



UFPB

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JULYANA PAULA DE FREITAS MARCONE

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *BRASSICA RAPA* L. MEDIANTE À
CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO E O EFEITO DE SUPLEMENTAÇÃO COM
AMINOÁCIDOS: GLUTAMATO, GLICINA E CISTEÍNA**

JOÃO PESSOA

2019

JULYANA PAULA DE FREITAS MARCONE

**DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *BRASSICA RAPA* L. MEDIANTE À
CONCENTRAÇÕES DE CÁDMIO E O EFEITO DE SUPLEMENTAÇÃO COM
AMINOÁCIDOS: GLUTAMATO, GLICINA E CISTEÍNA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador:

Profº. Dr. Luciano Coutinho Silva

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M321d Marcone, Julyana Paula de Freitas.

Desenvolvimento in vitro de Brassica rapa L. mediante à concentrações de cádmio e o efeito de suplementação com aminoácidos: glutamato, glicina e cisteína / Julyana Paula de Freitas Marcone. - João Pessoa, 2019.

59 f. : il.

Orientação: Luciano Coutinho Silva Silva.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

Fitorremediação. 2. Metais pesados. 3. Aminoácidos.
Á Brassica. I. Silva, Luciano Coutinho Silva. II.
Titulo.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e quatro dias do mês de abril de 2019, às 14:00h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Dr. Luciano Coutinho Silva e composta pelas avaliadoras: 1. Profa. Dra. Adna Cristina Barbosa de Sousa (DBCM/CBIOTEC/UFPB); 2. Profa. Dra. Andréa Farias de Almeida (DB/CBIOTEC/UFPB), a discente Julyana Paula de Freitas Marcone, matrícula 11502302, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: “**Desenvolvimento *in vitro* de *Brassica rapa L.* mediante às concentrações de cádmio e o efeito de suplementação com aminoácidos: glutamato, glicina e cisteína**”, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela Aprovação do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente a discente e demais presentes e eu, Luciano Coutinho Silva, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.

Presidente da Banca Examinadora

Avaliador 1

Discente

Avaliador 2

Dedico este trabalho aos meus avós, especialmente ao meu avô que partiu há pouco tempo e sempre terei na memória como uma das principais inspirações da vida. Igualmente, dedico às maiores forças naturais que me conduzem, meus pais e irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, às cinco pessoas que, juntas, são os pilares do meu âmago. Primeiramente, meus extraordinários pais, Cristiane Tomaz e Paulo Marcone, minha maior referência de construção pessoal. Vocês não imaginam minha adoração e gratidão por ser parte de suas almas. Herói e heroína que me fascinam. Obrigada por me ensinar sobre perseverança, destemor e me guiar para ser a mulher que sou hoje.

Ao meu eterno avô Edson Tomaz, por ter estado presente nos principais momentos da minha vida, até mesmo quando eu não sabia que estes seriam tão importantes. Minha referência de estudo, trabalho e um dos grandes incentivadores da minha busca por conhecimento. Á minha amada avó, Socorro Cunha, a personificação de amor que me enche o coração de alegria e meu destemido irmão, Thyago Paulo, uma versão aprimorada de mim a qual admiro cada dia mais. Não há adjetivos suficientes. São vocês que dão todo o suporte necessário para que eu acredite no mundo e na vida. Vocês são a inspiração.

Á minha fonte de serenidade e apoio emocional durante o percurso de finalização de curso, Nathan Mendes. Sua bondade e seu coração puro me inspiram e vão te levar além.

Agradeço ao Centro de Biotecnologia por prover de toda estrutura física para a realização do trabalho, e acima de tudo, por quatro anos de um curso que satisfaz os anseios de uma jovem em sua busca pelo encaixe no mundo. Por despertar a ciência em mim. Sempre levarei tal lugar na memória como um dos momentos mais importantes da minha trajetória.

Pensando nisso, gostaria de agradecer profundamente à todos os professores que passaram por essa jornada e que hoje, me inspiram na vida. Vocês sempre serão lembrados. Em especial à mulheres com as quais tive o privilégio de ter presenciado admiráveis ensinamentos: Andréa Almeida, Flávia Paulino, Sildivane Silva, Fabíola Mendes, Josiane Cruz, Adna Cristina, Maria de Fátima Agra e Juliana Almeida, vocês de alguma forma, me inspiraram a ser quem sou hoje.

Ao professor Luciano Silva, por ter me atendido no primeiro dia de aula, quando já sabia que a área vegetal seria minha direção, e que sempre foi uma fonte serena de

sabedoria, experiência e paciência. Foi um privilégio ser sua orientanda e serei sempre grata.

Á todos os meu colegas de turma e curso que me ensinaram sobre amizade, amor e companheirismo. Com os quais dividi os últimos quatro anos e quero levar para o resto da vida. Em especial, João Gabriel e Matheus Fabião.

Aos colegas e professores que compartilharam materiais e equipamentos dos seus laboratórios, e que me permitiram realizar esse trabalho, principalmente Lucas, Bianca e Vitória. Sem vocês, talvez isso não fosse possível.

“If you cannot be a poet, be the poem.”

RESUMO

Com o avanço das tecnologias e desenvolvimento das cidades, a poluição do ambiente pelas práticas antropogênicas têm degradado de forma geral o habitat ecológico em que nos inserimos. Atividades como mineração, exploração do solo e uso de fertilizantes fez com que a contaminação por metais pesados fosse um tópico de bastante interesse à comunidade científica, principalmente pelo elevado perigo de contaminação humana por elementos tóxicos, como o cádmio. A fitorremediação surge como uma alternativa eficaz para remover as substâncias nocivas do solo e recuperar áreas degradadas, e especialmente o gênero *Brassica* L. têm ganhado visibilidade por possuir características desejáveis para este propósito. Em alguns casos citados na literatura, por exemplo, o Cádmio mostrou uma relação positiva de melhorar características fenotípicas respostas de crescimento ao ambiente. Outrossim, a suplementação do meio com aminoácidos se mostrou positivo em alguns trabalhos, e há a possibilidade de atuarem de forma a auxiliar o processo fitorremediador. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi a avaliação da germinação e desenvolvimento de plântulas de *Brassica rapa* cultivadas *in vitro*, em diferentes concentrações do metal pesado, assim como o efeito do acréscimo de glutamato, glicina e cisteína. Os experimentos foram delineados em oito tratamentos para cada aminoácido separadamente, o meio MS (Murashige e Skoog) era formulado e adicionado a ele as moléculas nitrogenadas em concentrações de 0, 50, 100 e 200 ppm, interrelacionadas com duas concentrações diferentes de cádmio, 50 e 100 ppm. Parâmetros como índice de velocidade de germinação (IVG), número de folhas, altura e peso fresco foram avaliados. A presença de cádmio não inibiu o crescimento ou desenvolvimento das plântulas, e até estimulou em certos casos. Associado com glicina, o tratamento obteve aumento do peso fresco das plântulas. Já com glutamato, o aumento significativo ocorreu no número de folhas e IVG, apesar de o aminoácido isoladamente ter influenciado negativamente o peso fresco e a altura das plântulas. A cisteína, em conclusão, fora a que proporcionou os piores IVGs quando comparada aos outros aminoácidos. Com os resultados, pode-se sugerir o uso de *B. rapa* para fitorremediação, combinada com a adição de glutamato, como adjuvante ao processo de descontaminação do solo.

Palavras-chave: Fitorremediação, metais pesados, cultura de tecidos.

ABSTRACT

While the cities and technologies are developed in modern world, the pollution of the environment by anthropogenic practices has usually degraded the ecological system in which we are inserted. Activities such as mining, soil exploration and the use of fertilizers made heavy metal contamination a topic of great concern in the scientific community, mainly due to the high risk of human contamination by toxic elements such as Cadmium. Phytoremediation emerges as an effective alternative to remove harmful substances from the soil and recover degraded areas, and especially the genus *Brassica* L. have earned visibility because it possess desirable characteristics for the purpose of remediation. In some cases known by literature, for example, cadmium showed a positive relationship of improving phenotypic characteristics of growth responses to the environment. Furthermore, the supplementation of the medium with amino acids was positive in some studies, and there is the possibility of acting in order to assist the phytoremediation process. Therefore, the objective of the work was to evaluate the germination and development of *Brassica rapa* seedlings grown *in vitro* in different heavy metal concentrations, as well as the effect of the addition of glutamate, glycine and cysteine. The experiments were outlined in eight treatments for each amino acid separately, the MS (Murashige and Skoog) medium was formulated and added to the nitrogen-derivated molecules at concentrations of 0, 50, 100 and 200 ppm, interrelated with two different concentrations of cadmium, 50 and 100 ppm. Parameters such as germination speed index (GSI), number of leaves, height and fresh weight were evaluated. The presence of cadmium did not inhibit the growth or development of the seedlings, and even stimulated in certain cases. Associated with glycine, the treatment obtained an increase in the fresh weight of the seedlings. With glutamate, the significant increase occurred in the number of leaves and GSI, although the molecule alone influenced negatively the fresh weight and height of the seedlings. Cysteine, in conclusion, was the one that provided the worst GSI when compared to the other amino acids. With the results, we can suggest the use of *B. rapa* for phytoremediation, combined with the addition of glutamate, as an adjuvant to the soil decontamination process.

Key words: Phytoremediation, heavy metals, tissue culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Brassica rapa</i> L.....	24
Figura 2. Fórmula estrutural da unidade básica das fitoquelatinas.....	28
Figura 3. Sementes de <i>Brassica rapa</i> L. antes e depois da seleção fenotípica.....	31
Figura 4. Design experimental para condução dos ensaios, com suas respectivas concentrações e quantidade de repetições utilizadas para a avaliação	32
Figura 5. Teste de T para fonte de variação cádmio no dia 1	37
Figura 6. Teste de Scott-Knott para o desdobramento de Glutamato em cada nível de cádmio no dia 2.....	38
Figura 7. Teste de T para a fonte de variação cádmio influenciando o número de folhas de <i>Brassica rapa</i> L (A), seguido de uma imagem ilustrativa de plantas da espécie em concentração de 50 ppm do metal (B)	39
Figura 8. Teste de Tukey para a fonte de variação Glutamato influenciando o peso fresco de <i>Brassica rapa</i> L.....	39
Figura 9. Teste de Tukey para a fonte de variação Glutamato influenciando a altura de <i>Brassica rapa</i> L (A), seguido de uma imagem ilustrativa de plantas da espécie em concentração de 0 ppm e 200 ppm do aminoácido, respectivamente (B)	41
Figura 10. Germinação de sementes de <i>Brassica rapa</i> L., quando submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Teste de T para fonte de variação do elemento nos dias 2 (A) e 3 (B)	42
Figura 11. Acompanhamento das fases de Germinação de um <i>Brassica rapa</i> L. durante 4 dias consecutivos, em meio com Cd e Gly	42
Figura 12. Teste de T para peso fresco das espécimes de <i>Brassica rapa</i> L. em diferentes concentrações de cádmio	43
Figura 13. Plântula de <i>Brassica rapa</i> L. em meio com 50 ppm de Cd, de altura média de 25 mm	44

Figura 14. Tratamentos T0 a T7, em ordem crescente da esquerda para direita, com plântulas de *Brassica rapa* L. nos sete tratamentos do design experimental, e variações de desenvolvimento..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de <i>Brassica rapa</i> L. submetidas a diferentes concentrações de Cádmio e Glutamato, em seus respectivos tratamentos.....	36
Tabela 2. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de <i>Brassica rapa</i> L. submetidas a diferentes concentrações de Cádmio e Glicina, em seus respectivos tratamentos.....	41
Tabela 3. Altura (mm) das plântulas de <i>Brassica rapa</i> L. em diferentes concentrações de Cádmio e Glicina	44
Tabela 4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de <i>Brassica rapa</i> L. submetidas a diferentes concentrações de Cádmio e Cisteína, em seus respectivos tratamentos.....	46
Tabela 5. Porcentagem de germinação nos desdobramentos em entre os níveis de Cádmio e de Cisteína em diferentes dias de cultivo	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al	Alumínio
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i> - Adenosina Trifosfato
Cd₂₊	Íon Cádmió
Cr	Cromo
Cu	Cobre
Cu₂₊	Íon Cobre
Cys	<i>Cysteine</i> – Cisteína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i> - Agência De Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GLR	<i>Glutamate Receptor</i> - Receptor de Glutamato
Glu	Glutamato
Gly	<i>Glycine</i> – Glicina
Hg₂₊	Íon Mercurio
ICRs	Regiões de Controle de Imprinting
IVG	Índice De Velocidade de Germinação
K	Potássio
Met	Metionina

Mn²⁺	Íon Manganês
Mo	Molibdênio
MS	Meio Murashige e Skoog
N	Nitrogênio
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Reduzido
Ni²⁺	Íon Níquel
NO₃⁻	Nitrato
NO₂⁻	Nitrito
P	Fósforo
P.A.	Para Análise
Pb	Chumbo
Pb²⁺	Íon Chumbo
PCs	Fitoquelatinas
Se	Selênio
Zn²⁺	Íon Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 FITORREMEDIAÇÃO	18
2.2 METAIS PESADOS.....	19
2.2.1 Cádmio	20
2.3 ESPÉCIES FITORREMEIADORAS	22
2.3.1 <i>Brassica spp</i>	23
2.3.1.1 <i>Brassica rapa L.</i>	24
2.4 AMINOÁCIDOS	25
2.4.1 Glutamato	25
2.4.1.1 Glutamato e metais pesados	26
2.4.2 Glicina	27
2.4.3 Cisteína	29
3 OBJETIVOS	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 LOCAL E PERÍODO	31
4.2 FONTE E TIPO DE EXPLANTES	31
4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS.....	31
4.3.1 Cultivo <i>In Vitro</i>	31
4.3.2 Design Experimental	32
4.4 MEIOS DE CULTURA.....	32
4.5 AMINOÁCIDOS.....	33
4.6 ASSEPSIA DO MATERIAL E INOCULAÇÃO	33
4.7 CONDIÇÕES DO CRESCIMENTO	33
4.8 ANÁLISES DO CULTIVO <i>IN VITRO</i>	34
4.8.1 Índice de Velocidade de Germinação (IVG)	34
4.9 CÁDMIO E DESENVOLVIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>BRASSICA RAPA</i>	34
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

5.1 PROCESSO GERMINATIVO SOB INFLUÊNCIA DE CÁDMIO E AMINOÁCIDOS.....	36
5.2 CÁDMIO <i>VERSUS</i> GLUTAMATO	36
5.2.1 Índice de Velocidade de Germinação.....	36
5.2.2 Número de folhas e peso fresco.....	38
5.2.3 Altura.....	40
5.3 CÁDMIO <i>VERSUS</i> GLICINA	41
5.3.1 Índice de Velocidade de Germinação.....	41
5.3.2 Número de folhas e peso fresco.....	43
5.3.3 Altura.....	44
5.4 CÁDMIO <i>VERSUS</i> CISTEÍNA.....	45
5.4.1 Características fenotípicas	45
5.4.2 Índice de Velocidade de Germinação.....	45
6 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

O meio ambiente sempre foi modificado pelo homem em suas atividades, especialmente após o advento das indústrias e do aumento do poder do consumo das populações (CAMPBELL, 2018). Por outro lado, a poluição cresce junto à ascensão das tecnologias e ao desenvolvimento das cidades.

Quando as consequências das atividades humanas começam a gerar desastres ambientais de proporções gigantescas, a atenção às práticas sustentáveis surge de imediato. A preservação do meio ambiente é uma bandeira levantada por todo o mundo, e está cada vez mais presente nos modelos econômicos, planos de governo, indústrias, comércio e habitações (CLAYTON; RADCLIFFE, 2018). Porém, não apenas uma forma de ajudar a superar um momento de desastre, a sustentabilidade é uma forma de desenvolver o mundo de maneira à olhar para a natureza e a sua volta como aliada, e não como submissa às atividades humanas (IVES *et al.*, 2018). Assim surgiu a fitorremediação: observando como o reino vegetal conseguia “neutralizar” a toxicidade de ambientes contaminados, e analisando como esse processo natural poderia ajudar a humanidade (PETERSON, 1971).

O Cádmió é um dos metais pesados mais perigosos e tóxicos que tem-se conhecimento. Atividades antropogênicas como mineração, uso de fertilizantes e manutenção inadequada dos solos contribui para a aproximação do elemento com o homem, assim como a ameaça à sua saúde (MARET; MOULIS, 2013).

Espécies do gênero Brassica já se mostraram vantajosas no uso para a fitorremediação, devido à sua variedade de espécies com características de bioacumulação e fitoextração de metais em solos contaminados (EBBS; KOCHIAN, 1997. GUPTA; SINHA, 2007. SHAHEEN; RINKLEBE, 2015).

Diversos trabalhos associam os aminoácidos Glicina, Glutamato e Cisteína como protetores de membrana celular, agentes quelantes, sequestradores de metais pesados, indutores de tolerância e uma gama diversa de atuações protetoras à plantas e sua contaminação com metais pesados (ZHANG; WAN; ZHONG, 2014. DOUMETT, 2008. YAN *et al.*, 2017). O protetivo é uma consequência dos papéis que cada aminoácido desempenha fisiologicamente no reino vegetal, e como ele se relaciona com as condições de estresse biótico e abiótico. Essas moléculas participam da assimilação de nitrogênio,

compõem fitoquelatinas, além de terem papel essencial na assimilação de compostos inorgânicos e síntese proteica (ZHU *et al.*, 2018. MELENDEZ *et al.*, 2012. KREDICH, 2008).

Ao analisar a potencialidade do gênero *Brassica* como agente fitorremediador, e o papel dos aminoácidos como adjuvantes a esse processo, o objetivo do trabalho foi analisar o crescimento de *Brassica rapa* L. em meio com Cádmiio, e os possíveis efeitos de três aminoácidos: glutamato, glicina e cisteína na sua germinação e desenvolvimento.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 FITORREMEDIAÇÃO

Em 1971 nasce a visão de que plantas podiam acumular diversos elementos em níveis diferentes, inclusive metais pesados (PETERSON, 1971). Surge então, a inspiração para a fitorremediação: através da observação da endemia de plantas superiores em solos naturalmente mineralizados (RODRÍGUEZ *et al.*, 2007).

A fitorremediação surge como uma tecnologia relativamente barata e eficaz para a restauração de solos com presença de metais pesados. A capacidade remediadora das plantas utilizadas em suas diferentes modalidades, pode consistir no potencial da planta em extrair do solo o contaminante, e acumulá-lo em sua própria matéria seca, e há a possibilidade de ser feita por espécies selvagens ou cultivadas (MCINTYRE, 2003).

Entre as vantagens da fitorremediação, podemos destacar o baixo custo, possibilidade de aplicação *in situ* em áreas extensas e para diferentes tipos de poluentes, assim como a fácil monitorização das plantas, manutenção do solo e estímulo à vida dos organismos, possibilidade de ser combinada a outros métodos de descontaminação. (VASCONCELLOS *et al.*, 2012. SILVA *et al.*, 2019)

A fitorremediação é uma alternativa eficaz para descontaminação de áreas poluídas e ainda permite que as plantas sejam difundidas no ambiente, gerando mais áreas verdes, habitat para insetos e polinizadores, geração de oxigênio pela fotossíntese e ameniza ou até mesmo despolui totalmente áreas contaminadas, além de ter como principal fonte de energia a luz solar.

Ao se desenvolver a técnica de fitorremediação, foi observado os principais mecanismos que podem ser utilizados com as plantas para a extração de contaminantes do solo, e estes podem ser: fitoextração, quando os metais pesados são absorvidos e ficam acumulados nos tecidos vegetais; fitoadsorção, quando os contaminantes ficam acumulados especificamente no sistema radicular; fitoestabilização, quando compostos são liberados para o solo e agem como atores de imobilização de metais pesados; e ainda, a rizorremediação, que se utiliza de microorganismos que se encontram normalmente no sistema solo-raiz como agentes biorremediadores (ESTRELA; CHAVES; SILVA, 2018).

Segundo a Agência de Proteção do Meio Ambiente (U.S. Environmental Protection Agency – EPA, 2000), tem-se ainda a fitovolatilização, que consiste na capacidade da planta de captação e transpiração de um contaminante para a atmosfera;

controle hidráulico ou fitohidráulico, que é definido como a absorção de água contaminada do subsolo para que fiquem retidos em uma área (tendo a espécie um papel então de controlar a migração dos contaminantes); e por último, a utilização de espécies como cobertura vegetativa, apresentada como um sistema de plantas em crescimento sobre materiais que apresentam risco ambiental. A presença de tal cobertura pode reduzir os riscos desses materiais para um nível aceitável (VASCONCELLOS *et al.*, 2012).

A planta escolhida, por sua vez, deve possuir determinadas características como uma boa capacidade de absorção, sistema radicular profundo, acelerada taxa de crescimento, fácil colheita e que apresente uma grande resistência ao poluente (COUTINHO; BARBOSA, 2007).

O contínuo desenvolvimento dos países exige urgência para a limpeza de locais contaminados, o que inspira soluções ambientais, sustentáveis, econômicas e inovadoras (MCINTYRE, 2003). Com essas perspectivas, espera-se que a fitorremediação seja uma tecnologia comercialmente viável no futuro próximo (MAHAR *et al.*, 2016; MACEK; MACKOVA, 2000).

2.2 METAIS PESADOS

Os metais pesados são um dos principais fatores que causam a contaminação de solo e problemas de poluição ambiental. Na maioria das vezes, esses elementos estão presentes nos solos, em concentrações ou formas que não oferecem risco para o ambiente. No entanto, são as atividades antropogênicas como: agricultura, uso de pesticidas e biocidas, água de irrigação contaminada, produção e queima de combustíveis, incineração de resíduos, mineração, despejo de resíduos industriais e saneamento urbano (depósitos de lodo de esgoto), que podem causar a deposição e acúmulo desses metais em níveis tóxicos. Esses elementos além de se expressar nas plantas, podem ser diretamente poluente aos organismos do solo, além de existir a possibilidade de transferência para a cadeia alimentar, se for consumida, e contaminação das águas (SILVA, 2007).

A definição de metais pesados envolve suas características químicas, e são apresentados como elementos com densidade relativa maior que 5 g/cm^3 , ou número atômico maior que 20, e nessa categoria podem ser incluídos metais, semimetais e não metais. O último é definido como não-metal por estar presentes em rochas e em áreas com adição de rejeitos industriais, biossólidos e alguns agroquímicos em grandes

quantidades, mesmo não sendo necessariamente um metal de origem biológica (ESTRELA; CHAVES; SILVA, 2018). Os metais pesados são quimicamente definidos como um grupo de elementos situados entre o cobre (Cu) e o chumbo (Pb) na tabela periódica (ROCHA, 2009). Tais elementos são facilmente encontrados na superfície terrestre, e podem ser classificados como litogênicos quando provêm de fontes geológicas, constituindo cerca de 1% das rochas, ou antropogênico, quando provenientes de atividades resultantes da ação humana (CAMARGO *et al.*, 2001. ESTRELA; CHAVES; SILVA, 2018).

Os elementos que mais causam problemas de contaminação são: cádmio (Cd^{2+}), chumbo (Pb^{2+}), níquel (Ni^{2+}), zinco (Zn^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e manganês (Mn^{2+}) (COSTA *et al.*, 2004). Mesmo em pequenas cidades, onde não existem indústrias siderúrgicas ou atividades de mineração, áreas contaminadas especialmente por metais pesados podem ser encontradas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Alguns metais como Zn^{2+} e Cu^{2+} são necessários para o crescimento e desenvolvimento de plantas, porém em excesso, podem produzir sintomas tóxicos e a inibição do seu crescimento. (COUTINHO; BARBOSA, 2007).

2.2.1 Cádmio (Cd^{2+})

Segundo a mitologia grega, Cadmo foi um lendário herói fundador da cidade grega de Tebas e introdutor do alfabeto fenício na Grécia. Cadmo tornou-se rei de Tebas e seu reinado foi longo e próspero. Consta que ele civilizou a Beócia e ensinou aos gregos o uso da escrita. Embora Tebas tenha prosperado sob o reinado de Cadmo, o infortúnio sobrepujou seus descendentes. Na sua velhice, duas de suas filhas e dois de seus netos foram mortos violentamente. Viveu ainda algum tempo e, no final da vida, foi transformado pelos deuses em serpente, juntamente com sua esposa (SECRETARIA DA EDUCAÇÃO DO PARANÁ, 2019). É essa mistura mitológica de glória e lúgubre que ilustra um dos elementos mais fascinantes e ao mesmo tempo mais tóxicos da tabela periódica, o cádmio.

O Cádmio está entre o zinco (Zn^{+2}) e o mercúrio (Hg^{+2}), situado no grupo 12 da Tabela Periódica. Descoberto por dois químicos em 1817, acredita-se que esteja distribuído em cerca de 0,1 a 0,5 ppm na crosta terrestre (MARET; MOULIS, 2013), ou cerca de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ (TCHOUNWOU *et al.*, 2012). O Cd^{2+} puro é um metal macio branco prateado, encontrado na crosta terrestre, associado a zinco, chumbo (Pb^{2+}) e minérios de

cobre (Cu^{2+}), sendo o mais alto nível de compostos do elemento no ambiente, acumulado em rochas sedimentares. Suas formas solúveis em água são cloreto e sulfato de cádmio (ASHIZAWA *et al.*, 2008). Comercialmente, o metal em questão é usado como pigmento amarelo quando combinado com calcogenetos, como agente anticorrosivo, material de eletrodo em baterias e como semicondutor em células solares (TCHOUNWOU *et al.*, 2012).

Atividades como mineração, fundição e uso industrial aumentaram a disponibilidade no meio ambiente, e fontes antropogênicas são a ameaça mais significativa para a saúde humana. Uso de fertilizantes fosfatados e lodo de esgoto e manutenção inadequada dos solos contribui para a mobilização do cádmio no ambiente e acumulação nas culturas. (MARET; MOULIS, 2013)

Uma ingestão única de alto nível do elemento tóxico, pode causar sintomas como dor abdominal, sensação de queimação, náusea, vômito, salivação, câibras musculares, vertigem, choque, perda de consciência e convulsões, que geralmente aparecem dentro de 15 a 30 minutos (BASELT, 2000).

Quando se trata de sistema renal, a sensibilidade do rim ao cádmio está relacionada à sua distribuição no corpo e sua ligação com proteínas no sangue, sendo assim facilmente filtrado e reabsorvido no túbulo proximal. Exposição aguda por inalação a cádmio em concentrações superiores a 5 mg/m^3 pode causar edema pulmonar, traqueobronquite e pneumonite em humanos e animais, além de resultar em comprometimento da função respiratória à longo prazo (ASHIZAWA *et al.*, 2008).

Estudos recentes demonstraram que o metal tóxico aqui estudado tem afinidade por regiões de controle de imprinting (ICRs), sugerindo que alterações epigenéticas podem contribuir para a etiologia das doenças associadas à sua toxicidade (COWLEY *et al.*, 2018). No Japão, áreas contaminadas com cádmio por atividades de mineração, deixaram várias vítimas da doença *itai-itai*, que atinge os ossos e causa facilidade de fraturas e malformação dos mesmos (HIMENO; AOSHIMA, 2019). Este elemento também foi descrito como hepatotóxico e potencialmente carcinogênico em quantidades elevadas no organismo, além de diminuir a viabilidade celular quando exposto aos tecidos estudados (XUE *et al.*, 2017). O cádmio também se mostrou tóxico ao sistema gastrointestinal. Proteínas associadas com junções de adesão são os primeiros alvos do elemento no sistema. Além disso, os genes envolvidos na formação de células dessa categoria são mais sensíveis à influência desta substância (RUSANOV *et al.*, 2015).

Embora os mecanismos de toxicidade do Cádmiio sejam pouco compreendidos, especulou-se que ele cause danos às células primariamente através da geração de EROs, o que causa injúrias ao DNA e interrompe a síntese de ácidos nucléicos e proteínas (SKIPPER *et al.*, 2016. TCHOUNWOU *et al.*, 2012).

2.3 ESPÉCIES FITORREMEIADORAS

Grande parte do sucesso da fitorremediação foi atribuído à habilidade das plantas selecionadas crescerem e neutralizarem as concentrações de metais pesados e contaminantes no solo, de forma eficiente.

Dois tipos de plantas tem sido muito utilizadas para esse processo: as hiperacumuladoras e as que apresentam alta produção e biomassa (ESTRELA; CHAVES; SILVA, 2018).

As hiperacumuladoras, com excepcional capacidade natural de acumulação de metal, como o mamoneiro (*Ricinus communis L.*), são caracterizadas como específicas em acumular e/ou tolerar concentrações elevadas de metais pesados em seus tecidos, como, por exemplo: 10.000 mg kg⁻¹ de zinco e manganês; 1.000 mg kg⁻¹ de chumbo e cobre; 100 mg kg⁻¹ de cádmio (DOS SANTOS *et al.*, 2012. ESTRELA; CHAVES; SILVA, 2018). No entanto, a maioria das plantas identificadas como hiperacumuladoras de metais possui uma baixa produção de biomassa (GONZAGA *et al.*, 2008. ESTRELA; CHAVES; SILVA, 2018).

O segundo tipo mais utilizado são as plantas que demonstram uma alta produção de biomassa, a exemplo de milho (*Zea mays*) e mostarda da Índia (*Brassica juncea*). Em estudos com *Brassica juncea*, foi avaliado o efeito de alterações orgânicas sobre estabilização de metais e do potencial de fitoestabilização de solos, e a espécie se apresentou eficaz para a estabilização de metais no ambiente terrestre, utilizando o mecanismo de aumento da sua matéria orgânica (PÉREZ-ESTEBAN *et al.*, 2013)

Plantas com esse tipo de comportamento, segundo os cientistas, apresentam o perfil de fitoestabilizadoras. Na fitoestabilização ocorre a imobilização de um contaminante através das reações de absorção e acumulação, adsorção e/ou precipitação na zona das raízes visando reduzir a biodisponibilidade desses contaminantes e prevenir sua mobilidade nas águas subterrâneas (SILVA *et al.*, 2019).

Algumas plantas são eficientes no que diz respeito à acumulação de metais, tais como: mostarda (*Brassica hirta*), girassol (*Helianthus annuus*), bambu (*Phyllostachys praecox*), suculentas (*Sedum plumbizincicola*), milho (*Zea mays*), amendoim (*Arachis hypogaea*), brócolis (*Brassica oleracea*), entre outras (BIAN *et al.*, 2018; KOŠNÁŘ *et al.*, 2018; EZE *et al.*, 2018; RIZWAN *et al.*, 2018. CHAUHAN; MATHUR, 2018).

2.3.1 *Brassica spp.*

O gênero *Brassica* é um dos 365 gêneros da família Brassicaceae, que possui mais de 3.200 espécies, incluindo culturas como couve-flor (*Brassica oleracea*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), brócolis (*Brassica oleracea* var. *Italica*), mostarda (*Brassica juncea* e *Brassica hirta*), nabo (*Brassica rapa* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.), ervas daninhas (*Capsella*, *Lepidium*, *Sisymbrium* e *Thlaspi*), plantas ornamentais (*Hesperis*, *Lobularia* e *Matthiola*) e o famoso organismo modelo para plantas com flores *Arabidopsis thaliana* (COUVREUR *et al.*, 2009). É o gênero economicamente mais importante dentro da tribo Brassiceae, contendo 37 espécies diferentes (GÓMEZ-CAMPO *et al.*, 1980). Muitas espécies de culturas fornecem raízes comestíveis, folhas, caules, brotos, flores e sementes. (RAKOW, 2004). A canola (*Brassica napus*), por exemplo, é a terceira oleaginosa mais produzida no mundo, e o Brasil é um dos grandes produtores de seus grãos ricos em óleo de excelente qualidade. (ESTEVEZ *et al.*, 2014).

As espécies do gênero *Brassica* vêm sendo utilizadas como ferramenta para a fitorremediação com uma ascendente atenção dos pesquisadores. Ebbs e Kochian (1997) utilizaram três espécies de *Brassica*: *B. juncea*, *B. rapa* e *B. napus* para avaliar a sua tolerância à Zinco e Cobre. Foi observado que em termos de redução de biomassa e densidade de raízes, todas as três espécies obtiveram consideráveis níveis de tolerância, sendo *B. juncea* a espécie com melhores resultados, e em termos de remoção de Zinco do ambiente, os resultados foram igualmente altos e positivos para as três espécies.

Gupta e Sinha (2007), utilizaram *B. juncea* para a extração de solos contaminados com efluentes de curtume, na Índia, e observaram que cádmio e zinco apresentaram altas cargas em seu material vegetal, além de haver a translocação da maioria dos metais testados (Pb, Mn, Cd, Ni, Fe) para a parte aérea da planta.

Shaheen e Rinklebe (2015) testaram diferentes concentrações de metais pesados em diferentes vegetais, e a mostarda indiana, *B. juncea*, apresentou a maior eficiência de fitoextração de alumínio (Al), cromo (Cr), molibdênio (Mo) e selênio (Se). A bioconcentração de contaminantes indicaram a adequabilidade da *B. juncea*, *B. napus* e *H. annuus*, o girassol, plantas estudadas para a fitoextração.

Pertencente à família Brassicaceae, *Thlaspi caerulescens* mostrou grande potencial de extração de cádmio e contaminantes do solo, como demonstrado em estudos de Su, Jiang e Li (2018) e Lombi *et al.* (2000), onde a concentração deste elemento em plantas e a eficiência da fitoextração aumentou com a duração prolongada do seu crescimento.

2.3.1.1 *Brassica rapa* L.

Brassica rapa L. é um vegetal, conhecida popularmente como nabo ou nabo-forrageiro. É uma planta que produz raiz e folhas comestíveis, sendo a sua raiz mais consumida que as folhas. Possui fonte de fibras e sais minerais, principalmente cálcio (GONDIM, 2010).

A espécie é uma planta herbácea anual ou bianual de altura de folhas em torno de 35 cm. Suas folhas são verdes, sem tricomas, recortadas e amplexicaules. As flores são amarelas e os frutos são do tipo síliquas (**Figura 1**) (GONDIM, 2010).

Figura 1 - *Brassica rapa* L. Fonte: autoral.



Acredita-se geralmente que *B. rapa* tenha se originado das terras altas perto do Mar Mediterrâneo (TSUNODA, 1980), devido ao fato dessa região apresentar clima frio, e a espécie exibir rápido crescimento vegetativo sob condições de baixa temperatura (RAKOW, 2004).

No Brasil, há ocorrências na Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e se distribui no Nordeste (Piauí), Centro-Oeste (Distrito Federal), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e principalmente no Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) devido ao clima favorável ao seu cultivo (SOUZA, 2015).

Ensaio precedentes com a espécie já foram realizados, e fora observada um potencial satisfatório para ser utilizada como fitorremediadora sob níveis moderados de cádmio, *In vitro* (FAUSTINO, 2016. BEZERRA, 2017).

2.4 AMINOÁCIDOS

2.4.1 Glutamato

O nitrogênio é um elemento essencial para o reino vegetal. Sua assimilação permite a nutrição, síntese proteica, formação enzimática, e sobretudo, compõe o material genético desses seres. Ele está abundantemente presente no solo, mas em forma orgânica, como em resíduos vegetais, animais ou fertilizantes artificiais, de tais formas, não diretamente disponíveis para as plantas (TEMPLE *et al*, 1998).

As plantas são capazes de absorver rapidamente o nitrato (NO_3^-) do solo, reduzindo-o para nitrito (NO_2^-), onde por sua vez, é transformado em amônio pela enzima Nitrito Redutase (MIFLIN; HABASH, 2002).

O amônio, em grandes quantidades pode ser tóxico para as plantas, e geralmente resulta em mudanças de pH entre as organelas do tecido vegetal. As células entretanto, desenvolveram métodos para a conversão do amônio em aminoácidos, reduzindo sua toxicidade. Esse processo envolve duas enzimas, a glutamina sintetase e a glutamato sintase (SUZUKI; KNAFF, 2005). Glutamato e Glutamina, servem como doadores de N na biossíntese de todos os aminoácidos essenciais e outros compostos contendo nitrogênio (ZHU *et al.*, 2018).

Os estudos acerca da importância do glutamato na vida animal, remontam há mais de 50 anos, com os trabalhos de Hayashi, em 1954. Além da sua importância na assimilação do nitrogênio, o glutamato também desempenha outros papéis. A percepção de sinais do ambiente sua transdução é essencial para a vida em todos os reinos, principalmente para as plantas. O glutamato faz parte do processo de sinalização para defesa no reino *Plantae*. Essa sinalização ocorre por meio dos receptores de glutamato (GLR), uma família canais iônicos permeáveis a cátions que funcionam desde defesa, até o crescimento de raízes (TOYOTA *et al.*, 2018).

Apesar do exemplo de estudos em mamíferos, apenas em 1998, a partir dos estudos de Lam *et al.* fora descoberto que as plantas possuem uma família de genes semelhantes ao receptor de glutamato, o GLR (FORDE, 2014). A finalização do projeto genoma em *Arabidopsis thaliana* revelou cerca de 600 genes previstos para codificar proteínas de transporte de membrana, e 20 homólogos aparentes de GLR.

2.4.1.1 Glutamato e metais pesados.

A presença de metais pesados no ambiente pode ser um fator determinante para a sobrevivência das plantas, e na maioria dos casos, é limitante. Em trabalhos anteriores, fora observado que a glutamina sintetase e a NADH-glutamato desidrogenase foram inibidas após uma hora de exposição à metais pesados, ambas as enzimas participam do processo de assimilação do nitrogênio (BURZYŃSKI; BUCZEK, 1998).

A associação de glutamato com nitrogênio em solos contaminados, já se mostrou eficiente para aliviar a toxicidade de cádmio para plantas de *Populus* (ZHANG; WAN; ZHONG, 2014). Isso porquê a síntese de glutamato requer nitrogênio, e o glutamato atua como fator essencial na síntese de glutatona, que tem um importante papel na desintoxicação do metal em plantas, transportando-o para vacúolos.

Em trabalhos com *Paulownia tomentosa*, plantas tratadas com glutamato tiveram peso seco maior do que as plantas não tratadas, e a área da folha foi consideravelmente maior do que os outros, indicando-o como forte adjuvante para a remediação de solos contaminados e para a manutenção da viabilidade e crescimento da planta nesses ambientes (DOUMETT, 2008). Além disso, a presença de glutamato diminuiu a biodisponibilidade de metais pesados no solo, evidenciando uma forte ligação com os contaminantes, permitindo um valor médio de acúmulo de metal nas raízes três vezes maior do que os controles não tratados (DOUMETT *et al.*, 2010).

O glutamato também tem importância enzimática. D1-pirrolina-5-carboxilato sintetase, é uma enzima que converte o aminoácido em prolina-5-carboxilato, e tem ação de glutamato quinase e glutamyl fosfato redutase. A atividade como quinase catalisa o primeiro passo da biossíntese de prolina (GIRIJA *et al.*, 2002).

Em um estudo, a presença de metais pesados (Cd e Zn) influenciou na diminuição significativa de glutamato quinase, quando comparadas com tratamentos controle. Esse declínio afetou diretamente o metabolismo vegetal das espécies, com efeitos em degradação de proteínas, indução de estresse oxidativo, perda de atividades fotossintéticas e hidrólise de substâncias que se acumulam durante o período de crescimento (PAVLÍKOVÁ *et al.*, 2008).

Sintetizado a partir do glutamato, a prolina é um aminoácido de ação dissipativa de elétrons, estabilizador de macromoléculas e um componente da parede celular (MATYSIK *et al.*, 2002), e é frequentemente encontrada em maiores níveis em plantas que são expostas a estresses abióticos, além de estar relacionada com o aumento de tolerância dessas espécies vegetais aos metais pesados as quais são expostas (SHARMA; DIETZ, 2006).

2.4.2 Glicina

Nas plantas, a glicina é convertida em serina através da fotorrespiração, uma via alternativa de respiração que faz parte do ciclo do glicolato. Através de uma reação catalisada pela enzima glicina descarboxilase, a glicina torna-se a principal fonte de NADH mitocondrial para posterior produção de ATP (NELSON; COX, 2004).

Em épocas e situações de estresse ambiental, como temperaturas extremas, secas, salinidade, alta radiação solar e presença de metais pesados, a glicina é um dos principais osmólitos orgânicos que se acumulam nos tecidos vegetais. Além disso, possui efeitos positivos na proteção da integridade de enzimas e membranas (ASHRAF; FOOLAD, 2007).

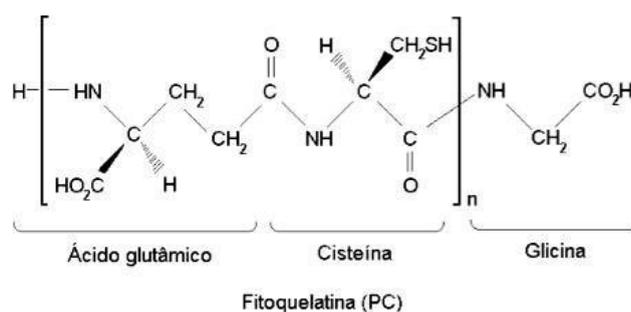
O mecanismo responsável pelo aumento da tolerância relacionado com a presença de glicina, talvez seja a fitoquelatização. Isto porque ao entrar nos tecidos vegetais, o cádmio é ligado a quelantes e sequestrado para o vacúolo (GUIMARÃES, 2008).

Trabalhos já demonstraram que a exposição ao cádmio em espécies do gênero *Brassica* provocou a formação de fitoquelatinas, e isso foi essencial para uma indução

relativamente maior de acúmulo do elemento nas raízes e maior tolerância ao metal (YAN *et al.*, 2017).

As fitoquelatinas (**Figura 2**) são pequenos peptídeos, formados por três aminoácidos: glutamato, cisteína e glicina (MELENDEZ *et al.*, 2012). A estrutura geral das fitoquelatinas é representada pela forma oligomérica da glutathione, possuindo a recorrência do dipeptídeo γ -glutamato (Glu) - cisteína (Cys), seguido por uma glicina (Gly) (AHMAD *et al.*, 2019). A síntese de fitoquelatinas é induzida dentro de poucos minutos após exposição a metais ou metalóides, sendo que o cádmio é o indutor mais forte desta acumulação (GUIMARÃES *et al.*, 2008).

Figura 2. Fórmula estrutural da unidade básica das fitoquelatinas. **Fonte:** Melendez (2012).



A metionina e o glutamato são sintetizados a partir de intermediários do ciclo de Krebs, e a glicina é produzida a partir de um intermediário da glicólise, o 3-fosfoglicerato (TAIZ; ZEIGER, 2017). Sendo a glicina produzida pela glicólise, sua síntese antecederá a síntese de metionina e glutamato, já que a glicólise antecede o Ciclo de Krebs. Assim, uma suplementação exógena do aminoácido pode favorecer positivamente no aumento do potencial antioxidante do meio submetido à um metal pesado.

2.4.3 Cisteína

A cisteína é um dos aminoácidos componentes das proteínas dos seres vivos. A síntese de L-cisteína, seu enantiômero, é um importante mecanismo que permite que o enxofre inorgânico seja incorporado em compostos orgânicos. Em plantas, o sulfato inorgânico, é absorvido e reduzido a sulfeto, que é então incorporado em L-cisteína em uma etapa que é equivalente à fixação de amônia em glutamina ou glutamato. A L-cisteína, como molécula livre, pode ser usada para a síntese de proteínas e glutathione (KREDICH, 2008).

Os organismos superiores respondem à presença de metais pesados com a produção de peptídeos que podem sequestrá-los e transformá-los em formas biologicamente inativas. Esses peptídeos são ricos em cisteína, como glutatona, fitoquelatinas e metalotioneínas, que se ligam aos metais (BAE *et al.*, 2000). A glutatona é um tripeptídeo considerado o principal agente antioxidante móvel em tecidos vegetais, eliminando radicais livres induzidos pela presença de metais pesados nas células, como o cádmio (KOTRBA *et al.*, 2009).

Um outro fator desencadeado pelo estresse causado por contaminação de metais pesados, é a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's). Um mecanismo utilizado pelas plantas para detectar ERO's é pela modificação de proteínas em resíduos específicos de cisteína (Cys) e metionina (Met) (WASZCZAK *et al.*, 2015).

Proteases derivadas de Cisteína têm um papel fundamental na degradação, reconstrução e remoção de proteínas em resposta a diferentes estímulos externos, como estresses ambientais. Pode somar até 30% na atividade proteolítica total em órgãos maduros vegetais (GRUDKOWSKA; ZAGDANSKA, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral foi analisar a germinação e o desenvolvimento *in vitro* da espécie *Brassica rapa* L. na presença de cádmio e os possíveis efeitos atenuantes desse estresse pela adição de aminoácidos no meio de cultura.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desenvolvimento de *B. rapa* L. em presença de cádmio, pelos parâmetros de germinação, peso fresco, altura de plântula e número de folhas.
- Avaliar a influência ou efeitos da adição de três aminoácidos no crescimento das espécies, e sua interação com o metal pesado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

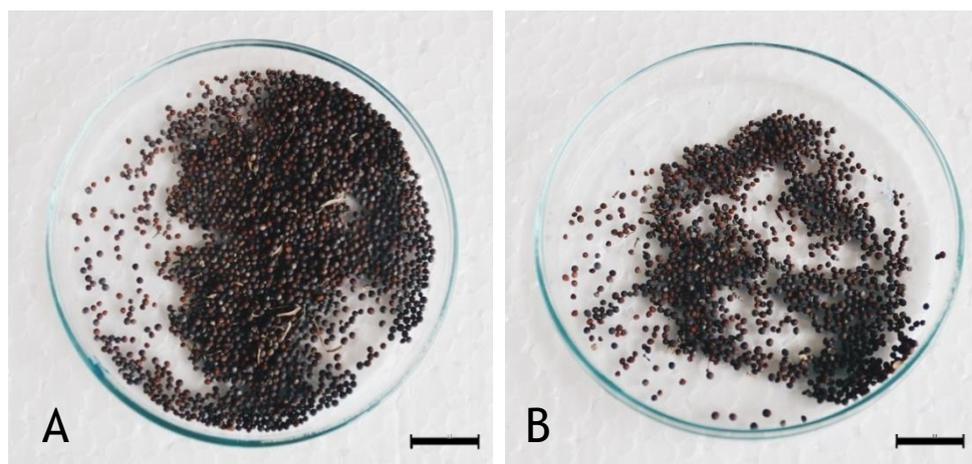
4.1 LOCAL E PERÍODO

O presente trabalho foi conduzido e acompanhado no Laboratório de Fisiologia do Cultivo *In vitro* e da Criopreservação de Plantas (LAFICC), localizado no Centro de Biotecnologia, *Campus* I da Universidade Federal da Paraíba e o período de experimentação se estendeu de novembro de 2018 à abril de 2019.

4.2 FONTE E TIPO DE EXPLANTES

O material vegetal utilizado nos ensaios foram sementes da espécie *Brassica rapa* L., obtidas no município de Estiva, localizada no estado de Minas Gerais. Para a utilização nos ensaios, as sementes foram selecionadas, seguindo os critérios de melhor característica fenotípica: cor, volume e estado do seu envoltório protetor (**Figura 3**).

Figura 3. Sementes de *B. rapa* L. antes (A) e depois (B) da seleção fenotípica, respectivamente. Barra: 1cm. Fonte: Autoral



4.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

4.3.1 Cultivo *In vitro*

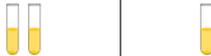
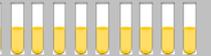
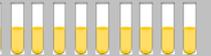
Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio, de vidro, com 15 cm de altura, 2 cm de diâmetro e capacidade para 100 ml. As tampas utilizadas para vedar os

tubos eram constituídas de polipropileno. Todos os experimentos foram executados em uma câmara de fluxo laminar horizontal.

4.3.2 Design experimental

O experimento foi dividido em três ensaios com diferentes aminoácidos: glicina, glutamato e cisteína com diferentes concentrações (0; 50; 100 e 200 ppm), todos combinados com duas concentrações e cádmio (50 e 100ppm) (**Figura 4**). As concentrações de cádmio e aminoácidos foram escolhidas baseada em resultados de trabalhos anteriores, realizados no LAFICC (FAUSTINO, 2016. BEZERRA, 2017). O ensaio foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado com 10 repetições para cada tratamento.

Figura 4. Design experimental para condução dos ensaios, com suas respectivas concentrações e quantidade de repetições utilizadas para a avaliação.

		Cádmio	
		50 ppm	100 ppm
Aminoácido	0 ppm	T0 	T1 
	50 ppm	T2 	T3 
	100 ppm	T4 	T5 
	200 ppm	T6 	T7 

4.4 MEIOS DE CULTURA

Para os experimentos foi utilizado o meio de cultura MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) modificado, onde os nitratos de amônia e de potássio foram substituídos pelo produto comercial Kristalon com concentrações de 15% de N, 5% de P e 30% de K. Segundo o protocolo convencional de preparação do meio MS, os sais são diluídos em água destilada, e fora adicionado 30g.L⁻¹ de sacarose. O pH foi ajustado para 5,8 utilizando o ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH) a 1 mol/L para possíveis correções.

O volume de meio adicionado em cada tubo de ensaio foi de 15 mL, e em seguida foram esterilizados em autoclave por 15 minutos à temperatura de 120°C e pressão de 1,5 atm (Autoclave Phoenix Luferco, 75 litros, horizontal, 220V).

4.5 AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos utilizados foram cisteína (cloridrato de L-cisteína anidra, P.A., $C_3H_7NO_2.HCl$, marca Synth), glutamato (ácido L-glutâmico, P.A., $C_5H_9NO_4$, marca Synth) e glicina (P.A., $C_2H_6NO_2$, marca Vetec).

4.6 ASSEPSIA DO MATERIAL E INOCULAÇÃO

No interior da câmara de fluxo laminar, antes do início da inoculação, as sementes passaram por um processo de assepsia que consistiu em: em solução de álcool 70% (v/v) durante 30 segundos para quebrar a tensão superficial do envoltório protetor; em seguida, o material foi imerso por 10 minutos em hipoclorito de sódio (NaClO) comercial, na proporção de 50% (v/v) com água destilada, obtendo a concentração final de 1% de cloro ativo. O hipoclorito foi retirado do recipiente, e por fim, as sementes foram submersas em água destilada e autoclavada por três vezes para a máxima remoção de possíveis resíduos de do agente desinfestante.

Em câmara de fluxo laminar e utilizando pinça estéril, foram inoculadas duas sementes em cada tubo de ensaio, totalizando 160 sementes por ensaio.

4.7 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Todos os experimentos foram mantidos no LAFICC, em uma estante de fotoperíodo de 16/8 (horas de luz/escuro), com irradiância de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, proveniente de lâmpadas fluorescentes e em temperatura média de 27°C.

4.8 ANÁLISES DO CULTIVO *IN VITRO*

Durante o experimento parâmetros fenotípicos como índice de velocidade de germinação, porcentagem de germinação, altura da plântula, peso fresco e número de folhas foram utilizados para mensurar o crescimento *In vitro* da *B. rapa*.

4.8.1 Índice de Velocidade de Germinação (IVG)

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi obtido mediante análises da protrusão radicular (germinação), durante o período de sete dias após a inoculação, para todos os tratamentos. Tal procedimento tem o objetivo de estabelecer as diferenças na velocidade de germinação de acessos, grupos ou lotes de sementes, e é calculado por meio da aplicação da fórmula de Maguire (1962) descrita abaixo:

$$\text{IVG: } (G1/N1 + G2/N2 + G3/N3 + \dots + Gn/Nn)$$

Onde:

- IVG: índice de velocidade de germinação;
- G1, G2, G3, ..., Gn: número de sementes germinadas contadas na primeira, segunda, terceira e última enésima contagem;
- N1, N2, N3, ..., Nn: número de dias decorridos, da inoculação até o último dia de avaliação;

4.9 CÁDMIO E DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE *BRASSICA RAPA*

O experimento com variação nas concentrações de cádmio e aminoácidos foi realizado com o intuito de observar a influência do elemento contaminante e de sua interação com glutamato, cisteína e glicina sobre o desenvolvimento da planta.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância e quando houve diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos, as médias foram avaliadas por testes de médias (teste T, Tukey e Scott-Knott) utilizando o software SISVAR[®] (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PROCESSO GERMINATIVO SOB INFLUÊNCIA DE CÁDMIO E AMINOÁCIDOS

A toxicidade do cádmio em diferentes concentrações e sua interação com os aminoácidos foi inicialmente observada pelos ensaios de porcentagem de germinação e IVG. Com esses dados, foi possível observar a influência do metal, dos aminoácidos e sua interação em diferentes períodos (1 – 7 dias de cultivo).

5.2 CÁDMIO *VERSUS* GLUTAMATO

5.2.1 Índice de Velocidade de Germinação

Os IVGs dos diferentes tratamentos com cádmio e glutamato (Glu) variaram de 19 (mínimo) a 35 (máximo), sendo este último pertencente ao tratamento T3, (100 ppm de Cd e 50 ppm de Glu). Foi observado que grandes concentrações de Cd não influenciaram negativamente o IVG, já que os valores do índice eram maiores em concentrações de 100 ppm deste elemento do que em 50 ppm (**Tabela 1**).

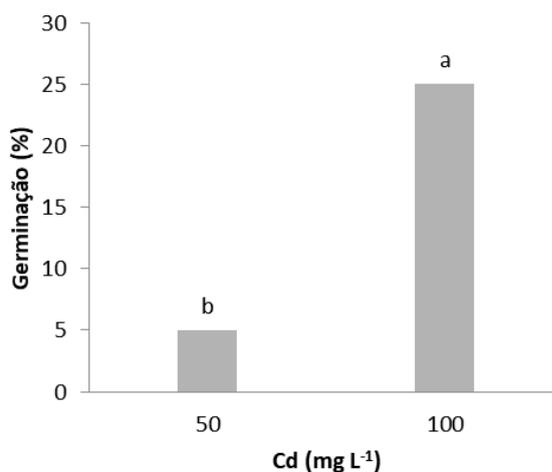
Tabela 1. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Brassica rapa* L. submetidas a diferentes concentrações de Cd e Glu, em seus respectivos tratamentos.

Tratamento	Cd (ppm)	Glu (ppm)	IVG
T0	50	0	26
T1	100	0	21
T2	50	50	19
T3	100	50	35
T4	50	100	22
T5	100	100	27
T6	50	200	22
T7	100	200	24

Em plantas do gênero *Brassica* fora observado incremento no conteúdo de clorofila e, aumento ou manutenção, da biomassa padrão (XIONG; WANG, 2005). O Glu está envolvido na assimilação e transporte de nitrogênio dentro das plantas, seja ele diretamente ou atuando na síntese de compostos que servem como doadores de nitrogênio. O Glu também tem atividade elucidada no acúmulo de reservas, durante períodos de pouca disponibilidade de nitrogênio, para um possível uso em processos de crescimento, defesa e reprodução (ZHU *et al.*, 2018).

Para o primeiro dia de avaliação, apenas a fonte de variação cádmio apresentou efeito significativo ($p=0,0126$) com relação a germinação. Sementes expostas na concentração de 100 ppm de cádmio germinaram mais rápido (**Figura 5**).

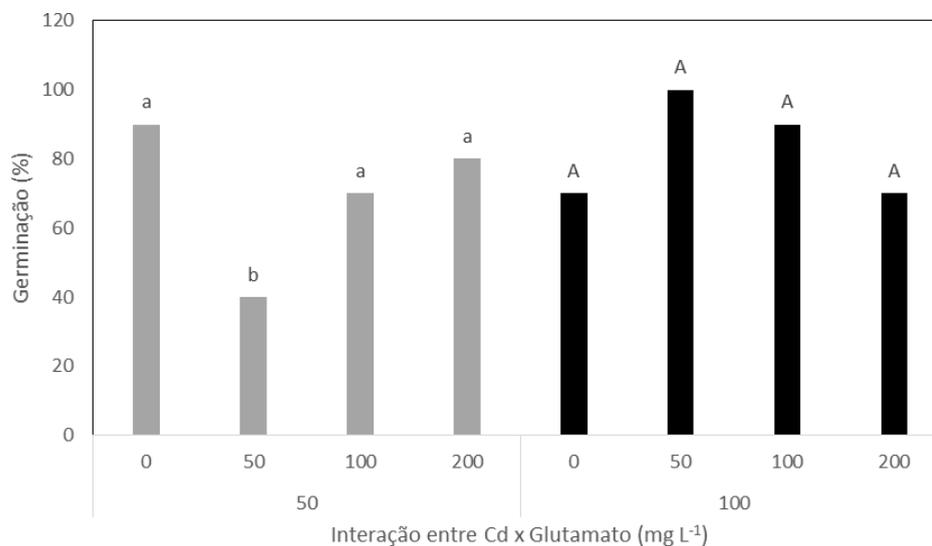
Figura 5. Teste de T para fonte de variação cádmio no dia 1. Fonte: autor.



Em plantas consideradas hiperacumuladoras, geralmente não é notado redução em sua taxa de germinação mesmo em altas concentrações de cádmio, e na verdade, apresentam taxas mais elevadas de crescimento em maiores níveis deste elemento (SUN; ZHOU; DIAO, 2008).

Por outro lado, no segundo dia de avaliação foi observado que houve uma interação significativa entre cádmio e Glu ($p=0,0130$). Foi possível identificar efeito significativo em um dos dois desdobramentos das concentrações de Glu dentro de cada nível de cádmio, onde a menor porcentagem de germinação ocorreu na presença de 50 ppm de cádmio e Glu. Para os tratamentos com 100 ppm de cádmio não houve diferenças significativas (**Figura 6**).

Figura 6. Teste de Scott-Knott para o desdobramento de Glutamato em cada nível de cádmio no dia 2. Médias seguidas pela mesma letra, para as concentrações de glutamato dentro de cada concentração de cádmio, não diferem entre si. Fonte: autor.



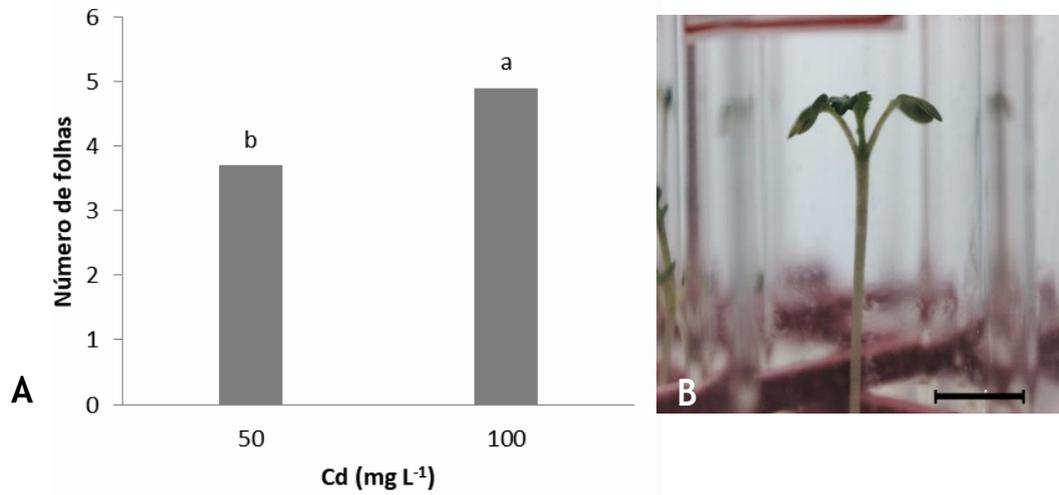
A correlação positiva entre aminoácidos e cádmio já foi registrada recentemente, em plantas da família Asteraceae (antiga Compositae). A exposição das espécies ao metal pesado resultou em uma resposta diferencial e coordenada, dos níveis de aminoácidos, que mostraram estar desempenhando um papel significativo na adaptação da planta a esse estresse. Entre os principais aminoácidos, estava o Glu. Nesse experimento, foi possível observar um maior acúmulo de Glu em plantas expostas à maiores níveis de cádmio (ZHU *et al.*, 2018).

Também em um ensaio com inserção de diferentes aminoácidos com objetivo de auxiliar a fitorremediação, a comparação das diferenças nas quantidades médias de metais pesados acumulados no final de experimentos indicou o efeito positivo de aplicações Glu no acúmulo de Cu, Pb e Zn por *Paulownia tomentosa* (DOUMETT *et al.*, 2010).

5.2.2 Número de Folhas e Peso Fresco

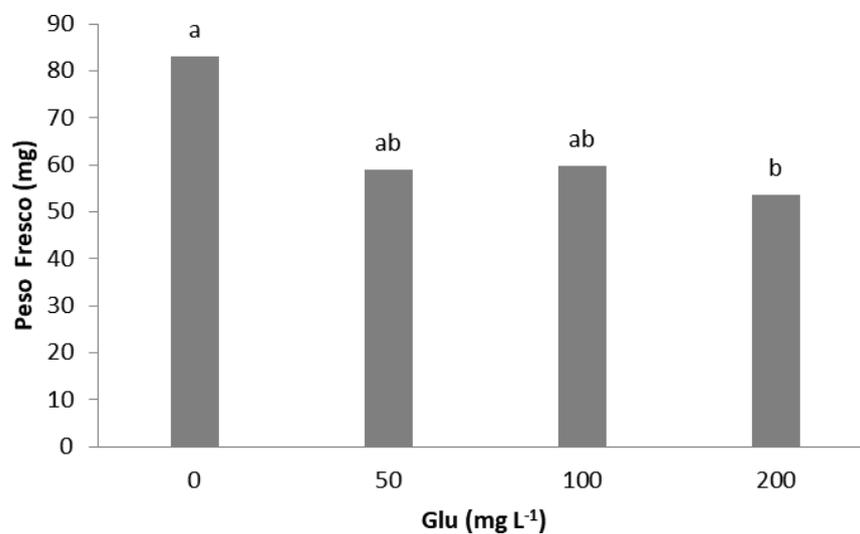
O número de folhas foi um parâmetro significativo ($p=0,0001$) para a fonte de variação cádmio, apresentando um valor médio de quatro. Neste estudo, a influência do metal mostrou ser positiva para um maior número de folhas (**Figura 7**).

Figura 7. Teste de T para a fonte de variação cádmio influenciando o número de folhas de *Brassica rapa* L (A), seguido de uma imagem ilustrativa de plantas da espécie em concentração de 50 ppm do metal (B). Barra: 1 cm. Fonte: Autor.



O aminoácido por sua vez, influenciou significativamente ($p=0,0130$) o peso fresco das plântulas, especialmente em concentrações de 200 ppm (**Figura 8**), que obteve a menor média de todos os tratamentos. Sua ausência, como é demonstrada neste ensaio, influencia o aumento do peso fresco das plantas.

Figura8. Teste de Tukey para a fonte de variação Glutamato influenciando o peso fresco de *Brassicarapa* L. Fonte: autor.



A folha é um dos principais elementos de um organismo vegetal. Seu número e aparência são afetados por fatores ambientais como temperatura, fotoperíodo, radiação, estresse hídrico e composição do solução nutritiva (CHO; SUN, 2007).

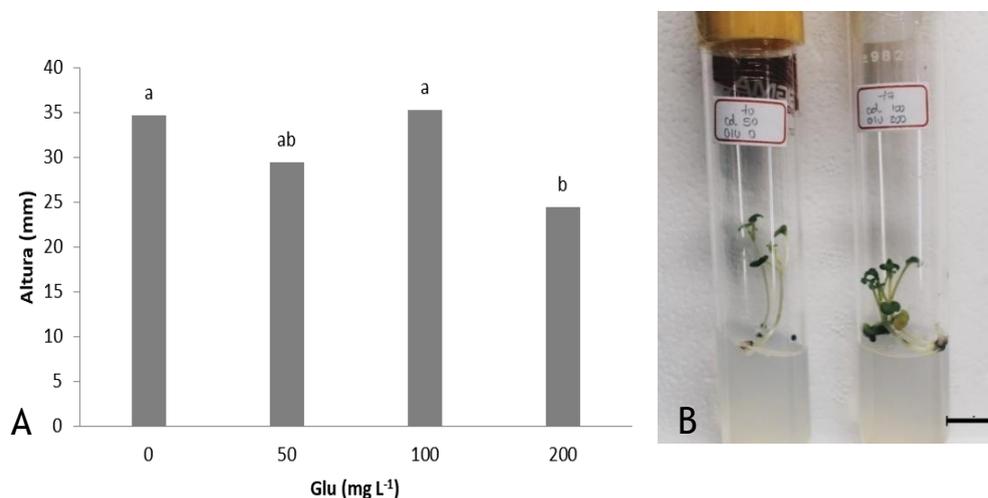
Um recente estudo de expressão gênica em resposta à exposição ao cádmio em espécies de milho (*Zea mays*) localizou genes que ativam mecanismos de defesas vegetais. Entre eles estão ATPases que controlam o movimento de íons através da membrana vacuolar, além de genes que contribuem de alguma forma para diminuir a peroxidação lipídica, diminuindo o estresse nas plantas e aumentando possivelmente a tolerância ao cádmio. Tais genes foram encontrados principalmente em raízes, caules e folhas em resposta ao estresse do metal pesado (ZHAO *et al.*, 2018).

Como já citado anteriormente, é sabido que o mecanismo de acumulação de metais na biomassa das espécies é bastante utilizado para as plantas hiperacumuladoras como estratégia de sobrevivência em ambientes contaminados (BIAN *et al.*, 2018). A presença de cádmio no meio influenciou para obter os resultados com maiores medidas. Também fora observado que a junção de cádmio e aminoácidos no meio diminui a resposta de acumulação de biomassa, e pode ser um parâmetro de futuros estudos.

5.2.3 Altura

A altura das plântulas de *B. rapa* foi influenciada diretamente pela fonte de variação Glu ($p=0,0077$), e sua ausência ou presença no meio. Embora a ausência do aminoácido tenha influenciado as espécimes a alcançar significativas alturas, a maior estatura foi em concentração de 100 ppm. Em contrapartida, altas concentrações do aminoácido (200 ppm) revelaram efeitos negativos, diminuindo a estatura das plântulas quando comparada a concentrações menores (**Figura 9**).

Figura 9. Teste de Tukey para a fonte de variação Glutamato influenciando a altura de *Brassica rapa* L (A), seguido de uma imagem ilustrativa de plantas da espécie em concentração de 0 ppm e 200 ppm do aminoácido, respectivamente (B). Barra: 1 cm. Fonte: Autor.



5.3 CÁDMIO VERSUS GLICINA

5.3.1 Índice de Velocidade de Germinação

O IVG dos tratamentos com Glicina (Gly) variaram de seis (mínimo) a 17, sendo este, o valor máximo dos ensaios, correspondente ao tratamento com 100 ppm de Gly e cádmio. De maneira geral, o IVG diminuiu quando a concentração de cádmio era mais baixa (50 ppm) e aumenta nas concentrações de 100 ppm (**Tabela 2**).

Tabela 2. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Brassica rapa* L. submetidas a diferentes concentrações de Cd e Gly, em seus respectivos tratamentos.

Tratamento	Cd ²⁺ (ppm)	Gly (ppm)	IVG
T0	50	0	9
T1	100	0	13
T2	50	50	8
T3	100	50	12
T4	50	100	10
T5	100	100	17
T6	50	200	6
T7	100	200	13

Nos dias 1, 4, 5, 6 e 7, não houve resultado significativo para fontes de variação cádmio ou Gly, bem como para a interação entre os dois (**Figura 11**). Entretanto, a fonte de variação cádmio foi significativa no dia 2 ($p=0,00220$) e no dia 3 ($p=0,0080$), com elevadas porcentagens de germinação na mais alta concentração de deste elemento (**Figura 10**).

Figura 10. Germinação de sementes de *Brassica rapa* L., quando submetidas a diferentes concentrações de cádmio. Teste de T para fonte de variação do elemento nos dias 2 (A) e 3 (B), respectivamente. Fonte: autor.

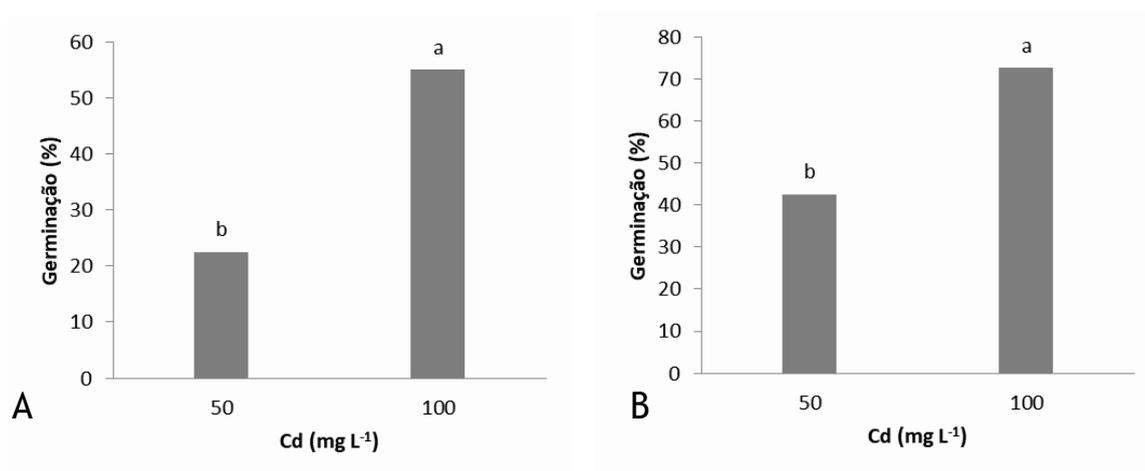


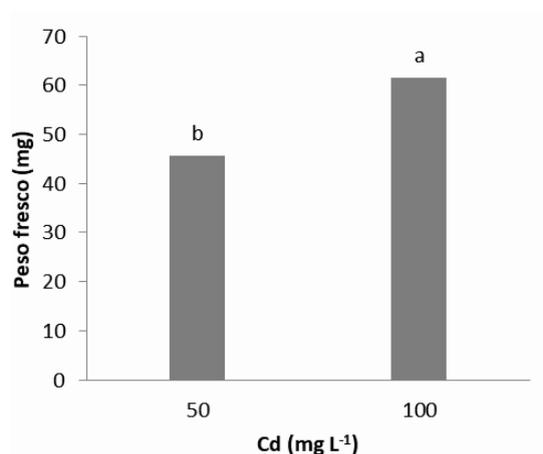
Figura 11. Acompanhamento das fases de Germinação de um *Brassica rapa* L. durante 4 dias consecutivos, em meio com Cd e Gly. Fonte: Autoral.



5.3.2 Número de Folhas e Peso Fresco

O número de folhas analisado nos tratamentos com Cd e Gly não foram estatisticamente significativo entre os tratamentos com média geral de quatro folhas. Por outro lado, o peso fresco apresentou resultados significativos ($p=0,0194$) na comparação entre as concentrações de cádmio elemento em concentrações elevadas (100 ppm) influencia positivamente para o aumento da massa fresca total da plântula (**Figura 12**).

Figura 12. Teste de T para peso fresco das espécimes de *Brassica rapa* L. em diferentes concentrações de cádmio. Fonte: autor.



Já foi observado que sob influência de cádmio, atividades de enzimas antioxidantes, superóxido dismutase, peroxidase e catalase aumentaram até um certo nível na parte aérea das plântulas (AFZAL *et al.*, 2018). Essas enzimas são responsáveis por trabalhar em conjunto para diminuir as EROs produzidas e desintoxicar as células, principalmente em situação de estresse abiótico para recuperar a homeostase celular (ROSSI; COSTA, 2012). A alta concentração de cádmio pode ter influenciado para que a viabilidade celular aumentasse em resposta ao estresse, desenvolvendo assim a atividade e multiplicação celular, que é refletida em seus caracteres fenotípicos.

Em culturas de tomate (*Solanum lycopersicum*), o rendimento das plantas não foi afetado pelo estresse de cádmio, que foi capaz de melhorar o tamanho e o peso dos frutos na cultivar tolerante (CARVALHO *et al.*, 2018).

5.3.3 Altura

A altura das plântulas de *B. rapa* foi influenciada pela interação entre cádmio e Gly, especialmente em 100 ppm do elemento. Esse resultado corrobora trabalhos anteriores onde foi demonstrado que o metal pesado influencia na altura média das plantas, mesmo quando em quantidades elevadas no meio (Figura 13) (BRAGA, 2018). Concentrações maiores que 0 ppm do aminoácido também influenciaram positivamente para que as plântulas apresentassem maiores alturas. Embora esse efeito não seja progressivo, ainda assim é evidenciado sua relevância quando comparado à ausência de Gly (Tabela 3).

Tabela 3. Altura (mm) das plântulas de *Brassica rapa* L. em diferentes concentrações de cádmio e Gly.

Altura (mm)		
Gly (ppm)	Cd (ppm)	
	50	100
0	25 aA	45 aB
50	47 bA	40 aA
100	38 bA	42 aA
200	37 bA	44 aA

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na coluna e minúscula na linha, de acordo com o teste de Scott Knott.

Figura 13. Plântula de *Brassica rapa* L. em meio com 50 ppm de Cd, de altura média de 25 mm. Barra: 1cm. Fonte: Autoral.



No caso do estresse por metal pesado o mecanismo de tolerância mais importante conhecido pela comunidade acadêmica é a complexação celular por meio de fitoquelatinas (GUIMARÃES, 2008). Como a síntese dessas moléculas depende da glutatona, a presença de íons de metais pesados que se ligam à glutatona faz com que a produção seja mais acentuada. Portanto, a quantidade de fitoquelatina aumenta quando a célula precisa sobreviver em um ambiente com altas concentrações de metais pesados (VATAMANIUK *et al.*, 2000).

5.4 CÁDMIO *VERSUS* CISTEÍNA

5.4.1 Caracteres fenotípicos

Devido à perda de tubos durante a realização dos experimentos, por contaminação ou falta de desenvolvimento das plantas, as repetições não possuíam replicatas suficientes para a análise de características como peso fresco, altura e número de folhas de todos os tratamentos de forma padronizada (**Figura 14**). Por este motivo a análise de cisteína foi feita apenas por avaliação de germinação.

Figura 14. Tratamentos T0 a T7, em ordem crescente da esquerda para direita, com plântulas de *Brassica rapa* L. nos sete tratamentos do design experimental, e variações de desenvolvimento. Barra: 1 cm. Fonte:



Autoral.

5.4.2 Índice de Velocidade de Germinação

A cisteína (Cys), em todos os tratamentos observados, apresentou resultados muito menos significativos em IVG do que os outros aminoácidos. Os valores variaram de zero (mínimo) a 11 (máximo). O valor mais alto de IVG foi obtido no tratamento com 200 ppm de Cys e 50 ppm de cádmio. Além disso, ao se analisar a interação entre cádmio e Cys, esta pareceu inibir a germinação (T3), mesmo a concentração de Cys sendo de 100 ppm (**Tabela 4**).

Tabela 4. Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Brassica rapa* L. submetidas a diferentes concentrações de cádmio e Cys, em seus respectivos tratamentos.

Tratamento	Cd (ppm)	Cys (ppm)	IVG
T0	50	0	1
T1	100	0	10
T2	50	50	5
T3	100	50	1
T4	50	100	5
T5	100	100	1
T6	50	200	11
T7	100	200	0

Quando analisado a influência de cádmio e Cys nos dias 1 e 2 não houve resultado significativo para nenhum dos parâmetros analisados. Entretanto, a interação entre os dois elementos foi significativa, para o dia 3 ($p < 0,0001$), dia 4 ($p < 0,0001$), dia 5 ($p = 0,0001$), dia 6 ($p < 0,0001$) e 7 ($p < 0,0001$). O desdobramento da análise entre Cys e cádmio mostrou resultados significativos para ambas situações: cádmio dentro de Cys e Cys dentro de cádmio (Tabela 5).

Plantas transgênicas, por exemplo, que contém mais cisteína sintase (*O*-acetil-l-serina-tiol-liase) são significativamente mais tolerantes que as do tipo selvagem em meio ágar contendo Cd, Se e Ni, podendo aumentar o acúmulo de Cd na parte aérea, sugerindo que sejam aplicáveis à fitorremediação deste elemento em solos contaminados (KAWASHIMA *et al.*, 2004).

A Cys também é um dos elementos fundamentais das fitoquelatinas, e os genes de síntese dessas moléculas também desempenham um papel crucial na sinalização, absorção, desintoxicação e acumulação do metal (CHAUDHARY; AGARWAL; KHAN, 2018).

Tabela 5. Porcentagem de germinação nos desdobramentos em entre os níveis de cádmio e de Cys em diferentes dias de cultivo.

Germinação em %			
		Cd (ppm)	
	Cys (ppm)	50	100
Dia 3	0	0 bB	40 aA
	50	30 bA	0 bA
	100	20 bA	0 bA
	200	70 aA	0 bB
Dia 4	0	0 bB	50 aA
	50	30 bB	10 bB
	100	20 bB	0 bB
	200	80 aA	0 bB
Dia 5	0	20 bB	60 aB
	50	40 bB	10 bB
	100	20 bB	10 bB
	200	20 aA	0 bA
Dia 6	0	20 bB	80 aB
	50	50 bB	10 bB
	100	40 bB	10 bB
	200	80 aA	0 bA
Dia 7	0	20 bB	90 aA
	50	60 aA	30 bB
	100	50 aA	30 bB
	200	80 aA	10 bB

*Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, maiúscula na linha e minúscula na coluna, de acordo com o teste de Scott-Knott.

6 CONCLUSÃO

A presença do metal nos tratamentos com glicina por exemplo, influenciou o aumento do peso fresco das plântulas, e no tratamento com glutamato, no número de folhas e IVG foram aumentados.

A interação com os aminoácidos se mostrou vantajosa até certo ponto. A associação do cádmio com o glutamato influenciou positivamente o aumento do IVG e número de folhas. Por outro lado, o glutamato isoladamente influenciou negativamente o peso fresco e a altura das plântulas.

Entre os três aminoácidos testados, a cisteína foi a que proporcionou os piores IVGs entre os mesmos tratamentos.

De maneira geral, a utilização de *Brassica rapa* L. para fins de fitorremediação mostrou-se promissora, já que elevadas concentrações de cádmio, um dos principais metais pesados contaminantes do ambiente, não inibiu o crescimento ou desenvolvimento das mesmas, e até estimulou em certos casos.

Conclui-se que a incorporação de glutamato como adjuvante para a fitorremediação com *B. rapa* pode ser uma alternativa promissora para as técnicas de recuperação de solos. A micropropagação de tecidos vegetais da espécie submetida ao meio acrescido com o aminoácido, por exemplo, é uma possibilidade de difundir espécimes com os atributos positivos adquiridos da fonte exógena.

REFERÊNCIAS

- AFZAL, J. *et al.* Cadmium tolerance in rice cultivars associated with antioxidant enzymes activities and Fe/Zn concentrations. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-12, 2018.
- AHMAD, Javed *et al.* Role of Phytochelatin in Cadmium Stress Tolerance in Plants. In: **Cadmium Toxicity and Tolerance in Plants**. Academic Press, 2019. p. 185- 212.
- ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE *et al.* Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 408, n. 6814, p. 796, 2000.
- ASHRAF, M. F. M. R.; FOOLAD, MRv. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and experimental botany**, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.
- BAE, Weon *et al.* Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelatin. **Biotechnology and bioengineering**, v. 70, n. 5, p. 518-524, 2000.
- BEZERRA, Luanna Pinheiro. **Uso de glicina e mio-inositol para minimizar os efeitos citotóxicos do cádmio no cultivo *In vitro* de *Brassica rapa*. L. 2017. TCC (Graduação em Biotecnologia) - UFPB, João Pessoa, Paraíba, 2017.**
- BIAN, Fangyuan *et al.* Comparison of heavy metal phytoremediation in monoculture and intercropping systems of *Phyllostachys praecox* and *Sedum plumbizincicola* in polluted soil. **International journal of phytoremediation**, v. 20, n. 5, p. 490-498, 2018.
- BRAGA, João Gabriel Silveira. **Estudos *In vitro* do efeito da aplicação exógena de glicina para atenuar o estresse provocado por cádmio em plantas**. 2018. Projeto de Iniciação Científica (Graduação em Biotecnologia) - UFPB, João Pessoa, Paraíba, 2018.
- BURZYŃSKI, Marek; BUCZEK, Józef. Uptake and assimilation of ammonium ions by cucumber seedlings from solutions with different pH and addition of heavy metals. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 67, n. 2, p. 197-200, 1998.

- CAMARGO, O. A.; ALLEONI, L. R. F. & CASAGRANDE, J. C. Reações dos micronutrientes e elementos tóxicos no solo. In: Ferreira, M. E.; Cruz, M. C. P.; Raij, B. & Abreu, C. A. **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal: Legis Summa, 2001. p. 89-124.
- CAMPBELL, Colin. The puzzle of modern consumerism. **The Romantic Ethic and the Spirit of Modern Consumerism**. Palgrave Macmillan, Cham, 2018. p. 77-105.
- CARVALHO, Marcia EA *et al.* New insights about cadmium impacts on tomato: plant acclimation, nutritional changes, fruit quality and yield. **Food and Energy Security**, v. 7, n. 2, p. e00131, 2018.
- CHAUHAN, Priti; MATHUR, Jyoti. Potential of *Helianthus annuus* for phytoremediation of multiple pollutants in the environment: A Review. **Journal of Biological Sciences and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 5-16, 2018.
- CHAUDHARY, Khushboo; AGARWAL, Swati; KHAN, Suphiya. Role of Phytochelatins (PCs), Metallothioneins (MTs), and Heavy Metal ATPase (HMA) Genes in Heavy Metal Tolerance. **Mycoremediation and Environmental Sustainability**. Springer, Cham, 2018. p. 39-60.
- CHO, Young Yeol; SON, Jung Eek. Estimation of leaf number and leaf area of hydroponic pak-choi plants (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) using growing degree-days. **Journal of Plant Biology**, v. 50, n. 1, p. 8, 2007.
- CLAYTON, Tony; RADCLIFFE, Nicholas. **Sustainability: a systems approach**. Routledge, 2018.
- COSTA, N. C. *et al.* **Contaminantes do solo e o meio ambiente**. Fundamentos de Química do Solo. 2a ed. Porto Alegre: Gênese, 2004, p. 239-279.
- COUTINHO, Henrique; BARBOSA, Aline. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. **Silva Lusitana**, Lisboa, Portugal, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.mec.pt/pdf/sluc/v15n1/v15n1a08.pdf>. Acesso em: 23 mar. 2019.
- COUVREUR, Thomas LP *et al.* Molecular phylogenetics, temporal diversification, and principles of evolution in the mustard family (Brassicaceae). **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 1, p. 55-71, 2009.

- COWLEY, Michael *et al.* Effects of cadmium exposure on DNA methylation at imprinting control regions and genome-wide in mothers and newborn children. **Environmental health perspectives**, v. 126, n. 3, p. 037003, 2018.
- DOS SANTOS, Carlos Henrique *et al.* Potencial de fitoextração de Pb por mamoneiras em solo contaminado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, 2012.
- DOUMETT, S. *et al.* Influence of the application renewal of glutamate and tartrate on Cd, Cu, Pb and Zn distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa* in a pilot-scale assisted phytoremediation study. **International journal of phytoremediation**, v. 13, n. 1, p. 1-17, 2010.
- DOUMETT, S. *et al.* Heavy metal distribution between contaminated soil and *Paulownia tomentosa*, in a pilot-scale assisted phytoremediation study: influence of different complexing agents. **Chemosphere**, v. 72, n. 10, p. 1481-1490, 2008.
- EBBS, Stephen D.; KOCHIAN, Leon V. Toxicity of zinc and copper to *Brassica* species: implications for phytoremediation. **Journal of Environmental Quality**, v. 26, n. 3, p. 776-781, 1997.
- ESTEVEZ, Rogério Lopes *et al.* A cultura da canola (*Brassica napus* var. oleifera). **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2014.
- ESTRELA, Maria Alexandra; CHAVES, Lúcia Helena Garofalo; SILVA, Larissa Novais. Fitorremediação como solução para solos contaminados por metais pesados. **Revista Ceuma Perspectivas**, v. 31, n. 1, p. 160-172, 2018.
- EPA. (2000). Introduction of phytoremediation. EPA/600/ R-99/107. Recuperado em 5 Maio 2012, de <http://nepis.epa.gov>.
- EZE, Chibuzor Nwadibe *et al.* Chromium (III) and its effects on soil microbial activities and phytoremediation potentials of *Arachis hypogea* and *Vigna unguiculata*. **Nigerian Society for Microbiology 39th Annual Scientific Conference and General Meeting**, 2018.
- FAUSTINO, Lucemberg Sales. **Análise do crescimento *In vitro* e da anatomia caulinar de *Brassica rapa* L. mediante concentrações de cádmio**. 2016. TCC (Graduação em Biotecnologia) - UFPB, João Pessoa, Paraíba, 2016.

- FORDE, Brian G.; LEA, Peter J. Glutamate in plants: metabolism, regulation, and signalling. **Journal of experimental botany**, v. 58, n. 9, p. 2339-2358, 2007.
- GIRIJA, C.; SMITH, B. N.; SWAMY, P. M. Interactive effects of sodium chloride and calcium chloride on the accumulation of proline and glycinebetaine in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, n. 1, p. 1-10, 2002.
- GÓMEZ-CAMPO, César *et al.* Morphology and morpho-taxonomy of the tribe Brassiceae. **Morphology and morpho-taxonomy of the tribe Brassiceae.**, p. 3-31, 1980.
- GONDIM, A. **Catálogo Brasileiro de Hortaliças: saiba como plantar e aproveitar 50 das espécies mais comercializadas no país.** Embrapa Hortaliças: SEBRAE, 2010.
- GONZAGA, M. I. S.; Santos, J. A. G.; Ma, L. Q. **Extração de arsênio do solo por samambaias do gênero Pteris.** Magistra, Cruz das Almas-BA, v. 20, n. 3, p. 291-300, jul./set., 2008.
- GRUDKOWSKA, Małgorzata; ZAGDANSKA, Barbara. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. **ACTA BIOCHIMICA POLONICA-ENGLISH EDITION**, p. 609-624, 2004.
- GUIMARÃES, Marcelo de A. *et al.* Toxicidade e tolerância ao cádmio em plantas. **Revista Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 2, p. 58-68, 2008.
- GUPTA, Amit K.; SINHA, Sarita. Assessment of single extraction methods for the prediction of bioavailability of metals to *Brassica juncea* L. Czern. (var. Vaibhav) grown on tannery waste contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 1, p. 144-150, 2007.
- HAYASHI, TAKASHI. Effects of sodium glutamate on the nervous system. **The Keio Journal of Medicine**, v. 3, n. 4, p. 183-192, 1954.
- HIMENO, Seiichiro; AOSHIMA, Keiko. **Cadmium Toxicity: New Aspects in Human Disease, Rice Contamination, and Cytotoxicity.** Springer, 190 p., 2019.
- IVES, Christopher D. *et al.* Reconnecting with nature for sustainability. **Sustainability science**, v. 13, n. 5, p. 1389-1397, 2018.

- KAWASHIMA, Cintia Goulart *et al.* Heavy metal tolerance of transgenic tobacco plants over-expressing cysteine synthase. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 2, p. 153-157, 2004.
- KOŠNÁŘ, Zdeněk; MERCL, Filip; TLUSTOŠ, Pavel. Ability of natural attenuation and phytoremediation using maize (*Zea mays* L.) to decrease soil contents of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derived from biomass fly ash in comparison with PAHs-spiked soil. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 153, p. 16-22, 2018.
- KOTRBA, Pavel *et al.* Genetically modified plants in phytoremediation of heavy metal and metalloid soil and sediment pollution. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 6, p. 799-810, 2009.
- KREDICH, Nicholas M. Biosynthesis of cysteine. **EcoSal Plus**, v. 3, n. 1, 2008.
- LOMBI, E. *et al.* Cadmium accumulation in populations of *Thlaspi caerulescens* and *Thlaspi goesingense*. **New Phytologist**, v. 145, n. 1, p. 11-20, 2000.
- MACEK, T.; MACKOVA, M.; KÁŠ, J. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. **Biotechnology advances**, v. 18, n. 1, p. 23-34, 2000.
- MAHAR, Amanullah *et al.* Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: a review. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 126, p. 111-121, 2016.
- MARET, Wolfgang; MOULIS, Jean-Marc. The bioinorganic chemistry of cadmium in the context of its toxicity. In: **Cadmium: From toxicity to essentiality**. Springer, Dordrecht, 2013. p. 1-29.
- MATYSIK, Jörg *et al.* Molecular mechanisms of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plants. **Current Science**, p. 525-532, 2002.
- MCINTYRE, Terry. Phytoremediation of heavy metals from soils. **Phytoremediation**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2003. p. 97-123.
- MELENDEZ, L. B. *et al.* Determinação de metalotioneínas e fitoquelatinas utilizando a técnica de HPLC-ICP-MS. **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 612-622, 2012.

- MIFLIN, Ben J.; HABASH, Dimah Z. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. **Journal of experimental botany**, v. 53, n. 370, p. 979-987, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de identificação de áreas com populações expostas a solo contaminado**. Brasília-DF, 2007. 17p.
- MOURATO, Miguel *et al.* Effect of heavy metals in plants of the genus *Brassica*. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 8, p. 17975-17998, 2015.
- NELSON, David L.; COX, Michael M. **Lehninger Principles of Biochemistry** 4ed. [S.l.]: W.H. Freeman, 2004.
- PAVLÍKOVÁ, Daniela *et al.* Glutamate kinase as a potential biomarker of heavy metal stress in plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 70, n. 2, p. 223-230, 2008.
- PÉREZ-ESTEBAN, J.; Escolástico, C.; Moliner, A.; Masaguer, A.; Fernández, J.R. Phytostabilization of metals in mine soils using *Brassica juncea* in combination with organic amendments. **Plant Soil** 2013, 377, 97.
- PÉREZ-ESTEBAN, Javier *et al.* Phytostabilization of metals in mine soils using *Brassica juncea* in combination with organic amendments. **Plant and Soil**, [S. l.], 2014.
- PETERSON, P. J. Unusual accumulations of elements by plants and animals. **Science Progress (1933-)**, p. 505-526, 1971.
- RAKOW, G. Species origin and economic importance of *Brassica*. **Brassica**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2004. p. 3-11.
- ROCHA, Adriano. **Cádmio, Chumbo, Mercúrio – A problemática destes metais pesados na Saúde Pública?**. 2009. TCC (Ciências da Nutrição) - FCNAUP, Porto, 2009.
- RODRÍGUEZ, Nuria *et al.* Heavy metal content in *Erica andevalensis*: an endemic plant from the extreme acidic environment of Tinto River and its soils. **Arid Land Research and Management**, v. 21, n. 1, p. 51-65, 2007.

- ROSSI, M. F.; COSTA, MARGARETE DE FÁTIMA. Mecanismo antioxidante em plantas. **10º mostra acadêmica UNIMEP. 10º**, 2012.
- RUSANOV, A. L. *et al.* Effects of cadmium chloride on the functional state of human intestinal cells. **Toxicology In vitro**, v. 29, n. 5, p. 1006-1011, 2015.
- SECRETARIA DA EDUCAÇÃO DO PARANÁ - Cadmo. Paraná, [2019]. Disponível em: <http://www.filosofia.seed.pr.gov.br/> Acesso em: 31 mar. 2019.
- SHAHEEN, Sabry M.; RINKLEBE, Jörg. Phytoextraction of potentially toxic elements by Indian mustard, rapeseed, and sunflower from a contaminated riparian soil. **Environmental geochemistry and health**, v. 37, n. 6, p. 953-967, 2015.
- SHARMA, Shanti S.; DIETZ, Karl-Josef. The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 4, p. 711-726, 2006.
- SILVA, T. J *et al.* Fitorremediação de Solos Contaminados com Metais: Panorama Atual e Perspectivas de uso de Espécies Florestais. **Rev. Virtual Quim.**, Londrina, 2019.
- SILVA, Maria; VITTI, Godofredo; TREVIZAM, Anderson. Concentração de metais pesados em grãos de plantas cultivadas em solo com diferentes níveis de contaminação. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 2007.
- SOUZA, V.C. 2015. Brassicaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB117486>. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*, v.66, n.4, p.1085-1113. 2015. (DOI: 10.1590/2175-7860201566411)
- SU, Dechun; JIANG, Rongfeng; LI, Huafen. The Potential of Oilseed Rape and *Thlaspi caerulescens* for Phytoremediation of Cadmium-Contaminated Soil. In: **Twenty Years of Research and Development on Soil Pollution and Remediation in China**. Springer, Singapore, 2018. p. 349-363.
- SUN, Yuebing; ZHOU, Qixing; DIAO, Chunyan. Effects of cadmium and arsenic on growth and metal accumulation of Cd-hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1103-1110, 2008.

- SUZUKI, Akira; KNAFF, David B. Glutamate synthase: structural, mechanistic and regulatory properties, and role in the amino acid metabolism. **Photosynthesis research**, v. 83, n. 2, p. 191-217, 2005.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6. ed.: Artmed, 2017. 888 p.
- TEMPLE, Stephen J.; VANCE, Carroll P.; GANTT, J. Stephen. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. **Trends in plant science**, v. 3, n. 2, p. 51-56, 1998.
- TCHOUNWOU, Paul B. *et al.* Heavy metal toxicity and the environment. In: **Molecular, clinical and environmental toxicology**. Springer, Basel, 2012. p. 133-164.
- TOYOTA, Masatsugu *et al.* Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. **Science**, v. 361, n. 6407, p. 1112-1115, 2018.
- TSUNODA, S. *et al.* Eco-physiology of wild and cultivated forms in *Brassica* and allied genera. **Brassica crops and wild allies.[I]**, p. 109-120, 1980.
- VASCONCELLOS, M. C.; Pagliuso, D.; Sotomaior, V. S. Fitorremediação: Uma proposta de descontaminação do solo. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade** 2012, 83, 261.
- VATAMANIUK, Olena K. *et al.* Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31451-31459, 2000.
- WASZCZAK, Cezary *et al.* Oxidative post-translational modifications of cysteine residues in plant signal transduction. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 10, p. 2923-2934, 2015.
- XIONG, Zhi-Ting; WANG, Hai. Copper toxicity and bioaccumulation in Chinese cabbage (*Brassica pekinensis* Rupr.). **Environmental Toxicology: An International Journal**, v. 20, n. 2, p. 188-194, 2005.
- XUE, Shengguo *et al.* Cadmium, lead, and arsenic contamination in paddy soils of a mining area and their exposure effects on human HEPG2 and keratinocyte cell-lines. **Environmental research**, v. 156, p. 23-30, 2017.

YAN, S. U. N. *et al.* Root cell wall and phytochelatin in low-cadmium cultivar of *Brassica parachinensis*. **Pedosphere**, 2017.

ZHANG, Fan; WAN, Xueqin; ZHONG, Yu. Nitrogen as an important detoxification factor to cadmium stress in poplar plants. **Journal of plant interactions**, v. 9, n. 1, p. 249-258, 2014.

ZHAO, Xiongwei *et al.* Genome-wide association analysis and QTL mapping reveal the genetic control of cadmium accumulation in maize leaf. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 91, 2018.

ZHU, Guangxu *et al.* Effects of cadmium stress on growth and amino acid metabolism in two compositae plants. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 158, p. 300-308, 2018.