Assim pode-se afirmar que os cultivares de *Vigna unguiculata* aumentaram a atividade das enzimas antioxidantes sendo capazes de combater o excesso de EROs provocado pelo Pb.

Além de induzir a formação de EROs, 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). Nesse sentido, procedeu-se uma análise morfológica e anatômica comparativa das raízes e folhas dos cultivares de *Vigna unguiculata* submetidos ou não a EDTA-Pb 0,5 mM.

A análise ultraestrutural da superfície das raízes não mostrou nenhum efeito tóxico do chumbo especialmente nas células que compõem o cilindro central (xilema e floema) mesmo SV apresentando maior teor de Pb^{2+} nas raízes. De forma semelhante às raízes de SET não mostraram nenhuma alteração ultraestrutural induzida pelo chumbo (Figuras 28). Contudo, a análise morfológica das raízes dos cultivares revelou sintomas de toxicidade provocadas pelo metal pesado, como redução do tamanho, aparência escura, rígida e quebradiça (Figuras 29 A, B, C e D) (ALKHATIB et al., 2011; SHARMA; DUBEY, 2005) . Evidências contrárias foram obtidas por Kaur et al.(2014) em plantas de trigo tratadas com diferentes concentrações de chumbo, onde consideráveis alterações morfológicas e anatômicas foram observadas como distorção das células que integram o parênquima cortical das raízes, perda da uniformidade do periciclo e da endoderme.

Ao contrário do observado nas raízes, os cultivares apresentaram diferenças em suas superfícies foliares. Nas folhas de SV submetidas ao estresse com EDTA-Pb 0,5 mM foi possível observar grande quantidade de cera em relação ao grupo controle e em relação às plantas de SET tratadas com chumbo. Já em SET grupo controle e tratamento não apresentaram diferenças com relação à distribuição de ceras na superfície foliar (Figuras 30). As ceras são compostas de lipídeos que formam um filme protetor sobre a cutícula, reduzindo a perda de água não estomática. Além disso, as ceras evitam a deposição de poeira e poluentes atmosféricos sobre a superfície foliar e constituem proteção contra patógenos, estando relacionadas com a resistência a diferentes tipos de estresse ambientais (BRUNET, 2009; KUNST; SAMUELS, 2003). Desse modo, a maior distribuição de ceras na superfície foliar de SV sugere maior resistência ao estresse provocado pelo Pb, numa tentativa de diminuir a perda de água que naturalmente ocorre através da superfície foliar. Ademais, as plantas de SV aparentemente reduziram o número de estômatos da epiderme foliar corroborando com essa hipótese.

Resultados similares foram obtidos por Brunet (2009) em plantas de *Lathyrus sativus* submetidas a diferentes concentrações de EDTA-Pb, onde um dos cultivares estudados “Bangladesh” apresentou maior teor de ceras.

Outros trabalhos mostram que o chumbo provoca alterações na anatomia e morfologia das plantas, ALKHATIB et al. (2011) observaram em plantas de tabaco submetidas a estresse com $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,5 mM que o metal induziu ao fechamento do estômatos. No presente estudo os estômatos aparentemente diminuíram em SV e aumentaram em SET, especialmente nas plantas submetidas ao tratamento com Pb. Tal aspecto parece relacionar-se com a maior resistência observada em SV diante do estresse chumbo. Contudo, mais estudos são necessários para comprovar tal afirmação.

Apesar de poucos, alguns trabalhos reportam as alterações anatômicas provocadas pelo chumbo em plantas (ALVES et al., 2014; KAUR, et al., 2013; MOREK; WIERZBICKA, 2004; ZHAO; YE; ZHENG, 2011; ZHENG et al., 2012).

Com o desenvolvimento da indústria a concentração de metais tóxicos no solo vem aumentando aceleradamente. O Pb não sendo um nutriente essencial para os vegetais tornou-se um dos poluentes mais perigosos, uma vez que sua entrada e permanência na cadeia alimentar causa grandes impactos à saúde humana (SHU et al, 2012). Como supracitados muitos estudos tratam sobre os efeitos do Pb no desenvolvimento dos vegetais. Contudo, apenas as espécies *Noccaea rotundifolium* e *N. caerulescens* foram até hoje relatadas como hiperacumuladoras de Pb (BAKER; REEVES; HAJAR, 1994; REEVES; BROOKS, 1983; SHIMWELL; LAURIE, 1972; ZAIER, et al., 2014). Desse modo, mais pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na absorção de Pb pelas plantas, uma vez que estas através da fitorremediação podem tornar o solo adequado ao cultivo.

7 CONCLUSÃO

O estresse induzido por metais tóxicos em plantas bem como o potencial das plantas em fitorremediar o solo ainda são dados pouco elucidados. Os cultivares Sempre Verde (SV) e Setentão (SET) de *Vigna unguiculata* acumulam Pb nas raízes e nas folhas, respectivamente.

Os efeitos do Pb foram avaliados nos cultivares de *Vigna unguiculata* L. Walp, SV (Sempre verde) e SET (Setentão), no tocante aos parâmetros fisiológicos, bioquímicos e das enzimas antioxidantes (CAT, APX e SOD).

Os cultivares acumularam principalmente nas raízes (SV) e nas folhas (SET). Os parâmetros fisiológicos (massa seca, área foliar, eficiência quântica do PSII, taxa de transporte de elétrons do PSII, taxa fotossintética líquida, condutância estomática, transpiração e concentração intercelular de CO₂) apresentaram parcialmente o mesmo perfil.

A atividade das enzimas antioxidantes CAT, APX e SOD nas raízes e nas folhas de ambos cultivares, em geral, aumentou em presença de chumbo.

Com relação a expressão gênica, SV revelou aumento de expressão para todas as enzimas avaliadas em raízes, enquanto que SET mostrou redução da expressão de *VuAPX1*, *VuAPX4'* e *VuAPX5* nas folhas.

A avaliação microscópica revelou distribuição diferencial das ceras nas folhas desses cultivares sendo encontrada maior produção nas folhas de SV.

Os cultivares de *Vigna unguiculata* (SV e SET) exibiram perfil diferencial nas respostas avaliadas em presença de chumbo. Sugere-se uma regulação distinta concernente à proteção contra danos oxidativos e aparentemente maior tolerância do cultivar SV. Contudo, nenhum dos cultivares revelou potencial para a fitorremediação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, M. H. , PEREIRA, M. L. S., MARASCO, A. I. M., SILVA, M. R. P. , MIYAZAKI, L. C. Y. , TAVARES, A. Q. S. , PADULA, N. A. M. R. , TOMITA, N. E . Contaminação por Chumbo em Bauru: vigilância sanitária e ações ambientais no período de 2002 a 2007. **Saúde e Sociedade**, v. 18, p. 83-84, 2009.
- ADRIANO, D. C. , BOLAN, N. S. , VANGROSVELD, J. , WENZEL, W. W. Heavy metals. Elsevier Ltd. All Rights Reserved, 2005.
- ALDOOBIE, N. F.; BELTAGI, M. S. Physiological , biochemical and molecular responses of common bean (*Phaseolus vulgaris* L .) plants to heavy metals stress. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 29, p. 4614–4622, 2013.
- 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. 2011.
- AL-KHATIB, R. et al. Microscopic analysis of lead accumulation in tobacco (*Nicotiana tabacum* var. turkish) roots. **Microscopy and Microanalysis**, v. 14, n. S2, p. 1528–1529, 3 ago. 2008.
- ALKORTA, I. et al. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. **The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, v. 3, n. 1, p. 58–66, 2003.
- ALLAN, D. L.; JARRELL, W. M. Proton and Copper Adsorption to Maize and Soybean Root Cell Walls. **Plant Physiology**, v. 89, n. 3, p. 823–832, 1 mar. 1989.
- 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.
- ALVES, ET AL. ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE CHUMBO EM PLANTAS. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 1329–1336, 2008.
- 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.
- ANTOSIEWICZ, D. M. Study of calcium-dependent lead-tolerance on plants differing in their level of Ca-deficiency tolerance. **Environmental pollution**. v. 134, n. 1, p. 23–34, mar. 2005.

ARAZI, T.; SUNKAR, R.; KAPLAN, B. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. **The Plant journal**, v. 20, n. 2, p. 171–182, 1999.

ASHRAF, M. et al. Influence of lead on growth and nutrient accumulation in canola (*Brassica napus* L .) cultivars Author Details. **Journal of environmental biology / Academy of Environmental Biology, India**, v. 32, n. September, p. 659–666, 2011.

AXELSEN, K. B.; PALMGREN, M. G. Inventory of the Superfamily of P-Type Ion Pumps in Arabidopsis 1. **Plant Physiology**, v. 126, n. June, p. 696–706, 2001.

BAKER, A. J. M.; REEVES, R. D.; HAJAR, A. S. M. Heavy metal accumulation and tolerance in British populations of the metallophyte *Thlaspi caerulescens* J. & C . Presl. **New Phytologist**, v. 127, p. 61–68, 1994.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annual review of plant biology**, v. 59, p. 89–113, jan. 2008.

BARCELÓ, J.; POSCHENRIEDER, C. Phytoremediation : principles and perspectives. **Contributions to Science**, v. 2, n. 3, p. 333–344, 2003.

BELATIK, A.; HOTCHANDANI, S.; CARPENTIER, R. Inhibition of the water oxidizing complex of photosystem II and the reoxidation of the quinone acceptor QA- by Pb²⁺. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. 68-142, jan. 2013.

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.

BRANQUINHO, C.; BROWN, D. H.; CATARINO, F. The cellular location of Cu in lichens and its effects on membrane integrity and chlorophyll fluorescence. **Environmental and Experimental Botany**, v. 38, n. 2, p. 165–179, nov. 1997.

BRASIL. **Atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao chumbo metálico / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Ações Programáticas Estratégicas**. BRASÍLIA, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Vigilância Ambiental em Saúde. **Diagnóstico Nacional de Áreas com Populações sob Risco de Exposição a Solos Contaminados**. Brasília 2004. http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=21570 (Acessado em 03/05/2012).

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Atuação para Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Solo Contaminado Vigisolo**. portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/capitulo_12_saudebrasil.pdf , 2007. (Acessado em 03/05/2012).

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.

BRUNET, J. et al. Lead accumulation in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.): a novel plant for phytoremediation systems? **Comptes rendus biologies**, v. 331, n. 11, p. 859–64, nov. 2008.

BRUNET, J. et al. Accumulation of lead in the roots of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) plants triggers systemic variation in gene expression in the shoots. **Chemosphere**, v. 77, n. 8, p. 1113–20, nov. 2009.

BURTON, K. W.; MORGAN, E. ROIG, A. The influence of heavy metals on the growth of sitka-spruce in South Wales forest. II green house experiments. **Plant Soil**, v. 78, p 271-282, 1984.

CENKCI, S. et al. Lead contamination reduces chlorophyll biosynthesis and genomic template stability in *Brassica rapa* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 467–473, jan. 2010.

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.

CHEN, Y. et al. Health risk assessment of heavy metals in vegetables grown around battery production area. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 2, p. 126–132, 2014.

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.

DAS, S.; GOSWAMI, S.; TALUKDAR, A. DAS. A study on cadmium phytoremediation potential of water lettuce, *Pistia stratiotes* L. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 92, n. 2, p. 169–74, fev. 2014.

DI GIULIO, G.M., FIGUEIREDO, B.R., FERREIRA, L.C., DOS ANJOS, J.A.S.A. Experiências brasileiras e o debate sobre comunicação e governança do risco em áreas contaminadas por chumbo. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 2, p. 337-349, 2012

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.

ERNST, W. Effects of heavy metals in plants at the cellular and organismic levels. In: Schuurmann G (ed), *Ecotoxicology: Ecological Fundamentals*,

Chemical Exposure and Biological Effects, Heidelberg, Wiley, p. 587 –620, 1998.

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, K. D. FENTON REACTION - CONTROVERSY CONCERNING THE CHEMISTRY Fenton chemistry - the controversies. **Ecological chemistry and engineering**, v. 16, n. 3, p. 347–358, 2009.

FERNANDES, J. D. et al. Estudo de impactos ambientais em solos : o caso da reciclagem de baterias automotivas usadas , tipo chumbo-ácido Study of environment impacts in soils : Acid lead type used car bateries recycle case. **Revista Brasileira de Gestão e Desenvolvimento Regional**, v. 7, p. 231–255, 2011.

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. 1303–1308, jul. 2011.

FERREIRA, A. P. ESTIMATION OF HEAVY METALS IN LITTLE BLUE HERON (*Egretta caerulea*) COLLECTED FROM SEPETIBA BAY. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 58, n. 4, p. 269–274, 2010.

FERRON, M. M. ET AL. Environmental lead poisoning among children in Porto Alegre state , Southern Brazil Intoxicação ambiental por chumbo em crianças de Porto Alegre. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 2, p. 226–233, 2012.

FILHO, F. R. F. et al. **Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L .) Walp .) na região do Nordeste .**, 1997.

FILHO, F. R. F. **Panorama da cultura do feijão-caupi no Brasil**, 2006.

FILHO, F. R. F. et al. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L .) Walp .) na região do Nordeste . **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste**, p. 1–30, 2011.

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.

FONSECA, E. M. et al. Geochemical behavior of heavy metals in differents environments in Rodrigo de Freitas lagoon - RJ/Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 83, n. 2, p. 457–69, jun. 2011.

FORTES, J. D. N. A intervenção técnica em pequenas indústrias de fabricação e reforma de baterias chumbo-ácidas: proposta para melhoria da qualidade do ar e preservação da saúde do trabalhador. 2003. Tese (Doutorado em

Ciências) -Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz (ENSP/FIOCRUZ), Rio de Janeiro, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling : A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. **The Plant Cell**, v. 17, n. July, p. 1866–1875, 2005.

FREITAS, E. V. D. S.; DO NASCIMENTO, C. W. A. The use of NTA for lead phytoextraction from soil from a battery recycling site. **Journal of hazardous materials**, v. 171, n. 1-3, p. 833–7, 15 nov. 2009.

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.

GAO, J. et al. The development dynamics of the maize root transcriptome responsive to heavy metal Pb pollution. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 458, n. 2, p. 287–93, 6 mar. 2015.

GHANI, A. Effect of Lead Toxicity on Growth, Chlorophyll and Lead (Pb) Contents of Two Varieties of Maize (*Zea mays* L.). **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 9, n. 9, p. 887–891, set. 2010.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant physiology**, v. 59, p. 309–314, 1977.

GIDLOW, D. A. Lead toxicity. **Occupational Medicine**, v. 54, n. 2, p. 76–81, mar. 2004.

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. 909–930, dez. 2010a.

GILL, S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 48, p. 909–930, dez. 2010b.

GLASS, D. J. Economic potential of phytoremediation. In: Raskin I, Ensley BD (eds) *Phytoremediation of toxic metals: using plants to clean up the environment*. Wiley, New York, p. 15–31, 2000.

GOLEKAR, R. B.; PATIL, S. N.; BARIDE, M. V. Human health risk due to trace element contamination in groundwater from the Anjani and Jhiri river catchment area in northern Maharashtra , India. **Earth Sciences Research Journal**, v. 17, n. 1, p. 17–23, 2013.

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.

GOPAL, R.; RIZVI, A. H. Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. **Chemosphere**, v. 70, n. 9, p. 1539–1544, fev. 2008.

GUPTA, A K. et al. Metal accumulation and growth performance of Phaseolus vulgaris grown in fly ash amended soil. **Bioresource technology**, v. 98, n. 17, p. 3404–7, dez. 2007.

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. et al. The detoxification of lead in Sedum alfredii H. is not related to phytochelatins but the glutathione. **Journal of hazardous materials**, v. 177, n. 1-3, p. 437–44, maio 2010.

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.

GUSSARSSON, M.: Cadmium-induced alterations in nutrient composition and growth of Betula pendula seedlings: the significance of fine roots as a primary target for cadmium toxicity. **Journal Plant Nutrition**, 17, 2151-2163, 1994.

HA, T. H. N. et al. Uptake of metals and metalloids by plants growing in a lead-zinc mine area, Northern Vietnam. **Journal of hazardous materials**, v. 186, n. 2-3, p. 1384–91, 28 fev. 2011.

HAMID, N. et al. PHYSIOLOGICAL RESPONSES OF PHASEOLUS VULGARIS TO DIFFERENT LEAD CONCENTRATIONS. **Pakistan Journal of Botany**, v. 42, n. 1, p. 239–246, 2010.

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. 450–455, 1 jun. 1987.

HE, Z. L.; YANG, X. E.; STOFFELLA, P. J. Trace elements in agroecosystems and impacts on the environment. **Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)**, v. 19, n. 2-3, p. 125–40, jan. 2005.

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.

HIRSCH, R. E. et al. A Role for the AKT1 Potassium Channel in Plant Nutrition. **Science**, v. 280, p. 918–922, 1998.

HOAGLAND, D. .; ARNON, D. . The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil THE COLLEGE OF AGRICULTURE. **California Agricultural Experiment Station**, 1950.

HU, H. et al. Combined effects of lead and acid rain on photosynthesis in soybean seedlings. **Biological trace element research**, v. 161, n. 1, p. 136–42, out. 2014.

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, fev. 2012.

HUSSAIN, A. et al. Effects of diverse doses of Lead (Pb) on different growth attributes of *Zea-Mays* L . **Agricultural Sciences**. v. 4, n. 5, p. 262–265, 2013.

IBGE, INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA -IBGE. Produção Agrícola Municipal. IBGE, Tabela 1612. 2003. Disponível em: www.sidra.ibge.gov.br. (Acessado em 03/05/2012).

ISLAM, S.; UZ-ZAMAN, W.; RAHMAN, M. 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.

JAROSIŃSKA, D.; PEDDADA, S.; ROGAN, W. J. Assessment of lead exposure and associated risk factors in urban children in Silesia, Poland. **Environmental research**, v. 95, n. 2, p. 133–42, jun. 2004.

JENNINGS, A. A. Analysis of worldwide regulatory guidance values for the most commonly regulated elemental surface soil contamination. **Journal of environmental management**, v. 118, p. 72–95, 2013.

KABATA-PENDIAS, A.; PENDIAS, H. Trace elements in soils and plants. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1992.

KABATA - PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants - 4th edition**. [s.l: s.n.].

KANWAL, U. et al. EDTA ameliorates phytoextraction of lead and plant growth by reducing morphological and biochemical injuries in *Brassica napus* L. under lead stress. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, p. 9899–9910, 2014.

KAUR, G. et al. A time course assessment of changes in reactive oxygen species generation and antioxidant defense in hydroponically grown wheat in response to lead ions (Pb²⁺). **Protoplasma**, v. 249, n. 4, p. 1091–100, 2011.

KAUR, G. et al. Growth , photosynthetic activity and oxidative stress in wheat (*Triticum aestivum*) after exposure of lead to soil. **Journal of environmental biology**, v. 33, p. 266–269, 2012.

KAUR, G. et al. Pb-inhibited mitotic activity in onion roots involves DNA damage and disruption of oxidative metabolism. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 23, n. 7, p. 1292–304, 2014.

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

KHAN, N. A.; SINGH, S. **Abiotic stress and Plant Responses**. 2008.

KITAJIMA, S. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of two chloroplastic peroxidases, ascorbate peroxidase and 2-cys peroxiredoxin. **Photochemistry and photobiology**, v. 84, n. 6, p. 1404–9, 2008.

KOHLER, C.; MERKLE, T.; NEUHAUS, G. Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant journal**, v. 18, p. 97–104, 1999.

KOMÁREK, M. et al. The use of maize and poplar in chelant-enhanced phytoextraction of lead from contaminated agricultural soils. **Chemosphere**, v. 67, p. 640–651, 2007.

KOPITTKÉ, P. M. et al. Toxic effects of Pb²⁺ on growth of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 150, n. 2, p. 280–7, nov. 2007.

KOSOBROUKHOV, A.; KNYAZEVA, I.; MUDRIK, V. *Plantago major* plants responses to increase content of lead in soil : Growth and photosynthesis. **Plant Growth Regulation**, v. 42, p. 145–151, 2004.

KUMAR, A. et al. Elucidation of lead-induced oxidative stress in *Talinum triangulare* roots by analysis of antioxidant responses and DNA damage at cellular level. **Environmental science and pollution research international**, v. 20, n. 7, p. 4551–61, jul. 2013.

KUNST, L.; SAMUELS, A. L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax. **Progress in Lipid Research**, v. 42, p. 51–80, 2003.

LAMHAMDI, M. et al. Lead phytotoxicity on wheat (*Triticum aestivum* L.) seed germination and seedlings growth. **Comptes rendus biologies**, v. 334, n. 2, p. 118–26, fev. 2011.

LANTZY, R. J.; MACKENZIE, F. T. Atmospheric trace metals: global cycles and assessment of man's impact. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 43, n. 4, p. 511–525, abr. 1979.

LI, H. et al. Antioxidant Enzyme Activity and Gene Expression in Response to Lead Stress in Perennial Ryegrass. **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, v. 137, n. 2, p. 80–85, 2012.

LIMA, L. R. P. D. A.; BERNARDEZ, L. A. Characterization of the lead smelter slag in Santo Amaro, Bahia, Brazil. **Journal of hazardous materials**, v. 189, n. 3, p. 692–9, 30 maio 2011.

LISENBEE, C. S.; HEINZE, M.; TRELEASE, R. N. Peroxisomal Ascorbate Peroxidase Resides within a Subdomain of Rough Endoplasmic Reticulum in Wild-Type Arabidopsis Cells 1. **Plant Physiology**, v. 132, n. June, p. 870–882, 2003.

LIU, D. et al. Lead induced changes in the growth and antioxidant metabolism of the lead accumulating and non-accumulating ecotypes of *Sedum alfredii*. **Journal of integrative plant biology**, v. 50, n. 2, p. 129–40, fev. 2008.

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.

LIU, J. et al. Lead toxicity, uptake, and translocation in different rice cultivars. **Plant Science**, v. 165, n. 4, p. 793–802, out. 2003.

LONG, X. X., YANG, X. E., NI, W. Z. **Chinese Journal Of Applied Ecology**, v. 13, p. 757–762, 2002.

LUO, C.L., Shen, Z.G., Baker, A.J.M., Li, X.D. A novel strategy using biodegradable EDDS for the chemically enhanced phytoextraction. **Plant Soil**, v. 285, p. 67-80, 2006.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–58, dez. 2005.

MALAR, S. et al. Effect of lead on phytotoxicity, growth, biochemical alterations and its role on genomic template stability in *Sesbania grandiflora*: a potential plant for phytoremediation. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 108, p. 249–57, out. 2014.

MALECKA, A. et al. Response of the pea roots defense systems to the two-element combinations of metals (Cu , Zn , Cd , Pb)*. **Acta biochimica Polonica**, v. 61, n. 1, p. 23–28, 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. 687–698, 2001.

MAŁKOWSKI, E. et al. Lead distribution in corn seedlings (*Zea mays* L.) and its effect on growth and the concentrations of potassium and calcium. **Plant Growth Regulation**, v. 37, n. 1, p. 69–76, 2002.

MALLICK, N.; MOHN, F. . Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 1, p. 64–69, maio 2003.

- MANARA, A. Plant Responses to Heavy Metal Toxicity. In: FURINI, A. (Ed.). . **Plants and Heavy Metals**. SpringerBriefs in Molecular Science. Verona: Springer Netherlands, 2012. p. 27–54.
- 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.
- MEMON, A. R.; SCHRÖDER, P. Implications of metal accumulation mechanisms to phytoremediation. **Environmental science and pollution research international**, v. 16, n. 2, p. 162–75, mar. 2009.
- MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 181–94, set. 2012.
- MIGNARDI, S.; CORAMI, A.; FERRINI, V. Evaluation of the effectiveness of phosphate treatment for the remediation of mine waste soils contaminated with Cd, Cu, Pb, and Zn. **Chemosphere**, v. 86, n. 4, p. 354–60, jan. 2012.
- MINOZZO, R. et al. Plumbemia em trabalhadores da indústria de reciclagem de baterias automotivas da Grande Porto Alegre , RS. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 44, n. 6, p. 407–412, 2008.
- MISHRA, S. et al. Lead detoxification by coontail (*Ceratophyllum demersum* L.) involves induction of phytochelatins and antioxidant system in response to its accumulation. **Chemosphere**, v. 65, n. 6, p. 1027–39, nov. 2006.
- MITTLER, R. Oxidative stress , antioxidants and. **Trends in plant science**, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v. 9, n. 10, p. 490–8, out. 2004.
- MOREIRA, F. R.; MOREIRA, J. C. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. **Revista Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health**, v. 15, n. 2, p. 119–129, 2004.
- MOREK, A. B.-; WIERZBICKA, M. LOCALIZATION OF LEAD IN ROOT TIP OF *DIANTHUS CARTHUSIANORUM*. **Acta Biologica cracoviensia**, v. 46, n. Wierzbicka 1998, p. 45–56, 2004.
- MUNHOZ, P.M. Monitoramento ambiental em região contaminada por chumbo. 2010. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.
- MUSHAK, P. New directions in the toxicokinetics of human lead exposure. **Neurotoxicology**, v. 14, p.29–42. 1993

- 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.
- NASCIMENTO, C. W. A; AMARASIRIWARDENA, D.; XING, B. Comparison of natural organic acids and synthetic chelates at enhancing phytoextraction of metals from a multi-metal contaminated soil. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 140, n. 1, p. 114–23, mar. 2006.
- NRIAGU, J.O. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. **Nature**, v. 279, p. 409 – 411, 1979.
- NOURI, J. et al. Phytoremediation potential of native plants grown in the vicinity of Ahangaran lead–zinc mine (Hamedan, Iran). **Environmental Earth Sciences**, v. 62, n. 3, p. 639–644, 8 maio 2010.
- OBROUCHEVA, N. V et al. Root growth responses to lead in young maize seedlings. **Plant and Soil**, v. 7, n. 095, p. 55–61, 1998.
- OKADA, I.A., SAKUMA, A. M., MAIO, F.D., DOVIDAUSKAS, S., ZENEBON, O. Avaliação do níveis de chumbo e cádmio em leite em decorrência de contaminação ambiental na região do Vale do Paraíba, Sudeste do Brasil. **Revista de Saude Publica**, v. 31, n. 2, p. 140-143, 1997.
- OLIVEIRA, L. P., MORITA, D. M. Tratabilidade de solos tropicais contaminados por resíduos da indústria de revestimentos cerâmicos. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 97–108, 2008.
- OUZOUNIDOU, G., ILIAS, I., TRANOPOULOU, H., KARATAGLIS, S. Amelioration of copper toxicity by iron on spinach physiology. **J. Plant Nutr.** V. 21, p. 2089-2101, 1998.
- PAIVA, J. B. et al. “ SETENT ÃO ” UMA NOVA CULTIVAR DE FEUÃO-DE-CORDA PARA O ESTADO DO CEARÁ. **Acta bot. bras.**, v. 4, n. 2, p. 165–169, 1990.
- PAL, R.; RAI, J. P. N. Phytochelatins: peptides involved in heavy metal detoxification. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 160, n. 3, p. 945–63, mar. 2010.
- 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. 926–932, 21 jul. 2005.
- PANDA, S. K.; CHOUDHURY, S. Chromium Toxicity in plants. **Toxic metals in plants**, v. 0, 2004.
- 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.
- PARYS, E. et al. The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 20, n. 3, p. 313–322, 1998.
- PARYS, E. et al. Metabolic responses to lead of metalicolous and nonmetalicolous populations of *Armeria maritima*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 67, n. 4, p. 565–77, nov. 2014.
- PEREIRA, B. F. F. et al. Phytoremediation of lead by jack beans on a Rhodic Hapludox amended with EDTA. **Scientia Agricola**, v. 67, n. 3, p. 308–318, 2010.
- PEREIRA, F. J. et al. Lead tolerance of water hyacinth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 3, p. 1423–1433, 2014.
- POURRUT, B. et al. Potential role of NADPH-oxidase in early steps of lead-induced oxidative burst in *Vicia faba* roots. **Journal of plant physiology**, v. 165, n. 6, p. 571–579, 18 abr. 2008.
- POURRUT, B. et al. Lead Uptake, Toxicity, and Detoxification in Plants. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. v. 213, p. 113–136, 2011.
- QUFEI, L.; FASHUI, H. Effects of Pb²⁺ on the structure and function of photosystem II of *Spirodela polyrrhiza*. **Biological trace element research**, v. 129, n. 1-3, p. 251–60, jan. 2009.
- 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.
- REDDY, A. M. et al. Lead induced changes in antioxidant metabolism of horsegram (*Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc.) and bengalgram (*Cicer arietinum* L.). **Chemosphere**, v. 60, n. 1, p. 97–104, jun. 2005.
- REEVES, R. D.; BROOKS, R. R. Hyperaccumulation of Lead and Zinc by Two Metallophytes from Mining Areas of Central Europe. **Environmental pollution**, v. 31, p. 277–285, 1983.

RODRIGUEZ, E. et al. Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. **Environmental science and pollution research international**, v. 22, n. 1, p. 574–85, jan. 2014.

ROELFSEMA, M. R. G.; HEDRICH, R. In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate.” **New Phytologist**, v. 167, n. 3, p. 665–691, 17 jun. 2005.

ROMANOWSKA, E. et al. Stimulation of respiration by Pb²⁺ in detached leaves and mitochondria of C₃ and C₄ plants. **Physiologia plantarum**, v. 116, p. 148–154, 2002.

ROMANOWSKA, E. et al. High light intensity protects photosynthetic apparatus of pea plants against exposure to lead. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 5-6, p. 387–394, maio 2006.

ROMANOWSKA, E. et al. Phosphorylation of PSII proteins in maize thylakoids in the presence of Pb ions. **Journal of plant physiology**, v. 169, n. 4, p. 345–52, 1 mar. 2012.

ROSSATO, L. V. et al. Effects of lead on the growth, lead accumulation and physiological responses of *Pluchea sagittalis*. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 21, n. 1, p. 111–23, jan. 2012.

RUDAKOVA, E. V., KARAKIS K. D., E.T. S. The role of plant cell walls in the uptake and accumulation of metal ions. **Fiziol. Biochim. Kult. Rast.** v. 20, p. 3–12, 1988.

RULEY, A T.; SHARMA, N. C.; SAHI, S. V. Antioxidant defense in a lead accumulating plant, *Sesbania drummondii*. **Plant physiology and Biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 42, n. 11, p. 899–906, dez. 2004.

RULEY, A.T. et al. Effects of lead and chelators on growth, photosynthetic activity and Pb uptake in *Sesbania drummondii* grown in soil. **Environ. Pollut.** v.144, p. 11–18, nov. 2006.

SAIFULLAH, E. M. et al. EDTA-assisted Pb phytoextraction. **Chemosphere**, v. 74, n. 10, p. 1279–1291, 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.

SAMARDAKIEWICZ, S.; WOŹNY, A. Cell division in *Lemna minor* roots treated with lead. **Aquatic Botany**, v. 83, n. 4, p. 289–295, dez. 2005.

SEREGIN, I. V.; IVANOV, V. B. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 48, n. 4, p. 523–544, 2001.

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

SHAHID, M. et al. Effect of organic ligands on lead-induced oxidative damage and enhanced antioxidant defense in the leaves of *Vicia faba* plants. **Journal of Geochemical Exploration**, v. 144, p. 282–289, set. 2014.

SHAIK, A P.; SULTANA, S. A; ALSAEED, A H. Lead exposure: a summary of global studies and the need for new studies from Saudi Arabia. **Disease markers**, v. 2014, p. 415160, jan. 2014.

SHAKOOR, M. B. et al. Citric acid improves lead (pb) phytoextraction in brassica napus L. by mitigating pb-induced morphological and biochemical damages. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 109, n. 2014, p. 38–47, nov. 2014.

SHARMA, P. et al. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead Toxicity in Plants. **Toxic metals in plants**, v. 0, 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, dez. 2011.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305–1319, 2002.

SHIMWELL, D. W.; LAURIE, A. E. Lead and Zinc contamination of vegetation in the southern pennines. **Environmental pollution**, v. 3, p. 291–301, 1972.

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.

SHU, X.; ZHANG, Q.; WANG, W. Lead induced changes in growth and micronutrient uptake of *Jatropha curcas* L. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 93, n. 5, p. 611–7, nov. 2014.

SILVA, C. M. et al. Lead poisoning risk for dairy cows in the semi-arid region of Pernambuco, Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 86, n. 2, p. 199–202, fev. 2011.

SINGH, R. et al. Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system. **Bioresource technology**, v. 101, n. 9, p. 3025–32, maio 2010.

SINGH, S. et al. **Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram**, 2008.

SINHA, P. et al. Alteration in uptake and translocation of essential nutrients in cabbage by excess lead. **Chemosphere**, v. 65, n. 4, p. 651–6, out. 2006.

SMITH, A. T.; SMITH, K. P.; ROSENZWEIG, A. C. Diversity of the metal-transporting P1B-type ATPases. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 947–960, abr. 2014.

STANISLAWSKA-GLUBIAK, E.; KORZENIOWSKA, J.; KOCON, A. Effect of peat on the accumulation and translocation of heavy metals by maize grown in contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4706–4714, out. 2014.

TIAN, S. et al. The impact of EDTA on lead distribution and speciation in the accumulator *Sedum alfredii* by synchrotron X-ray investigation. **Environmental Pollution**, v.159, p. 782-788, 2011.

TRIVEDI, S., ERDEI, L., Effects of cadmium and lead on the accumulation of Ca^{2+} and K^{+} and on the influx and translocation of K^{+} in wheat of low and high K^{+} status, **Physiol. Plant.** V. 84, p. 94–100, 1992.

TUNG, G., TEMPLE, P. Uptake and localization of lead in corn (*Zea mays* L .) seedlings , a study by histochemical and electron microscopy. **The Science of the total environment**, v. 9697, n. 96, p. 71–85, 1996.

US EPA, S. Human Health and Lead, Addressing Lead at Superfund Sites | Superfund | US Environmental Protection Agency. 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.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, v. 164, n. 4, p. 645–655, abr. 2003.

VILLEN-GUZMAN, et al. The use of ethylenediaminetetraacetic acid as enhancing agent for the remediation of a lead polluted soil. **Electrochimica Acta**, p. 1–8, mar. 2015.

- WANG, C. et al. Lead-contaminated soil induced oxidative stress, defense response and its indicative biomarkers in roots of *Vicia faba* seedlings. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 6, p. 1130–1139, 30 abr. 2010.
- WANG, C. et al. Effects of Pb stress on nutrient uptake and secondary metabolism in submerged macrophyte *Vallisneria natans*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 5, p. 1297–303, jul. 2011.
- WANG, H. et al. Effect of indole-3-acetic acid on lead accumulation in maize (*Zea mays* L.) seedlings and the relevant antioxidant response. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, n. 3, p. 246–253, dez. 2007.
- WANG, P. et al. Effects of Pb on the oxidative stress and antioxidant response in a Pb bioaccumulator plant *Vallisneria natans*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 28–34, abr. 2012.
- WENZEL, W. et al. Chelate-assisted phytoextraction using canola *Brassica napus* L.) in outdoors pot and lysimeter experiments. **Plant and soil**, v. 249, p.83-96, fev. 2003.
- WHITE, P. J.; BROADLEY, M. R. Calcium in plants. **Annals of botany**, v. 92, n. 4, p. 487–511, out. 2003.
- WIOLETA, W. et al. Lead induced changes in phosphorylation of PSII proteins in low light grown pea plants. **BioMetals**, v. 28, n. 1, p. 151–162, 10 dez. 2015.
- WOJAS, S. et al. $\text{Ca}^{(2+)}$ -dependent plant response to $\text{Pb}^{(2+)}$ is regulated by LCT1. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 147, n. 3, p. 584–92, jun. 2007.
- WÓJCIK, M.; TUKIENDORF, A. Accumulation and tolerance of lead in two contrasting ecotypes of *Dianthus carthusianorum*. **Phytochemistry**, v. 100, p. 60–5, abr. 2014.
- WU, H. et al. Regulation of Metabolites, Gene Expression, and Antioxidant Enzymes to Environmentally Relevant Lead and Zinc in the Halophyte *Suaeda salsa*. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 32, n. 2, p. 353–361, 28 nov. 2012.
- WU, X. et al. Effects of Pb^{2+} on energy distribution and photochemical activity of spinach chloroplast. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 69, n. 3, p. 738–742, mar. 2008.
- XIAO, W. et al. Effects of lead on activities of photochemical reaction and key enzymes of carbon assimilation in spinach chloroplast. **Biological trace element research**, v. 126, n. 1-3, p. 269–279, jan. 2008.
- YANG, H. M.; ZHANG, X. Y.; WANG, G. X. Effects of Heavy Metals on Stomatal Movements in Broad Bean Leaves. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 51, n. 4, p. 464–468, jul. 2004.

- YANG, Y. et al. Lead-induced phytotoxicity mechanism involved in seed germination and seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 73, n. 8, p. 1982–7, nov. 2010.
- YANG, Y. et al. Comparative antioxidative responses and proline metabolism in two wheat cultivars under short term lead stress. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 4, p. 733–40, maio 2011.
- YOUSSEF, M. M.; AZOOZ, M. M. Biochemical Studies on the effects of Zinc and Lead on Oxidative Stress, antioxidant enzymes and lipid peroxidation in Okra (*Hibiscus esculentus* cv. Hassawi). **Science international**, v. 1, n. 3, p. 29–38, 2013.
- YUAN, H. et al. Effects of exogenous glutathione and cysteine on growth, lead accumulation, and tolerance of *Iris lactea* var. *chinensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 4, p. 2808–2816, 13 set. 2014.
- YUCEL, E. et al. The effects of the lead (PbCl₂) on mitotic cell division of Anatolian Black Pine. **Biological Diversity and Conservation**, p. 124 – 129, 2008.
- ZAIER, H. et al. EDTA-enhanced phytoremediation of lead-contaminated soil by the halophyte *Sesuvium portulacastrum*. **Environmental science and pollution research international**, v. 21, n. 12, p. 7607–15, jun. 2014.
- ZEITOUNI, Carolina Freitas. Eficiência de espécies vegetais como fitoextratoras de cádmio, chumbo, cobre, níquel e zinco de um latossolo vermelho amarelo distrófico, 2003. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical). Instituto agrônômico. São Paulo, julho, 2003.
- ZHANG, F.-Q. et al. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). **Chemosphere**, v. 67, n. 1, p. 44–50, fev. 2007.
- ZHAO, S.; YE, X.; ZHENG, J. Lead-induced changes in plant morphology , cell ultrastructure , growth and yields of tomato. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 50, p. 10116–10124, 2011.
- ZHENG, L. et al. Pb-induced ultrastructural alterations and subcellular localization of Pb in two species of *Lespedeza* by TEM-coupled electron energy loss spectroscopy. **Environmental and Experimental Botany**, v. 77, p. 196–206, abr. 2012.