



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

FRANCISCO DALTON BARRETO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DOS EFEITOS DO CHUMBO
EM GENÓTIPOS DE *Zea mays* L.

FORTALEZA

2014

FRANCISCO DALTON BARRETO DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DOS EFEITOS DO CHUMBO EM
GENÓTIPOS DE *Zea mays* L.

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.

Co-orientador (a): Ms. Nila Maria Bezerril Fontenele.

FORTALEZA

2014

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

-
- O47a Oliveira, Francisco Dalton Barreto de.
Avaliação bioquímica e fisiológica dos efeitos do chumbo em genótipos de *Zea mays* L. / Francisco Dalton Barreto de Oliveira. – 2014.
81f. : il. color.
- Monografia (Graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2014.
Orientação: Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.
Coorientação: Ms. Nila Maria Bezerril Fontenele.
1. Milho – genótipos. 2. Estresses Abióticos. 3. Parâmetros Fisiológicos. I. Título.

CDD 660.6

FRANCISCO DALTON BARRETO DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DOS EFEITOS DO CHUMBO
EM GENÓTIPOS DE *Zea mays* L.**

Monografia apresentada ao curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador (a): Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo.

Co-orientador (a): Ms. Nila Maria Bezerril Fontenele.

Aprovada em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Dirce Fernandes de Melo (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Ms. Nila Maria Bezerril Fontenele (Co - Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^ª. Dr^ª. Maria de Lourdes de Oliveira Otoch

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me guiado neste caminho até agora, possibilitando-me fazer o que me apraz além de encontrar excelentes pessoas pelo caminho;

À Profa. Dra. Dirce Fernandes de Melo, do Laboratório de Bioenergética, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), por ter me acolhido e tutoriado por todos estes anos e na realização deste trabalho;

À iminente Dra. Nila Fontenele, com quem muito aprendi, não só profissionalmente, mas também pessoalmente, por todo o companheirismo, técnicas e pelo desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Ronaldo do Nascimento e à Prof^a Dra. Gisele Lopes, do Laboratório de Traços do Departamento de Físico - Química & Química Analítica da UFC, e seus orientandos, por todo o auxílio prestado na condução de parte dos experimentos;

Ao Prof. Dr. Enéas Gomes, do Laboratório de Fisiologia Vegetal I, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, e seus orientandos, pelo auxílio na realização de parte dos experimentos;

À Profa. Dra. Maria Raquel Miranda, do Laboratório de Bioquímica e Fisiologia de Frutos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, e suas orientandas, por ter nos auxiliado em parte dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Blumwald e aos integrantes de seu laboratório, em especial ao Dr. Wagner de Souza, do Departamento de Biologia de Plantas da Universidade da Califórnia, Davis, pela oportunidade concedida, ensinamentos e confraternizações;

Ao secretário da coordenação do curso de Bacharelado em Biotecnologia, Gilmar Ferreira, pelo apoio e orientações nestes 4 anos;

A Maria Gildemar de Oliveira e Hediberto Freitas, da coordenação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFC, pela consideração e auxílios prestados.

A minha família, em especial meus pais, por sempre terem me apoiado neste curso e em minhas decisões;

Ao amigo e colega de curso Adolph Barreto, por sua grande contribuição na realização deste trabalho e pelo companheirismo nestes 4 anos de curso;

A meus amigos Anderson Cavalcanti, André Cavalcante, Bruno Damasceno, Caio Araújo, Diego da Silva, José Araújo Jr., Luiz Figueiredo, Makson Lima, Marcelo Farias Jr., Rafael Vieira, Rainer Leal, Tony Matos, e meu primo Marcos Paulo Oliveira pela consideração, risos e suporte por todos estes anos.

Aos demais integrantes do Laboratório de Bioenergética, em especial aos colegas Albert Layo Costa, Isabel Ribeiro, Janaína Martins, Joanna Rocha, Karolliny Roger e Katia Saraiva por seu tempo, auxílio e momentos de descontração.

Aos meus colegas de curso, em especial Hugo, Emanuel, Victor, Renato, Yasmine, Raissa, Claudia, Beatriz, Fernanda, Mayara Queiroz, Roberta Laiz, Roberta Cristiane, Vanessa, Camila e Andréa pelo apoio e companheirismo nestes 4 anos de graduação;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa Iniciação Científica nestes 3 últimos anos e pelo fomento à pesquisa aqui apresentada;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de intercâmbio acadêmico e científico que contribuiu em parte para desenvolvimento de capital intelectual aqui aplicado.

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”.

John F. Kennedy (1917 – 1963).

RESUMO

O chumbo (Pb) é um metal pesado de significativa abundância no dia a dia do homem, mas seu manejo inapropriado tem acarretado sua liberação no meio ambiente, fazendo com que se acumule nos ecossistemas e termine afetando a saúde do homem e vegetais de forma generalizada. No Brasil e na Região Nordeste há casos de contaminação de áreas por este metal, o que evidencia a busca por soluções para sua remoção e possível reutilização. O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura herbácea anual com grande importância para o Brasil, especialmente para o Nordeste, onde representa o maior consumo no país. Os mecanismos de ação do chumbo nesta planta ainda se encontram pouco elucidados. O objetivo deste trabalho foi analisar os efeitos bioquímicos e fisiológicos do chumbo sobre dois genótipos de milho, BRS – 5033 e BRS – 5011. As sementes foram germinadas em vermiculita sendo diariamente irrigadas com água, por 7 dias. Posteriormente, as plântulas germinadas foram transferidas para a solução nutritiva de Hoagland e transportadas para casa de vegetação. Após 7 dias de hidroponia, aplicou-se uma solução de 0,5 mM de EDTA – Pb em alguns grupos. Avaliou-se a concentração de chumbo, os fatores de translocação e bioconcentração de Pb, teores de cálcio e zinco em raízes caules e folhas, e parâmetros fisiológicos em 7 e em 14 dias, mostrando perfis diferenciais em cada genótipo. Não houve diferença entre os fatores dos genótipos. O Pb também inibiu a massa seca e a área foliar de ambos os genótipos, com distintos valores para raízes, colmos e folhas, quando comparados a seus controles. A eficiência do fotossistema II, a taxa de transporte de elétrons do PSII, a fotossíntese líquida, a transpiração e a condutância estomática dos dois genótipos foi inibida por Pb quanto a seus controles, ao passo que a concentração intercelular de CO₂ aumentou com 14 dias. As atividades enzimáticas antioxidantes em ambos os genótipos mostraram resultados distintos entre raízes e folhas. Assim, pôde-se observar que os dois genótipos foram significativamente inibidos por chumbo, e por seus valores de TF e BCF podem não ser adequados para a fitorremediação.

Palavras – chave: Chumbo; *Zea mays* L; ICP-OES; IRGA; Enzimas Antioxidantes.

ABSTRACT

Lead (Pb) is a heavy metal with significant abundance in everyday life, but its inappropriate handling has caused its release into the environment, making it accumulate in ecosystems and ending up affecting human and plants health. There are reported cases of lead contamination of areas in Brazil and in the Northeastern Region, what highlights the importance of the search for solutions for its removal and possible reutilization. Maize (*Zea mays* L.) is an anual herbaceous crop with great economic importance to Brazil, especially for the Northeastern Region, where its greatest consumption is found. The mechanisms of action of the metal on this plant are not very clear yet. The goal of this work was to analyze the biochemical and physiological effects of Pb on two maize genotypes, BRS – 5033 e BRS – 5011. The seeds were sown in vermiculite, being daily watered for 7 days. Later, the seedlings were transferred to a Hoagland nutrient solution and taken to a greenhouse. 7 days after hidropony, a 0.5 mM solution of EDTA – Pb was applied in some groups. The lead content, the translocation and bioconcentration factors, other ions contents and physiological parameters in 7 and 14 dias in roots, shoots and leaves showed differential profiles in each genótipo. It was not observed any differences among the factors of the genotypes. Lead also inhibited the dry mass and the foliar areas of both genotypes, with distinct values for their parts when compared to their control groups. The efficiency of the photosystem II, the electron transfer rate of PSII, the net photosynthesis, the transpiration and the stomatal conductance were inhibited in both genótipos by Pb. The antioxidant activities in both genotypes showed differential results between roots and leaves. Thus, it can be inferred that both genotypes were significantly inhibited by lead, and for their factor values were low they might not be suitable for phytoremediation.

Keywords: Lead; *Zea mays* L.; ICP-OES; IRGA; Antioxidant Enzymes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Geração das EROs por transferência de energia	13
Figura 2 – Reação Catalisada pela SOD	14
Figura 3 – Reação Catalisada pela APX	15
Figura 4 – Reação Catalisada pela CAT	16
Figura 5 – EROs e Mecanismos de Defesa Antioxidantes	17
Figura 6 – Teores de Chumbo nos genótipos de milho 5033 e 5011.....	26
Figura 7 – Teores de Cálcio nos genótipos de <i>Zea mays</i> L. submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	29
Figura 8 – Teores de Zinco nos genótipos de <i>Zea mays</i> L. submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	32
Figura 9 – Fotografias dos genótipos de <i>Zea mays</i> L com 21 dias de vida submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	34
Figura 9 – Fotografias dos genótipos de <i>Zea mays</i> L com 28 dias de vida submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	35
Figura 11 – Massas secas genótipos de <i>Zea mays</i> L com 21 dias de vida submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	36
Figura 12 – Área foliar dos genótipos de <i>Zea mays</i> L com 21 dias de vida submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	39
Figura 13 – Eficiência quântica, taxa de transporte de elétrons no PSII e taxa fotossintética líquida dos genótipos de <i>Zea mays</i> L submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	41

Figura 14 – Transpiração, condutância estomática e concentração intercelular de CO ₂ dos genótipos de <i>Zea mays</i> L submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 Mm	44
Figura 15 – Atividade da SOD dos genótipos de <i>Zea mays</i> L submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	46
Figura 16 – Atividade da APX dos genótipos de <i>Zea mays</i> L submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fatores de Translocação e Bioconcentração nos genótipos de *Zea mays* L. 27

LISTA DE ABREVIATURAS

Pb - Chumbo

BRIC – sigla que representa os países em desenvolvimento Brasil, Rússia, Índia e China

Cd - Cádmio

ALA-D – Ácido aminolevulínico desidratase

PBG – Porfobilinogênio

Ca²⁺ - íon Cálcio

Fe²⁺ - íon ferro (II)

Mg²⁺ - íon Magnésio

Mn²⁺ - íon Manganês (II)

Zn²⁺ - íon Zinco

K⁺ - íon Potássio

C- Mitose – Colchicina Mitose (anomalia mitótica similar ao efeito da colchicina)

PSI – Fotossistema I

PSII – Fotossistema II

WOC – Complexo Enzimático Oxidante da Água do PSII

Q_A – Quinona A

Q_B – Quinona B

ABA – Ácido abscísico (fitormônio)

RuBISCO – Ribulose – 1,5 – bisfosfato carboxilase - oxigenase

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

DTPA – Ácido Dietilenotrinitro-penta-acético

PEP Carboxilase – Fosfoenolpiruvato carboxilase

CO₂ – Dióxido de carbono ou gás carbônico

3PG – 3 - fosfoglicerato

PFDK – Piruvato – fosfato diquinase

NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidado)

NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzido)

PPase – Pirofosfatase

ATP – Adenosina trifosfato

TF – Fator de translocação

BCF – Fator de bioconcentração

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

O₂ – Oxigênio molecular

EROs – Espécies reativas de oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

APX – Ascorbato peroxidase

CAT – Catalase

Ca – Cálcio

Zn – Zinco

ICP OES – Espectrômetro de Emissão Óptica por Plasma Indutivamente Acoplado

MS – Massa seca

AF – Área foliar

IRGA – Analisador de Gás Infravermelho

ΦPSII – Eficiência quântica do PSII

ETR – Taxa de transporte de elétrons do PSII

Pn – Taxa Fotossintética Líquida

E - Transpiração

Gs – Condutância Estomática

Ci – Concentração de CO₂ intercelular

CDF – *Cation Diffusion Facilitator*. Família de proteínas transportadoras membranares

DCPIP – Diclorofenolindofenol

DCP - Diclorofenol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	02
2.1	O Chumbo	02
2.1.1	<i>Efeitos Bioquímicos e Fisiológicos do Chumbo nas Plantas</i>	04
2.1.2	<i>Biodisponibilidade do chumbo</i>	07
2.2	O Milho	08
2.3	A Fitorremediação	10
2.3.1	<i>Eficiência da Fitoextração.....</i>	12
2.4	Espécies Reativas de Oxigênio e Defesa Antioxidante	12
3	OBJETIVOS	18
4	MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1	Material Vegetal	19
4.2	Germinação das Sementes	19
4.3	Aplicação do Chumbo	19
4.4	Coleta do Material Vegetal	20
4.5	Parâmetros Fisiológicos	20
4.6	Análise de Íons nas Plantas	20
4.7	Eficiência da Fitoextração	21
4.7.1	<i>Fator de Translocação</i>	21
4.7.2	<i>Fator de Bioconcentração</i>	21
4.8	Análises de Atividade Enzimática	21
4.8.1	<i>Preparo das Amostras</i>	21
4.8.2	<i>Atividade da Superóxido Dismutase</i>	22
4.8.3	<i>Atividade da Ascorbato Peroxidase</i>	22
4.8.4	<i>Atividade da Catalase</i>	22
4.9	Análise Estatística	23
5	RESULTADOS	24
5.1	Quantificação de Chumbo	24
5.2	Fatores de Translocação e de Bioconcentração	27
5.3	Quantificação de Elementos Essenciais	27
5.3.1	<i>Teor de Cálcio.....</i>	27
5.3.2	<i>Teor de Zinco</i>	30

5.3.3	<i>Teor de Cobre</i>	31
5.4	Parâmetros Fisiológicos	33
5.4.1	<i>Massa Seca e Área Foliar</i>	33
5.4.2	<i>Eficiência Quântica do PSII</i>	39
5.4.3	<i>Taxa de Transporte de Elétrons no PSII (ETR)</i>	40
5.4.4	<i>Taxa Fotossintética (Pn)</i>	40
5.4.5	<i>Transpiração</i>	42
5.4.6	<i>Condutância Estomática</i>	42
5.4.7	<i>Concentração de CO₂ Intercelular</i>	43
5.5	Atividade Enzimática Antioxidante	45
5.5.1	<i>Superóxido Dismutase</i>	45
5.5.2	<i>Ascorbato Peroxidase</i>	47
5.5.3	<i>Catalase</i>	49
6	DISCUSSÃO	50
7	CONCLUSÃO	57
	REFERÊNCIAS	58

INTRODUÇÃO

O chumbo (Pb) é um metal pesado proveniente de resíduos industriais, aditivos de combustíveis, agrotóxicos, descarte indevido de baterias automobilísticas dentre outras fontes e ao ser liberado no meio ambiente torna-se gradativamente acumulado. Além de partículas que contaminam a atmosfera, esse metal pode ser acumulado no solo e nas águas. Na agricultura, o chumbo proveniente de agrotóxicos pode também ser levado por águas das chuvas que ao serem carreadas no solo ampliam a contaminação, acarretando aumento gradativo da toxicidade levando à perda de plantações e/ou à plantações contaminadas dentre outros efeitos. Ademais, a crescente urbanização aliada a falta de tratamento adequado em esgotos pode levar a impactos significativos nos rios e nos solos.

No homem, o Pb afeta vários órgãos e sistemas, sendo que as alterações subcelulares e os efeitos neurológicos sobre o desenvolvimento parecem ser os mais críticos, podendo levar até a morte. Em plantas, os efeitos do Pb variam desde a inibição da germinação, em determinadas espécies, à inibição do crescimento e dos processos de transpiração e fotossíntese.

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. (CHEN et al., 2014; GOLEKAR; PATIL; BARIDE, 2013; JENNINGS, 2013; US EPA, 2013)

No Brasil, já em 2004, um levantamento realizado pelo Ministério da Saúde, identificou 703 áreas contaminadas principalmente com chumbo, cádmio e mercúrio (BRASIL, 2004; BRASIL, 2007). Os estudos relacionados com a toxicidade do Pb em plantas é limitado e em decorrência da diversidade das espécies vegetais estudadas há diversidade também nos resultados publicados (HU et al., 2012; HUSSAIN et al., 2013). Os mecanismos de defesa das plantas em relação aos metais pesados, particularmente o Pb, ainda não estão completamente elucidados.

O milho é uma planta anual, cultivada mundialmente, tendo como maiores produtores os Estados Unidos, a China e o Brasil. O milho é usado não só no setor alimentício, mas também em aplicações biotecnológicas. Considerando a importância

da cultura do milho e a ameaça de solos contaminados com Pb mundialmente, faz-se necessário avaliar o efeito tóxico do Pb nesse vegetal.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 – O Chumbo

O chumbo é um elemento químico representado com as letras Pb em virtude do seu nome em latim ser *Plumbum* (Lenntech, 1998; RSC, 2011). Consiste de um metal representativo do grupo 14 e 6º período da tabela periódica. Seu número atômico é 82, sua massa atômica média é 207,2 g/mol e sua densidade 11.34 g/cm³ a 20° C. Apresenta coloração branco-azulada tornando-se acinzentada quando exposto ao ar atmosférico. É altamente maleável, macio e mau condutor de eletricidade, porém bastante resistente à corrosão. Apresenta geralmente números de oxidação de valores +2 ou +4 em seus compostos.

A utilização do Pb data do século I a.C. e está relacionada com a civilização do Império Romano por explorar extensivamente os depósitos de Pb devido sua fácil extração e ductilidade. Na Roma Antiga, era extensivamente utilizado, seja em sistemas de esgoto, utensílios domésticos ou até como adoçante de vinhos de má qualidade, num processo chamado *sapa* (do latim *sapio*, sabor). A preparação dessa bebida (*sapa*) consistia no leve aquecimento do vinho em recipientes de chumbo, o qual reagia com ácido acético, componente do vinho, gerando acetato de chumbo (PbAc₂), conhecido como “o açúcar do chumbo” (RIVA et al., 2012). Entretanto, devido aos efeitos danosos provocados pelo Pb tal prática foi posteriormente abandonada (Século XVII). Apesar do médico alemão Ulrich Ellenbog (1440 – 1499) em 1473 ter adotado medidas preventivas contra os malefícios do Pb, particularmente para os mineradores, durante o Renascimento Cultural o chumbo ainda era utilizado em tintas usadas em obras de arte, como nas telas dos famosos pintores Rembrandt (1606 – 1669) e Francisco Goya (1746-1828), cujas mortes podem ter sido devido ao envenenamento com esse metal. (FRIEDMAN et al., 2007; RIVA et al., 2012). Já no século XIX, em plena Revolução Industrial, continuava-se a usar metais em sistemas de produção, acarretando um aumento do número de operários envenenados. Daí, surgiu o maior interesse dos médicos pelo assunto e o médico francês Louis Tanquerel des Planches (1810-1862)

escreveu um tratado intitulado: “ *Traité des maladies de plomb ou saturnines* “ onde detalhava sintomas da intoxicação crônica por Pb (PEARCE, 2007; RIVA et al., 2012).

A despeito dos benefícios do uso de Pb na história da humanidade , sabe-se que esse metal não possui nenhuma função biológica conhecida em seres vivos (MAESTRI et al., 2010). Hoje, o Pb é reconhecido como elemento de grande preocupação por diversas instituições de regulamentação envolvendo registro, avaliação, autorização e restrição para uso de elementos químicos.

O Pb é considerado a segunda substância mais tóxica na natureza, seguida do arsênio, com base na frequência de sua toxicidade, ocorrência e potencial para a exposição humana (ATSDR, 2003). As principais fontes de chumbo são baterias ácidas de automóveis, efluentes de baterias, resíduos industriais, na mineração e *smelting* de galenas (minérios de chumbo), na agropecuária como agrotóxicos e como aditivos de combustíveis (SHARMA; DUBEY, 2005).

A contaminação por chumbo é um problema de alcance mundial. Golekar, Patil e Baride (2013) relatam a contaminação de águas subterrâneas, em duas regiões urbanas, por metais pesados, dentre eles o chumbo, decorrente do despejo inadequado de resíduos líquidos de atividades agrícolas e do uso de combustíveis fósseis. Segundo Jennings (2013) o valor de referência RGV (Valor guia regulatório) especifica a quantidade máxima que um poluente pode estar presente no solo sem acionar uma resposta regulatória. Contudo, embora as jurisdições concordem quanto aos poluentes que devem ser regulamentados, esses valores raramente concordam no tocante aos valores de suas magnitudes. O Pb é o elemento que apresenta maior número de RGVs (409), somente nos Estados Unidos, o que revela o grau de importância desse poluente. Chen et al (2014) avaliaram a concentração de metais pesados (chumbo, cádmio e cromo) em plantas cultivadas em uma região da China onde há intensa produção de baterias ácidas de chumbo e constataram uma intensa acumulação de chumbo em vegetais folhosos, como *Brassica chinensis* L, espinafre e repolho.

No Brasil, foram identificadas 703 áreas cuja população foi exposta a solos contaminados (BRASIL, 2004). Dentre os poluentes mais comuns, os metais pesados representam 11,3% dessas áreas, principalmente 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, uma consequência do manejo e descarte inadequado

de resíduos líquidos e sólidos de indústrias de revestimentos cerâmicos. Tal prática acarreta o comprometimento da qualidade da água do manancial responsável pelo abastecimento de sete municípios do interior paulista e de mais de 650 mil habitantes (OLIVEIRA; MORITA, 2008). Em Santo Amaro, na Bahia, pessoas que vivem próximas a um local de fusão de chumbo, que processa principalmente galena (PbS), têm sido afetadas por elementos tóxicos como Pb e Cd (ANDRADE LIMA; BERNADEZ, 2011).

O chumbo nos seres vivos costuma causar danos generalizados. No homem, os efeitos variam de disfunções neuropsicológicas, disfunções renais (glicosúria e aminoacidúria) características do envenenamento por chumbo (saturnismo) e redução na produção de anticorpos e 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 que adultos por razões neurológicas, metabólicas e comportamentais (JAROSIŃSKA; PEDDADA; ROGAN, 2004).

2.1.1 Efeitos Bioquímicos e Fisiológicos do Chumbo nas Plantas

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 pesado afeta a obtenção de sais minerais nas plantas. Sabe-se também que a exposição ao chumbo reduz a concentração de cátions divalentes como Ca^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} em folhas de algumas plantas como milho (SEREGIN; SHPIGUN; IVANOV, 2004), *Brassica oleracea* (SINHA et al., 2006) e *Vigna unguiculata* (KOPITTKE 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 Pb sobre a acumulação de sais minerais nas raízes é dependente da espécie e da magnitude do estresse aplicado. O efeito do Pb na acumulação de minerais na parte aérea, na maioria

dos casos, segue o mesmo padrão das raízes. (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. Um exemplo de competição entre íons foi mostrada por Sharma e Dubey (2005) entre potássio (K^+) e Pb que apresentam raios atômicos 1,33 Å e 1,29 Å respectivamente e portanto o Pb pode ter acesso à planta através dos canais de K^+ . No tocante as alterações fisiológicas das plantas pode-se citar modificações no metabolismo celular, causada por mudanças nas atividades enzimáticas e na estrutura da membrana pelo Pb.

O efluxo de íons K^+ pelas raízes, em presença de Pb, pode ser explicado pela alta sensibilidade da K^+ - ATPase e grupos tióis (-SH) de proteínas de membranas celulares a esse metal (SHARMA; DUBEY, 2005).

No entanto, sabe-se que o Pb não acarreta o efluxo de nitrogênio (N). O decréscimo no teor de N inorgânico na planta pode ser causado pela inibição da atividade da nitrato redutase, a principal enzima envolvida no processo de assimilação de nitrogênio pela planta (XIONG; ZHAO; LI, 2006).

Os efeitos do Pb 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 como a C – 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; YUCCEL et al., 2008). Assim, o Pb 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)

A inibição da fotossíntese é um sintoma característico da toxicidade do chumbo em plantas, podendo causar distorção da ultraestrutura do cloroplasto e inibição da síntese de pigmentos fotossintéticos e enzimas da etapa clara e do Ciclo de Calvin (LIU et al., 2008). A fotossíntese é bem mais sensível a metais pesados 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), mas 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) demonstraram que, em presença de Pb, os tilacóides de células da bainha e do mesofilo de milho ativavam a fosforilação das proteínas do PSII.

Foi observado que o Pb afetava distintamente os fotossistemas (PSII) das células dos referidos tecidos. O PSII fosforilado, nas células do mesofilo, realizou sua atividade regularmente, enquanto que nas células da bainha, foi inibido. Esses são alguns dos mecanismos regulatórios essenciais para a manutenção da atividade fotossintética. A magnitude da toxicidade e dos mecanismos que influenciam o aparato fotossintético dependem do sistema *in vitro* ou *in vivo*, assim como da idade das plantas utilizadas. (PATRA et al., 2004). Sabe – se que o chumbo reduz a atividade fotossintética, não só pela inibição de enzimas e compostos associados aos fotossistemas como também pela redução dos teores de clorofila (ROMANOWSKA et al., 2012; WU et al., 2008).

Além da fotossíntese, o chumbo acarreta efeitos indesejáveis nos processos associados à transpiração celular. Sabe-se que a abertura e o fechamento dos estômatos são controlados pelo ácido abscísico (ABA), um fitormônio (ROELFSEMA; HEDRICH, 2005). Foi reportado que a presença de chumbo acarreta um grande acúmulo de ABA nas raízes e na parte aérea (CENKCI et al., 2010), levando ao fechamento estomatal (MOHAN; HOSETTI, 1998). Tal fechamento limita a troca gasosa 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 Pb através de canais de água (aquaporinas) ou canais de íons nas células estomatais. Além

disso, há relatos de que a RuBISCO é inibida também por chumbo, reduzindo assim sua capacidade carboxilativa (POURRUT et al., 2011) e dessa forma contribuindo para o aumento da concentração intercelular de CO₂.

2.1.2 Biodisponibilidade do Chumbo

Em solos alcalinos ou neutros os 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 no solo, pelo aumento do pH e consequente interação do chumbo com bases, fosfatos e carbonatos, compostos geralmente insolúveis de chumbo (KABATA - PENDIAS, 2011).

Metais pesados solúveis, trocáveis e quelatados são os que possuem maior mobilidade no solo e comandam sua fitodisponibilidade e migração. Há uma intensa correlação entre a concentração de um metal nas plantas e o conteúdo de sua espécie móvel no solo. O Pb 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).

O transporte de íons dentro de tecidos e órgãos vegetais é dependente de vários processos: movimentação no xilema, no floema, acumulação e imobilização. A quelatação de cátions é um importante fator para o abastecimento de nutrientes para as plantas, assim como para a translocação dos íons nas plantas. A solubilidade dos complexos metálicos é uma função tanto da força de ligação como da mobilidade do complexo formado, que por sua vez é determinada pelo tamanho do grupo orgânico envolvido. Entretanto, vários fatores controlam a mobilidade dos metais nas plantas, como pH, potencial de redução, competição com outros cátions, hidrólise e formação de sais e bases insolúveis. A complexação destes íons com ácidos orgânicos (ácido cítrico, aminoácidos, etc) evita a imobilização dos cátions no xilema, permitindo assim sua translocação para as partes superiores (KABATA - PENDIAS, 2011).

Com o intuito de se aumentar a biodisponibilidade de chumbo no solo e sua consecutiva translocação da raiz para a parte aérea, tem sido proposta a ligação do Pb a agentes quelantes sintéticos como o ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA) e ácido dietilenotrinitro-penta-acético (DTPA). Dentre diversos agentes quelantes, o EDTA é considerado o mais eficiente na solubilização do chumbo, por dissolver os íons de chumbo adsorvidos a partículas do solo, aumentando assim a movimentação do metal

para as raízes por difusão e favorecendo sua translocação até as partes superiores (SAIFULLAH et al., 2009).

2.2 O Milho

O milho (*Zea mays* L.) é uma cultura herbácea, anual, economicamente cultivada e acredita-se que seja a planta mais comercialmente importante originária das Américas. Sabe-se que é uma das culturas mais antigas do mundo, com evidências arqueológicas de seu cultivo *c.a* 5000 anos (DUARTE, 2000).

Conforme classificação taxonômica, o milho (*Zea mays* L.) é um organismo pertencente ao reino *Plantae* ou *Metaphyta*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Liliopsida*, ordem *Poales*, família *Poaceae*, subfamília *Panicoidae*, tribo *Maydae*, gênero *Zea* e espécie *Zea mays*. É considerada a espécie botânica com maior diversidade genética natural, com uma grande quantidade de variedades inter-raciais e genes sequenciados (SRB, 2001). Seus grãos são, usualmente, amarelos ou brancos, podendo abranger uma gama de tonalidades avermelhadas a pretas. A massa individual do grão encontra-se na faixa de 250-300 mg e, com base na massa seca, sua composição nutricional é 72% de amido, 9,5% de proteínas, 9% de fibras e 4% de lipídios (PAES, 2006; RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014), suprimindo uma energia de 365 kcal/100 g, além de possuir a maioria das vitaminas B e minerais essenciais (RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014). Independe de processos de refinamento, pois a casca de seus grãos é rica em fibras e sais minerais (Abimilho, 2011; Ranum et al., 2014).

O milho é uma planta monocotiledônea de metabolismo C4. Plantas que apresentam esse tipo de metabolismo de assimilação do carbono possuem dois tipos especiais de células: as células da bainha do feixe vascular e do mesofilo. As células da bainha são cercadas por um anel externo, que são as células do mesofilo. As células da bainha exibem cloroplastos arranjados centrifugamente que apresentam grãos de amido e cloroplastos aleatoriamente posicionados, com tilacóides empilhados. Essa estrutura dimórfica peculiar, chamada anatomia Kranz (do alemão *kranz*, coroa) promove a compartimentalização celular específica das enzimas envolvidas nesse metabolismo, fundamental para o fornecimento de CO₂ para a via C4. O carbono é transferido do

carbono 4 do malato para o carbono 1 do 3-fosfoglicerato (3PG), e esse processo foi elucidado quando as funções das células do mesofilo e da bainha foram identificadas. A fosfoenolpiruvato-carboxilase (PEPCase) e a piruvato-fosfato-diquinase (PFDK) são restritas às células do mesofilo, ao passo que as descarboxilases e as enzimas do Ciclo de Calvin, como a Ribulose – Bisfosfato Carboxilase – Oxigenase (RuBISCO), estão limitadas às células da bainha. As células do mesofilo captam o CO₂ atmosférico, que é rapidamente convertido a íon hidrogenocarbonato (ou bicarbonato) pela enzima anidrase carbônica. Em seguida, o íon bicarbonato é utilizado como substrato pela enzima PEP-carboxilase, formando oxalacetato e liberando íon fosfato. Assim, a carboxilação primária nas plantas C₄ é catalisada pela PEP-carboxilase, diferentemente das plantas C₃, cuja carboxilação é mediada pela Rubisco. Vale lembrar também que o metabolismo C₄ recebe esse nome porque o primeiro composto gerado pela fixação do CO₂ é o oxalacetato, um composto de 4 carbonos. Logo após a produção do oxalacetato, esse composto será convertido a malato pela enzima malato desidrogenase, reoxidando NADPH a NADP⁺. O malato, por sua vez, através de difusão, penetrará nas células da bainha, onde será utilizado pela enzima málica para a produção de CO₂ e piruvato, através da redução de NADP⁺ a NADPH. O CO₂ gerado desta reação será utilizado no Ciclo de Calvin, presente nesta célula, e o piruvato passará por reações, migrando novamente para as células do mesofilo e sendo convertido a PEP, reiniciando o ciclo C₄. Esse tipo de metabolismo apresenta vantagens como a supressão da fotorrespiração (atividade oxigenásica da RuBISCO), mas em contrapartida realiza maior consumo energético que plantas C₃, pois a regeneração do aceptor primário, PEP, consome duas moléculas adicionais de ATP para executar duas reações endergônicas: a catalisada pela piruvato-fosfato-diquinase e pela adenilato-quinase, complementada pela hidrólise exergônica de pirofosfato pela pirofosfatase (PPase), gerando 2 moléculas de fosfato inorgânico. Desse modo, o requerimento total de energia para a fixação de CO₂ pela ação em conjunto dos ciclos C₄ e de Calvin é de 5 ATPs mais 2 NADPH por CO₂ fixado (TAIZ; ZEIGER, 2002).

O milho é cultivado mundialmente, mas há grande diversidade de produção nos países. Estima-se que, em 2012, a produção total de milho foi de 875.226.630 toneladas, oriunda dos Estados Unidos (31%), China (24%) e Brasil (8%) referente a produção total de milho (RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014). Sua utilização abrange diversos setores, desde o alimentício à produção de biofilmes e

embalagens biodegradáveis (PAES, 2006). Outra utilização do milho também tem sido para a produção de etanol destinado a combustível automobilístico (BRASIL, 2007; RANUM; PEÑA-ROSAS; GARCIA-CASAL, 2014), motivo pelo qual tem sido aumentada sua produção nos Estados Unidos (BRASIL, 2007). Além disso, mostra aplicação biotecnológica como espécie fitorremediadora, extraíndo metais pesados do solo e possibilitando sua reutilização futuramente (GHEJU; STELESCU, 2013; SUTHAR; MEMON; MAHMOOD-UL-HASSAN, 2014).

No Brasil, aproximadamente 4% da produção total de milho (cerca de 1,6 milhões de toneladas) tem sido direcionada ao consumo humano e 10% à indústria alimentícia, a qual transforma o milho em produtos como farinha, xaropes, amido e outros. A Região Nordeste destaca-se por apresentar o maior consumo do cereal no país, exibindo consumo *per capita* anual de 11 kg, valor 40% maior que a média nacional, que é de 7,7 kg (PAES, 2006). Conforme dados de 2006 da Associação Brasileira das Indústrias de Milho, a principal utilização do milho no Brasil foi destinada à alimentação avícola, constituindo 48,21% do consumo total, seguida da suinocultura, com 29,43%. No Nordeste, os principais avicultores estão nos estados do Ceará e Pernambuco, grandes mercados consumidores de milho na região (CARNEIRO et al, 2006).

2.3. Fitorremediação

A contaminação por metais pesados no meio ambiente tem se mostrado um sério problema mundial. A mobilização destes metais por extrações de minérios e imediato processamento para diversas aplicações acarreta a liberação desses poluentes no meio ambiente. O acúmulo de metais pesados nos ecossistemas terrestres e aquáticos representa um risco à saúde ambiental e humana, pois os metais pesados tendem a sofrer um fenômeno conhecido como biomagnificação, ou seja, aumento da concentração do metal em tecidos de seres vivos (bioacumulação) através da passagem de um nível trófico menor para um maior. No solo, os metais pesados causam efeitos toxicológicos na microbiota presente, o que pode induzir um decréscimo populacional nessas comunidades e nas suas atividades (ALI; KHAN; SAJAD, 2013; KHAN et al., 2010).

Os métodos físicos e químicos possuem limitações como alto custo, trabalho intenso, distúrbios da microbiota nativa do solo e mudanças irreversíveis nas

propriedades do solo, podendo gerar poluição secundária. Assim, faz-se necessária a busca por desenvolvimento de metodologias de remediação rentáveis, eficientes e não danosas ao meio ambiente. A fitorremediação surge como um método alternativo, ecologicamente correto e de baixo custo para solucionar o problema da poluição dos metais pesados (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

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 pesados, radioisótopos e poluentes orgânicos (compostos aromáticos polinucleares, etc.). É uma estratégia de baixo custo-benefício, 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 fitorremediação é 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 pesados 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. 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 pesados, são chamadas metalófitas. As metalófitas são divididas em 3 categorias: metaloexcludentes, metaloindicadoras e hiperacumuladoras (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

Metaloexclutoras 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 pesados na parte aérea. Conforme o nome (metalindicadora) essas plantas refletem as concentrações do metal pesado no substrato (SHEORAN; SHEORAN; POONIA, 2011). Hiperacumuladoras são plantas que absorvem quantidades elevadas de um ou mais metais pesados do solo. Em adição, os metais pesados não ficam retidos nas raízes, mas são translocados para o caule e acumulados em órgãos acima do solo, como as folhas, 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 pesados (ALI; KHAN; SAJAD, 2013). Aproximadamente 25% das plantas hiperacumuladoras descobertas pertencem à família *Brassicaceae*, particularmente aos gêneros *Thlapsi* & *Alyssum* (ALI; KHAN; SAJAD, 2013).

2.3.1 Eficiência da Fitoextração

A eficiência da fitoextração pode ser quantificada pelos cálculos 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 pesados, elevada biomassa, rápido crescimento e valores de BCF e TF superiores a 1 (DAS; GOSWAMI; TALUKDAR, 2014).

2.4 Espécies Reativas de Oxigênio e Sistema Antioxidante nas plantas

Há aproximadamente 2,7 bilhões de anos atrás, o oxigênio molecular surgiu no meio ambiente quando seres fotossintetizantes passaram a realizar a oxidação da água para geração concomitante de elétrons e do O_2 . Além de O_2 , a vida aeróbica acabou

originando também as indesejadas espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS, em inglês) (GILL; TUTEJA, 2010; HALLIWELL, 2006). 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, 2010). 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 pesados, salinidade, seca e outros. Esse desequilíbrio leva a um súbito aumento no teor intracelular de EROs (Figura 1), danificando estruturas celulares (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 . A formação do $^1\text{O}_2$ na fotossíntese danifica severamente os fotossistemas I (PSI) e II (PSII) assim como todo o aparato fotossintético (GILL; TUTEJA, 2010). Além de danificar o aparato fotossintético, outros efeitos nocivos das EROs são a peroxidação lipídica de membranas celulares ou de organelas, danos a ácidos nucleicos, oxidação de resíduos de aminoácidos, como arginina, histidina, lisina, prolina, cisteína e metionina, acarretando a inativação das proteínas (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL; TUTEJA, 2010).

Fig. 1 Geração das EROs por transferência de energia

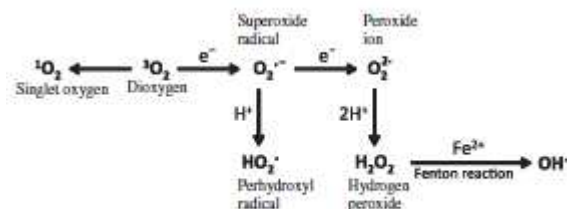


Fig. 3. Generation of ROS by energy transfer.

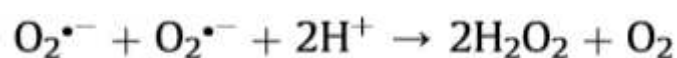
Fonte: (GILL; TUTEJA, 2010)

As espécies reativas de oxigênio em células de organismos aeróbicos, que acarretarão o estresse oxidativo, são um dos principais produtos da toxicidade dos metais pesados, 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 Pb é consequência da afinidade de chumbo 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 na 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 pesados 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 superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), etc., e também não-enzimáticos como glutatona reduzida (GSH), ácido ascórbico (reduzido), carotenoides e tocoferóis (GILL; TUTEJA, 2010; SINGH et al., 2008).

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 abaixo:

Figura 2 - Reação Catalisada pela SOD.

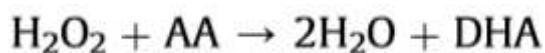


Fonte: GILL;TUTEJA, 2010.

As SODs são classificadas em função dos íons que atuam como cofatores, em 3 classes : Cu/Zn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD. Em plantas, as isoformas Mn-SOD geralmente são encontradas nas mitocôndrias e nos peroxissomos; as Cu/Zn-SOD são encontradas no citoplasma e nos cloroplastos. As isoformas Fe-SOD, frequentemente não 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).

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 glutathiona – ascorbato (diversos compartimentos celulares). A APX catalisa a seguinte reação:

Figura 3. 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, 2010; LIENBEE; HEINZE; TRELEASE, 2003; SHIGEOKA et al., 2002). A APX apresenta maior afinidade para H₂O₂ (da ordem de micromolar, 10⁻⁶ M) do que a CAT (da ordem de milimolar, 10⁻³ M), 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).

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 H₂O₂ a H₂O e O₂ (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 H₂O₂ a H₂O e O₂ (GILL; TUTEJA, 2010). A CAT catalisa a seguinte reação:

Figura 4: Reação catalisada pela CAT.



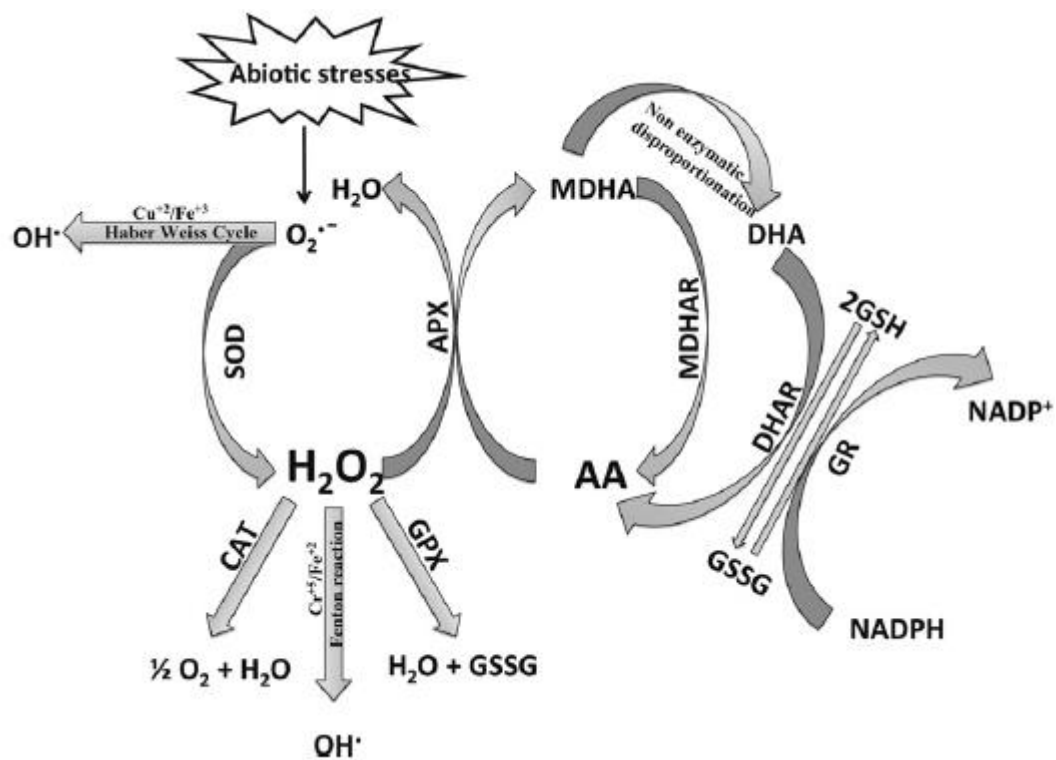
Fonte: GILL:TUTEJA, 2010.

As isozimas da CAT são espacial e temporalmente reguladas e podem responder diferencialmente à luz. Três genes da catalase foram identificados nas angiospermas: arabidopsis, 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).

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 ¹O₂ e OH⁻, 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 ¹O₂ 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.

Fig. 5 – EROs e mecanismos de defesa antioxidantes.



Fonte: (GILL; TUTEJA, 2010).

3. OBJETIVOS

Geral: Avaliar bioquímica e fisiologicamente os efeitos do chumbo (Pb) em genótipos de *Zea mays* L. dotados de diferentes graus de tolerância à salinidade.

Específicos:

- Identificar as condições experimentais ótimas para o estudo do efeito do chumbo no desenvolvimento dos genótipos de *Zea mays* L (BRS-5033 e BRS- 5011);
- Avaliar os efeitos do chumbo nos parâmetros fisiológicos (crescimento, massa seca, área foliar, concentração interna de CO₂ , condutância estomática, transpiração, taxa fotossintética, taxa de transferência de elétrons/PSII, eficiência do PSII) em *Zea mays* L (BRS-5033 e BRS- 5011);
- Quantificar o teor de Pb em plantas controle e submetidas a estresse por chumbo (EDTA – Pb 0,5 mM) em genótipos de *Zea mays* L (BRS-5033 e BRS- 5011);
- Determinar os valores dos fatores de translocação (TF) e de bioconcentração (BCF) de chumbo em genótipos de *Zea mays* L (BRS-5033 e BRS- 5011);
- Quantificar o teor de Ca e Zn em plantas controle e submetidas a estresse por chumbo (EDTA – Pb 0,5 mM) em genótipos de *Zea mays* L (BRS-5033 e BRS- 5011);
- Determinar a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e catalase (CAT) em genótipos de *Zea mays* L (BRS-5033 e BRS- 5011);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Foram utilizadas sementes de dois genótipos de milho (*Zea Mays L.*), 5033 e 5011, com diferentes graus de tolerância à salinidade, resistente e sensível respectivamente. As sementes foram adquiridas no Laboratório de Análises de Sementes (EMBRAPA).

4.2 Germinação das Sementes

As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 5 minutos para desinfecção. Após várias lavagens, com água para retirada do hipoclorito, foram embebidas em água destilada durante 2 horas. Seguidamente, foram semeadas em copos plásticos (200 mL) contendo vermiculita, sendo diariamente irrigadas com 50 mL de água destilada durante 7 dias. Posteriormente, as plântulas germinadas foram transferidas para sistema de hidroponia em solução contendo: KNOP[Ca(NO₃)₂ 1.44g/L, KNO₃ 0.25g/L, KH₂ PO₄ 0.25g/L e MgSO₄ .7H₂O 0.246g/L] com micro nutrientes (FeEDTA 65.7mg/L, H₃BO₃ 2.86mg/L, MnCl₂ .4H₂O 2.84mg/L, Na₂O₄ Mo.2H₂O 0.286mg/L, ZnSO₄ .7H₂O .22mg/L, CuSO₄ .5H₂O 0.079mg/L e CoSO₄ .7H₂O 0.0476mg/L), pH 5,0. O sistema foi continuamente aerado e mantido em casa de vegetação por mais 7 e 14 dias com temperaturas médias de 28.3 ± 0.62 °C, umidade relativa do ar média de 75.0 ± 1.9% e radiação fotossinteticamente ativa (PAR) de 1200 μmol s⁻¹ m⁻².

4.3Aplicação do Chumbo

Foram realizados experimentos preliminares com diferentes concentrações de nitrato de chumbo Pb(NO₃)₂ e EDTA-Pb afim de se determinar a melhor forma e concentração de chumbo a ser aplicada. Após 7 dias da 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 e 14 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.

4.4 Coleta do material vegetal

O desenho experimental foi realizado levando em consideração a coleta de plantas dos dois genótipos (5033 e 5011) 7 e 14 dias após a aplicação de EDTA-Pb 0,5 mM. Para as análises dos parâmetros fisiológicos, dosagem de íons e atividade das enzimas antioxidantes, em cada genótipo, utilizou-se um grupo controle e um grupo tratado, ambos contendo 6 plantas cada.

Para determinação das atividades das enzimas antioxidantes foram coletadas amostras de raízes e a primeira folha de cada planta. Seguidamente à coleta, raízes e folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -20°C .

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 dessa solução, o sobrenadante foi descartado e o precipitado, contendo chumbo, foi coletado em garrafas plásticas e armazenado.

4.5 Parâmetros Fisiológicos

Os parâmetros de crescimento massa seca e área foliar foram avaliados. Para obtenção da massa seca as amostras foram colocadas em estufa com circulação forçada de ar a 60°C (Marconi Brasil) por cinco dias. Sendo seguidamente pesadas em balança digital (Tecnal Brasil). A área foliar foi determinada em integrador de área foliar Li – 3100 Li-cor Inc Lincoln, Nebraska EUA.

Já os parâmetros de desenvolvimento avaliados foram taxa fotossintética líquida, transpiração, condutância estomática, concentração interna de CO_2 e eficiência efetiva do fotossistema II em ausência e presença de EDTA-Pb 0,5 mM. Usando analisador de gás infravermelho portátil (IRGA, ADC System -Hoddesdon, UK).

4.6 Análise de íons nas plantas

As diferentes partes das plantas (raiz, colmo e folha) de cada condição (controle e presença de EDTA – Pb 0,5 mM) foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 60°C (Marconi Brasil) por cinco dias e em seguida trituradas em Mini Processador (Black & Decker Brasil). Em seguida 200 mg de cada amostra foi submersa em 5 mL de água régia (3 mL 65% [v/v] HNO_3 ; 1 mL 37% HCl [v/v]) 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, adicionou-se 4 mL de ácido fluorídrico (HF) concentrado e a mistura foi digerida por mais 3 horas.

Após digestão, as amostras ficaram 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+} e Zn^{2+} foram determinados em espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES, Perkin Elmer 4300 DV).

4.7 Eficiência da Fitoextração

4.7.1 Fator de Translocação

Para analisar a capacidade da planta em transportar metais das raízes para a parte aérea efetuou-se o cálculo do fator de translocação (TF), calculado de acordo com Islam, Uz-Zaman e Rahman (2013), tendo como fórmula:

$$TF: \frac{\text{Concentração de Pb na Parte Aérea (Colmo + Folha)}}{\text{Concentração de Pb na Raiz}}$$

4.7.2 Fator de Bioconcentração

Para a medida da capacidade de concentrar um metal a partir do solo ou solução usou-se o fator de bioconcentração (BCF) conforme Islam, Uz-Zaman e Rahman (2013), calculado como:

$$BCF(L\ g^{-1}): \frac{\text{Concentração de Pb na Parte Aérea (Colmo + Folha)}}{\text{Concentração Inicial de Pb no solo ou solução}}$$

4.8 Análises das Atividades Enzimáticas

4.8.1 Preparo das Amostras

Para obtenção do extrato enzimático 150 mg de raízes e folhas de *Zea mays* 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°C, 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 soroalbumina bovina (BSA) como padrão. Todas as atividades enzimáticas foram realizadas em microplaca Synergy Mx, (BioTek, USA).

4.8.2 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. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro à 560 nm após 15 min de reação. 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. 8. 3 Atividade da Ascorbato Peroxidase (APX)

A atividade da APX (APX, EC 1.11.1.1) foi determinada de acordo com Nakano e Aasada (1981). A solução de reação consistiu de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6.0), EDTA 0,05 mM, ascorbato 15 mM, H_2O_2 30 mM e 30 μL de extrato enzimático. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 . 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 ($2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol}.\text{mg} \text{ proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

4. 8. 4 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, H_2O_2 20 mM e 20 μL de extrato enzimático. O decaimento de H_2O_2 foi monitorado a 240 nm durante 10 minutos e a atividade enzimática foi quantificada usando o coeficiente de absorção do H_2O_2 ($36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol} \text{ H}_2\text{O}_2. \text{ mg} \text{ proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

4.9 Análise Estatística

O desenho experimental foi completamente randomizado num arranjo fatorial do tipo 2 x 2. Os tratamentos (controle & EDTA-Pb) e os tempos (7 e 14 dias) de cada genótipo foram usados como fatores independentes numa série de análise de variância *two-way* (*Two-way* ANOVA), seguida do teste de Tukey. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $P \leq 0.05$ e resultados foram expressos como as médias de desvio padrão (S.E.M.).

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação de Chumbo nas Plantas

Os genótipos de milho, *Zea mays* L. (5033 e 5011), na presença e ausência (controle) de EDTA-Pb 0,5 mM durante 7 e 14 dias, foram quantificados quanto aos teores de Pb^{2+} nas raízes, colmos e folhas.

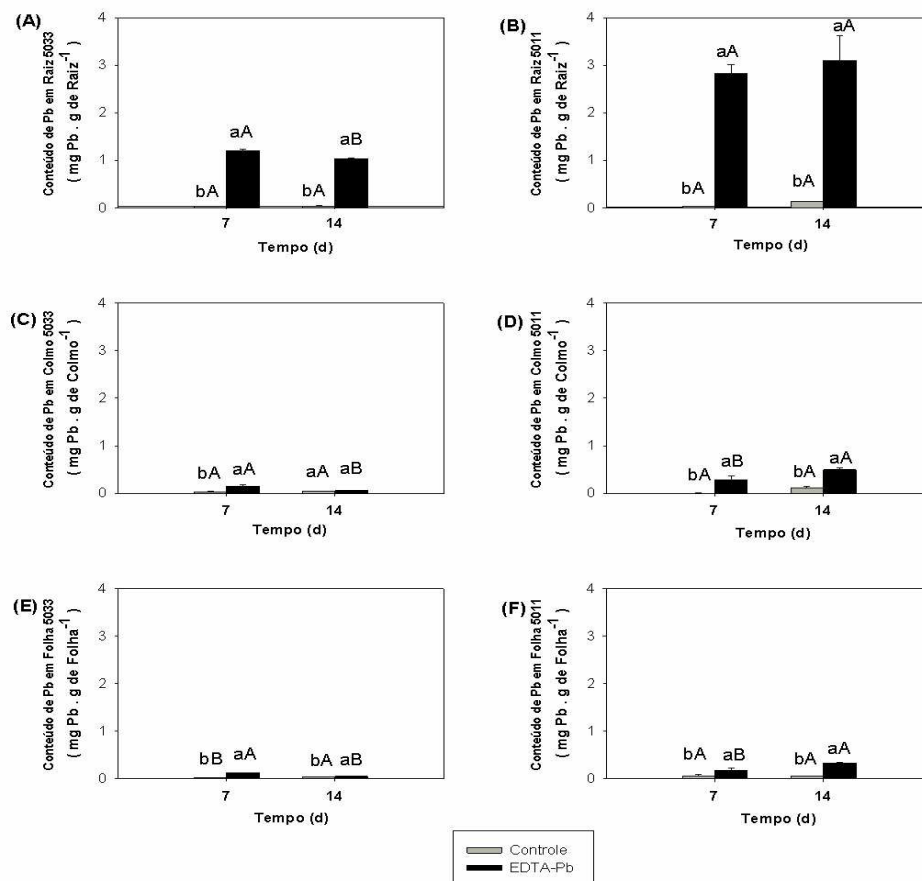
Em raízes de 5033, com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM foi revelado um acúmulo de 1,21 mg Pb g^{-1} MS significando um aumento de 40 vezes em relação ao controle. Ao passo que o grupo tratado com chumbo durante 14 dias apresentou um acúmulo de 1,03 mg Pb g^{-1} MS MS sendo 26 vezes superior ao grupo controle. Analisando as plantas tratadas com 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM observou-se uma redução no teor de chumbo de 14,5% quando comparado a 7 dias de tratamento (Figura 1A). Os teores de chumbo em raízes de 5011 (Figura 1B), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM revelaram um acúmulo de 2,824 mg Pb g^{-1} MS significando um aumento de 141 vezes em relação ao controle. Já o grupo tratado com chumbo durante 14 dias apresentou um acúmulo de 3,094 mg Pb g^{-1} MS MS sendo 155 vezes superior ao controle. A comparação entre os diferentes dias de tratamento não revelou diferenças estatísticas. Comparando-se o acúmulo de chumbo nas raízes dos dois genótipos, os valores encontrados para 5011 foram 133% e 200% maiores que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

Em colmos de 5033 (Figura 1C), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM foram revelados um acúmulo de 0,154 mg Pb g^{-1} MS significando um aumento de 285 % em relação ao controle. Enquanto que grupo o tratado com chumbo durante 14 dias apresentou um acúmulo de 0,063 mg Pb g^{-1} MS correspondendo a 57,5 % do controle. Analisando as plantas tratadas com 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM observou-se uma redução no teor de chumbo de 59% quando comparado a 7 dias de tratamento. Já em colmos de 5011 (Figura 1D), com 7 dias de estresse, o acúmulo de chumbo encontrado foi de 0,289 mg Pb g^{-1} MS MS, 15 vezes superior ao controle. Com 14 dias de estresse, os colmos de 5011 tratados com EDTA – Pb 0,5mM acumularam 0,493 mg Pb g^{-1} MS MS correspondendo a um aumento de 25 vezes em relação ao controle. Ao contrário de 5033, houve um aumento significativo de 70% no acúmulo de chumbo em 14 dias quando comparado a 7 dias. Comparando-se o acúmulo de chumbo

nos colmos dos dois genótipos, os valores encontrados para 5011 foram 88 % e 682 % maiores que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

Folhas de 5033 (Figura 1E), tratadas com chumbo durante 7 dias apresentaram um acúmulo de $0,132 \text{ mg Pb g}^{-1} \text{ MS MS}$ significando um aumento de 340 % em relação ao controle. Ao passo que o grupo tratado com chumbo durante 14 dias apresentou um acúmulo de $0,050 \text{ mg Pb g}^{-1} \text{ MS MS}$ correspondendo a 400 % do controle. Analisando as plantas tratadas com 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM observou-se uma redução no teor de chumbo em 62% quando comparado a 7 dias de tratamento. Nas folhas de 5011 (Figura 1D), com 7 dias de estresse, o acúmulo de chumbo encontrado foi de $0,176 \text{ mg Pb g}^{-1} \text{ MS MS}$, correspondendo a 340% do controle. Com 14 dias de estresse, as folhas de 5011 tratados com EDTA – Pb 0,5mM acumularam $0,329 \text{ mg.Pb.g}^{-1} \text{ MS}$ sendo 8 vezes superior ao seu controle. Ao contrário de 5033, houve um aumento significativo de 87 % no acúmulo de chumbo em 14 dias quando comparado a 7 dias. Comparando-se os dois genótipos quanto ao acúmulo de chumbo nas folhas, os valores encontrados para 5011 foram 33 % e 558 % maiores que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

Figura 6 - Teores de chumbo nos genótipos de milho 5033 e 5011



Legenda:(A) Teor de chumbo nas raízes de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Teor de chumbo nas raízes de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Teor de chumbo nos colmos de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Teor de chumbo nos colmos de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (E) Teor de chumbo nas folhas de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (F) Teor de chumbo nas folhas de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. O teor de chumbo está expresso em mg Pb g⁻¹ de massa seca e as medidas foram realizadas em ICP-OES com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com P≤0,05 e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

5.2 – Fatores de Translocação (TF) E Bioconcentração (BCF)

A Tabela 1 mostra os valores obtidos para os fatores de translocação (TF) e bioconcentração (BCF) nos dois genótipos (5033 e 5011). O valor de TF no genótipo 5033 foi de 0,2 e 0,1 com 7 e 14 dias de estresse respectivamente. No genótipo 5011 os valores de TF obtidos foram respectivamente de 0,2 e 0,3 com 7 e 14 dias de estresse. Já o BCF foi inferior a 1 em ambos genótipos com 7 e 14 dias de estresse.

Tabela1 – Fatores de Translocação e Bioconcentração nos genótipos de *Zea mays* L.

		Teores de Pb (mg Pb/g de MS)			TF	BCF (L g ⁻¹)
		Raiz	Colmo	Folha		
5033	7 dias	1,208	0,154	0,132	0,2	0,002
	14 dias	1,034	0,063	0,050	0,1	0,001
5011	7 dias	2,824	0,289	0,176	0,2	0,004
	14 dias	3,094	0,493	0,176	0,3	0,007

5.3 Quantificação de Elementos Essenciais na Presença de EDTA-Pb 0,5 mM

Os elementos essenciais Ca²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺ foram quantificados em presença e ausência (controle) de EDTA-Pb 0,5 mM durante 7 e 14 dias nas raízes, colmos e folhas dos genótipos de milho, *Zea mays* L. (5033 e 5011).

5.3.1 – Teor de Cálcio

Em raízes de 5033, tratadas com EDTA – Pb 0,5 mM durante 7 dias, observou-se um teor de cálcio de 1,80 mg.Ca.g⁻¹ MS significando um aumento de 251 % em relação ao controle. Ao passo que as plantas tratadas com chumbo durante 14 dias apresentaram um teor de cálcio de 0,43 mg Ca g⁻¹ MS sendo 75 % inferior ao controle. Analisando as plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM durante 14 dias, observou-se uma redução no teor de cálcio de 76 % quando comparado a 7 dias de tratamento (Figura 7A). O teor de cálcio em raízes de 5011 (Figura 7B), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM foi de 3,28 mg Ca g⁻¹ MS significando um aumento de 16 vezes em relação ao controle. Já nas plantas tratadas com chumbo durante 14 dias o teor de cálcio foi de 1,21 mg Ca g⁻¹ MS correspondendo a uma redução de 87,5 % em relação ao controle. Nesse genótipo a redução no teor de cálcio em plantas tratadas

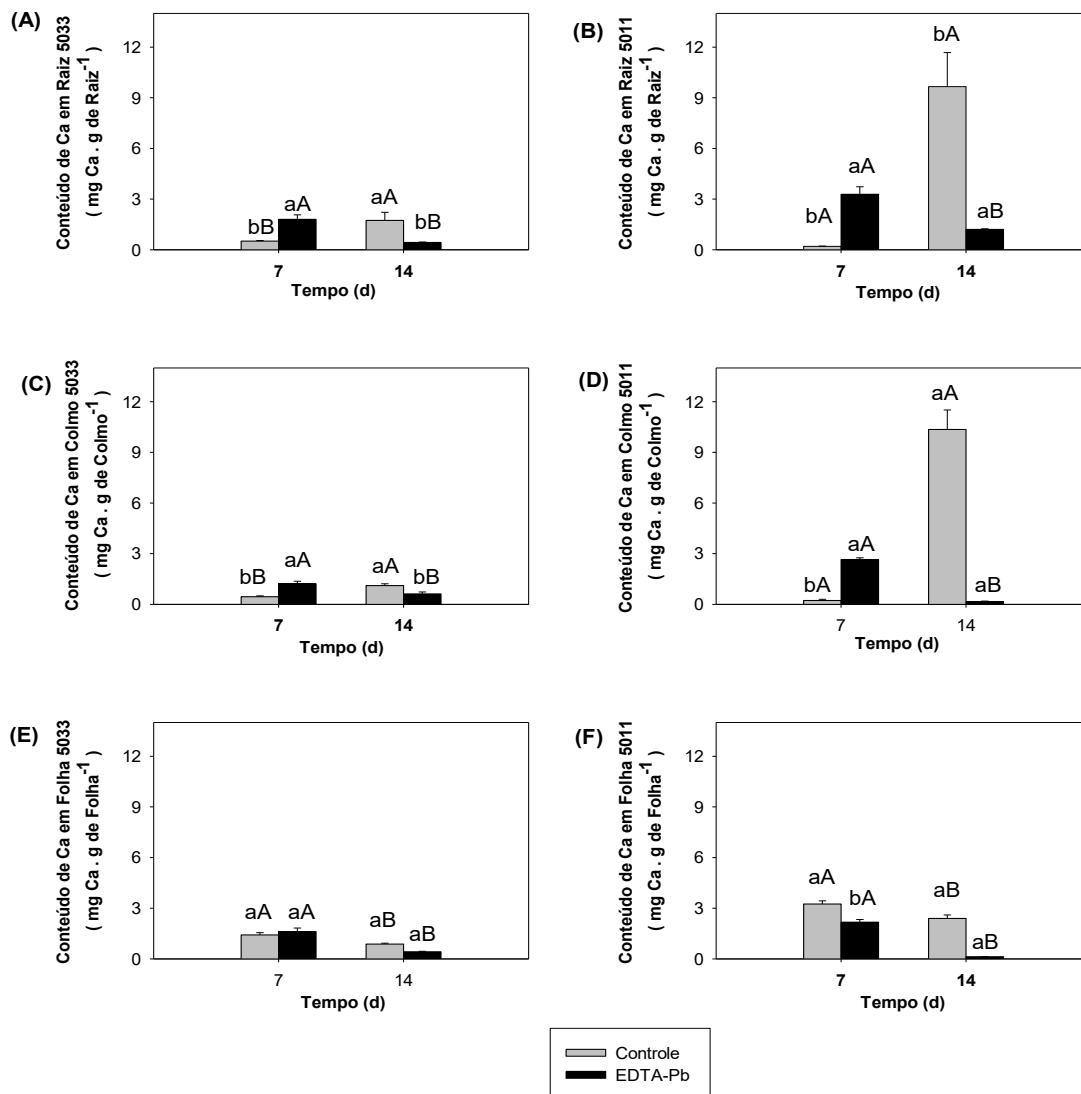
durante 14 dias foi de 63,2 % em relação as plantas de 7 dias de tratamento (Figura 7B). Comparando-se o teor de cálcio nas raízes dos dois genótipos tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, os valores encontrados para 5011 foram 82,4 % e 178,3 % maiores que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

Colmos de 5033 (Figura 7C), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM apresentaram um teor de cálcio de 1,22 mg Ca g⁻¹ MS significando um aumento de 172,3 % em relação ao controle. Enquanto que em colmos de plantas tratadas durante 14 dias, o teor de cálcio foi de 0,62 mg Ca g⁻¹ MS correspondendo a uma redução de 44 % em relação ao controle. Analisando as plantas tratadas durante 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM, observou-se uma redução no teor de cálcio de 49% quando comparado a 7 dias de tratamento. Já em colmos de 5011 (Figura 7D), com 7 dias de estresse, o teor de cálcio (2,65 mg Ca g⁻¹ MS) foi 12 vezes superior ao controle. Com 14 dias de estresse, os colmos de 5011 tratados com EDTA – Pb 0,5mM apresentaram um teor de cálcio de 0,15 mg Ca g⁻¹ MS sendo 98,5% inferior ao controle. Nesse genótipo a redução no teor de cálcio em plantas tratadas durante 14 dias foi de 94,2 % em relação as plantas de 7 dias de tratamento (Figura 7D). Comparando-se o teor de cálcio, na presença de EDTA-Pb 0,5 mM nos dois genótipos, os valores encontrados para 5011 foram 117 % maiores e 75,2 % menores que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

Folhas de 5033 (Figura 7E), tratadas com chumbo durante 7 dias apresentaram um acúmulo de cálcio de 1,61 mg Ca g⁻¹ MS significando um aumento de 14 % em relação ao controle. Já as folhas de plantas tratadas com chumbo durante 14 dias apresentaram um acúmulo de cálcio de 0,42 mg Ca g⁻¹ MS correspondendo a uma diminuição de 52 % quando comparado ao controle. Analisando as plantas tratadas com 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM observou-se uma redução no teor de cálcio em 74 % quando comparado a 7 dias de tratamento. Nas folhas de 5011 (Figura 7F), com 7 dias de estresse, o teor de cálcio encontrado foi de 2,17 mg Ca g⁻¹ MS, correspondendo a uma redução de 33% em relação ao controle. Com 14 dias de estresse, as folhas de 5011 tratados com EDTA – Pb 0,5 mM apresentaram mg Ca g⁻¹ MS revelando uma diminuição de 94% em relação ao controle. De forma semelhante a 5033, nas plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM houve uma diminuição significativa de 94 % no teor de cálcio em 14 dias quando comparado a 7 dias. Comparando-se os

dois genótipos quanto aos teores de cálcio nas folhas, os valores encontrados para 5011 foram 36 % maior e 69 % menor que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

Figura 7 - Teores de Cálcio nos genótipos de *Zea mays* L. submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM



Legenda:(A) Teor de cálcio nas raízes de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Teor de cálcio nas raízes de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Teor de cálcio nos colmos de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Teor de cálcio nos colmos de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (E) Teor de cálcio nas folhas de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (F) Teor de cálcio nas folhas de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. O teor de cálcio está expresso em mg Ca g⁻¹ de massa seca e as medidas foram realizadas em ICP-OES com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com P≤0,05 e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

5.3.2 – Teor de Zinco

O teor de zinco determinado nas raízes de 5033 (Figura 8A), de plantas tratadas com EDTA – Pb 0,5 mM durante 7 dias, foi de 0,09 mg Zn g⁻¹ MS significando um aumento de 50 % em relação ao controle. Já nas raízes de plantas tratadas com chumbo durante 14 dias apresentaram um teor de zinco de 0,1 mg Zn g⁻¹ MS correspondendo ao dobro do controle. Analisando o teor de zinco em raízes de plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM durante 14 dias, observou-se um aumento no teor de zinco de 11 % quando comparado a 7 dias de tratamento, mas sem diferenças estatísticas (Figura 4A). O teor de zinco em raízes de 5011 (Figura 8B), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM foi de 0,101 mg Zn g⁻¹ MS. Já na ausência de EDTA-Pb durante 7 dias o valor de zinco foi igual a zero. Nas raízes das plantas de 5011 tratadas com chumbo durante 14 dias o teor de zinco foi de 0,08 mg Zn g⁻¹ MS correspondendo a um aumento de 60% em relação a seu controle. Nesse genótipo a redução no teor de zinco em plantas tratadas durante 14 dias foi de 21 % em relação as plantas de 7 dias de tratamento (Figura 4B). Comparando-se o teor de zinco nas raízes dos dois genótipos, os valores encontrados para 5011 foram 12 % maiores que os de 5033 com 7 dias de estresse, e 20 % menores que os obtidos em 5033 para 14 dias.

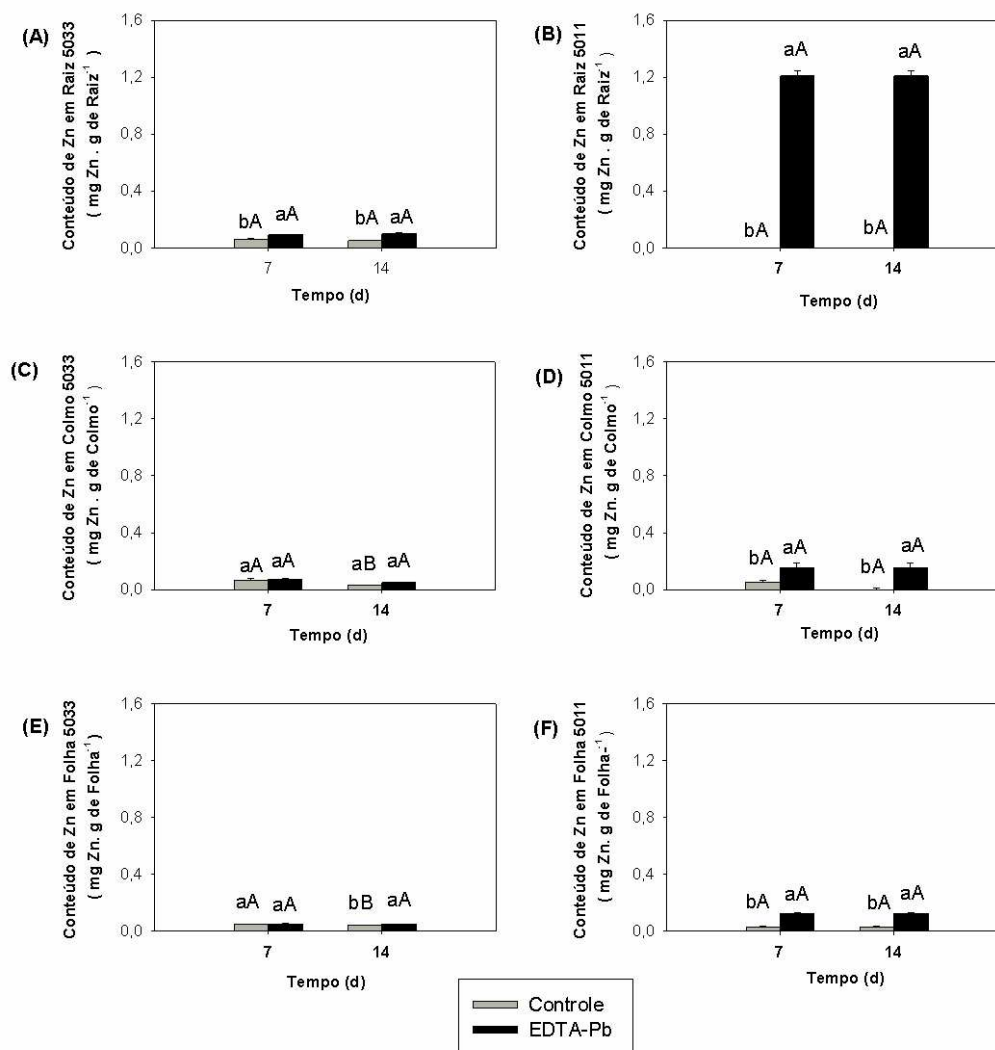
Colmos de 5033 (Figura 8C), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM apresentaram um teor de zinco de 0,07 mg Zn g⁻¹ MS, não mostrando variação em comparação com seu controle, visto que o mesmo exibiu igual valor para o teor de zinco em 7 dias. Já em colmos de plantas tratadas durante 14 dias, o teor de zinco foi de 0,049 mg Zn g⁻¹ MS correspondendo a um aumento de 63% em relação a seu controle. Analisando as plantas tratadas durante 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM, observou-se uma redução no teor de zinco de 30 % quando comparado a 7 dias de tratamento. Já em colmos de 5011 (Figura 8D), com 7 dias de estresse, o teor de zinco encontrado foi de 0,154 mg Zn g⁻¹ MS, correspondendo a 156% do controle. Com 14 dias de estresse, os colmos de 5011 tratados com EDTA – Pb 0,5mM apresentaram um teor de zinco de 0,04 mg Zn g⁻¹ MS correspondente a um aumento de 33% em relação ao seu controle. Nesse genótipo a redução no teor de zinco em plantas tratadas durante 14 dias foi de 74 % em relação as plantas com 7 dias de tratamento (Figura 4D). Comparando-se o teor de zinco nos dois genótipos, os valores encontrados para 5011 foram 120% maior e 18 % menor que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

As folhas de 5033 (Figura 8E), tratadas com chumbo durante 7 dias apresentaram um acúmulo de zinco de 0,05 mg Zn g⁻¹ MS, não exibindo variação em relação ao controle. Já as folhas de plantas tratadas com chumbo durante 14 dias apresentaram um acúmulo de zinco de 0,051 mg Zn g⁻¹ MS, correspondendo a um aumento de 27% em relação a seu controle. Analisando as plantas tratadas com 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM observou-se um aumento no teor de zinco de 2 % quando comparado a 7 dias de tratamento. Nas folhas de 5011 (Figura 8F), com 7 dias de estresse, o teor de zinco encontrado foi de 0,126 mg Zn g⁻¹ MS, correspondendo a 320% do controle. Com 14 dias de estresse, as folhas de 5011 tratadas com EDTA – Pb 0,5 mM apresentaram 0,05 mg Zn g⁻¹ MS, exibindo um aumento de 25% em relação a seu controle. Comparando-se o teor de zinco nas folhas de 5011 com 7 e 14 dias de estresse observou-se uma diminuição de 60 % no teor de Zinco em 14 dias. Comparando-se os dois genótipos quanto aos teores de zinco nas folhas tratadas com EDTA-Pb, os valores encontrados para 5011 foram 152% maiores e 2 % menores que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

5.3.3 – Teor de Cobre

O elemento essencial cobre foi quantificado em presença e ausência (controle) de EDTA-Pb 0,5 mM durante 7 e 14 dias nas raízes, colmos e folhas dos genótipos de milho, *Zea mays* L. (5033 e 5011). A presença de cobre não foi detectada em nenhum dos três órgãos analisados para ambos os genótipos.

Figura 8 - Teores de zinco nos genótipos de *Zea mays* L. submetidos ou não a EDTA – Pb 0,5 mM



Legenda:(A) Teor de zinco nas raízes de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Teor de zinco nas raízes de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Teor de zinco nos colmos de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Teor de zinco nos colmos de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (E) Teor de zinco nas folhas de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (F) Teor de zinco nas folhas de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. O teor de zinco está expresso em mg Zn g⁻¹ de massa seca e as medidas foram realizadas em ICP-OES com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com P≤0,05 e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

5.4 – Parâmetros Fisiológicos

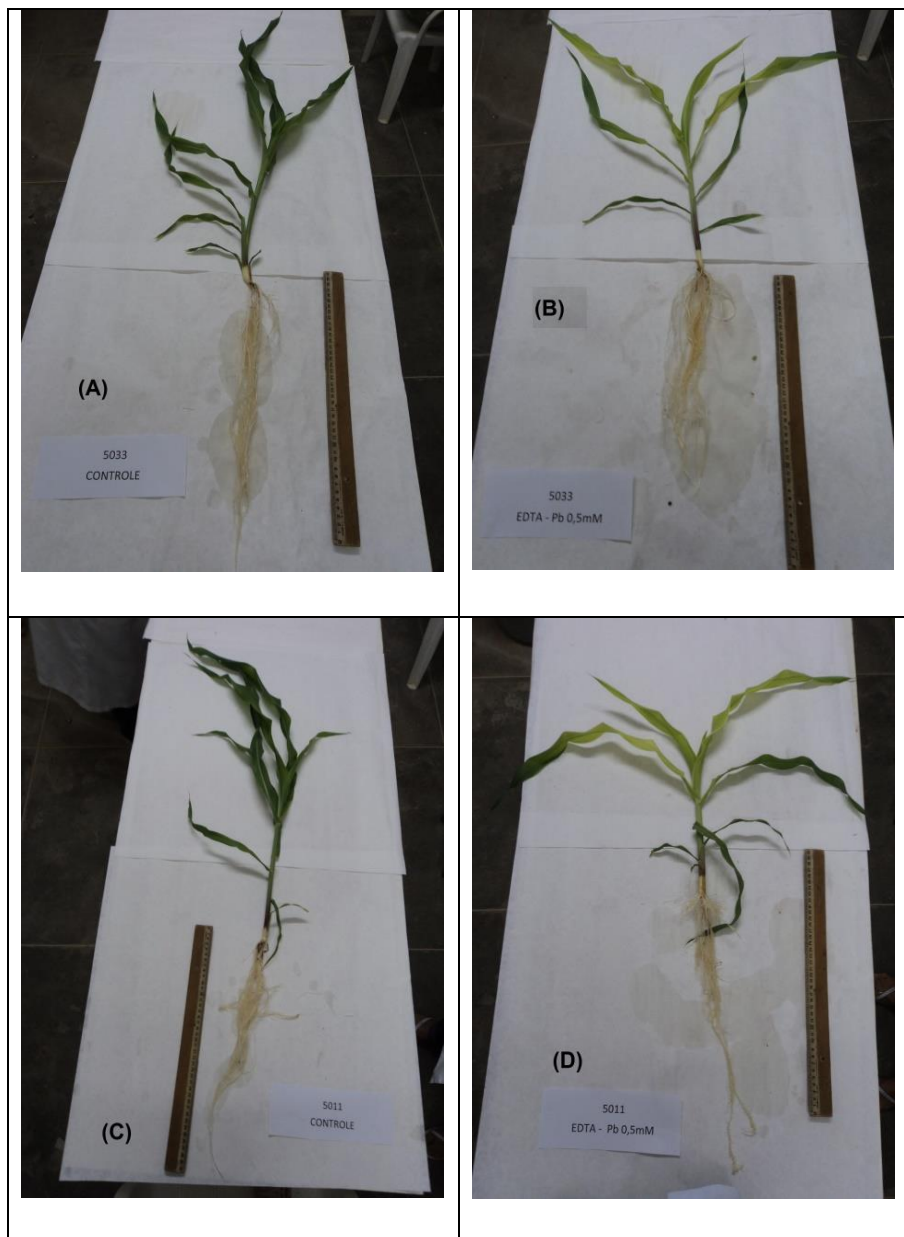
Os parâmetros fisiológicos massa seca (MS), área foliar (AF), eficiência quântica do PSII (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR), taxa fotossintética líquida (Pn), transpiração (E), condutância estomática (Gs) e concentração intercelular de CO₂ (Ci) foram avaliados nos genótipos 5033 e 5011 na presença ou não de EDTA-Pb 0,5 mM, com 7 e 14 dias de tratamento.

5.4.1 Massa Seca e Área Foliar

A análise dos parâmetros de crescimento nos genótipos, 5033 e 5011, foi avaliada através de medidas de massa seca e área foliar. As Figuras 9 e 10 mostram as plantas de *Zea mays* L. submetidas ou não ao tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM.

Em raízes de 5033, tratadas com EDTA – Pb 0,5 mM durante 7 dias, os valores de massa seca foram similares ao controle. Já as plantas tratadas com chumbo durante 14 dias apresentaram uma redução da massa seca de 61,3% em relação ao controle. Analisando as plantas de 5033 tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM durante 14 dias, observou-se um aumento da massa seca de 71 % quando comparado a 7 dias de tratamento (Figura 11A). Nas raízes de 5011 (Figura 11B), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM a massa seca foi de 0,474 g sendo semelhante ao grupo controle. Já nas plantas tratadas com chumbo durante 14 dias a massa seca das raízes foi de 0,551 correspondendo a uma redução de 50 % em relação ao controle. Nesse genótipo os valores de massa seca para as plantas tratadas com 7 e 14 dias foram similares (Figura 11B).

Figuras 9 – Plantas de *Zea mays* L. com 21 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM.



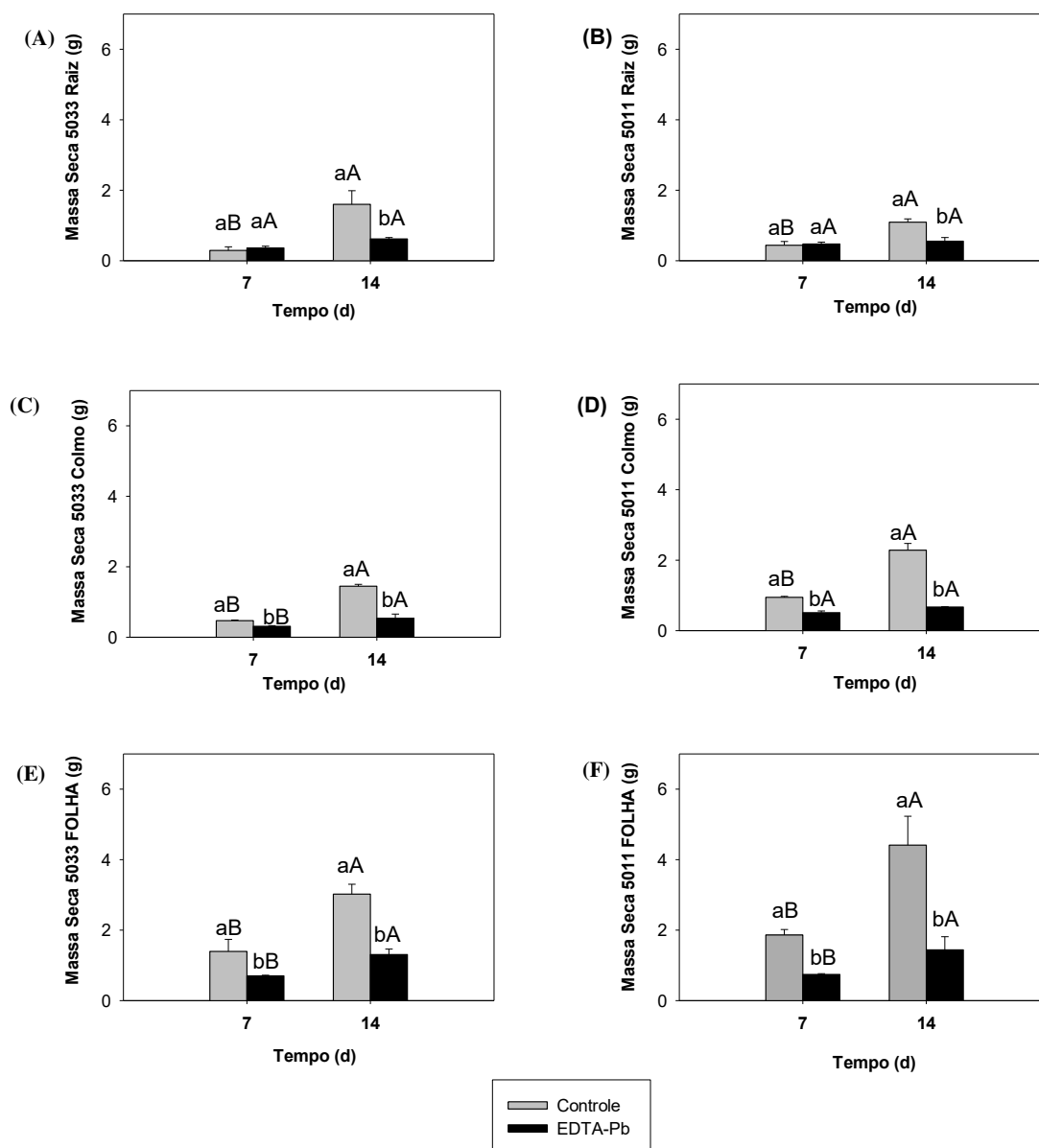
Legenda: (A) 5033 na ausência de EDTA-Pb 0,5mM (B) 5033 na presença de EDTA-Pb 0,5mM com 7 dias de estresse. (C) 5011 na ausência de EDTA-Pb 0,5mM (D) 5011 na presença de EDTA-Pb 0,5mM com 7 dias de estresse.

Figuras 10 – Plantas de *Zea mays* L. com 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM.



Legenda: (A) 5033 na ausência de EDTA-Pb 0,5mM (B) 5033 na presença de EDTA-Pb 0,5mM com 14 dias de estresse. (C) 5011 na ausência de EDTA-Pb 0,5mM (D) 5011 na presença de EDTA-Pb 0,5mM com 14 dias de estresse.

Figura 11 - Massas secas dos genótipos de *Zea mays* L., submetidos ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM..



Legenda: (A) Massa seca das raízes de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Massa seca das raízes de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Massa seca dos colmos de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Massa seca dos colmos de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (E) Massa seca das folhas de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (F) Massa seca das folhas de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. A massa seca está expressa em g e as medidas foram realizadas com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

Colmos de 5033 (Figura 11C), com 7 dias na presença de EDTA – Pb 0,5 mM apresentaram um valor de MS de 0,31 g significando um diminuição de 34 % em relação ao controle. Enquanto que em colmos de plantas tratadas durante 14 dias, o valor de MS foi de 0,536 g correspondendo a uma redução de 63 % em relação ao controle. Analisando as plantas tratadas durante 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM, observou-se um aumento na MS de 73% quando comparado a 7 dias de tratamento. Já em colmos de 5011 (Figura 11D), com 7 dias de estresse, a MS foi de 0,509 g sendo 46% inferior ao controle. Com 14 dias de estresse, os colmos de 5011 tratados com EDTA – Pb 0,5mM apresentaram MS 71% inferior ao controle. Nesse genótipo os valores de MS para as plantas tratadas com 7 e 14 dias foram similares (Figura 11D). Comparando-se a MS, na presença de EDTA-Pb 0,5 mM nos dois genótipos, os valores encontrados para 5011 foram 64 % e 25 % maiores que os obtidos em 5033 para 7 e 14, respectivamente.

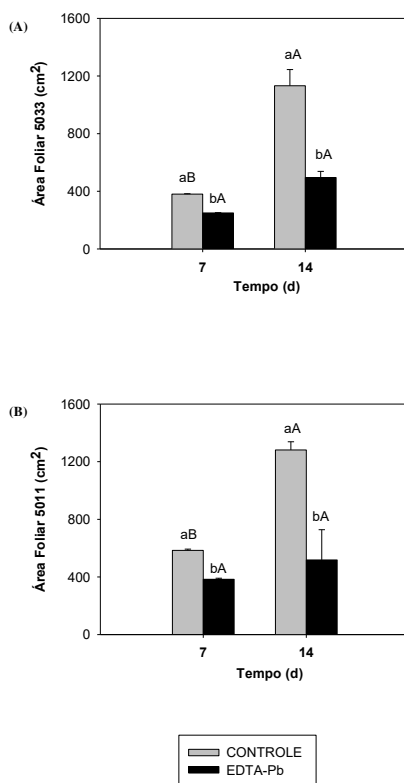
Folhas de 5033 (Figura 11E), tratadas com chumbo durante 7 dias apresentaram MS de 0,701 g significando um redução de 50 % em relação ao controle. Já as folhas de plantas tratadas com chumbo durante 14 dias apresentaram MS de 1,303 g correspondendo a uma diminuição de 57 % quando comparado ao controle. Analisando as plantas tratadas com 14 dias em presença de EDTA-Pb 0,5 mM observou-se um aumento de 86 % na MS quando comparado a 7 dias de tratamento. Nas folhas de 5011 (Figura 11F), com 7 dias de estresse, o valor de MS foi de 0,741 correspondendo a uma redução de 60% em relação ao controle. Com 14 dias de estresse, as folhas de 5011 tratadas com EDTA – Pb 0,5 mM apresentaram MS de 1,437 g revelando uma diminuição de 68% em relação ao controle. De forma semelhante a 5033, nas plantas tratadas com EDTA-Pb 0,5 mM houve um aumento de 94 % na MS em 14 dias quando comparado a 7 dias. Comparando-se os dois genótipos quanto a MS nas folhas, os valores encontrados para 5011 foram similares aos obtidos em 5033 para 7 e 14 dias, respectivamente.

No tocante a área foliar (AF) as plantas de 5033, com 7 dias de tratamento apresentaram uma inibição de 35% em relação ao controle, ao passo que com 14 dias de tratamento a AF foi de 495,830 cm², correspondendo a uma redução de 56% em comparação ao controle. Ao se comparar a AF de 5033 nos diferentes dias de tratamento, registrou-se um aumento de 98% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento (Figura 12A).

Assim como 5033, as folhas de 5011 mostraram uma redução de 35% em relação ao controle (Figura 12B) com 7 dias de tratamento, apresentando AF de 383,405 cm². Já com 14 dias a AF do grupo tratado com chumbo foi de 518,19 cm², correspondendo a uma inibição de 60% em relação ao controle. Comparando os valores de AF nos diferentes dias de tratamento com chumbo em 5011, constatou-se um aumento de 35% em 14 dias com relação a 7 dias, mas sem diferença estatística.

Comparando se AF de 7 dias de tratamento com chumbo dos dois genótipos, observou-se que nas folhas de 5011 a AF foi 53% maior que a de 5033. Já com 14 dias a AF nos dois genótipos foi semelhante.

Figura 12 - Área foliar dos genótipos de *Zea mays* L., submetidos ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5



Legenda: (A) Área foliar das plantas de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Área foliar das plantas de e 5011 com 7 e 14 dias de estresse. A área foliar está expressa em cm² e as medidas foram realizadas com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

5.4.2 - Eficiência Quântica do PSII (Φ PSII)

Com 7 dias de tratamento, a eficiência quântica do PSII nas plantas de 5033 (Figura 13A) foi de 0,240, representando uma redução de 41% em relação ao controle. Já em 14 dias de tratamento, a Φ PSII foi de 0,102, correspondendo a uma redução de 70% em relação ao controle, com diferença estatística. Ao se comparar a Φ PSII de 5033 nos dois tempos de tratamento, registrou-se uma inibição de 57,5% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento. Em 5011, com 7 dias de tratamento, a eficiência quântica do PSII (Figura 13B) exibiu valor de 0,163, uma inibição de 60% em relação

ao controle. Em 14 dias de tratamento, a Φ PSII de 5011 foi de 0,17, representando uma redução 47% em relação ao seu respectivo controle. A Φ PSII em 5011 nos diferentes dias de tratamento, 7 e 14 dias, foram similares.

Ao se comparar a Φ PSII de 7 dias de tratamento com chumbo dos dois genótipos, observou-se que a eficiência quântica de 5033 foi 47% maior que a de 5011. Já com 14 dias de tratamento, a Φ PSII de 5011 foi 66% maior que a de 5033.

5.4.3 – Taxa de Transporte de Elétrons no PSII (ETR)

No genótipo 5033, em 7 dias de tratamento, a taxa de transporte de elétrons no PSII (Figura 13C) foi de 105,116 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondendo a uma redução de 41% em relação ao controle. Em 14 dias de tratamento, a ETR foi de 45,107 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, representando uma inibição de 70% em comparação ao controle. Ao se comparar a ETR de 5033 nos dois tempos de tratamento, observou-se uma inibição de 57% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento. Em 5011, com 7 dias de tratamento, a taxa de transporte de elétrons no PSII (Figura 13D) mostrou valor de 71,406 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, representando uma inibição de 60% em relação ao controle. Em 14 dias de tratamento, a ETR de 5011 foi de 74,830 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mostrando uma redução de 47% em comparação ao controle. Nesse genótipo os valores de ETR para as plantas tratadas com 7 e 14 dias foram similares.

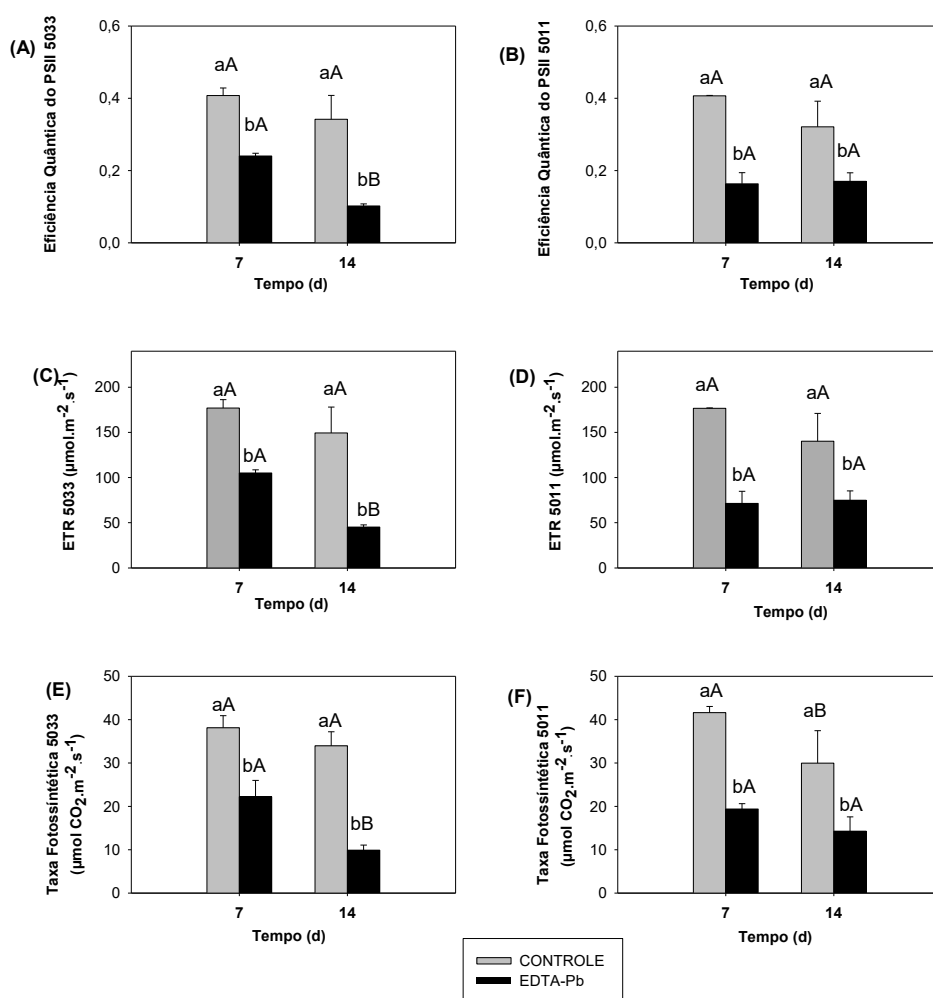
Ao se comparar a ETR nos dois genótipos com 7 dias de tratamento, 5033 revelou ter ETR 47% maior que a de 5011. Já com 14 dias de tratamento, a ETR de 5011 foi 66% maior que a de 5033.

5.4.4 Taxa Fotossintética líquida (Pn)

Em 5033, com 7 dias de tratamento, a taxa fotossintética (Pn) (Figura 13E) foi de 22,214 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondendo a uma redução de 42% em relação ao controle. Em 14 dias de tratamento, a Pn foi de 9,896 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, representando uma inibição de 71% em comparação ao controle. Ao se comparar a Pn de 5033 nos dois tempos de tratamento, observou-se uma inibição de 56% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento. Em 5011, com 7 dias de tratamento (Figura 13F), a Pn mostrou valor de 19,371 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, correspondendo a uma inibição de 54% em relação ao controle. Em 14 dias de tratamento, a taxa fotossintética de 5011 foi de 14,264 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mostrando uma redução de 53% em comparação ao

controle. Ao se comparar a Pn de 5011 nos diferentes dias de tratamento, verificou-se uma inibição de 27% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento, mas sem diferença estatística. Já a taxa fotossintética nos dois genótipos com 7 dias de tratamento, revelou que o valor de Pn para 5033 foi 14% maior que a de 5011 enquanto que com 14 dias de tratamento, a taxa fotossintética de 5011 foi 44% maior que a de 5033.

Figura 13 – Eficiência quântica do PSII, taxa de transporte de elétrons no PSII e taxa fotossintética líquida dos genótipos de *Zea mays* L. submetidos ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM..



Legenda: (A) Eficiência quântica do PSII em 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Eficiência quântica do PSII em 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Taxa de transporte de elétrons no PSII em 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Taxa de transporte de elétrons no PSII em 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (E) Taxa fotossintética líquida em 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (F) Taxa fotossintética líquida em 5011 com 7 e 14 dias de estresse. As medidas foram realizadas com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

5.4.5 Transpiração (E)

Em 5033, com 7 dias de tratamento (Figura 14A), a transpiração (E) exibiu valor de 3,637 mmol de H₂O m⁻² s⁻¹, representando uma inibição de 38% em relação ao controle. Em 14 dias de tratamento, a E em 5033 foi de 1,472 mmol de H₂O m⁻² s⁻¹, correspondendo a uma inibição de 51% em comparação ao controle. Ao se comparar a transpiração de 5033 nos dois tempos de tratamento, constatou-se uma inibição de 60% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento. Em 5011, com 7 dias de tratamento, E (Figura 14B) exibiu valor de 3,914 mmol de H₂O m⁻² s⁻¹, correspondendo a uma inibição de 32% em relação ao controle. Em 14 dias de tratamento, a transpiração de 5011 foi de 1,692 mmol de H₂O m⁻² s⁻¹, mostrando uma redução de 25% em comparação ao controle, contudo sem diferenças estatísticas. Ao se comparar a E de 5011 nos diferentes dias de tratamento, verificou-se uma inibição de 57% em 14 dias comparado a 7 dias. Já a transpiração em 7 dias de tratamento revelou ser similar nos dois genótipos, enquanto que com 14 dias de tratamento, a transpiração de 5011 foi 15% maior que a de 5033.

5.4.6 Condutância Estomática (Gs)

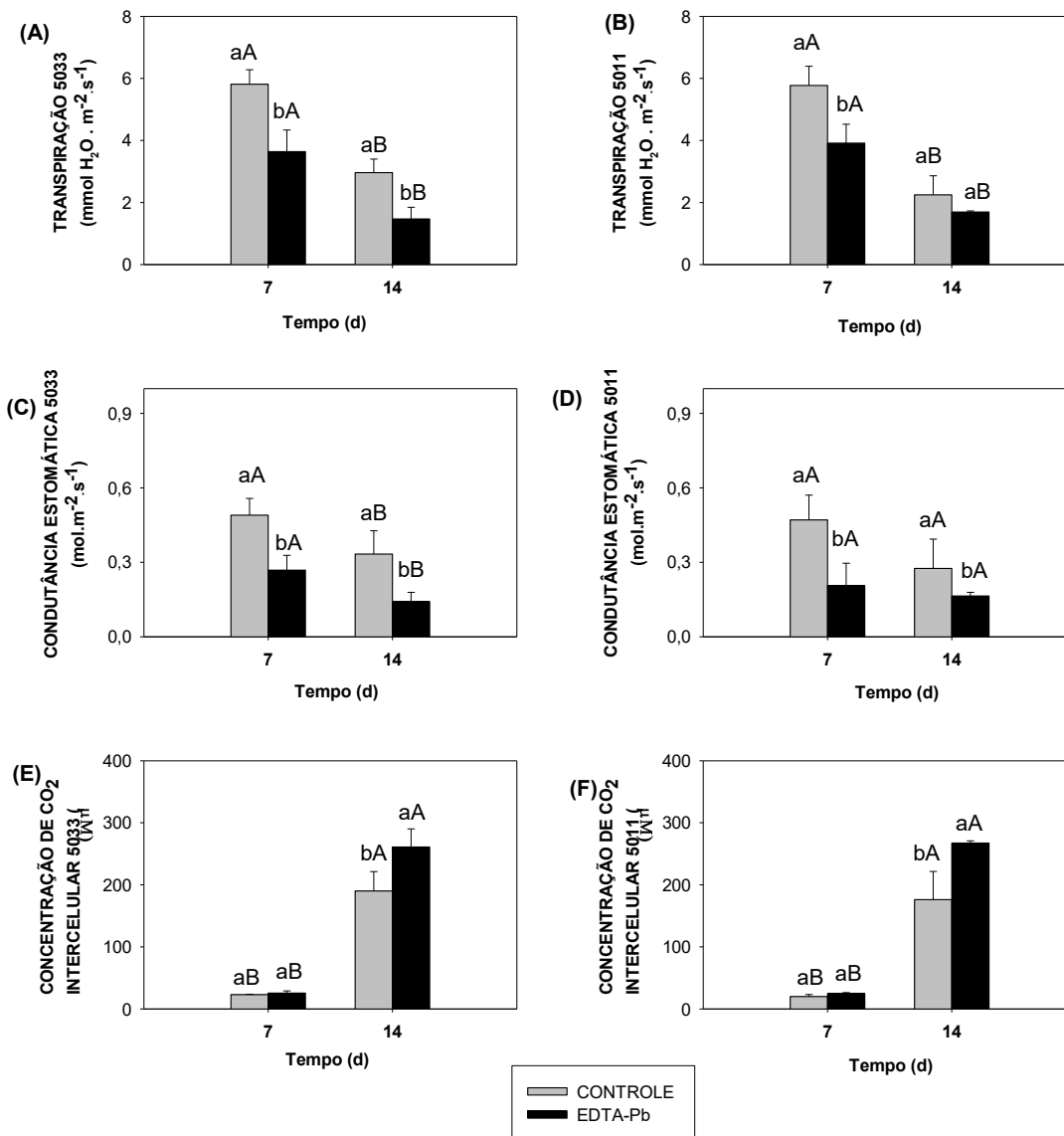
Em 5033, com 7 dias de tratamento (Figura 14C), a condutância estomática (Gs) exibiu valor de 0,268 mol de H₂O m⁻² s⁻¹, representando inibição de 45% em relação ao controle.. Em 14 dias de tratamento, o valor de Gs foi de 0,141 mol de H₂O m⁻² s⁻¹, correspondendo a uma inibição de 58% em comparação ao controle. Ao se comparar a condutância estomática de 5033 nos dois tempos de tratamento, constatou-se uma inibição de 48% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento. Em 5011, com 7 dias de tratamento, Gs exibiu valor de 0,206 mol de H₂O m⁻² s⁻¹ (Figura 14D), correspondendo a uma inibição de 56% em relação ao controle. Em 14 dias de tratamento, a condutância estomática de 5011 foi de 0,164 mol de H₂O m⁻² s⁻¹, mostrando uma redução de 41% em comparação ao controle. Ao se comparar a Gs de 5011 nos diferentes dias de tratamento, verificou-se uma inibição de 21% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento, mas sem diferenças estatísticas.

Já a condutância estomática em 7 dias de tratamento nos dois genótipos revelou que o valor de Gs em 5033 foi 30% maior que o de 5011, enquanto que com 14 dias de tratamento, a Gs de 5011 mostrou valor 16% maior que a de 5033.

5.4.7 Concentração Intercelular de CO₂ (Ci)

Em 5033, com 7 dias de tratamento (Figura 14E), a concentração intercelular de CO₂ (Ci) exibiu valor de 25,602 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, mostrando aumento de 12% em relação ao controle, sem diferenças estatísticas. Em 14 dias de tratamento, o valor de Ci foi de 261,043 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, correspondendo a um aumento de 37% em comparação ao controle. Ao se comparar a concentração intercelular de CO₂ em 5033 nos dois tempos de tratamento, verificou-se um aumento de 920% em 14 dias comparado a 7 dias. Em 5011, com 7 dias de tratamento (Figura 14F), o valor de Ci foi de 24,446 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ sendo semelhante ao seu controle. Em 14 dias de tratamento, a concentração intercelular de CO₂ em 5011 foi de 267,373 $\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, mostrando um aumento de 52% em comparação ao controle. Ao se comparar a concentração intercelular de CO₂ de 5011 nos diferentes dias de tratamento, verificou-se um aumento de 1000% em 14 dias. Comparando-se os dois genótipos a concentração intercelular de CO₂ nas plantas tratadas com 7 e 14 dias foram similares

Figura 14 - Transpiração, condutância estomática e concentração intercelular de CO₂ nos genótipos de *Zea mays* L. submetidos ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM..



Legenda: (A) Transpiração de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Transpiração de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Condutância estomática de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Condutância estomática de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (E) Concentração Intercelular de CO₂ de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (F) Concentração Intercelular de CO₂ de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. As medidas foram realizadas com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

5.5 Atividade das enzimas antioxidante

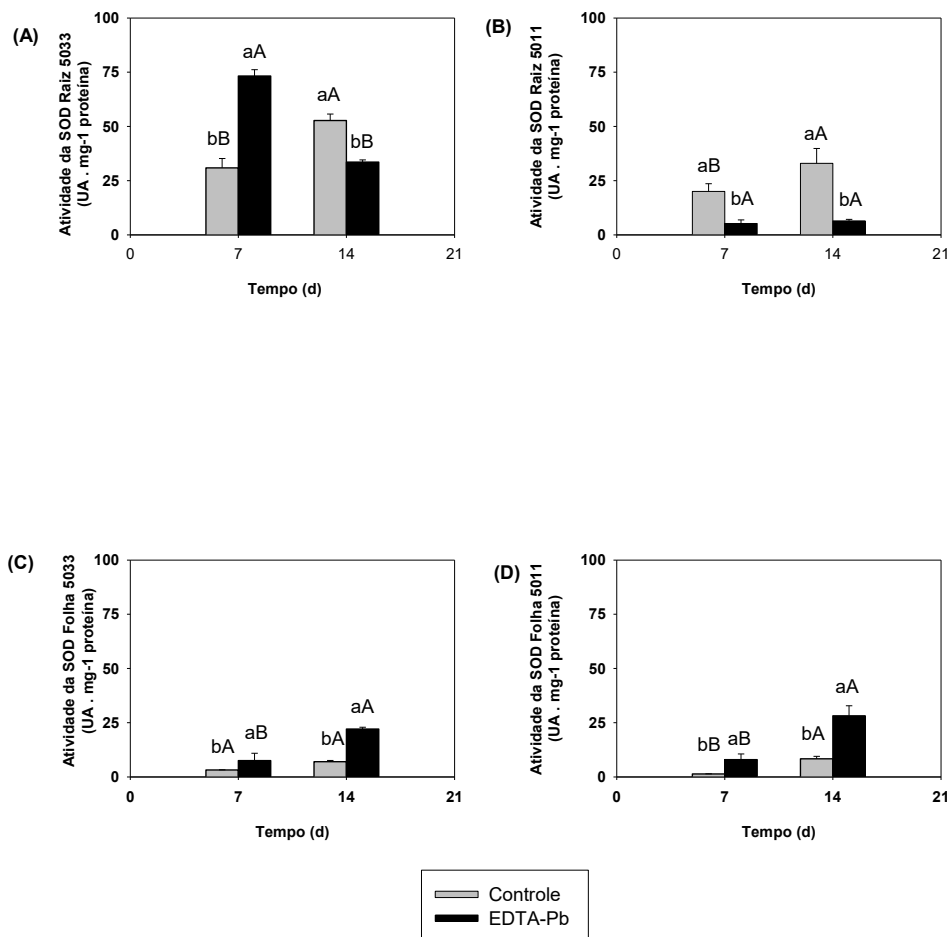
5.5.1 – *Superóxido Dismutase (SOD)*

A atividade da SOD em raízes no genótipo 5033 (Figura 15A), após 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM apresentou valor de 73,251 UA mg⁻¹ de proteína, o que corresponde a um aumento de 137% em relação a seu controle. Em 14 dias de tratamento, o valor da atividade da SOD foi de 33,590 UA mg⁻¹ de proteína, mostrando uma redução da atividade de 36% em relação as raízes do controle. Ao se comparar a atividade da SOD em 5033 nos diferentes dias de tratamento, verificou-se uma inibição de 54% em 14 dias comparado a 7 dias de tratamento. No genótipo 5011, a atividade da SOD nas raízes (Figura 15B), após 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM, mostrou valor de 5,234 UA mg⁻¹ de proteína, representando uma inibição de 74% em relação ao controle. Com 14 dias de tratamento, o valor da atividade da SOD foi de 6,433 UA mg⁻¹ de proteína, constatando-se uma redução da atividade de 81% em relação ao controle. Ainda em raízes de 5011, em grupos tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, comparando-se a atividades da SOD em 7 e 14 dias, observou-se um aumento na atividade de 23% em 14 dias com relação a 7, mas sem diferença estatística.

Ao se comparar a atividade da SOD em raízes com 7 dias de tratamento com EDTA – Pb 0,5 mM nos dois genótipos, observou-se que a atividade de 5033 foi 1300% maior que a de 5011. Já com 14 dias de tratamento, a atividade da SOD em 5033 mostrou valor 422% maior que a de 5011.

Em folhas do genótipo 5033 (Figura 15C), A atividade da SOD após 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM mostrou valor de 7,492 UA mg⁻¹ de proteína, o que corresponde a um aumento de 135% em relação a seu controle. Com 14 dias de tratamento, o valor da atividade da SOD foi de 22,046 UA mg⁻¹ de proteína, exibindo uma redução de atividade de 214% em relação as folhas do seu controle. Ao se comparar a atividade da SOD em 5033 nos diferentes dias de tratamento, verificou-se um aumento de 194% em 14 dias comparado a 7 dias. Em folhas de 5011 (Figura 15D), a atividade da SOD, após 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM. exibiu valor de 7,962 UA mg⁻¹ de proteína, correspondendo a um aumento de 487% em relação ao controle.

Figura 15 – Atividade da SOD nos genótipos de *Zea mays* L. submetidos ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM..



Legenda: (A) Atividade da SOD nos raízes de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Atividade da SOD em raízes de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Atividade da SOD nas folhas de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Atividade da SOD nas folhas de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. A atividade da SOD está expressa em UA mg⁻¹ de proteína e as medidas foram realizadas com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com P≤0,05 e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

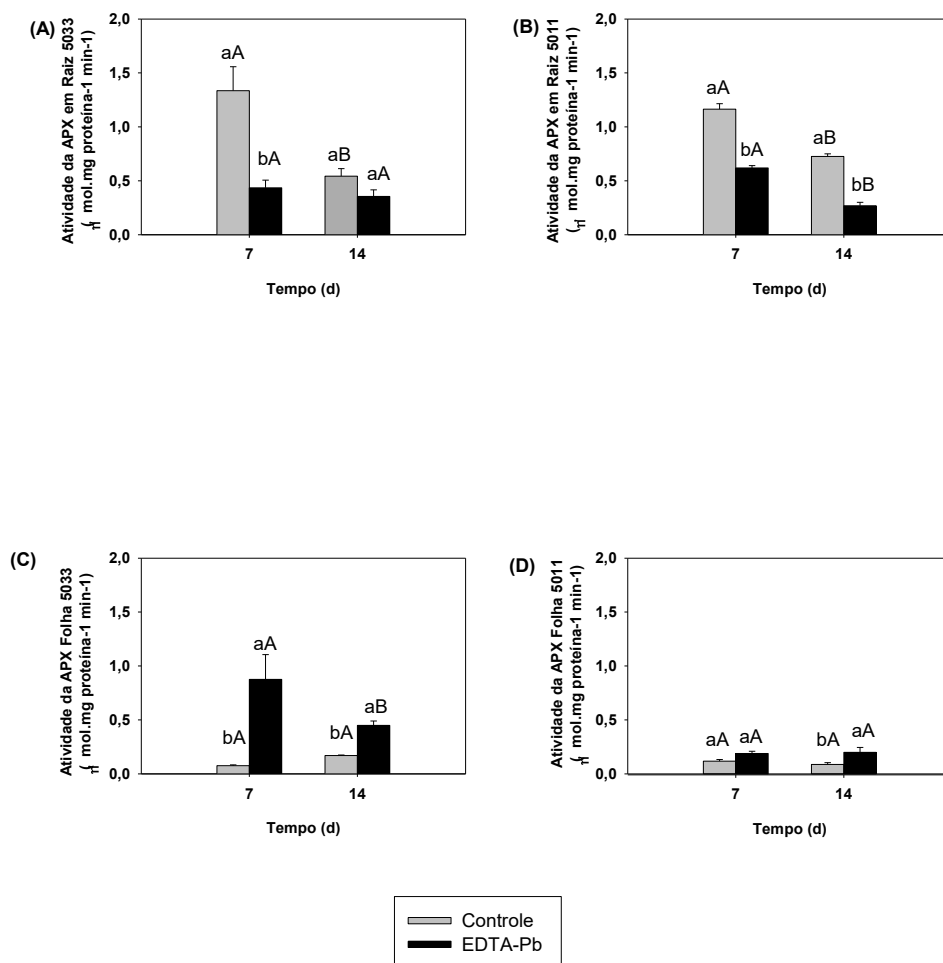
Com 14 dias de tratamento, o valor da atividade da SOD foi de 28,168 UA mg^{-1} de proteína, constatando-se um aumento da atividade em 237% em relação ao controle. Ainda nas folhas de 5011, em grupos tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, comparando-se a atividades da SOD em 7 e 14 dias, observou-se um aumento na atividade de 253% em 14 dias com relação a 7.

Nas folhas, comparando - se a atividade da SOD nos dois genótipos com 7 dias de tratamento com EDTA – Pb 0,5 mM, observou-se que a atividade de 5011 foi similar a de 5033. Já com 14 dias de tratamento, a atividade da SOD de 5011 mostrou valor 28% maior que a de 5033.

5.6.2 – Ascorbato Peroxidase (APX)

Com 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5mM, a atividade da APX em raízes do genótipo 5033 (Figura 16A) exibiu valor de 0,435 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{min}^{-1}$, o que corresponde a uma inibição de 68% em relação a seu controle. Com 14 dias de tratamento, o valor da atividade da APX foi de 0,427 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{min}^{-1}$, mostrando uma redução de atividade de 22% em relação ao controle. Nesse genótipo os valores da atividade para as plantas tratadas com 7 e 14 dias foram similares. No genótipo 5011, a atividade da APX nas raízes (Figura 16B), após 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM, foi de 0,619 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{min}^{-1}$, representando uma inibição de 47% em relação ao controle. Com 14 dias de tratamento, o valor da atividade da APX foi de 0,269 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{min}^{-1}$, constatando-se uma redução de atividade de 63% em relação ao controle. Ainda em raízes de 5011, em grupos tratados com EDTA – Pb 0,5 mM, comparando-se a atividades da APX em 7 e 14 dias, observou-se uma redução de 57% em 14 dias com relação a 7. Ao se comparar a atividade da APX em raízes de 7 dias de tratamento com chumbo nos dois genótipos, observou-se que os valores de atividade da APX de 5011 foram 43% maiores que os de 5033. Já com 14 dias de tratamento, a atividade da APX das raízes de 5033 foi 59% maior que a de 5011.

Figura 16. Atividade da APX nos genótipos de *Zea mays* L. submetidos ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM.



(A) Atividade da APX em raízes de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (B) Atividade da APX em raízes de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. (C) Atividade da APX nas folhas de 5033 com 7 e 14 dias de estresse. (D) Atividade da APX nas folhas de 5011 com 7 e 14 dias de estresse. A atividade da APX está expressa em $\mu\text{mol} (\text{mg de proteína})^{-1} \text{min}^{-1}$ e as medidas foram realizadas com plantas de 21 e 28 dias submetidas ou não a estresse com EDTA-Pb 0,5 mM. A análise de variância de dois sentidos (two-way ANOVA) seguido pelo teste de Tukey foram realizados para determinação de diferenças estatísticas com $P \leq 0,05$ e os resultados expressos como desvio padrão das médias (SEM). Letras minúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM dentro do mesmo cultivar. Letras maiúsculas diferentes representam significância estatística quando se compara controle e EDTA-Pb 0,5 mM entre os dois cultivares. Letras minúsculas ou maiúsculas iguais significam que não há diferença entre as comparações, portanto, não há significância estatística.

A atividade da APX em folhas do genótipo 5033 (Figura 16C) submetidas a 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5mM exibiu valor de 0,875 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{ min}^{-1}$, equivalente a um aumento de 1066% em relação a seu controle. Com 14 dias de tratamento em folhas, o valor da atividade da APX foi de 0,499 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{ min}^{-1}$, representando um aumento de 165% em relação ao controle. Ao se comparar a atividade da APX em 5033 nos diferentes dias de tratamento, verificou-se uma inibição de 49% em 14 dias comparado a 7. No genótipo 5011, a atividade da APX nas folhas (Figura 16D), após 7 dias de tratamento com EDTA-Pb 0,5 mM, mostrou valor de 0,188 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{ min}^{-1}$, representando um aumento de 60% em relação ao controle. Com 14 dias de tratamento, o valor da atividade da APX foi de 0,199 $\mu\text{mol (mg de proteína)}^{-1} \text{ min}^{-1}$, constatando-se um aumento de atividade de 129% em relação ao controle. Comparando-se a atividades da APX em folhas de 5011 tratadas com EDTA – Pb em 7 e 14 dias, os valores foram similares. Ao se comparar a atividade da APX em folhas com 7 dias de tratamento, nos dois genótipos, observou-se que 5033 foi 365% maior que 5011. Já com 14 dias de tratamento, a atividade da APX nas folhas de 5033 foi 125% maior que a de 5011.

5.6.3 – *Catalase (CAT)*

A atividade da catalase foi avaliada em presença e ausência (controle) de EDTA-Pb 0,5 mM durante 7 e 14 dias nas raízes, colmos e folhas dos genótipos de milho, *Zea mays* L. (5033 e 5011). No entanto tal atividade não foi detectada em nenhum dos três órgãos analisados para os dois genótipos.

5. DISCUSSÃO

A concentração de chumbo utilizada foi escolhida com base em trabalhos anteriores de toxicidade do chumbo em milho. Seregin, Shpigun e Ivanov (2004), ao trabalharem com efeitos e acumulação de Cd e Pb em milho, notaram que com 1 e 10 mM de $Pb(NO_3)_2$ a inibição era severa em raízes de milho, além de encontrarem vários tecidos mortos em raízes. Ghani (2010), ao avaliar a toxicidade do chumbo no conteúdo de clorofila e nos parâmetros de crescimento em milho, verificou que 90 μM de $Pb(NO_3)_2$ (equivalente a 30 ppm) conseguiam inibir a massa seca em 33% e o comprimento das raízes em 34% no genótipo Neelam enquanto que no genótipo Deesi, a MS foi inibida em 25% e o comprimento da raiz em 26%. A concentração de 0,5 mM de $Pb(NO_3)_2$ foi escolhida por representar uma concentração de Pb, capaz de evidenciar a toxicidade do chumbo e também de permitir que a planta conseguisse tolerar ou sobreviver ao estresse. A adição de quelantes sintéticos como o EDTA favorece não só uma maior solubilidade de Pb no solo, como também aumenta sua absorção pela raízes e impede que o chumbo sofra imobilização ou complexação no xilema ou floema (SAIFULLAH et al., 2009). Assim, aplicou – se uma concentração de EDTA similar àquela do $Pb(NO_3)_2$, permitindo quelação e maior absorção do chumbo pela planta. Hu et al. (2012) mostraram que plantas dotadas de tolerância a estresses abióticos (seca e salinidade) como as xerófitas *Salsola passerina* L. Bunge e *Chenopodium album*. podem exibir também tolerância a metais pesados como o chumbo. Desse modo, os genótipos BRS – 5033, tolerante à salinidade, e BRS – 5011, suscetível à salinidade (AZEVEDO NETO et al., 2004), foram escolhidos a fim de se avaliar se há alguma correlação entre a resistência à salinidade e resistência a chumbo em plantas.

O conteúdo de Pb foi maior nas raízes dos dois genótipos, que nos colmos e folhas. Isto pode ser explicado principalmente pelo fato da raiz ser a principal barreira contra a translocação de elementos indesejáveis pela planta, como o chumbo e outros metais pesados sem função biológica. A parede celular das células de raízes possuem mecanismos de defesa específicos contra a translocação de metais pesados, como agentes complexantes, precipitantes, de troca iônica e de efluxos (HU et al., 2012). Outra possível explicação é que a endoderme das raízes deve funcionar como uma segunda barreira contra a entrada de metal pesado, sendo as estrias de Caspary o principal fator limitante da translocação de Pb (SHARMA; DUBEY, 2005).

Os valores de TF e de BCF de ambos os genótipos foram menores que 1. Isso significa que os genótipos 5033 e 5011 não foram adequados para a fitoextração, pois plantas fitoextratoras geralmente apresentam valores de TF e BCF acima de 1. Uma possível explicação da baixa translocação é que, conforme supracitado, a endoderme das raízes pode agir como uma segunda barreira contra a translocação de metal pesado. Suthar, Memon e Mahmood-Ul-Hassan (2014), ao analisarem a capacidade fitoextratora de *Zea mays* L. e *Sesbania aculeata*, com ou sem o acréscimo de EDTA, verificaram que os valores de BCF de milho foram todos abaixo de 1, sugerindo que *S. aculeata* seja mais propícia a fitoextração que o milho.

No tocante ao conteúdo de Ca em raízes, colmos e folhas nos dois genótipos, houve uma redução da concentração deste íon nos grupos tratados com EDTA – Pb 0,5 mM de 7 para 14 dias. Isso se deve possivelmente ao fato de que os íons Pb causam disfunções tanto por suas características físicas quanto químicas: o Pb pode tanto competir com íons Ca^{2+} em proteínas transportadoras de membrana como inibir a atividade de canais de cálcio dependentes de voltagens (WANG et al., 2007). Além disso, alguns autores sugerem que a entrada de Pb na planta se deve em parte a canais de Ca^{2+} permeáveis (POURRUT et al., 2008; WANG et al., 2007). Estudos realizados por Doncheva et al. (2013) relataram a comparação entre os efeitos de 0.1 mM $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ e 0.1 mM EDTA - Pb em duas espécies de girassóis, mostrando que o chumbo quelatado ou não causou disfunções nas plantas, como vazamento de eletrólitos e também redução significativa do conteúdo de cálcio.

A concentração de zinco nos dois genótipos mostrou perfis distintos para raízes, colmos e folhas. Em raízes de 5011, nos dois tempos, os valores de zinco foram superiores a 1 mg Zn g^{-1} raiz. Zinco e chumbo possuem muitas formas de acesso à célula em comum, como as proteínas membranares H^+ - ATPases (OLSEN; PALMGREN, 2014), proteínas CDF (*Cation Diffusion Facilitators*) (GUSTIN; ZANIS; SALT, 2011) e proteínas $\text{P}_{1\text{B}}$ -ATPases (SMITH; SMITH; ROSENZWEIG, 2014). Contudo, os mecanismos que acarretaram o aumento exacerbado de Zn em raízes de 5011 ainda não foram elucidados. Embora o Zn seja um cofator enzimático e o segundo metal de transição mais abundante nas plantas, logo após o ferro, os valores de Zn encontrados nos dois genótipos mostraram-se acima dos requeridos pela planta, que se encontram na faixa de 25 a 150 mg Zn/kg de massa seca, conteúdos de Zn acima de 400

mg caracterizam toxicidade (MALIK et al, 2011). Até então, não há trabalhos que mostrem que o chumbo promove a entrada a de zinco nas plantas.

Quanto à inibição do teor de cobre ocasionada por chumbo nos dois genótipos, nos tecidos e tempos estudados, uma possível explicação seria que cobre e chumbo estariam competindo pela entrada nas células através de transportadores de membrana, ou que possivelmente o Pb estaria causando um efluxo do íon Cu, pelo fato do mesmo também ser bivalente (SEREGIN; SHPIGUN; IVANOV, 2004). A absorção ou o efluxo de íons é dependente da espécie vegetal ou do estresse aplicado (GOPAL; RIZVI, 2008). Estudos de Seregin e Ivanov (2001) mostraram que o conteúdo de Cu em raízes de milho, arroz e couve foi reduzido na presença de íons Cd^{2+} . Por outro lado, Paiva et al. (2003) verificou que, em ipê-roxo (*Tabebuia impetiginosa*) a absorção de Cu^{2+} não era inibida por chumbo, mas que o Pb afetava o transporte deste micronutriente até a parte aérea.

O chumbo inibiu as massas secas de raízes, colmos e folhas e a área foliar nos dois genótipos, mostrando perfis semelhantes de inibição. Embora a raiz, dependendo da concentração de Pb, seja a parte geralmente mais afetada (LIU et al., 2008), colmos e folhas também mostraram evidente redução de massa seca. Uma das possíveis explicações para a redução da massa seca e da biomassa em geral pode ser as disfunções nos processos de divisão e alongação celular (MAŁKOWSKI et al., 2002; SAMARDAKIEWICZ; WOŹNY, 2005; YUCEL et al., 2008) por chumbo. Além disso, a planta gastaria mais ATP para combater o estresse do que para sua utilização no crescimento (HU et al., 2012). A quelação de Pb com EDTA facilitou o acesso de Pb às folhas, possivelmente causando inibição da síntese de clorofila e redução da área foliar. Vários trabalhos relatam a inibição de parâmetros de crescimento em plantas (GHANI, 2010; GOPAL; RIZVI, 2008; GUPTA et al., 2009; HUSSAIN et al., 2013; KOPITKE et al., 2007). Ghani et al. (2010) reportaram que a concentração de $90\mu M$ de $Pb(NO_3)_2$ (30 ppm) conseguiu inibir a massa seca dos genótipos de *Zea mays* L. Neelam & Deesi em 57% e 52%, respectivamente. Gupta et al. (2009) constataram que o genótipo de milho BR-3060, com 7 dias de exposição a $200\mu M$ de $Pb(NO_3)_2$ sofreu inibição da massa seca de 40% quando comparado a seu controle. Hussain et al. (2013) constataram que plântulas de *Zea mays* L. tiveram as massas secas de raízes e partes aéreas inibidas em 70 e 90%, respectivamente, numa solução 200 mM de $Pb(NO_3)_2$.

Os parâmetros fisiológicos eficiência quântica do PSII (Φ PSII), taxa de transporte de elétrons no PSII (ETR) e taxa fotossintética líquida (P_n) foram inibidos pelo chumbo de formas distintas nos dois genótipos. 5033 exibiu maior resistência ao Pb com 7 dias, mas ao fim de 14 teve esses parâmetros foram mais inibidos que em 5011. Por outro lado, 5011 mostrou – se bastante afetado já com 7 dias, mas ao fim de 14 dias conseguiu tolerar melhor o estresse, não exibindo redução desses parâmetros como 5033. A eficiência quântica do PSII representa a eficiência na qual a luz absorvida pelo PSII é usada para redução da Quinona A (BAKER, 2008). Desse modo, uma das possíveis explicações para a inibição deste parâmetro é uma possível inibição ou alteração das proteínas LHCII ocasionada pelo chumbo. Além disso, uma redução dos teores de clorofila também poderia reduzir a eficiência quântica do PSII. Kaur et al. (2010) mostraram que plantas de trigo (*Triticum aestivum*) submetidas a uma concentração de $Pb(NO_3)_2$ de até 2,5 mM exibiram inibição de Φ PSII de 36% quando comparadas a seu controle. Hu et al. (2014), ao combinar chuva ácida (redução de pH) e concentrações de acetato de chumbo II de 0,3 a 1,5 mM conseguiam inibir a eficiência quântica de plântulas de soja (*Glycine max*). Wu et al. (2008) demonstraram que elevadas concentrações de $PbCl_2$ (até 2,5 mM) conseguiram inibir a absorção de energia de excitação que seria absorvida por LHCII e transferida ao centro de reação do PSII em plântulas de espinafre. Romanowska et al. (2012), por outro lado, mostraram que folhas de milho tratadas com solução de 5mM de $Pb(NO_3)_2$ mostraram a Φ PSII pouco afetada, com uma inibição de apenas 8%.

A taxa de transporte de elétrons do PSII (ETR) também foi inibida por chumbo. Além de estar relacionada com a Φ PSII, essa redução pode ser explicada pelo fato do chumbo possivelmente inibir o complexo oxidante da água (WOC) no PSII ou mesmo o transporte de elétrons da Quinona A para Quinona B, impedindo assim o fluxo de elétrons no PSII (BELATIK; HOTCHANDANI; CARPENTIER, 2013). Wu et al. (2008) mostraram que em plântulas de espinafre borrifadas com soluções de $PbCl_2$ até 25 mM a fotorredução de DCPIP pelo PSII, e toda a cadeia de transporte de elétrons no PSII (de H_2O a MV) foi fortemente inibida por Pb. Romanowska et al. (2012) mostraram que em tilacóides de células de bainha de milho o transporte de elétrons da água para um aceptor exógeno (DCPIP) foi inibido por Pb, e ao aplicar um doador de elétrons exógeno (DPC) para o DCPIP, verificaram que o transporte de elétrons era

umentado, sugerindo que o transporte de elétrons seja inibido por chumbo no lado doador de elétrons do PSII, o WOC.

A taxa fotossintética (Pn) também apresentou inibição considerável nos dois genótipos. Possíveis explicações para estes resultados são semelhantes às explicações das inibições da Φ PSII e do ETR por chumbo, acarretando uma consequente inibição deste parâmetro (Pn). Stanislawska-Glubiak, Korzeniowska e Kocon (2014) mostraram que plantas de milho em solos contendo metais pesados, dentre eles Pb 10 μ M, apresentavam uma redução da Pn de até 45% em relação ao controle. Romanowska et al. (2006) mostrou que, plantas de ervilha tratadas com 5 mM de Pb(NO₃)₂, em alta e baixa luminosidade, mostravam inibições da Pn de 60% e 80%, respectivamente. Por outro lado, Parys et al. (2014) relataram que folhas de *Armeria marítima* em béqueres contendo de 10 a 20 mM de Pb(NO₃)₂ mostravam uma inibição da Pn de 12%.

A condutância estomática (Gs) foi inibida pelo chumbo. Isso se deve possivelmente à redução dos tamanhos das células estomatais, assim como um possível acúmulo de ABA nestas células (PARYS et al., 1998), fazendo com que o hormônio se ligue a seus receptores e cause o fechamento dos estômatos, reduzindo assim sua condutância. Outra possível explicação seria que o Pb, nas células estomatais, causaria uma disfunção nas aquaporinas ou canais de íons responsáveis pelo movimento estomatal (YANG; ZHANG; WANG, 2004). Kosobrukhov, Knyazeva e Mudrik (2004) relataram que *Plantago major* L. tratadas com concentrações de Pb de 2,25 e 9 mM mostravam inibição da condutância estomática de 27% e 40%, respectivamente. Pereira et al. (2014) mostraram que, plantas de aguapé (*Eichhornia crassipes*) submetidas a concentrações de Pb até 4 mg/L mostravam redução de Gs de até 50% comparadas a seu controle. Por outro lado, Rodriguez et al. (2014) mostraram que plantas de ervilha (*Pisum sativum*) sob concentrações de Pb a 500 e 1000 mg/L exibiram inibições da condutância estomática, de 9% e 15%, respectivamente.

A transpiração também foi inibida por ação do chumbo. Isso pode ser explicado pela inibição da condutância estomática: uma vez que a abertura dos estômatos está comprometida, a troca gasosa seria consequentemente inibida. Rodriguez et al. (2014) em plantas de ervilha (*Pisum sativum*) sob concentrações de Pb a 500 e 1000 mg/L exibiram inibições da transpiração de 16% e 27%, respectivamente. Rossatto

et al. (2012) mostraram que, em *Pluchea sagittalis*, concentrações de Pb de 200 μM e 600 μM conseguiram inibir a transpiração em até 32%, mas curiosamente em 400 μM e 1000 μM a inibição foi de 22%. Pereira et al. (2014) por outro lado, relataram que plantas de aguapé em soluções de Pb de até 4 mg/L mostraram aumento da transpiração de 10%.

A concentração intercelular de CO_2 (Ci), com inibições da condutância estomática e transpiração celular, tenderia a diminuir. Contudo, neste trabalho, a concentração intercelular de CO_2 foi aumentada por ação do Pb. Uma possível explicação para isso seria que a inibição causada por chumbo é de natureza bioquímica, pois este possivelmente estaria inibindo a capacidade carboxilásica da Rubisco, impedindo assim a fixação de CO_2 para a biossíntese de açúcares e consequentemente aumentando a concentração do gás na célula estomática (POURRUT et al., 2011). Kosobrukhov, Knyazeva e Mudrik (2004) constataram inibição na taxa fotossintética (Pn) e na eficiência da carboxilação da Rubisco por Pb de 27% e 38%, respectivamente. Pereira et al. (2014) também registraram um aumento da concentração intercelular de CO_2 em aguapé que se manteve constante em altas concentrações de Pb. Rodriguez et al. (2014) mostraram que, em 1 g/L de Pb, plantas de ervilha mostravam Ci 10% maior que as plantas controle.

No tocante a atividade das enzimas antioxidantes, a superóxido dismutase constitui a primeira linha de defesa contra as EROs, visto que seu substrato é o íon superóxido, uma das mais potentes formas de espécies reativas de oxigênio (GILL; TUTEJA, 2010). A atividade da SOD decaiu com o passar do tempo em raízes, mas em folhas, ela tendeu a aumentar. Isso pode ser explicado pelo excesso de chumbo detectado nas raízes uma vez que todos os cofatores da SOD são íons bivalentes que competem com o chumbo (Cu, Fe, Mn e Zn) e, ou mesmo o aumento excessivo na concentração de Zn nas raízes. Contudo, em folhas, a SOD em ambos os genótipos conseguiu exibir aumento de sua atividade nos dois tempos corroborando com a ideia de que o excesso de chumbo afeta a atividade enzimática da SOD. Isso pode ser explicado pelo fato de que, além de ter acumulado bem menos chumbo que a raiz, as folhas também são responsáveis por processos essenciais ao crescimento e desenvolvimento das plantas, como a fotossíntese. Assim, a SOD pôde exercer sua função normalmente nas folhas. Gupta et al. (2009) relataram que, em plântulas de milho tratadas de 0 a 200 μM de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, a atividade da SOD foi aumentada tanto em raízes como em folhas.

Kaur et al. (2012) mostraram que, em raízes de trigo (*T. aestivum*), a SOD, sob concentração 2,5 mM de $Pb(NO_3)_2$ teve sua atividade aumentada em 223% com relação a seu controle. Reddy et al. (2005) mostraram resultados opostos aos encontrados para SOD neste trabalho: plantas de *Macrotyloma uniflorum* e *Cicer arietinum* L. cv Annogiri, mostraram atividade da SOD aumentada gradativamente conforme a concentração de Pb aumentava (até 2 mM de $Pb(NO_3)_2$ em raízes e folhas).

A ascorbato peroxidase é uma enzima com elevada afinidade para o peróxido e que possui como grupo prostético um grupamento heme. Embora sua inibição possa explicada pelo fato do chumbo bloquear a biossíntese de seu grupamento prostético, comprometendo assim, sua funcionalidade, ela ainda representa uma das principais defesas antioxidantes das plantas. Nos dois genótipos, em raízes, sua atividade foi inibida, enquanto que nas folhas sua atividade foi aumentada. Isso possivelmente se deve ao fato de que a concentração de chumbo na raiz foi mais elevada do que na folha, o que acarretaria uma superprodução de EROs ultrapassando a capacidade antioxidante desta e de outras enzimas antioxidantes agravando os efeitos tóxicos do metal. A APX em folhas mostrou – se eficiente nos dois genótipos mesmo sob a presença de Pb. Pereira et al. (2014) mostraram que, tanto raízes como folhas de aguapé só mostravam variação na atividade da APX a partir de concentrações maiores ou iguais a 2 mg/L de Pb. Em raízes, a atividade da APX foi inibida a partir dessa concentração, e em folhas, aumentada, corroborando com os resultados supracitados. Singh et al. (2010) ao estudarem o potencial bioacumulador de *Najas indica*, verificaram que de 1 a 7 dias, com o aumento das concentrações de Pb variando de 1 para 10 μ M, a APX teve sua atividade inibida. Parys et al. (2014) constataram que folhas excisadas de *A. marítima* submetidas a concentrações de Pb de até 20 mM mostraram redução na atividade da APX de até 33%..

A catalase não teve atividade detectada em presença de chumbo. Uma possível explicação para esse resultado é que como se trata de uma metaloenzima o chumbo poderá substituir seu cofator ocasionando uma inibição de sua atividade (SHARMA; DUBEY, 2005) ou mesmo que o chumbo estaria inibindo, em milho, tanto a atividade da CAT diretamente, como inibindo a biossíntese de seu grupo prostético heme (GILL; TUTEJA, 2010)

CONCLUSÃO

O estresse induzido por metais pesados em plantas bem como o potencial das plantas em fitorremediar o solo ainda são dados pouco elucidados.

Foram realizadas abordagens fisiológicas (medidas de 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) e bioquímicas (avaliação das atividades antioxidante das enzimas SOD, APX e CAT), a fim de se avaliar os efeitos do chumbo em genótipos de milho (*Zea mays* L.) dotados de diferentes graus de tolerância à salinidade, sendo BRS-5033 (tolerante) e BRS-5011(sensível).

Observou – se perfil diferencial de absorção do chumbo. BRS-5011 acumulou pelo menos três vezes mais chumbo nas suas raízes que o genótipo 5033. O teor dos íons Cálcio, Zinco e Cobre em presença de chumbo apresentou um perfil parcialmente diferente entre os genótipos. Os parâmetros fisiológicos avaliados mostraram parcialmente o mesmo perfil. As atividades das enzimas antioxidantes apresentaram perfis semelhantes para BRS-5033 e BRS-5011 salvo os valores das atividades da SOD nas raízes do genótipo BRS-5033 (7dias) que foram significativamente maiores. Ambos os genótipos não revelaram potencial fitorremediador.

Apesar dos genótipos estudados serem reconhecidos por apresentarem diferentes graus de tolerância ao estresse salino não se pode afirmar o mesmo para o chumbo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIMILHO. **O cereal que enriquece a alimentação humana**. Disponível em: <<http://www.abimilho.com.br/milho/cereal>>. Acesso em: 9 set. 2014.
- ALI, H.; KHAN, E.; SAJAD, M. A. Phytoremediation of heavy metals--concepts and applications. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 869–81, maio 2013.
- ALKORTA, I; HERNANDEZ-ALLICA, J.; BECERRIL, J. M.; AMEZAGA, I.; ALBIZU, I.; GARBISU, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. **The European Journal of Mineral Processing and Environmental Protection**, v. 3, n. 1, p. 58–66, 2003.
- ATSDR. **Lead**. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=22>>. Acesso em: 31 ago. 2014.
- AZEVEDO NETO, A. D.; PRISCO, J. T.; ENEAS-FILHO, J.; LACERDA, C. F.; SILVA, J. V.; COSTA, P. H. A.; GOMES-FILHO, E. Effects of salt stress on plant growth , stomatal response and solute accumulation of different maize genotypes. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 16, n. 1, p. 31–38, 2004.
- 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. e68142, jan. 2013.
- BRADFORD, M. D. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248–254, 7 maio 1976.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Cadeia Produtiva do Milho** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria de Política Agrícola, Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura; Pinazza, L. A. (Eds). – Brasília: IICA MAPA/SPA, 108p., 2007.
- 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>. Acesso em: 3 set. 2014.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Atuação para Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Solo Contaminado –Vigisolo. 12.2.

portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/capitulo_12_saudebrasil.pdf, 2007. Acesso em: 6 set. 2014.

CARNEIRO, W. M. A.; SOBRINHO, J. N.; COELHO, M. C. S. G. **Grãos nos cerrados nordestinos: produção, mercado e estruturação das principais cadeias**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2006. 88 p. (Série de documentos do ETENE nº 8).

CENKCI, S.; CIGERCI, I. H.; YILDIZ, M.; ÖZAY, C.; BOZDAG, A.; TERZI, H. 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, Y.; WU, P.; SHAO, Y. YING, Y. Health risk assessment of heavy metals in vegetables grown around battery production area. **Scientia Agricola**, v. 71, n. 2, p. 126–132, 2014.

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.

DONCHEVA, S.; MOUSTAKAS, M.; ANANIEVA, K.; CHAVDAROVA, M.; GESHEVA, E; VASSILEVSKA, R.; MATEEV, P. 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.

DUARTE, J. O. Introdução e importância econômica do milho. In: CRUZ, J. C.; VERSIANI, R. P.; FERREIRA, M. T. R. (Ed.) **Cultivo do Milho**. 2000. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho/importancia.htm>>. Acesso em: 06 de março de 2007.

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.

FRIEDMAN, T.; WESTREICH, M.; LURIE, D. J.; GOLIK, A. Rembrandt – Aging and Sickness: A Combined Look by Plastic Surgeons, an Art Researcher and an Internal Medicine Specialist. **Israel Medical Association Journal**, v. 9, n. February, p. 67–71, 2007.

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, 1 set. 2010.

GHEJU, M.; STELESCU, I. Chelant-assisted phytoextraction and accumulation of Zn by *Zea mays*. **Journal of environmental management**, v. 128, p. 631–6, 15 out. 2013.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p. 315–318, 1977.

GIDLOW, D. A. Lead toxicity. **Occupational Medicine**, v. 54, n. 2, p. 76–81, 1 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. 909–30, dez. 2010.

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.

GOPAL, R.; RIZVI, A. H. Excess lead alters growth, metabolism and translocation of certain nutrients in radish. **Chemosphere**, v. 70, n. 9, p. 1539–44, fev. 2008.

GUPTA, D. K.; NICOLOSO, F. T.; SCHETINGER, M. R. C.; ROSSATO, L. V.; PEREIRA, L. B. CASTRO, G. Y.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R. D. Antioxidant defense mechanism in hydroponically grown Zea mays seedlings under moderate lead stress. **Journal of hazardous materials**, v. 172, n. 1, p. 479–84, 15 dez. 2009.

GUPTA, D. K.; HUANG, H. G.; YANG, X; E.; RAZAFINDRABE, B. H. N.; INOUE, M. 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, 15 maio 2010.

GUSTIN, J. L.; ZANIS, M. J.; SALT, D. E. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 76, jan. 2011.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants . Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, v. 141, n. June, p. 312–322, 2006.

HAMID, N.; BUKHARI, N.; JAWAID, F . 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, jun. 1987.

HU, H.; WANG, L.; LIAO, C.; FAN, C.; ZHOU, Q.; HUANG, X. 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.; SUN, K.; SU, X.; PAN, Y.; ZHANG, Y.; WANG, X. Physiological responses and tolerance mechanisms to Pb in two xerophytes: *Salsola passerina* Bunge and *Chenopodium album* L. **Journal of hazardous materials**, v. 205-206, p. 131–8, 29 fev. 2012.

HUSSAIN, A.; ABBAS, N.; ARSHAD, F.; AKRAM, M.; KHAN, Z. I.; AHMAD, K.; MANSHA, M.; MIRZAEI, F. 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.

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, 30 mar. 2013.

KABATA - PENDIAS, A. **Trace Elements in Soils and Plants - 4th edition**. Fourth ed. Boca Raton, FL: [s.n.]. p. 65–68; 338–349

KAUR, G.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Growth , photosynthetic activity and oxidative stress in wheat (Triticum aestivum) after exposure of lead to soil. **Journal of Environmental Biology**, v. 33, n. March, p. 265–269, 2012.

KAUR, G.; SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. 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, set. 2014.

KHAN, S.; HESHAM, A. E.; QIAO, M.; REHMAN, S.; HE, J. Effects of Cd and Pb on soil microbial community structure and activities. **Environmental science and pollution research international**, v. 17, n. 2, p. 288–96, fev. 2010.

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.

KOPITTKA, P. M.; ASHER, C. J.; KOPITTKA, R. A.; MENZIES, N. W. 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. 86, p. 145–151, 2004.

LENNTech WATER TREATMENT SOLUTIONS. **Lead (Pb) - Chemical properties, Health and Environmental effects**. Disponível em: <<http://www.lenntech.com/periodic/elements/pb.htm>>. Acesso em: 6 nov. 2014.

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.; LI, T.; JIN, X.; YANG, X.; ISLAM, E.; MAHMOOD, Q. 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.

MAESTRI, E.; MARMIROLI, M.; VISIOLI, G.; MARMIROLI, N. Metal tolerance and hyperaccumulation: Costs and trade-offs between traits and environment. **Environmental and Experimental Botany**, v. 68, n. 1, p. 1–13, mar. 2010.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–58, 15 dez. 2005.

MAŁKOWSKI, E.; KITA, A.; GALAS, W.; KAR CZ, W.; KUPERBERG, J. M. 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.

MHAMDI, A.; NOCTOR, G.; BAKER, A. Plant catalases: peroxisomal redox guardians. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 525, n. 2, p. 181–94, 15 set. 2012.

MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; TRIPATHI, R. D.; KUMAR, R.; SETH, C. S.; GUPTA, D. K. 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.

MOHAN, B. S.; HOSETTI, B. B. POTENTIAL PHYTOTOXICITY OF LEAD AND CADMIUM TO LEMNA MINOR GROWN IN SEWAGE STABILIZATION PONDS. **Environmental Pollution**, v. 98, n. 2, p. 233–238, 1998.

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.

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.

OLSEN, L. I.; PALMGREN, M. G. Many rivers to cross: the journey of zinc from soil to seed. **Frontiers in plant science**, v. 5, n. February, p. 30, jan. 2014.

PAES. Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho 75. 2006.

PAIVA, H. N.; CARVALHO, J. N.; SIQUEIRA, J. O.; FERNANDES, A. R.; MIRANDA, J. R. P. INFLUÊNCIA DE DOSES CRESCENTES DE CHUMBO

SOBRE O TEOR E O CONTEÚDO DE NUTRIENTES E Pb EM MUDAS DE IPÊ-ROXO. **Revista Árvore**, v. 27, n. 2, p. 151–158, 2003.

PANDA, S. K.; CHOUDHURY, S. Chromium Toxicity in plants. **Toxic metals in plants**, v. 0, 2004.

PARYS, E.; ROMANOWSKA, E.; SIEDLECKA, M.; POSKUTA, J. W. 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.; WASILEWSKA, W.; SIEDLECKA, M.; ZIENKIEWICZ, M.; DROZAK, A.; ROMANOWSKA, E. Metabolic Responses to Lead of Metallicolous and Nonmetallicolous Populations of *Armeria maritima*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 67, n. 4, p. 565–77, nov. 2014.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, n. 3, p. 199–223, dez. 2004.

PEARCE, J. M. S. Burton's line in lead poisoning. **European neurology**, v. 57, n. 2, p. 118–9, jan. 2007.

PEREIRA, F. J.; CASTRO, E. M.; OLIVEIRA, C.; PIRES, M. F.; PEREIRA, M. P.; RAMOS, S. J.; FAQUIN, W. Lead tolerance of water hyacinth. **Anais da Academia Brasileira de Ciências (Annals of The Brazilian Academy of Sciences)**, v. 86, n. 3, p. 1423–1433, 2014.

POURRUT, B.; PERCHET, G.; SILVESTRE, J.; CECCHI, M.; GUIRESSE, M.; PINELLI, E. 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. 571–9, 18 abr. 2008.

POURRUT, B.; SHAHID, M.; DUMAT, C.; WINTERTON, P.; PINELLI, E. 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.

RANUM, P.; PEÑA-ROSAS, J. P.; GARCIA-CASAL, M. N. Global maize production, utilization, and consumption. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1312, p. 105–12, abr. 2014.

REDDY, A. M.; KUMAR, S. G.; JYOTHSNAKUMARI, G.; THIMMANAIK, S.; SUDHAKAR, C. 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.

RIVA, M. A.; LAFRANCONI, A.; D'ORSO, M. I.; CESANA, G. Lead poisoning: historical aspects of a paradigmatic “occupational and environmental disease”. **Safety and health at work**, v. 3, n. 1, p. 11–6, mar. 2012.

RODRIGUEZ, E.; SANTOS, M. C.; AZEVEDO, R.; CORREIA, C.; MOUTINHO-PEREIRA, J.; OLIVEIRA, J. M. P. F.; DIAS, M. C.; Photosynthesis light-independent reactions are sensitive biomarkers to monitor lead phytotoxicity in a Pb-tolerant *Pisum sativum* cultivar. **Environmental science and pollution research international**, 6 ago. 2014.

ROELFSEMA, M. R. G.; HEDRICH, R. In the light of stomatal opening: new insights into “the Watergate”. **The New phytologist**, v. 167, n. 3, p. 665–91, set. 2005.

ROMANOWSKA, E.; WROBLEWSKA, B.; DROZAK, A.; SIEDLECKA, M. High light intensity protects photosynthetic apparatus of pea plants against exposure to lead. **Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale**, v. 44, n. 5-6, p. 387–94, 2006.

ROMANOWSKA, E.; WASILEWSKA, W.; FRISTEDT, R.; VENER, A. V. 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.; NICOLOSO, F. T.; FARIAS, J. G.; CARGNELLUTI, D.; TABALDI, L. A.; ANTES, F. G.; DRESSLER, V. L.; MORSCH, V. M.; SCHETINGER, M. R. C. 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.

RSC. **Lead - Element information, properties and uses | Periodic Table**. Disponível em: <<http://www.rsc.org/periodic-table/element/82/lead>>. Acesso em: 6 out. 2014.

SAIFULLAH; MEERS, E.; QADIR, M.; CARITAT, P. TACK, F. M. G.; LAING, G. D.; ZIA, M. H. EDTA-assisted Pb phytoextraction. **Chemosphere**, v. 74, n. 10, p. 1279–91, mar. 2009.

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. 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.

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.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead Toxicity in Plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 35–52, 2005.

SHEORAN, V.; SHEORAN, A. S.; POONIA, P. Role of Hyperaccumulators in Phytoextraction of Metals From Contaminated Mining Sites: A Review. **Critical**

Reviews in Environmental Science and Technology, v. 41, n. 2, p. 168–214, 30 dez. 2011.

SHIGEOKA, S.; ISHIKAWA, T.; TAMOI, M.; MIYAGAWA, Y.; TAKEDA, T.; YABUTA, Y.; YOSHIMURA, K. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1305–1319, 2002.

SINGH, R.; TRIPATHI, R. D.; KUMAR, A.; TRIVEDI P. K.; CHAKRABARTY, D. 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.; KHAN, N. A.; NAZAR, R.; ANJUM, N. A. Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram. **American Journal of Plant Physiology**, v. 3, n. 1, p. 25–32, 2008.

SINHA, P.; DUBE, B. K.; SRIVASTAVA, P.; CHATTERJEE, C. 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. **Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry**, v. 19, n. 6, p. 947–60, ago. 2014.

SRB (Sociedade Rural Brasileira) **Agricultura – generalidades criar e plantar – texto milho**. 2001. Disponível em: <<http://criareplantar.com.br/agricultura/milho/milho.php>> acesso em Acesso em: 17 set. 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 international**, 22 out. 2014.

SUTHAR, V.; MEMON, K. S.; MAHMOOD-UL-HASSAN, M. EDTA-enhanced phytoremediation of contaminated calcareous soils: heavy metal bioavailability, extractability, and uptake by maize and sesbania. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 6, p. 3957–68, jun. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, L. *Fisiologia Vegetal* 3a edicao. 2002.

US EPA, S. Human Health and Lead, Addressing Lead at Superfund Sites | Superfund | US Environmental Protection Agency. 2013.

WANG, H.; SHAN, X; WEN, B.; OWENS, G.; FANG, J.; ZHANG, S. 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.

WU, X.; HONG, F.; LIU, C.; SU, M.; ZHENG, L.; GAO, F.; YANG, F. Effects of Pb²⁺ on energy distribution and photochemical activity of spinach chloroplast.

Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, v. 69, n. 3, p. 738–42, mar. 2008.

XIONG, Z.; ZHAO, F.; LI, M. Lead Toxicity in *Brassica pekinensis* Rupr. : Effect on Nitrate Assimilation and Growth. **Wiley InterScience**, p. 147–153, 2006.

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.

YUCEL, E.; HATIPOGLU, A.; SÖZEN, E.; GÜNER, S. T. The effects of the lead (PbCl₂) on mitotic cell division of Anatolian Black Pine. **Biological Diversity and Conservation**, p. 124 – 129, 2008.

ZEITOUNI, C. F. EFICIÊNCIA DE ESPÉCIES VEGETAIS COMO FITOEXTRATORAS DE CÁDMIO , CHUMBO , COBRE , NÍQUEL E ZINCO DE UM DE CÁDMIO , CHUMBO , COBRE , NÍQUEL E ZINCO DE UM. 2003.